

## 疏风解毒胶囊 HPLC 指纹图谱研究

曹 勇<sup>3</sup>, 郭 倩<sup>1</sup>, 田成旺<sup>2</sup>, 张铁军<sup>2\*</sup>, 任 涛<sup>2</sup>, 李翔宇<sup>3</sup>, 成娅婷<sup>4</sup>

1. 天津医科大学, 天津 300070

2. 天津药物研究院, 天津 300193

3. 安徽济人药业有限公司, 安徽 亳州 236800

4. 天津大学, 天津 300072

**摘要:** 目的 建立疏风解毒胶囊 (SJC) HPLC 指纹图谱分析方法, 为全面有效控制其质量提供依据。方法 采用 HPLC 法建立 SJC 指纹图谱, 色谱条件: Unitary C<sub>18</sub> 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 以乙腈-0.1%甲酸水溶液为流动相, 梯度洗脱, 体积流量 1.0 mL/min, 柱温 30 °C, 检测波长 250 nm, 进样量 10 μL; 对所建指纹图谱进行相似度分析及主成分分析 (PCA), 并对共有峰进行药材归属及成分指认。结果 建立了 SJC HPLC 指纹图谱共有模式, 确定了 22 个共有峰; 14 批 SJC 相似度在 0.915~0.977, PCA 表明前 3 个主成分代表了原始 HPLC 指纹图谱的主要信息; 在指纹图谱所标定的 22 个共有峰中, 8、12、13、14、15、16、21、22 号峰来自虎杖, 1、2、3、7、9、10 号峰来自连翘, 5、6、11 号峰来自马鞭草, 4 号峰来自败酱草, 18、19 号峰来自甘草, 17、20 号峰未能归属到具体药材; 通过质谱数据比对, 共指认出 16 个共有峰, 分别为 1 号峰 (连翘酯苷 E)、5 号峰 (戟叶马鞭草苷)、6 号峰 (马鞭草苷)、7 号峰 (5'-羟基连翘酯苷 A)、8 号峰 (虎杖苷)、9 号峰 (连翘苷)、10 号峰 (连翘酯苷 A)、11 号峰 (毛蕊花糖苷)、12 号峰 (异连翘酯苷 A)、13 号峰 (芦荟大黄素)、14 号峰 (大黄素-8-O-葡萄糖苷)、15 号峰 (大黄酸)、18 号峰 (甘草酸单铵盐)、19 号峰 (3-羟基光甘草酚)、21 号峰 (大黄素)、22 号峰 (大黄酚)。结论 首次建立了 SJC HPLC 指纹图谱分析方法, 该法操作简单、准确, 精密度高、重复性好, 可较全面地反映 SJC 中化学成分的信息, 为 SJC 质量控制提供了可靠的科学依据。

**关键词:** 疏风解毒胶囊; HPLC; 指纹图谱; 质量控制; 药材归属; 成分指认; 主成分分析; 虎杖; 连翘; 马鞭草; 败酱草; 甘草; 连翘酯苷 E; 戟叶马鞭草苷; 马鞭草苷; 5'-羟基连翘酯苷 A; 虎杖苷; 连翘苷; 连翘酯苷 A; 毛蕊花糖苷; 异连翘酯苷 A; 芦荟大黄素; 大黄素-8-O-葡萄糖苷; 大黄酸; 甘草酸单铵盐; 3-羟基光甘草酚; 大黄素; 大黄酚

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2016)12-2034-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.12.003

## HPLC fingerprint of Shufeng Jiedu Capsule

CAO Yong<sup>3</sup>, GUO Qian<sup>1</sup>, TIAN Cheng-wang<sup>2</sup>, ZHANG Tie-jun<sup>2</sup>, REN Tao<sup>2</sup>, LI Xiang-yu<sup>3</sup>, CHENG Ya-ting<sup>4</sup>

1. Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China

2. Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

3. Anhui Jiren Pharmaceutical Co., Ltd., Bozhou 236800, China

4. Tianjin University, Tianjin 300072, China

**Abstract: Objective** To establish an HPLC method for the fingerprint analysis of Shufeng Jiedu Capsule (SJC), so as to provide evidence for the quality control of it. **Methods** HPLC method was applied with the chromatographic condition as follows: The chromatographic column was Unitary C<sub>18</sub> column (200 mm×4.6 mm, 5 μm), acetonitrile-0.1% formic acid as the mobile phase with gradient elution, the flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelength was 250 nm, the column temperature was 30 °C, and the injection volume was 10 μL. The HPLC fingerprint of SJC was analyzed with similarity analysis and principal component analysis (PCA) method. **Results** The fingerprint chromatography included 22 mutual peaks, of which eight mutual peaks from *Polygonum cuspidatum*, six mutual peaks from *Forsythia suspensa*, three mutual peaks from *Verbena officinalis*, two mutual peaks from *Glycyrrhiza uralensis*, and one mutual peak from *Thlaspi arvense*. The similarity among 14 batches was more than 0.9. Based on the

收稿日期: 2016-02-18

作者简介: 郭倩 (1991—), 女, 甘肃庆阳人, 硕士研究生, 主要从事中药质量控制研究。Tel: (022)23006845 E-mail: grq1413@163.com

\*通信作者 张铁军, 研究员, 主要研究方向为中药新药的研究与开发。Tel: (022)23006848 E-mail: zhangtj@tjipr.com

HPLC-MS<sup>2</sup> data, 16 components were identified, which were forsythosid E, hastatoside, verbenalin, 5'-hydroxy-forsythiaside A, polydatin, phillyrin, forsythosid A, acteoside, iso-forsythosid A, aloe-emodin, emodin-8-*O*-grapeglycosides, parietic acid, monoammonium glycyrrhizinate, 3-hydroxyglabrol, emodin, and chrysophanol. **Conclusion** It is the first time to establish the HPLC fingerprint of SJC. The method is simple, accurate, and reproducible, which could reflect the chemical composition information of SJC comprehensively and provide scientific evidence for the quality control.

**Key words:** Shufeng Jiedu Capluse; HPLC; fingerprint; quality control; medicinal attribute; component identification; principal component analysis; *Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc.; *Forsythia suspensa* (Thunb.) Vahl; *Verbena officinalis* L.; *Thlaspi arvense* Linn.; *Glycyrrhiza uralensis* Fisch.; forsythosid E; hastatoside; verbenalin; 5'-hydroxy-forsythiaside A; polydatin; phillyrin; forsythosid A; acteoside; iso-forsythosid A; aloe-emodin; emodin-8-*O*-grapeglycosides; parietic acid; monoammonium glycyrrhizinate; 3-hydroxyglabrol; emodin; chrysophanol

疏风解毒胶囊 (SJC) 是由虎杖、连翘、板蓝根、马鞭草、败酱草、柴胡、芦根、甘草 8 味药材组成的中药复方制剂, 用于急性上呼吸道感染属风热证, 症见发热、恶心、咽痛、头痛、鼻塞、流涕、咳嗽等。体内外实验研究表明, SJC 具有抗流感病毒<sup>[1]</sup>、肠道病毒<sup>[2]</sup>及其他呼吸道病毒<sup>[3]</sup>的作用, 还具有保护急性肝损伤<sup>[4]</sup>及病毒性心肌炎<sup>[5]</sup>的作用, 并具有抗菌、抗炎作用<sup>[6]</sup>, 该药经多年临床实践与应用, 疗效确切<sup>[7-10]</sup>。

SJC 药味多、化学成分复杂, 方中多种成分已有明确的药理活性, 而现有的质量标准仅制定了采用薄层扫描法测定虎杖中大黄素的量<sup>[11]</sup>, 难以有效地控制药品的内在质量。本课题组前期已建立了 HPLC 法同时测定 SJC 中 7 种活性成分的方法<sup>[12]</sup>, 本研究将利用 HPLC 法进行 SJC 指纹图谱研究, 为 SJC 质量控制提供参考和依据。

## 1 仪器与材料

Agilent1100-高效液相色谱仪, 美国安捷伦公司, 配置自动进样器、柱温箱、UV 检测器、Agilent 1100 色谱工作站; Sartorius BT25S 型电子天平 (十万分之一), 赛多利斯科学仪器 (北京) 有限公司; 色谱柱为 Unitary C<sub>18</sub> 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 浙江华谱新创科技有限公司; Mettler Toledo AB204-N 型电子天平 (万分之一), 梅特勒-托利多仪器 (上海) 有限公司; AS3120 超声仪, 美国 Autoscience 公司。

14 批 SJC, 由安徽济人药业有限公司提供, 批号分别为 140301、140203、140204、140105、140206、140207、140208、140209、140210、140211、140212、140213、140214、140215, 分别编号为 S1~S14。乙腈 (色谱纯)、乙醇 (分析纯), 天津市康科德科技有限公司; 甲酸, 分析纯, 天津市光复科技发展有限公司; 去离子水。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

