

## 通络止痛胶囊中4种成分测定及HPLC指纹图谱建立

周和, 谭翔匀, 冯华, 王奥\*  
(遵义市产品质量检验检测院, 贵州遵义 563002)

**摘要:** 目的 测定通络止痛胶囊(虎杖、当归、独活等)中4种成分的含有量,并建立HPLC指纹图谱。方法 该药物甲醇提取液的分析采用Waters XSelect C<sub>18</sub>色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm);流动相甲醇-0.5%磷酸,梯度洗脱;体积流量1.0 mL/min;柱温25℃;检测波长330 nm。以虎杖苷为内标,计算其他3种成分的相对校正因子,一测多评法测定含有量。结果 虎杖苷、阿魏酸、蛇床子素、二氢欧山芹醇当归酸酯分别在16.61~332.16、1.07~21.42、15.66~313.15、24.91~498.21 μg/mL范围内线性关系良好( $r>0.999\ 0$ ),平均加样回收率分别为100.01%、99.47%、99.63%、99.06%,RSD分别为0.42%、1.85%、0.54%、0.87%。一测多评法所得结果与外标法接近。10批样品指纹图谱中有21个共有峰,相似度大于0.950。结论 该方法简便高效,重复性好,可用于通络止痛胶囊的质量控制。

**关键词:** 通络止痛胶囊;虎杖苷;阿魏酸;蛇床子素;二氢欧山芹醇当归酸酯;HPLC指纹图谱;一测多评

中图分类号: R927.2 文献标志码: A 文章编号: 1001-1528(2020)08-1996-07

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2020.08.007

## Determination of four constituents in Tongluo Zhitong Capsules and establishment of HPLC fingerprints

ZHOU He, TAN Xiang-yun, FENG Hua, WANG Ao\*  
(Zunyi Municipal Institute for Product Quality Inspection and Testing, Zunyi 563002, China)

**ABSTRACT:** **AIM** To determine the contents of four constituents in Tongluo Zhitong Capsules (*Polygoni cuspidati Rhizoma et Radix*, *Angelicae sinensis Radix*, *Angelicae pubescentis Radix*, etc.) and to establish the HPLC fingerprints. **METHODS** The analysis of methanol extract of this drug was performed on a 25 °C thermostatic Waters XSelect C<sub>18</sub> column (4.6 mm×250 mm, 5 μm), with the mobile phase comprising of methanol-0.5% phosphoric acid flowing at 1.0 mL/min in a gradient elution manner, and the detection wavelength was set at 330 nm. Polydatin was used as an internal standard to calculate the relative correction factors of the other three constituents, after which the content determination was made by quantitative analysis of multi-components by single-marker (QAMS). **RESULTS** Polydatin, ferulic acid, osthole, columbianadin showed good linear relationships within the ranges of 16.61 - 332.16, 1.07 - 21.42, 15.66 - 313.15, 24.91 - 498.21 μg/mL ( $r>0.999\ 0$ ), whose average recoveries were 100.01%, 99.47%, 99.63%, 99.06% with the RSDs of 0.42%, 1.85%, 0.54%, 0.87%, respectively. The results obtained by QAMS approximated those obtained by external standard method. There were twenty-one common peaks in the fingerprints of ten batches of samples with the similarities of more than 0.950. **CONCLUSION** This simple, efficient and reproducible method can be used for the quality control of Tongluo Zhitong Capsules.

**KEY WORDS:** Tongluo Zhitong Capsules; polydatin; ferulic acid; osthole; columbianadin; HPLC fingerprints; quantitative analysis of multi-components by single-marker (QAMS)

收稿日期: 2020-03-26

基金项目: 贵州省科技计划项目(黔科合平台人才[2018]5744);遵义市优秀青年科技创新人才培养项目(遵优青科[2018]4);遵义市创新人才团队培养项目(遵市科合[2016]7)

作者简介: 周和(1989—),男,硕士,主管药师,从事药品检验及新药研究。Tel: 15923321066, E-mail: 596328458@qq.com

\*通信作者: 王奥(1986—),男,博士,高级工程师,从事产品质量与安全风险分析研究。Tel: 18984242056, E-mail: zyjc018@163.com.

