基于指纹图谱和多成分含量测定的颅复丸质量评价Δ

郭小红[1,2,3*]，唐　萍[1]，李　杰[1]，敖靖翔[2]，陈　娟[1]，杨　敏[1]，冷　静[1#]（1.重庆市中医院中药制剂研究所，重庆　400021；2.重庆医科大学药学院，重庆　400016；3.重庆市中药研究院药物化学研究所，重庆　400036）

中图分类号　R284；R917　　**文献标志码**　A　　**文章编号**　1001-0408（2026）20-2693-07
DOI　10.6039/j.issn.1001-0408.2026.20.11

摘　要　目的　评价颅复丸（LFP）的质量。**方法**　采用《中药指纹图谱相似度评价系统（2012版）》建立LFP的高效液相色谱（HPLC）指纹图谱并进行相似度评价；采用SIMCA 14.1软件进行层次聚类分析（HCA）、主成分分析（PCA）和正交偏最小二乘-判别分析（OPLS-DA）。采用HPLC法测定12批样品中士的宁、马钱子碱、甘草苷、三七皂苷R_1、人参皂苷Rg_1、人参皂苷Rb_1、甘草皂苷G_2、人参皂苷Rd的含量。**结果**　从12批LFP样品的HPLC指纹图谱中标定出26个共有峰，指认出其中8个，分别为士的宁（峰3）、马钱子碱（峰4）、甘草苷（峰6）、三七皂苷R_1（峰7）、人参皂苷Rg_1（峰8）、人参皂苷Rb_1（峰15）、甘草皂苷G_2（峰17）、人参皂苷Rd（峰18）；12批LFP样品的相似度均大于0.90。HCA和PCA结果均显示，12批样品分为两类，S2、S4～S6、S12为一类，S1、S3、S7～S11为一类；Hotelling's T^2和DMod$X$的控制上限分别为16.631和1.578。人参皂苷Rg_1（峰8）、人参皂苷Rb_1（峰15）、峰20、士的宁（峰3）、峰11、三七皂苷R_1（峰7）、峰2、峰17、峰13、峰10、人参皂苷Rd（峰18）、峰23、峰26、峰21、峰24的变量重要性投影值均大于1。含量测定结果显示，士的宁、马钱子碱、甘草苷、三七皂苷R_1、人参皂苷Rg_1、人参皂苷Rb_1、甘草皂苷G_2、人参皂苷Rd的含量分别为0.005%～0.018%、0.005%～0.010%、0.050%～0.118%、0.033%～0.073%、0.132%～0.248%、0.122%～0.242%、0.021%～0.043%、0.016%～0.048%。**结论**　所建HPLC指纹图谱和含量测定方法的准确性、重复性均较好，可用于LFP的质量评价；人参皂苷Rg_1、人参皂苷Rb_1、士的宁、三七皂苷R_1、人参皂苷Rd可能是影响制剂整体质量的差异性成分。

关键词　颅复丸；指纹图谱；化学计量学；多成分含量；质量评价

Quality evaluation of Lufu pill based on fingerprint chromatography and multi-component content determination

GUO Xiaohong[1,2,3], TANG Ping[1], LI Jie[1], AO Jingxiang[2], CHEN Juan[1], YANG Min[1], LENG Jing[1]（1. Institute of Traditional Chinese Medicine Preparations, Chongqing Traditional Chinese Medicine Hospital, Chongqing 400021, China; 2. School of Pharmacy, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China; 3. Institute of Medicinal Chemistry, Chongqing Academy of Chinese Materia Medica, Chongqing 400036, China）

ABSTRACT　OBJECTIVE To evaluate the quality of Lufu Pill (LFP). **METHODS** The high-performance liquid chromatography (HPLC) fingerprint of LFP was established using the *Similarity Evaluation System for Chromatographic Fingerprint of Traditional Chinese Medicine* (2012 Edition), and similarity evaluation was performed. Hierarchical cluster analysis (HCA), principal component analysis (PCA), and orthogonal partial least squares-discriminant analysis (OPLS-DA) were performed using SIMCA 14.1 software. The contents of strychnine, brucine, liquiritin, notoginsenoside R_1, ginsenoside Rg_1, ginsenoside Rb_1, licoricesaponin G_2, and ginsenoside Rd in 12 batches of samples were determined by the HPLC method. **RESULTS** A total of 26 common peaks were identified in the HPLC fingerprint of 12 batches of LFP samples, and eight common peaks were identified as strychnine (peak 3), brucine (peak 4), liquiritin (peak 6), notoginsenoside R_1 (peak 7), ginsenoside Rg_1 (peak 8), ginsenoside Rb_1 (peak 15), licoricesaponin G_2 (peak 17), and ginsenoside Rd (peak 18). The similarities of 12 batches of LFP samples were all greater than 0.90. The results of HCA and PCA both showed that the 12 batches of samples were divided into two categories: S2, S4-S6, and S12 were grouped into one category, while S1, S3, S7-S11 were grouped into another category. The upper control limits for Hotelling's T^2 and DMod$X$ were 16.631 and 1.578, respectively. The variable importance in projection values of ginsenoside Rg_1 (peak 8), ginsenoside Rb_1 (peak 15), peak 20, strychnine (peak 3), peak 11, notoginsenoside R_1 (peak 7), peak 2, peak 17, peak 13, peak 10, ginsenoside Rd (peak 18), peak 23, peak 26, peak 21, and peak 24 were greater than 1. The content determination results showed that strychnine, brucine, liquiritin, notoginsenoside R_1, ginsenoside Rg_1, ginsenoside Rb_1, licoricesaponin G_2, and ginsenoside Rd were 0.005%-0.018%, 0.005%-0.010%, 0.050%-0.118%, 0.033%-0.073%, 0.132%-0.248%, 0.122%-0.242%, 0.021%-0.043%, and 0.016%-0.048%, respectively. **CONCLUSIONS** The established HPLC fingerprint and content determination method are accurate and reproducible,

Δ**基金项目**　重庆英才包干制项目（No.cstc2024ycjh-bgzxm0163）

＊**第一作者**　副主任中药师，硕士生导师，博士。研究方向：中药药效物质基础及药理作用机制。E-mail：472413721@qq.com

＃**通信作者**　主任中药师，硕士生导师，博士。研究方向：中药新制剂开发及中药炮制原理。E-mail：54408193@qq.com

and can be used for the quality evaluation of LFP. Ginsenoside Rg_1, ginsenoside Rb_1, strychnine, notoginsenoside R_1, and ginsenoside Rd may be the differential components affecting its overall quality.