Unitary C<sub>18</sub> 色谱柱 (200 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-0.1%甲酸水溶液, 梯度洗脱: 0~65 min, 10%~30%乙腈; 65~105 min, 30%~80%乙腈; 105~107 min, 80%~10%乙腈; 107~120 min, 10%乙腈; 体积流量 1.0 mL/min; 检测波长 250 nm; 柱温 30 °C; 进样量 10 μL。

### 2.2 供试品溶液的制备

取 SJC 内容物 1.0 g, 精密称定, 置于 100 mL 圆底烧瓶中, 加入 50 mL 70%乙醇水溶液, 称定质量, 回流提取 2 h, 冷却后称定质量, 用 70%乙醇溶液补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液作为供试品溶液。

### 2.3 精密度试验

精密吸取同一供试品溶液 (S8), 连续进样 6 次, 按“2.1”项下方法测定。结果各共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 分别为 0.01%~0.39%、0.85%~2.64%, 表明本方法精密度良好。

### 2.4 重复性试验

取 SJC 样品 (S8) 6 份, 按“2.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下方法进样测定。结果各共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 分别为 0.06%~0.29%和 1.33%~2.82%, 表明本方法重复性良好。

### 2.5 稳定性试验

取同一供试品溶液 (S8), 室温放置, 分别于 0、4、8、12、24 h, 按“2.1”项下方法进样测定。结果各共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 分别为 0.17%~0.97%和 0.25%~2.47%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

### 2.6 SJC 指纹图谱的建立及相关技术参数分析

**2.6.1 指纹图谱的建立及相似度分析** 根据 14 批

SJC 检测所得图谱, 标定 22 个共有峰, 采用国家药典颁布的“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”2012 年版进行分析, 以中位数法建立对照指纹图谱, 见图 1。对 14 批样品进行相似度计算, 结果 S1~S14 的相似度分别为 0.920、0.974、0.951、0.960、0.972、0.974、0.952、0.977、0.974、0.960、0.915、0.919、0.920、0.962。结果表明不同批次的 SJC 之间相似性良好, 质量稳定。

**2.6.2 SJC 指纹图谱主成分分析 (PCA)** 采用 SPSS 21.0 软件对 14 批 SJC 指纹图谱的 22 个共有峰峰面积做标准化处理, 再对其进行运算, 主成分个数的提取原则为主成分对应的特征值大于 1 的前 *m* 个主成分。表 1 结果表明, 前 4 个主成分的累积贡献率可达 92.28%, 包含了大部分信息。其中, 第 1 主成分特征值为 10.92, 贡献率为 49.64%; 第 2 主成分特征值为 6.66, 贡献率为 30.26%; 第 3 主成分特征值为 1.54, 贡献率为 6.98%; 第 4 主成分特征值为 1.19, 贡献率为 5.40%。由因子负荷矩阵表

(表 2) 可以看出, 第 1 主成分主要反映了来自色谱峰 1、6~20 的信息, 第 2 主成分主要反映了来自色谱峰 3~5、21、22 的信息, 第 3 主成分主要反映了来自色谱峰 2 的信息。前 3 个主成分代表了原始 HPLC 指纹图谱的主要信息。

**2.6.3 主要色谱峰的药材归属** 取虎杖药材、连翘药材、败酱草药材、马鞭草药材、甘草药材粉末(过三号筛)各约 1.0 g, 精密称定置具塞锥形瓶内, 加 50%甲醇超声处理 30 min, 取续滤液, 过 0.45 μm 微孔滤膜, 即得。

另按照 SJC 处方及制备工艺依次制备缺虎杖、缺连翘、缺败酱草、缺马鞭草、缺甘草阴性样品, 按“2.2”项下方法制得各阴性供试品溶液。

按“2.1”项下色谱条件进样分析, 得到如图 2 所示各样品色谱峰, 通过保留时间和各样品比对分析, 指纹图谱中标定的 22 个共有峰中, 8、12、13、14、15、16、21、22 号峰来自于虎杖, 1、2、3、7、9、10 号峰来自于连翘, 5、6、11 号峰来自于马鞭