通络止痛胶囊由虎杖、当归、独活、威灵仙、全蝎、蕲蛇、杜仲等16味药材组成,方中虎杖利湿退黄、清热解毒、散瘀止痛;当归补血活血、调经止痛;独活祛风除湿、通痹止痛,配合其他药材可充分发挥该制剂搜风通络、活血止痛、祛风除湿的功效,主要用于骨痹、风湿痹血瘀阻络症所致肌肉麻木及关节、腰颈疼痛等症<sup>[1]</sup>。但该制剂药味多,成分复杂,传统的单一成分测定难以全面控制其质量,而且存在费时费力、成本高昂的缺点,以及对对照品质量不稳定、供应不充足等因素的制约。

近年来,一测多评法越来越受到重视,在2015年版《中国药典》编制大纲一部纲要中,国家药典委员会也重点提出要引入该方法<sup>[2]</sup>,它在仅使用1种对照品的情况下,利用相对校正因子来同时测定其他成分的含有量,具有经济、高效、制约因素少的优势,已成功应用于清热止咳颗粒、细辛、新疆软紫草、罗布麻叶等多种中药材及其复方制剂的质量控制<sup>[3-10]</sup>。另外,指纹图谱可反映整体化学成分信息,而一测多评法可用于定量,两者联合应用能更科学地评价中药及其复方制剂的整体质量<sup>[11-17]</sup>。因此,本实验建立一测多评法<sup>[18]</sup>同时测定通络止痛胶囊中虎杖苷、阿魏酸、蛇床子素、二氢欧山芹醇当归酸酯的含有量,并结合HPLC指纹图谱来反映该制剂整体化学成分信息,可为其质量控制提供参考。

## 1 材料

1.1 仪器 LC-1260型高效液相色谱仪(美国Agilent公司);AB204-S型电子天平(北京中恒日鑫科技有限公司);KQ-500DV型数控超声波清洗机(昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 试剂与药物 虎杖苷、阿魏酸、蛇床子素、二氢欧山芹醇当归酸酯对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为11575-200502、111773-201614、110822-201710、111583-201605)。通络止痛胶囊(批号161201、161202、161203购于遵义市中医院,批号19091601、19091602、19091603、19092301、19092302、19092303、19092304,自制)。甲醇、磷酸为色谱纯(天津市科密欧化学试剂有限公司);其他试剂均为分析纯;水为纯净水(杭州娃哈哈集团有限公司)。

## 2 方法与结果

2.1 色谱条件 Waters XSelect C<sub>18</sub>色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm);流动相甲醇(A)-0.5%磷酸(B),梯度洗脱(0~15 min, 80%~60% B; 15~

25 min, 60%~50% B; 25~35 min, 50% B; 35~45 min, 50%~30% B; 45~60 min, 30% B);体积流量1.0 mL/min;柱温25℃;检测波长330 nm;进样量10 μL。

### 2.2 溶液制备

2.2.1 对照品溶液 精密称取各对照品适量,甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,制成分别含虎杖苷0.830 4 mg/mL、阿魏酸0.053 6 mg/mL、蛇床子素0.782 9 mg/mL、二氢欧山芹醇当归酸酯1.245 5 mg/mL的贮备液,精密吸取0.2、0.5、1.0、2.0、4.0 mL,置于5个10 mL量瓶中,甲醇稀释,即得。

2.2.2 供试品溶液 取胶囊内容物适量,研细,取约3.0 g,精密称定,置于具塞锥形瓶中,精密加入30 mL甲醇,称定质量,超声处理60 min,静置至室温,甲醇补足减失的质量,摇匀,取续滤液,0.22 μm微孔滤膜过滤,即得。

2.2.3 阴性样品溶液 按处方比例制备缺独活(含蛇床子素、二氢欧山芹醇)、缺虎杖(含虎杖苷)、缺当归(含阿魏酸)的阴性样品,按“2.2.2”项下方法制备,即得。