KEYWORDS Lufu pill; fingerprint; chemometrics; multi-component content; quality evaluation

颅复丸（Lufu pill，LFP）是重庆市中医院特色院内制剂（备案号：Z20051133），其处方源于全国名中医张锡君教授的临床抗肿瘤经验方，由三七、石菖蒲、重楼、黄芪、甘草、制马钱子、牛黄、冰片8味中药组成，以“以毒攻毒，扶正祛邪”为治疗原则，具有活血化瘀、软坚散结、醒脑镇痛之功效，主要用于颅内肿瘤的临床治疗，对脑胶质瘤所致的脑功能缺损症状有较好的恢复作用，可降低该病致残率，延长患者的生存时间[1]。

三七皂苷R_1、人参皂苷Rg_1、人参皂苷Rb_1、人参皂苷Rd等成分被认为是三七延缓胶质瘤进展的主要药效物质，其中人参皂苷Rd可通过调控胱天蛋白酶-3、B淋巴细胞瘤2及人端粒酶逆转录酶凋亡相关蛋白的表达，诱导人脑胶质瘤U251细胞凋亡[2]；人参皂苷Rg_1可抑制活化的BV2小胶质细胞介导的炎症因子（一氧化氮合酶、肿瘤坏死因子α）的表达[3]，并可抑制转化生长因子β_1诱导的反应性星形胶质细胞（reactive astrocytes，RAs）活化表型并促进RAs由A1型向A2型转变[4]；三七皂苷R_1是一种新型白血病抑制因子抑制剂，与替莫唑胺联用可产生协同效应，抑制小胶质瘤细胞增殖[5]；人参皂苷Rb_1可通过G蛋白偶联受体-激动型G蛋白信号通路受体发挥对氧糖剥夺/复氧星形胶质细胞的保护作用[6]。

甘草苷、甘草皂苷G_2为甘草的主要成分，亦具有延缓胶质瘤进展的作用，甘草苷可通过靶向雌激素受体、抑制核因子κB通路，下调白细胞介素1β及焦亡相关蛋白（胱天蛋白酶1、焦孔素D氮端片段）的表达，从而减轻脂多糖诱导的BV2小胶质细胞焦亡[7]；甘草皂苷G2具有抑制肿瘤细胞增殖的作用[8]。马钱子碱、士的宁是马钱子的毒效成分，马钱子碱可以通过激活转录因子3介导过氧化氢和铁生成，进而诱导胶质瘤细胞铁死亡[9]；士的宁可阻断神经母细胞瘤-胶质瘤杂交细胞中藜芦碱激活的离子通道[10]。上述研究表明，LFP可通过多成分、多途径发挥抗脑胶质瘤作用。

LFP现收载于2008年版《重庆市医疗机构制剂规范》，其现行质量标准仅涵盖性状和显微鉴别，缺乏基于现代分析技术的定性定量评价方法，难以全面反映其内在质量。电雾式检测器（charged aerosol detector，CAD）是一种通用型检测器，其响应不依赖于化合物的紫外吸收特性，对非挥发性及半挥发性成分具有高灵敏度与广谱响应能力，适用于中药复方全成分指纹图谱分析与测定[11]。指纹图谱可表征中药复方化学成分的组成与相对含量特征，化学计量学分析可进一步挖掘不同样品批次间差异，筛选潜在质量标志物[12]。为此，本研究采用高效液相色谱（HPLC）-CAD技术构建LFP的指纹图谱，采用层次聚类分析（hierarchical cluster analysis，HCA）、主成分分析（principal component analysis，PCA）和正交偏最小二乘-判别分析（orthogonal partial least squares-discriminant analysis，OPLS-DA）评价不同批次LFP的质量差异，采用HPLC法测定其中士的宁、马钱子碱、甘草苷、三七皂苷R_1、人参皂苷Rg_1、人参皂苷Rb_1、甘草皂苷G_2、人参皂苷Rd的含量，以期为其质量评价提供依据。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器包括UltiMate 3000型HPLC仪联合Corona™ Veo™ RS型CAD、BN 3000型万分之一电子天平（上海精密科学仪器有限公司），CP 2000型十万分之一电子天平（德国Sartorius公司），Elix-Essential 10&Milli-Q IQ 7000型超纯水制备器（德国Merck公司），SCQ-9201B型超声波清洗仪（上海声彦超声仪有限公司）等。

1.2 药品与试剂

甘草苷（批号111610-202209）、人参皂苷Rg_1（批号110703-202034）、人参皂苷Rb_1（批号110704-200921）对照品均购自中国食品药品检定研究院，士的宁（批号DSTDS002602）、马钱子碱（批号DSTDM001902）、三七皂苷R_1（批号DSTDS005003）、甘草皂苷G_2（批号DST220316-098）、人参皂苷Rd（批号DSTDR001502）对照品均购自成都德思特生物技术有限公司；各对照品纯度均大于98%；制马钱子饮片（批号241101）由重庆市中医院炮制基地提供，三七饮片（批号231101）购自重庆国承堂制药有限公司，重楼（批号230510317）、黄芪（批号241261135）、甘草（批号240610456）、石菖蒲（批号250160026）饮片均购自重庆中药饮片厂有限公司，冰片饮片（批号Z51022577）购自四川青神康华制药有限公司，人工牛黄饮片（批号240201）购自四川菲德力制药有限公司；上述饮片经重庆市中医院中药制剂研究所主任中药师杨敏鉴定均为真品。12批LFP样品（编号S1～S12，批号分别为20240101、20240201、20240301、20240501、20240701、20240801、20240901、202401101、20250101、20250301、20250501、20250401，规格为9 g/粒）均由重庆市中医院制剂中心提供；乙腈、甲酸为色谱纯，其余试剂均为分析纯，水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 LFP的指纹图谱建立

2.1.1 溶液的制备

（1）混合对照品溶液：精密称取土的宁、马钱子碱、甘草苷、三七皂苷R_1、人参皂苷Rg_1、人参皂苷Rb_1、甘草皂苷G_2、人参皂苷Rd对照品适量，用甲醇溶解，制成上述各成分质量浓度分别为19.95、21.60、53.35、35.75、52.05、50.70、16.95、34.10 μg/mL的混合对照品溶液，经0.22 μm微孔滤膜滤过，取续滤液，即得。

（2）供试品溶液：精密称取LFP样品2.0 g，置于20 mL具塞锥形瓶中，加50%甲醇20 mL，称重，超声（功率500 W，频率40 kHz，下同）处理1 h，放冷，再次称重，加50%甲醇补足失重，摇匀，经0.22 μm微孔滤膜滤过，取续滤液，即得。

（3）单味中药样品溶液：按照LFP的处方比例，精密称取制马钱子饮片0.15 g、冰片饮片0.015 g、人工牛黄饮片0.3 g、三七饮片1.5 g、石菖蒲饮片0.9 g、重楼饮片1.5 g、黄芪饮片1.865 g、甘草饮片1.725 g，分别置于50 mL具塞锥形瓶中，加50%甲醇50 mL，按“2.1.1（2）”项下“称重，超声处理1 h……取续滤液”操作，即得各单味中药样品溶液。

2.1.2 色谱条件

以XTERRA® Phenyl（4.6 mm×100 mm，5 μm）为色谱柱，以0.1%甲酸溶液（A）-乙腈（B）为流动相进行梯度洗脱（0～5 min，10%B；5～15 min，10%B→20%B；15～45 min，20%B→33%B；45～100 min，33%B→47%B）；流速为1.0 mL/min；柱温为30 ℃；进样量为20 μL；雾化器温度为40 ℃；采集频率为2 Hz；过滤常数为5.0 s。

2.1.3 精密度试验

取“2.1.1（2）”项下供试品溶液（编号S1），按“2.1.2”项下色谱条件进样测定6次，记录峰面积，以人参皂苷Rb_1（峰15）为参照峰，计算得到各共有峰相对保留时间的RSD均不高于1.28%（n=6），相对峰面积的RSD均不高于1.35%（n=6），表明方法精密度良好。

2.1.4 稳定性试验

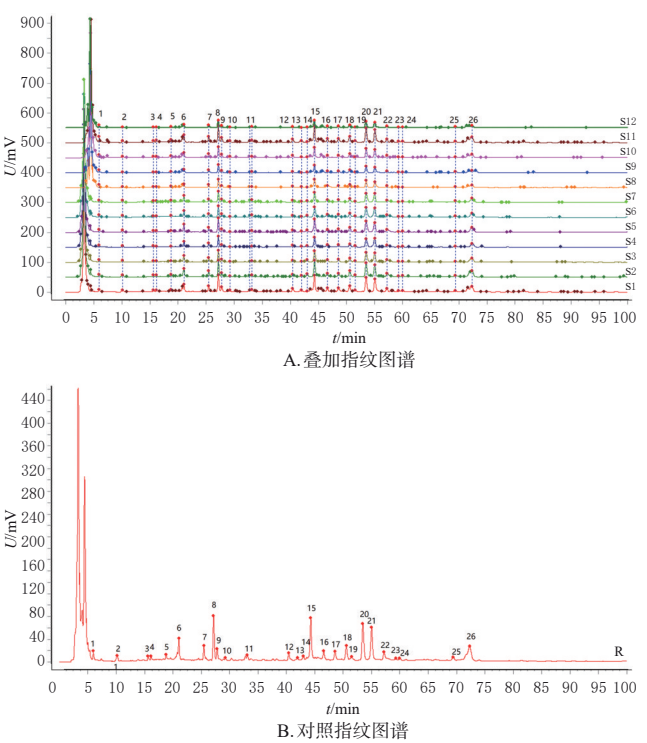
取“2.1.1（2）”项下供试品溶液（编号S1），分别于室温下放置0、3、6、9、12、24 h时，按“2.1.2”项下色谱条件进样测定，记录峰面积，以人参皂苷Rb_1（峰15）为参照峰，计算得到各共有峰相对保留时间的RSD均不高于1.55%（n=6），相对保留面积的RSD均不高于1.90%（n=6），表明供试品溶液于室温下放置24 h内稳定性良好。

2.1.5 重复性试验

取LFP样品（编号S1）适量，按“2.1.1（2）”项下方法制备供试品溶液，共6份，按“2.1.2”项下色谱条件进样测定，记录峰面积，以人参皂苷Rb_1（峰15）为参照峰，计算得到各共有峰相对保留时间的RSD均不高于2.05%（n=6），相对峰面积的RSD均不高于2.22%（n=6），表明方法重复性良好。