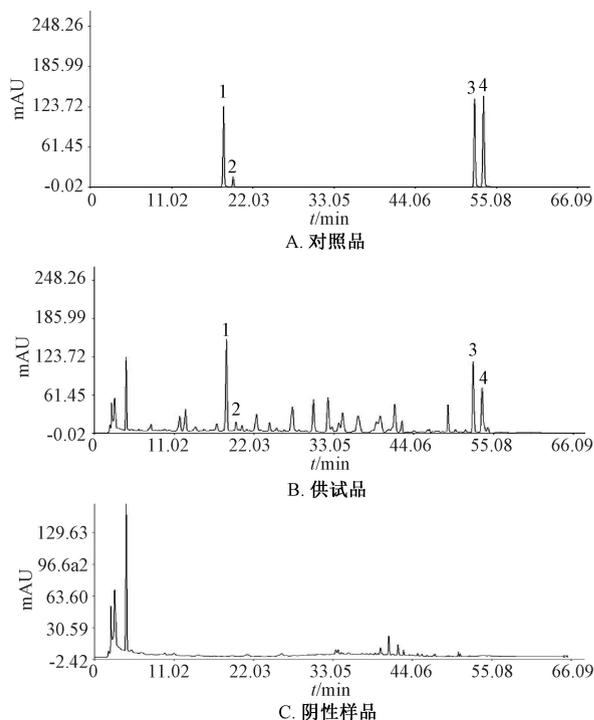
### 2.3 方法学考察

2.3.1 系统适应性考察 取对照品、供试品、阴性样品溶液,在“2.1”项色谱条件下进样测定,结果见图1。由此可知,各成分色谱峰达到基线分离,理论塔板数均大于5 000,与相邻色谱峰的分度大于1.5,阴性无干扰。

2.3.2 线性关系考察 取“2.2.1”项下对照品溶液,在“2.1”项色谱条件下进样10 μL测定,以溶液质量浓度为横坐标(X),峰面积为纵坐标(Y)进行回归,分别以信噪比(S/N)3、10计算检测限、定量限,结果见表1,可知各成分在各自范围内线性关系良好。

2.3.3 精密度试验 取同一供试品溶液(批号161201),在“2.1”项色谱条件下进样测定6次,测得虎杖苷、阿魏酸、蛇床子素、二氢欧山芹醇当归酸酯峰面积RSD分别为0.39%、1.04%、0.30%、0.81%,表明仪器精密度良好。

2.3.4 重复性试验 取胶囊(批号161201)内容物适量,按“2.2.2”项下方法平行制备6份供试品溶液,在“2.1”项色谱条件下进样测定,测得虎杖苷、阿魏酸、蛇床子素、二氢欧山芹醇当归酸酯峰面积RSD分别为0.45%、1.70%、0.57%、0.94%,表明该方法重复性良好。



1. 虎杖苷 2. 阿魏酸 3. 蛇床子素 4. 二氢欧山芹醇当归酸酯  
1. polydatin 2. ferulic acid 3. osthole 4. columbianadin

图1 各成分HPLC色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of various constituents

表1 各成分线性关系

Tab. 1 Linear relationships of various constituents

成分	回归方程	r	线性范围/( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	检测限/( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	定量限/( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )
虎杖苷	$Y=20.343X+130.67$	0.999 4	16.61~332.16	0.063	0.019
阿魏酸	$Y=34.252X+22.414$	0.999 6	1.07~21.42	0.035	0.010
蛇床子素	$Y=21.986X+276.05$	0.999 8	15.66~313.15	0.053	0.016
二氢欧山芹醇当归酸酯	$Y=17.484X+191.41$	0.999 3	24.91~498.21	0.072	0.022

2.4.2 检测波长 本实验考察了检测波长 332、330、328 nm 对相对校正因子的影响。结果，阿魏酸相对校正因子分别为 0.552、0.553、0.556，RSD 为 0.38%；蛇床子素相对校正因子分别为 0.835、0.832、0.835，RSD 为 0.21%；二氢欧山芹醇当归酸酯相对校正因子分别为 1.153、1.146、1.151，RSD 为 0.31%，可知均无明显影响。

2.4.3 体积流量 本实验考察了体积流量 0.8、1.0、1.2 mL/min 对相对校正因子的影响。结果，阿魏酸相对校正因子分别为 0.558、0.553、0.568，RSD 为 1.36%；蛇床子素相对校正因子分别为 0.837、0.832、0.825，RSD 为 0.73%；二氢欧山芹醇当归酸酯相对校正因子分别为 1.159、1.146、1.165，RSD 为 0.84%，可知均无明显影响。

2.4.4 柱温 本实验考察了柱温 20、25、30 °C 对

2.3.5 稳定性试验 取同一供试品溶液（批号 161201），于 0、2、4、6、8、10、12、24 h 在“2.1”项色谱条件下进样测定，测得虎杖苷、阿魏酸、蛇床子素、二氢欧山芹醇当归酸酯峰面积 RSD 分别为 0.93%、1.86%、1.35%、1.62%，表明供试品溶液在室温下 24 h 内稳定性良好。

2.3.6 加样回收率试验 精密称取各成分含有量已知的胶囊 9 份，每份 1.50 g，每 3 份 1 组，精密加入 80%、100%、120% 水平对照品溶液，按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液，在“2.1”项色谱条件下进样测定，计算回收率，结果见表 2。

2.3.7 相对校正因子计算 取“2.2.1”项下对照品溶液，在“2.1”项色谱条件下进样 2、5、10、12、15、20  $\mu\text{L}$  测定，以虎杖苷为内标，计算其他 3 种成分的相对校正因子，结果见表 3。