2.1.6 指纹图谱及相似度评价

取12批LFP样品（编号S1～S12），按“2.1.1（2）”项下方法制备供试品溶液，按“2.1.2”项下色谱条件进样测定，将色谱图导入《中药指纹图谱相似度评价系统（2012版）》，以S1样品的色谱图为参照图谱，采用中位数法，时间窗宽度设置为0.4 min，经多点校正后进行Mark峰匹配，生成12批LFP样品的叠加指纹图谱和对照指纹图谱（R）。结果（图1）显示，12批LFP样品共标定26个共有峰；12批LFP样品与对照指纹图谱的相似度分别为0.927、0.937、0.935、0.945、0.958、0.946、0.926、0.935、0.941、0.976、0.918、0.921，均大于0.90，表明各批次样品的整体化学成分一致性良好，质量较为稳定；但各批次样品间的相似度存在波动，提示各批次样品质量存在微小差异。



A. 叠加指纹图谱

B. 对照指纹图谱

图1 12批LFP样品的HPLC叠加指纹图谱和对照指纹图谱（R）

2.1.7 共有峰指认及归属

通过与各单味中药样品溶液的HPLC图谱（图2）比对，推测各共有峰可能的归属（表1）；通过与混合对照品溶液（图3）和单个对照品比对，最终指认8个共有峰，分别是土的宁（峰3）、马钱子碱（峰4）、甘草苷（峰6）、三七皂苷R_1（峰7）、人参皂苷Rg_1（峰8）、人参皂苷Rb_1（峰15）、甘草皂苷G_2（峰17）、人参皂苷Rd（峰18）。结果见表1。

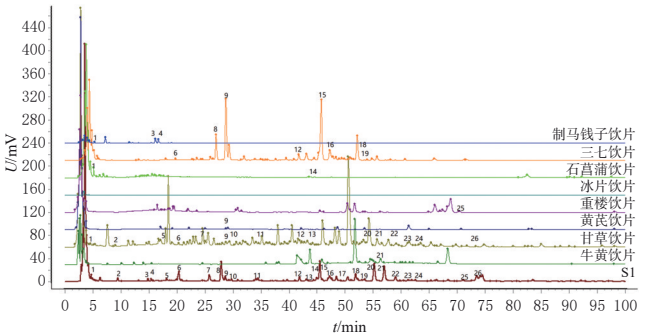


图2　LFP样品（编号S1）与各单味中药样品溶液的HPLC图谱

表1　12批LFP样品共有峰的归属

峰号	成分	饮片归属	峰号	成分	饮片归属
1	－	制马钱子、甘草、石菖蒲	14	－	石菖蒲
2	－	甘草	15	人参皂苷Rb_1	三七
3	士的宁	制马钱子	16	－	三七
4	马钱子碱	制马钱子	17	甘草皂苷G_2	甘草
5	－	甘草	18	人参皂苷Rd	三七
6	甘草苷	甘草	19	－	三七、牛黄
7	三七皂苷R_1	三七	20	－	甘草
8	人参皂苷Rg_1	三七	21	－	牛黄、甘草
9	－	三七、黄芪、甘草	22	－	甘草
10	－	甘草	23	－	甘草、黄芪
11	－	甘草	24	－	甘草
12	－	甘草、三七	25	－	牛黄、重楼
13	－	甘草	26	－	甘草

－：成分未知。

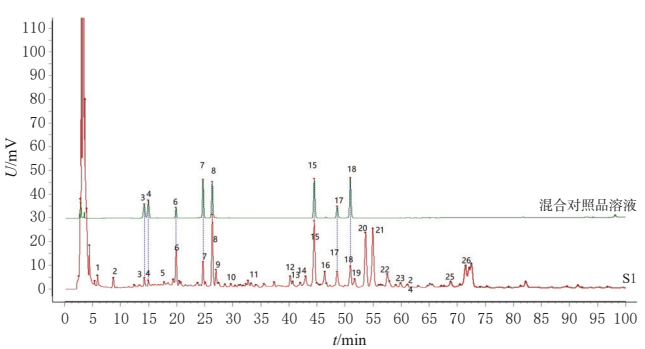


图3　LFP样品（编号S1）与混合对照品溶液的HPLC图谱

2.2　LFP样品的化学计量学分析

2.2.1　HCA

以12批LFP样品的26个共有峰峰面积为变量，使用SIMCA 14.1软件进行HCA，采用Ward法，距离度量设置为平方欧氏距离。结果（图4）显示，当平方欧氏距离为450时，12批LFP样品聚为2类，S2、S4～S6、S12聚为一类，S1、S3、S7～S11聚为一类，表明不同批次LFP样品所含化学成分存在一定的差异，这可能与不同批次中药饮片原料质量及制剂工艺操作差异有关。

2.2.2　PCA

将12批LFP样品的26个共有峰峰面积数据导入SIMCA 14.1软件进行PCA。结果（图5A）显示，第一主成分得分为0.631，第二主成分得分为0.526；12批LFP样品分为2类，分类结果与HCA结果一致。由主成分载荷图（图5B）可知，距离载荷图原点距离较远的共有峰依次为峰15（人参皂苷Rb_1）、峰2、峰20、峰18（人参皂苷Rd）、峰10、峰7（三七皂苷R_1）、峰8（人参皂苷Rg_1）、峰11、峰3（士的宁），表明这些成分可能是影响LFP样品整体质量的主要成分。

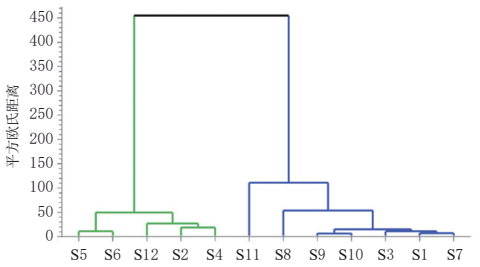
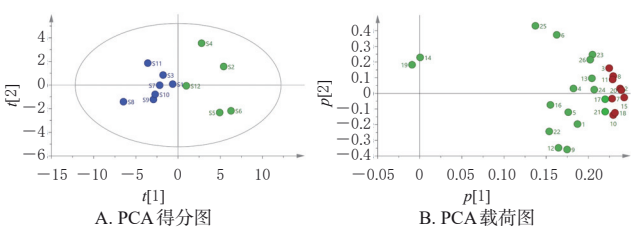