## 2.4 耐用性考察

2.4.1 仪器、色谱柱 本实验考察了 Agilent 1260、Waters 2695 色谱仪，以及 XSelect  $\text{C}_{18}$ 、Eclipse  $\text{C}_{18}$ 、Diamonsil  $\text{C}_{18}$  色谱柱对相对校正因子的影响，结果见表 4，可知均无明显影响（RSD<2.50%）。

相对校正因子的影响。结果，阿魏酸相对校正因子分别为 0.547、0.553、0.560，RSD 为 1.18%；蛇床子素相对校正因子分别为 0.821、0.832、0.835，RSD 为 0.89%；二氢欧山芹醇当归酸酯相对校正因子分别为 1.158、1.146、1.132，RSD 为 1.14%，可知均无明显影响。

2.4.5 磷酸体积分数 本实验考察了磷酸体积分数 0.4%、0.5%、0.6% 对相对校正因子的影响。结果，阿魏酸相对校正因子分别为 0.537、0.553、0.562，RSD 为 2.30%；蛇床子素相对校正因子分别为 0.861、0.832、0.839，RSD 为 1.79%；二氢欧山芹醇当归酸酯相对校正因子分别为 1.105、1.146、1.143，RSD 为 2.02%，可知均无明显影响。

2.5 色谱峰定位 精密吸取对照品溶液，在“2.1”项色谱条件下进样测定，结果见表 5。由此

表2 各成分加样回收率试验结果 (n=9)

Tab. 2 Results of recovery tests for various constituents (n=9)

成分	原有量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
虎杖苷	0.016 31	0.013 05	0.029 35	99.92	100.01	0.42
	0.016 36	0.013 05	0.029 43	100.15		
	0.016 29	0.013 05	0.029 34	100.00		
	0.016 37	0.016 33	0.032 71	100.06		
	0.016 30	0.016 33	0.032 75	100.73		
	0.016 29	0.016 33	0.032 64	100.12		
	0.016 29	0.019 58	0.035 69	99.08		
	0.016 35	0.019 58	0.035 92	99.95		
	0.016 36	0.019 58	0.035 95	100.05		
阿魏酸	0.000 77	0.000 62	0.001 40	101.61	99.47	1.85
	0.000 77	0.000 62	0.001 37	96.77		
	0.000 77	0.000 62	0.001 38	98.39		
	0.000 77	0.000 76	0.001 51	97.37		
	0.000 77	0.000 76	0.001 54	101.32		
	0.000 77	0.000 76	0.001 52	98.68		
	0.000 77	0.000 92	0.001 70	101.09		
	0.000 77	0.000 92	0.001 70	101.09		
	0.000 77	0.000 92	0.001 68	98.91		
蛇床子素	0.010 71	0.008 57	0.019 25	99.65	99.63	0.54
	0.010 74	0.008 57	0.019 18	98.48		
	0.010 70	0.008 57	0.019 21	99.30		
	0.010 75	0.010 73	0.021 47	99.91		
	0.010 70	0.010 73	0.021 48	100.47		
	0.010 70	0.010 73	0.021 41	99.81		
	0.010 70	0.012 85	0.023 53	99.84		
	0.010 73	0.012 85	0.023 55	99.77		
	0.010 74	0.012 85	0.023 52	99.46		
二氢欧山芹醇当归酸酯	0.011 86	0.009 49	0.021 32	99.68	99.06	0.87
	0.011 90	0.009 49	0.021 21	98.10		
	0.011 85	0.009 49	0.021 23	98.84		
	0.011 90	0.011 89	0.023 78	99.92		
	0.011 85	0.011 89	0.023 49	97.90		
	0.011 85	0.011 89	0.023 72	99.83		
	0.011 85	0.012 85	0.024 73	100.23		
	0.011 89	0.012 85	0.024 54	98.44		
	0.011 90	0.012 85	0.024 57	98.60		

表3 各成分相对校正因子

Tab. 3 Relative correction factors of various constituents

进样量/ $\mu$ L	相对校正因子(内标虎杖苷)		
	阿魏酸	蛇床子素	二氢欧山芹醇当归酸酯
2	0.558	0.837	1.155
5	0.559	0.834	1.133
10	0.558	0.836	1.157
12	0.571	0.837	1.150
15	0.572	0.832	1.147
20	0.569	0.822	1.142
平均值	0.565	0.833	1.147
RSD/%	1.21	0.69	0.77