图4　12批LFP样品的HCA图

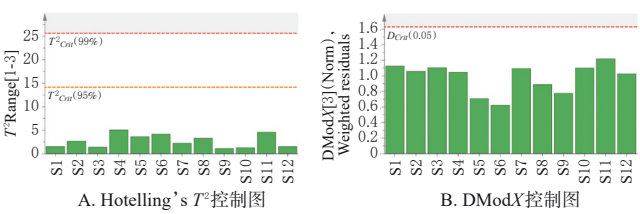


A. PCA得分图　　B. PCA载荷图

图5　12批LFP样品的PCA图

2.2.3　Hotelling's T^2和DMod$X$控制限分析

Hotelling's T^2和DMod$X$是两种互补的多变量统计分析指标，常用于评价样品批间一致性。Hotelling's T^2为PCA模型的内部变化度量，反映样品在模型主成分空间内与其余样品群体的偏离程度；DMod$X$为PCA模型外部残差度量，用于表征样品信号中无法被PCA模型解释的残差变异[13]。基于统计置信水平设定控制限：若样品统计值低于控制限，判定为正常批次；超出控制限则视为异常批次。本研究设置两类限度：（1）99%置信水平控制限T^2_{Crit}（99%），上限为16.631；DMod$X$控制限D_{Crit}（0.05），上限为1.578。（2）95%置信水平警戒线T^2_{Crit}（95%），上限为9.026[13]。采用SIMCA 14.1软件计算每批样品的Hotelling's T^2值和DMod$X$值。结果（图6，图中横线为对应限度的临界值）显示，12批LFP样品的Hotelling's T^2值和DMod$X$值均在控制限内，表明所有样品在PCA模型空间内无显著离群，批间一致性良好。



A. Hotelling's T^2控制图　　B. DMod$X$控制图

图6　12批LFP样品的Hotelling's T^2和DMod$X$控制图

2.2.4　OPLS-DA

将12批样品的26个共有峰峰面积数据导入SIMCA 14.1软件进行OPLS-DA分析。结果显示，该模型的RX^2为0.624，RY^2为0.578，Q^2为0.631，均大于0.5，表明该模型稳定可靠，有较好的预测能力。以变量重要性投影（variable importance in projection，VIP）值＞1为标准筛选差异性成分[14]。结果显示，人参皂苷Rg_1（峰8）、人参皂苷Rb_1（峰15）、峰20、士的宁（峰3）、峰11、三七皂苷R_1（峰7）、峰2、峰17、峰13、峰10、人参皂苷Rd（峰18）、峰23、峰26、峰21、峰24的VIP值均大于1。结果见图7。

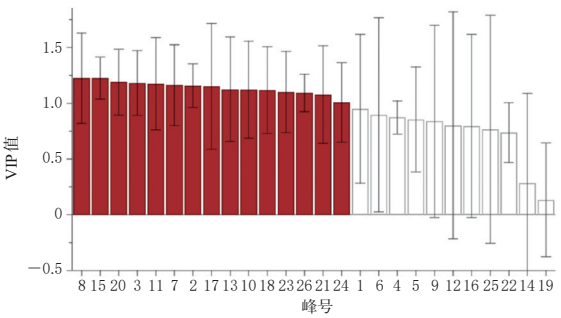


图7　26个共有峰的VIP值

2.3　多成分含量测定

2.3.1　溶液的制备

（1）混合对照品溶液：制备方法同“2.1.1（1）”项。

（2）供试品溶液：制备方法同“2.1.1（2）”项。

（3）阴性样品溶液：按LFP处方和工艺分别制备缺三七、缺马钱子、缺甘草的阴性样品。取缺三七、缺马钱子、缺甘草的阴性样品，分别按“2.1.1（2）”项下方法制成各阴性样品溶液。

2.3.2　色谱条件

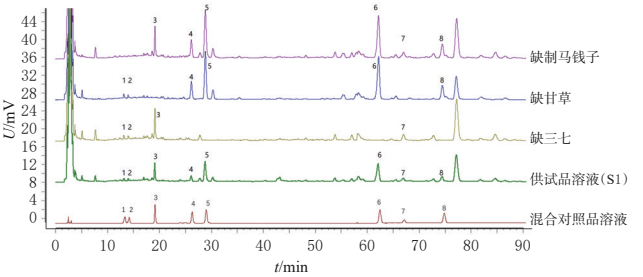
以XTERRA® Phenyl（4.6 mm×250 mm，5 μm）为色谱柱，以0.1%甲酸溶液（A）-乙腈（B）为流动相进行梯度洗脱（0～5 min，10%B；5～15 min，10%B→19%B；15～35 min，19%B→22%B；35～45 min，22%B→26%B；45～75 min，26%B→31%B；75～90 min，31%B）；流速为1.0 mL/min；柱温为30 ℃；进样量为20 μL；雾化器温度为40 ℃；采集频率为2 Hz；过滤常数为5.0 s。

2.3.3　专属性考察

分别吸取上述混合对照品溶液、供试品溶液（编号S1）、各阴性样品溶液及80%甲醇（空白溶剂），按“2.3.2”项下色谱条件进样测定。结果（图8）显示，供试品溶液在与对照品溶液保留时间相应位置处出现相同色谱峰；各峰分离度良好，且阴性样品及空白溶剂对测定无干扰。

2.3.4　线性关系考察

精密吸取“2.3.1（1）”项下混合对照品溶液，分别取5、10、15、20、25、30、35、40 μL，按“2.3.2”项下色谱条件进样测定，记录峰面积。以各成分质量（X）为横坐标、峰面积（Y）为纵坐标进行线性回归。结果见表2。



1：士的宁；2：马钱子碱；3：甘草苷；4：三七皂苷R_1；5：人参皂苷Rg_1；6：人参皂苷Rb_1；7：甘草皂苷G_2；8：人参皂苷Rd。

图8　8种成分定量分析专属性考察的HPLC色谱图

表2　8种成分定量分析的回归方程与线性范围

成分	回归方程	r	线性范围/μg
士的宁	Y=3.473 8X+0.077 1	0.999 1	0.099 75～0.798
马钱子碱	Y=2.765 7X+0.095 2	0.999 2	0.108 00～0.864
甘草苷	Y=2.501 9X+0.303 4	0.999 0	0.266 75～2.134
三七皂苷R_1	Y=3.141 9X+0.345 7	0.999 1	0.178 75～1.430
人参皂苷Rg_1	Y=2.815 4X+0.470 2	0.999 1	0.260 25～2.082
人参皂苷Rb_1	Y=3.185 5X+0.837 8	0.999 2	0.253 50～2.028
甘草皂苷G_2	Y=2.974 4X+0.030 9	0.999 4	0.084 75～0.678
人参皂苷Rd	Y=4.173 1X+0.414 7	0.999 1	0.170 5～1.364

2.3.5　精密度试验

取“2.3.1（2）”项下供试品溶液（编号S1），按“2.3.2”项下色谱条件连续进样6次，记录峰面积。结果显示，士的宁、马钱子碱、甘草苷、三七皂苷R_1、人参皂苷Rg_1、人参皂苷Rb_1、甘草皂苷G_2、人参皂苷Rd峰面积的RSD分别为0.07%、0.15%、0.43%、0.92%、1.28%、1.67%、0.31%、1.54%（n=6），表明方法精密度良好。

2.3.6　稳定性试验

取“2.3.1（2）”项下供试品溶液（编号S1），分别于室温下放置0、3、6、9、12、24 h时，按“2.3.2”项下色谱条件进样测定，记录峰面积。结果显示，士的宁、马钱子碱、甘草苷、三七皂苷R_1、人参皂苷Rg_1、人参皂苷Rb_1、甘草皂苷G_2、人参皂苷Rd峰面积的RSD分别为2.14%、2.89%、1.95%、3.42%、2.63%、0.27%、0.83%、4.71%（n=6），表明供试品溶液在室温下放置24 h内稳定性良好。

2.3.7　重复性试验

取LFP样品（编号S1）适量，按“2.3.1（2）”项下方法平行制备6份供试品溶液，按“2.3.2”项下色谱条件进样测定，记录峰面积并按回归方程计算含量。结果显示，士的宁、马钱子碱、甘草苷、三七皂苷R_1、人参皂苷Rg_1、人参皂苷Rb_1、甘草皂苷G_2、人参皂苷Rd含量的RSD分别为2.14%、1.72%、2.12%、0.95%、2.67%、1.31%、2.59%、2.08%（n=6），表明该方法重复性良好。

2.3.8　加样回收率试验

取已知含量的LFP样品（编号S1），共9份，每份1.0 g，精密称定，置于20 mL具塞锥形瓶中，分别加入相当于待测成分含量80%、100%、120%的单一对照品，按“2.3.1（2）”项下方法制备供试品溶液，按“2.3.2”项下色

谱条件进样测定，记录峰面积并计算加样回收率。结果显示，士的宁、马钱子碱、甘草苷、三七皂苷R_1、人参皂苷Rg_1、人参皂苷Rb_1、甘草皂苷G_2、人参皂苷Rd的平均加样回收率分别为98.35%、97.32%、100.56%、101.38%、96.34%、96.93%、99.55%、100.37%，RSD分别为2.04%、2.76%、2.79%、1.98%、2.38%、2.85%、2.94%、2.53%（n=9）。

2.3.9　样品含量测定

取12批LFP样品（编号S1～S12），按“2.3.1（2）”项下方法制备供试品溶液，按“2.3.2”项下色谱条件进样测定，记录峰面积并按回归方程计算含量，每批样品平行测定3次，取平均值。结果见表3。

表3　12批样品中8种成分的含量测定结果（n=3，%）

编号	士的宁	马钱子碱	甘草苷	三七皂苷R_1	人参皂苷Rg_1	人参皂苷Rb_1	甘草皂苷G_2	人参皂苷Rd	生物碱总量	甘草皂苷总量	三七皂苷总量
S1	0.007	0.006	0.082	0.045	0.178	0.162	0.033	0.029	0.013	0.115	0.414
S2	0.011	0.010	0.118	0.073	0.248	0.242	0.043	0.048	0.021	0.161	0.611
S3	0.011	0.006	0.082	0.035	0.185	0.180	0.043	0.029	0.017	0.125	0.429
S4	0.005	0.008	0.050	0.057	0.132	0.122	0.029	0.016	0.013	0.079	0.327
S5	0.008	0.009	0.089	0.066	0.186	0.156	0.040	0.018	0.017	0.129	0.426
S6	0.010	0.007	0.110	0.057	0.167	0.189	0.034	0.035	0.017	0.144	0.448
S7	0.011	0.008	0.099	0.054	0.134	0.196	0.027	0.041	0.019	0.126	0.425
S8	0.007	0.009	0.078	0.068	0.165	0.147	0.032	0.027	0.016	0.110	0.407
S9	0.009	0.006	0.086	0.071	0.155	0.156	0.035	0.033	0.015	0.121	0.415
S10	0.018	0.008	0.102	0.046	0.189	0.168	0.039	0.028	0.026	0.141	0.431
S11	0.006	0.005	0.068	0.033	0.145	0.185	0.021	0.035	0.011	0.089	0.398
S12	0.012	0.006	0.108	0.048	0.167	0.202	0.022	0.019	0.018	0.130	0.436