表4 不同仪器、色谱柱对相对校正因子的影响

Tab. 4 Effects of different instruments and columns on relative correction factors

仪器	色谱柱	相对校正因子(内标虎杖苷)		
		阿魏酸	蛇床子素	二氢欧山芹醇当归酸酯
Agilent 1260	XSelect C <sub>18</sub>	0.558	0.837	1.154
	Eclipse C <sub>18</sub>	0.565	0.831	1.146
	Diamonsil C <sub>18</sub>	0.552	0.848	1.161
Waters 2695	XSelect C <sub>18</sub>	0.573	0.829	1.140
	Eclipse C <sub>18</sub>	0.584	0.822	1.133
	Diamonsil C <sub>18</sub>	0.548	0.843	1.132
平均值	—	0.563	0.835	1.144
RSD/%	—	2.40	1.15	1.01

可知,不同仪器、色谱柱对相对保留时间的影响较小,RSD均小于5%,表明相对保留时间法可用于定位色谱峰。

2.6 样品含有量测定 取10批胶囊,按“2.2.2”

表5 各成分相对保留时间

Tab. 5 Relative retention time of various constituents

仪器	色谱柱	相对保留时间(内标虎杖苷)		
		阿魏酸	蛇床子素	二氢欧山芹醇当归酸酯
Agilent 1260	XSelect C <sub>18</sub>	1.073	2.878	2.946
	Eclipse C <sub>18</sub>	1.031	2.916	2.928
	Diamonsil C <sub>18</sub>	1.051	2.857	2.977
Waters 2695	XSelect C <sub>18</sub>	1.099	2.821	2.842
	Eclipse C <sub>18</sub>	1.117	2.853	2.863
	Diamonsil C <sub>18</sub>	1.105	2.810	2.873
平均值	—	1.079	2.856	2.905
RSD/%	—	3.11	1.35	1.83

表6 各成分含量测定结果 (mg/g)

Tab. 6 Results of content determination of various constituents (mg/g)

编号	虎杖苷		阿魏酸		蛇床子素		二氢欧山芹醇当归酸酯			
	外标法	外标法	一测多评法	PD/%	外标法	一测多评法	PD/%	外标法	一测多评法	PD/%
1	0.973 7	0.046 0	0.046 5	1.00	0.639 3	0.637 2	0.34	0.707 7	0.715 4	1.08
2	0.982 1	0.045 3	0.044 7	1.31	0.644 8	0.641 9	0.44	0.714 1	0.710 7	0.48
3	0.977 3	0.044 5	0.044 8	0.76	0.641 4	0.642 1	0.12	0.698 0	0.694 9	0.45
4	0.969 2	0.044 6	0.044 5	0.12	0.636 4	0.634 5	0.29	0.704 4	0.709 5	0.72
5	0.971 5	0.045 1	0.045 5	0.88	0.636 7	0.633 8	0.47	0.712 1	0.706 1	0.84
6	0.984 5	0.044 0	0.044 7	1.60	0.638 6	0.639 6	0.16	0.701 2	0.708 4	1.02
7	0.979 2	0.043 7	0.044 2	1.12	0.629 9	0.627 0	0.47	0.692 8	0.694 1	0.18
8	0.984 9	0.046 4	0.045 8	1.26	0.644 3	0.649 2	0.76	0.716 6	0.710 3	0.88
9	0.980 7	0.044 5	0.044 8	0.73	0.636 7	0.631 7	0.79	0.714 3	0.710 4	0.55
10	0.976 6	0.044 3	0.044 6	0.76	0.647 3	0.643 2	0.64	0.698 3	0.696 4	0.27

2.7.2 稳定性试验 取供试品溶液 (S1), 于0、2、4、8、12、16、24 h 在“2.1”项下色谱条件进样测定, 以虎杖苷为参照峰, 测得各共有峰相对保留时间、相对峰面积 RSD 均小于 1.72%, 指纹图谱相似度均大于 0.96, 表明溶液在室温下 24 h 内稳定性良好。

2.7.3 重复性试验 取样品 (S1), 平行制备 6 份供试品溶液, 在“2.1”项色谱条件下进样测定, 以虎杖苷为参照峰, 测得各共有峰相对保留时间 RSD 均小于 0.59%, 相对峰面积 RSD 均小于 1.43%, 指纹图谱相似度均大于 0.96, 表明该方法重复性良好。