注：生物碱总量为士的宁和马钱子含量之和；甘草皂苷总量为甘草苷和甘草皂苷G_2含量之和；三七皂苷总量为三七皂苷R_1、人参皂苷Rg_1、人参皂苷Rb_1和人参皂苷Rd含量之和。

3　讨论

3.1　指纹图谱的色谱条件考察

LFP含有三萜皂苷、甾体皂苷、生物碱、黄酮、氨基酸、苯丙素、挥发油等多种成分[15－18]，其中皂苷、生物碱、氨基酸等成分由于缺乏紫外吸收基团，无法采用紫外检测器检测。为了尽可能表征LFP的整体化学成分，本研究选用HPLC-CAD技术，其响应不依赖化合物的发色基团，可实现对无/弱紫外吸收成分的有效检测。

本课题组前期曾尝试使用十八烷基硅烷键合硅胶色谱柱对LFP样品中多指标成分进行分离，但部分成分（士的宁和马钱子碱）存在共洗脱或分离度不足的问题。在更换为苯基柱后，利用其π-π相互作用的独特选择性，提升了不同结构类型成分的选择性差异，有效解决了多组分共流出问题，最终实现全部指标成分的基线分离[19]。同时，为获得完整、稳定的样品前处理方法，本研究对不同提取方式（超声提取、加热回流提取）、提取溶剂（30%甲醇、50%甲醇、70%甲醇、甲醇）、提取时间（0.5、1.0、1.5、2.0 h）进行了考察。结果显示，以50%甲醇超声提取1 h时，检出26个共有色谱峰；以30%甲醇提取时，仅检出20个共有峰，极性偏弱成分提取不足；以70%甲醇及甲醇提取时，部分强极性共有峰信号较弱；加热回流提取则易造成部分成分降解，共有峰数量下降；提取时间不足1 h时提取不完全，超过1 h后峰面积无明显提升且耗时增加。最终综合共有峰数量、分离度与稳定性，最终确定以50%甲醇超声提取1 h。随后，本课题组又对不同流动相（乙腈-水、甲醇-水、乙腈-0.1%甲酸溶液、甲醇-0.1%甲酸溶液）进行了考察。结果显示，以乙腈-0.1%甲酸溶液为流动相进行梯度洗脱时，可有效改善色谱峰拖尾及展宽。针对CAD关键参数，本课题组考察了不同雾化器温度（40、60、80 ℃）。结果显示，当雾化器温度为40 ℃时，可在维持各成分良好峰形与分离度的基础上，显著提升色谱图的整体信息量。

3.2　指纹图谱的化学计量学结果分析

指纹图谱结果显示，12批LFP样品共标定26个共有峰，并指认出士的宁、马钱子碱、三七皂苷R_1、人参皂苷Rg_1、人参皂苷Rb_1、人参皂苷Rd、甘草苷及甘草皂苷G_2。12批样品的相似度均大于0.90，表明样品具有基本的工艺稳定性与化学一致性。HCA、PCA结果显示，12批样品可分为2类，提示尽管样品的整体相似度高，但不同批次间仍存在一定的质量差异，可能与不同批次投料药材的基源、产地或前期处理差异有关。OPLS-DA进一步显示，导致质量差异的主要标志性成分包括士的宁（峰3）、三七皂苷R_1（峰7）、人参皂苷Rg_1（峰8）、人参皂苷Rb_1（峰15）、甘草皂苷G_2（峰17）、人参皂苷Rd（峰18）等已知成分及多个尚未指认的色谱峰（峰2、峰20、峰11、峰13等）。这些已指认的成分主要来源于方中制马钱子、三七、甘草，其含量波动可能直接影响制剂的整体药效与安全性。

3.3　多成分含量测定结果分析

制马钱子为LFP组方中的毒性药材，其指标性成分士的宁和马钱子碱兼具药效与毒性双重属性，且治疗剂量与中毒剂量窗口极窄，是制约制剂使用安全的关键质控指标[20]。本研究所用制马钱子均经规范砂烫法炮制，严格控制炮制参数，成品各项指标均符合2025年版《中国药典》（一部）规定[21]，可有效保障原料安全。从给药剂量分析，每粒9 g的LFP样品中含制马钱子0.15 g，临床常规日服用剂量为2粒，即每日制马钱子饮片摄入总量为0.30 g，该总量位于2025年版《中国药典》（一部）规定的制马钱子0.3～0.6 g安全范围内[21]。含量测定结果显示，士的宁、马钱子碱含量分别为0.005%～0.018%、0.005%～0.010%，整体含量处于较低水平，远低于制马钱子原料药法定限值。此外，不同批次间LFP中士的宁、马钱子碱含量相差近2倍，虽未超出安全阈值，但仍存在药效不均、潜在毒性超标的风险。这提示实际生产

中需统一规范马钱子炮制工艺，强化原料与成品生物碱含量抽检，减少批次差异，以保障制剂安全有效。

三七为LFP的主要功效药材之一，2025年版《中国药典》（一部）以三七皂苷R_1、人参皂苷Rg_1、人参皂苷Rb_1三者总含量不得少于6.0%作为质控标准[21]。本研究发现，人参皂苷Rd在三七中含量较高，且分离良好、无阴性干扰，因此将其纳入三七多指标成分体系。结果显示，12批LFP中三七皂苷总量为0.327%～0.611%，批次间含量存在一定波动，推测主要与三七原药材的产地、采收期、贮存方式差异及制剂加工工艺参数波动相关[22]。甘草苷和甘草皂苷G_2来源于甘草，2025年版《中国药典》（一部）甘草项下规定甘草苷不得少于0.50%、甘草酸不得少于1.8%[21]。然而，本研究中并未检出甘草酸，这可能是LFP中含有的生物碱成分与酸性成分发生相互作用而出现转化[23]。12批LFP中，甘草苷含量为0.050%～0.118%，甘草皂苷G_2含量为0.021%～0.043%，其含量差异可能源于甘草原药材质量及LFP制剂工艺等因素的影响。

综上所述，所建HPLC指纹图谱和含量测定方法的准确性、重复性均较好，可用于LFP的质量评价；人参皂苷Rg_1、人参皂苷Rb_1、士的宁、三七皂苷R_1、人参皂苷Rd可能是影响制剂整体质量的差异性成分。

利益冲突　本文所有作者声明不存在利益冲突

参考文献

[1] 张锡君，张大国. 中医治疗脑部胶质瘤（术后）临床观察[J]. 中医杂志，1990，31(8)：27-28.

[2] Gu B，Wang J P，Song Y Q，et al. The inhibitory effects of ginsenoside Rd on the human glioma U251 cells and its underlying mechanisms[J]. J Cell Biochem，2019，120(3)：4444-4450.

[3] 吴雨珂，段兆达，徐冬垚，等. 人参皂苷Rg_1经JAK2/STAT3通路调控BV2小胶质细胞活化的机制研究[J]. 细胞与分子免疫学杂志，2025，41(12)：1065-1073.

[4] 胡立荣，陈文芳，郑洋洋. 人参皂苷Rg_1对TGF-β_1诱导的星形胶质细胞反应性特性及细胞表型的影响[J]. 青岛大学学报（医学版），2025，61(3)：345-349.

[5] Xie H，Jiang Y Y，Xiang Y F，et al. Super-enhancer-driven LIF promotes the mesenchymal transition in glioblastoma by activating ITGB2 signaling feedback in microglia[J]. Neuro Oncol，2024，26(8)：1438-1452.

[6] Wang X，Liu Y，Li J，et al. GPCR-Gs mediates the protective effects of ginsenoside Rb_1 against oxygen-glucose deprivation/re-oxygenation-induced astrocyte injury[J]. J Tradit Chin Med Sci，2024，11(1)：33-43.

[7] 喻浩恒. 甘草苷通过雌激素受体抑制小胶质细胞焦亡的作用和机制[D]. 新乡：新乡医学院，2020：21-24.

[8] Yang X，Xiao J H，Li X，et al. Based on network pharmacology and experiments to investigate the inhibitory effect of licoricesaponin G_2 on lung cancer tumor growth[J]. J Ethnopharmacol，2026，357：120950.

[9] Lu S，Wang X Z，He C，et al. ATF3 contributes to brucine-triggered glioma cell ferroptosis via promotion of hydrogen peroxide and iron[J]. Acta Pharmacol Sin，2021，42(10)：1690-1702.

[10] Reiser G，Günther A，Hamprecht B. Strychnine and local anesthetics block ion channels activated by veratridine in neuroblastoma X glioma hybrid cells[J]. FEBS Lett，1982，143(2)：306-310.

[11] Xie M J，Yu Y T，Zhu Z Y，et al. Simultaneous determination of six main components in Bushen huoxue prescription by HPLC-CAD[J]. J Pharm Biomed Anal，2021，201：114087.

[12] 唐亚男，张文丽，闫婕，等. 基于HPLC指纹图谱和一测多评法结合化学计量法的黄连须质量评价研究[J]. 中草药，2025，56(22)：8347-8356.

[13] 梅佳华，郝佳旭，程欣，等. 基于HPLC指纹图谱结合化学计量学及多成分定量测定的香果健消片质量评价[J]. 中草药，2025，56(2)：458-466.

[14] 廖嘉穗，付娟，张日美，等. 基于HPLC指纹图谱结合化学计量学及多成分定量测定的腰痹通胶囊质量评价研究[J]. 中草药，2024，55(8)：2579-2588.

[15] 石礼平，张国壮，刘丛盛，等. 三七化学成分和药理作用研究概况及质量标志物的预测[J]. 中国中药杂志，2023，48(8)：2059-2067.

[16] 乐颖娜，张金莲，钟凌云，等. 石菖蒲炮制的历史沿革、化学成分及神经药理作用研究进展[J]. 中草药，2025，56(11)：4115-4127.

[17] 李燕敏，关亮俊，陈两绵，等. 华重楼不同部位的UPLC-Q-TOF-MS/MS定性分析和HPLC含量测定[J]. 中国中药杂志，2021，46(12)：2900-2911.

[18] 邵长鑫，林欢欢，靳晓杰，等. 黄芪的炮制历史沿革及现代研究进展[J]. 中草药，2023，54(15)：5057-5074.

[19] 张雪蕊，王硕，任一鑫，等. 基于五氟苯基色谱柱液相色谱法测定苦参中生物碱和黄酮类成分[J]. 分析试验室，2025，44(12)：1802-1807.

[20] 张宏伟，林秀敏，王彦志，等. 不同炮制程度制马钱子毒性成分与色度变化研究[J]. 时珍国医国药，2024，35(3)：629-633.

[21] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典：一部[M]. 2025年版. 北京：中国医药科技出版社，2025：13，54，91.

[22] 莫伟，马恩耀，周劲松，等. 基于化学计量方法研究不同产地三七药材的质量[J]. 江西化工，2024，40(3)：36-39.

[23] 李晴晴，祝宇龙，杨蓓蓓，等. 基于指纹图谱和特征标志物的化学模式识别评价不同产地甘草质量差异[J]. 中草药，2026，57(13)：5235-5243.

（收稿日期：2026-05-19　修回日期：2026-10-14）

（本文责编：陈　宏）