2.7.4 指纹图谱生成及相似度评价 取 10 批胶囊内容物适量, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 在“2.1”项色谱条件下进样测定, 采用中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2012 版), 选择样品 S1 图谱作为对照指纹图谱, 通过多点校正全谱匹配后确定 21 个共有峰, 生成指纹图谱共有模式, 见图 2。另外, 10 批样品相似度分别为 0.984、0.996、0.973、0.980、0.982、0.962、0.971、0.978、0.985、0.987, 均大于 0.95, 表明不同批

项下方法制备供试品溶液, 在“2.1”项色谱条件下进样测定, 计算含有量, 结果见表 6, 可知 2 种方法所得结果接近, 差异百分比 (PD) 均小于 2%。

### 2.7 HPLC 指纹图谱建立

2.7.1 精密度试验 取同一供试品溶液 (S1, 批号 161201), 在“2.1”项色谱条件下进样测定 6 次, 以虎杖苷为参照峰, 测得各共有峰相对保留时间 RSD 为 0.15% ~ 0.46%, 相对峰面积 RSD 为 0.12% ~ 0.97%, 所采集指纹图谱的相似度均大于 0.97, 表明仪器精密度良好。

次样品之间的差异较小, 稳定性良好。

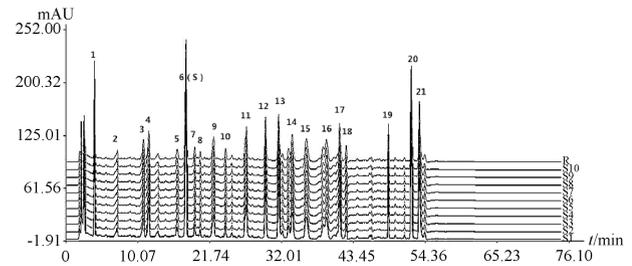


图2 10批样品 HPLC 指纹图谱

Fig. 2 HPLC fingerprints for ten batches of samples

2.7.5 共有峰 21 个共有峰的峰面积总和占色谱峰总面积的 93.51%, 表明它代表性较好, 然后在供试品溶液中加入对照品溶液以考察相应共有峰是否增高, 同时与对照品溶液图谱进行比较 (图 1), 确定 6 号峰为虎杖苷, 7 号峰为阿魏酸, 20 号峰为蛇床子素, 21 号峰为二氢欧山芹醇当归酸酯, 并选择峰形好、位置适中、前后无色谱峰干扰的虎杖苷作为参照峰 (S 峰)。再计算各共有峰相对保留时间、相对峰面积 RSD, 结果见表 7~8, 可知它们均小于 2.0%, 表明指纹图谱稳定性良好。

表7 共有峰相对保留时间

Tab. 7 Relative retention time of common peaks

峰号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	RSD/%
1	0.241	0.242	0.241	0.241	0.242	0.242	0.243	0.240	0.239	0.243	0.52
2	0.428	0.425	0.428	0.429	0.427	0.425	0.424	0.428	0.427	0.429	0.41
3	0.646	0.650	0.645	0.647	0.647	0.643	0.643	0.650	0.645	0.646	0.38
4	0.691	0.690	0.691	0.692	0.688	0.689	0.691	0.689	0.691	0.692	0.19
5	0.926	0.926	0.925	0.922	0.924	0.926	0.927	0.928	0.923	0.928	0.22
6	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.00
7	1.072	1.072	1.071	1.075	1.069	1.071	1.076	1.077	1.075	1.074	0.24
8	1.117	1.115	1.111	1.118	1.116	1.120	1.118	1.113	1.116	1.115	0.23
9	1.229	1.232	1.228	1.220	1.229	1.224	1.227	1.229	1.231	1.218	0.38
10	1.323	1.328	1.327	1.329	1.322	1.325	1.330	1.327	1.319	1.328	0.26
11	1.500	1.504	1.500	1.505	1.507	1.497	1.508	1.498	1.509	1.510	0.32
12	1.658	1.663	1.652	1.667	1.657	1.653	1.655	1.657	1.656	1.658	0.27
13	1.768	1.771	1.781	1.753	1.775	1.742	1.768	1.767	1.761	1.766	0.63
14	1.879	1.882	1.878	1.866	1.877	1.887	1.874	1.893	1.862	1.888	0.51
15	1.997	1.999	1.991	1.992	1.985	1.979	2.022	1.992	1.988	1.997	0.58
16	2.151	2.166	2.164	2.183	2.181	2.153	2.188	2.161	2.157	2.164	0.60
17	2.256	2.278	2.273	2.279	2.285	2.270	2.273	2.276	2.262	2.281	0.39
18	2.320	2.333	2.328	2.329	2.337	2.343	2.328	2.325	2.322	2.327	0.30
19	2.672	2.686	2.677	2.675	2.674	2.671	2.667	2.685	2.678	2.677	0.22
20	2.868	2.876	2.868	2.862	2.866	2.879	2.873	2.873	2.864	2.865	0.19
21	2.935	2.943	2.936	2.946	2.923	2.924	2.942	2.943	2.925	2.949	0.33

表8 共有峰相对峰面积

Tab. 8 Relative peak areas of common peaks

峰号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	RSD/%
1	0.572	0.577	0.568	0.572	0.573	0.573	0.574	0.568	0.574	0.571	0.48
2	0.090	0.088	0.087	0.088	0.089	0.091	0.089	0.087	0.089	0.088	1.43
3	0.234	0.230	0.228	0.232	0.229	0.225	0.232	0.234	0.235	0.232	1.34
4	0.287	0.283	0.281	0.285	0.281	0.280	0.284	0.282	0.286	0.281	0.85
5	0.094	0.097	0.093	0.094	0.093	0.092	0.093	0.094	0.094	0.093	1.43
6	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.00
7	0.095	0.098	0.096	0.097	0.097	0.096	0.098	0.096	0.099	0.098	1.29
8	0.056	0.058	0.058	0.056	0.057	0.056	0.057	0.058	0.057	0.058	1.53
9	0.289	0.289	0.287	0.282	0.293	0.287	0.284	0.286	0.292	0.288	1.16
10	0.094	0.093	0.096	0.094	0.095	0.095	0.095	0.094	0.094	0.095	0.90
11	0.419	0.425	0.417	0.421	0.433	0.417	0.419	0.417	0.419	0.426	1.24
12	0.442	0.443	0.439	0.441	0.443	0.439	0.445	0.442	0.446	0.443	0.51
13	0.494	0.490	0.492	0.497	0.486	0.492	0.491	0.499	0.494	0.487	0.82
14	0.338	0.340	0.336	0.338	0.339	0.341	0.343	0.333	0.342	0.336	0.90
15	0.428	0.438	0.427	0.421	0.433	0.427	0.425	0.432	0.428	0.423	1.17
16	0.347	0.347	0.345	0.341	0.353	0.341	0.355	0.343	0.337	0.339	1.70
17	0.459	0.458	0.456	0.455	0.445	0.462	0.449	0.456	0.463	0.458	1.21
18	0.146	0.143	0.146	0.145	0.143	0.146	0.145	0.144	0.143	0.145	0.87
19	0.220	0.221	0.219	0.221	0.220	0.218	0.220	0.221	0.220	0.221	0.45
20	0.784	0.783	0.781	0.782	0.783	0.785	0.782	0.781	0.785	0.787	0.25
21	0.629	0.625	0.626	0.633	0.609	0.631	0.623	0.628	0.629	0.625	1.06

### 3 讨论

3.1 指标成分、内标选择 根据通络止痛胶囊中16味药材的主要成分及其药理作用,本实验考察了虎杖苷、阿魏酸、蛇床子素、二氢欧山芹醇当归酸酯、毛蕊花糖苷、蒿本内酯、松脂醇二葡萄糖

苷。其中,毛蕊花糖苷、蒿本内酯含有量太低,松脂醇二葡萄糖苷不易提取分离,故选择虎杖苷、阿魏酸、蛇床子素、二氢欧山芹醇当归酸酯作为指标成分。另外,虎杖苷在供试品溶液中含有量高,位置适中,峰形好,分离度大,故选择其作为内标。

3.2 前处理方法选择 本实验比较了乙醇、甲醇,发现后者提取率高,基线平稳,图谱指纹性强,故选择甲醇作为提取溶剂;比较了超声提取、回流提取、索氏提取,发现三者无明显差异,但超声提取操作方便快捷,易于制备供试品溶液,故选择其作为提取方法;比较了提取时间 50、60、70 min,发现提取 60 min 后各成分提取率基本一致,故选择 60 min 作为提取时间。

3.3 色谱条件选择 本实验所测成分的极性相差较大,故采用梯度洗脱模式以实现快速分离。考察了甲醇-水、甲醇-磷酸、甲醇-醋酸、乙腈-水、乙腈-磷酸、乙腈-醋酸,发现甲醇-0.5% 磷酸洗脱效果最好,故以其为流动相。各成分紫外吸收波长分别为虎杖苷 306 nm、阿魏酸 316 nm、蛇床子素 330 nm、二氢欧山芹醇当归酸酯 330 nm,四者比较接近,采用 DAD 检测器进行 190~400 nm 全波长扫描,通过分析三维图谱,兼顾信号强度和检测灵敏度,发现在 330 nm 波长附近各成分色谱图的基线噪音较低,均有较高的响应,有利于含有量测定,故选择其作为检测波长。

#### 4 结论

指纹图谱具有整体性、相似性的特点,可快速判断药味是否缺少,但不能准确反映化学成分信息;一测多评法定量准确,但受制于中药的复杂性,也并非所有活性成分均能如此测定。本实验首次建立通络止痛胶囊 HPLC 指纹图谱,并通过一测多评法同时测定虎杖苷、阿魏酸、蛇床子素、二氢欧山芹醇当归酸酯的含有量,发现所得结果与外标法接近,而且该方法简便高效,重复性好,可为该制剂整体质量控制提供参考。

#### 参考文献:

[ 1 ] Z20030349, 通络止痛胶囊标准[S].  
[ 2 ] 杨 洋, 黄良永, 朱美玲, 等. 一测多评法在中国药典 2015 年版中的应用[J]. 中南药学, 2017, 15(12): 1738-1741.  
[ 3 ] 王 欣, 覃 瑶, 王德江, 等. 一测多评法在中药质量控

制中的应用进展[J]. 中成药, 2016, 38(2): 395-402.  
[ 4 ] 于 娟. 一测多评法测定清热止咳颗粒及中间体中 7 种黄酮类成分的含量[J]. 中国中药杂志, 2019, 44(19): 4185-4195.  
[ 5 ] 匡艳辉, 廖丰蕴, 李雯珊, 等. 一测多评法测定细辛中 5 种成分含量[J]. 中药材, 2019, 42(9): 2091-2095.  
[ 6 ] 毛 艳, 蔡晓翠, 古丽白热木·玉素因, 等. 一测多评法同时测定新疆紫萼草中 6 种萜醌类成分[J]. 中草药, 2019, 50(17): 4170-4175.  
[ 7 ] 徐 硕, 徐文峰, 邝咏梅, 等. 一测多评法测定罗布麻叶中 6 个黄酮类成分的含量[J]. 药物分析杂志, 2019, 39(7): 1217-1228.  
[ 8 ] 唐 林, 肖望重, 黄 莉, 等. 一测多评法同时测定清解颗粒中 3 种成分[J]. 中成药, 2019, 41(9): 2052-2057.  
[ 9 ] Gu C C, Wu F, Cao Y M, *et al.* Determination and quality evaluation of six components in Zhou's Prescription through quantitative analysis of multi-components by single marker[J]. *Accredit Qual Assur*, 2017, 22(6): 369-379.  
[ 10 ] 孙立磊, 包永睿, 孟宪生, 等. 一测多评法同时测定川芎中 5 种成分[J]. 中成药, 2016, 38(11): 2503-2505.  
[ 11 ] 裴玉琼, 石海培, 严 辉, 等. 基于 HPLC 指纹图谱及多成分一测多评法定量的炙甘草饮片质量评价研究[J]. 中草药, 2019, 50(18): 4293-4304.  
[ 12 ] 何 兵, 刘 艳, 田 吉, 等. 指纹图谱结合一测多评模式在中药鱼腥草质量评价中的应用研究[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(16): 2682-2689.  
[ 13 ] 徐 容. 关防风 HPLC 特征指纹图谱研究及 4 个色原酮类成分一测多评法分析研究[J]. 药物分析杂志, 2019, 39(3): 458-466.  
[ 14 ] Li F, Wu H, Sun L L, *et al.* Quantitative analysis of multi-components by single marker and fingerprint analysis of *Achyranthes bidentata* Blume[J]. *J Chromatogra Sci*, 2018, 56(7): 595-603.  
[ 15 ] 陆敏灵, 覃洁萍, 罗宇东, 等. 八味龙钻颗粒 HPLC 指纹图谱建立及 7 种成分测定[J]. 中成药, 2019, 41(6): 1232-1236.  
[ 16 ] 李鹏辉, 严 辉, 朱邵晴, 等. 干姜 HPLC 指纹图谱建立及 5 种成分测定[J]. 中成药, 2019, 41(9): 2246-2251.  
[ 17 ] 谭玲龙, 钟凌云, 宋 嫵, 等. 地龙炮制品 HPLC 指纹图谱的建立及 5 种成分测定[J]. 中成药, 2018, 40(10): 2238-2243.  
[ 18 ] 王智民, 钱忠直, 张启伟, 等. 一测多评法建立的技术指南[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(6): 657-658.