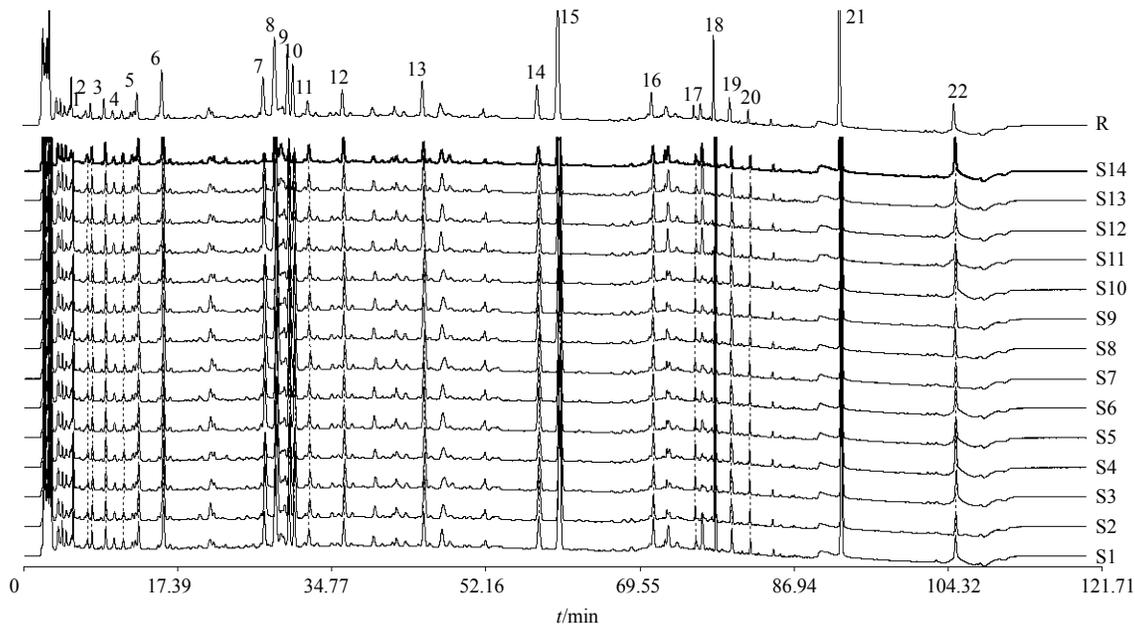


图 1 14 批 SJC HPLC 指纹图谱及对照指纹图谱 (R)

Fig. 1 HPLC fingerprints and control fingerprint (R) for 14 batches of SJC

表 1 特征值与贡献率

Table 1 Characteristic value and contribution rate

成分	特征值	贡献率/%	累积贡献率/%	成分	特征值	贡献率/%	累积贡献率/%	成分	特征值	贡献率/%	累积贡献率/%
1	10.920	49.637	49.637	5	0.516	2.347	94.624	9	0.133	0.603	99.710
2	6.656	30.257	79.894	6	0.451	2.051	96.674	10	0.064	0.290	100.000
3	1.537	6.985	86.879	7	0.331	1.503	98.177	11	$4.437 \times 10^{-16}$	$2.017 \times 10^{-15}$	100.000
4	1.188	5.398	92.276	8	0.205	0.930	99.108				

表 2 因子负荷矩阵  
Table 2 Component matrix

色谱峰	主成分				色谱峰	主成分				色谱峰	主成分			
	1	2	3	4		1	2	3	4		1	2	3	4
1	0.704	-0.535	0.360	0.273	9	0.842	-0.482	-0.132	-0.023	17	0.822	0.536	-0.061	0.129
2	0.524	-0.374	0.690	0.297	10	0.837	-0.481	-0.134	-0.044	18	0.720	0.571	0.139	0.265
3	0.477	0.694	-0.305	0.092	11	0.717	0.535	-0.217	-0.148	19	0.788	0.356	-0.150	0.097
4	0.286	0.861	0.088	-0.155	12	0.587	0.405	0.304	-0.543	20	0.625	0.484	-0.292	0.038
5	0.507	0.740	0.396	-0.043	13	0.937	-0.283	-0.058	-0.059	21	-0.310	0.911	0.128	0.129
6	0.638	0.532	0.326	-0.366	14	0.918	-0.217	0.061	-0.161	22	-0.118	0.860	-0.261	0.362
7	0.692	-0.568	-0.274	-0.312	15	0.879	-0.442	-0.066	0.063					
8	0.916	-0.225	-0.291	0.106	16	0.886	-0.150	0.076	0.386					

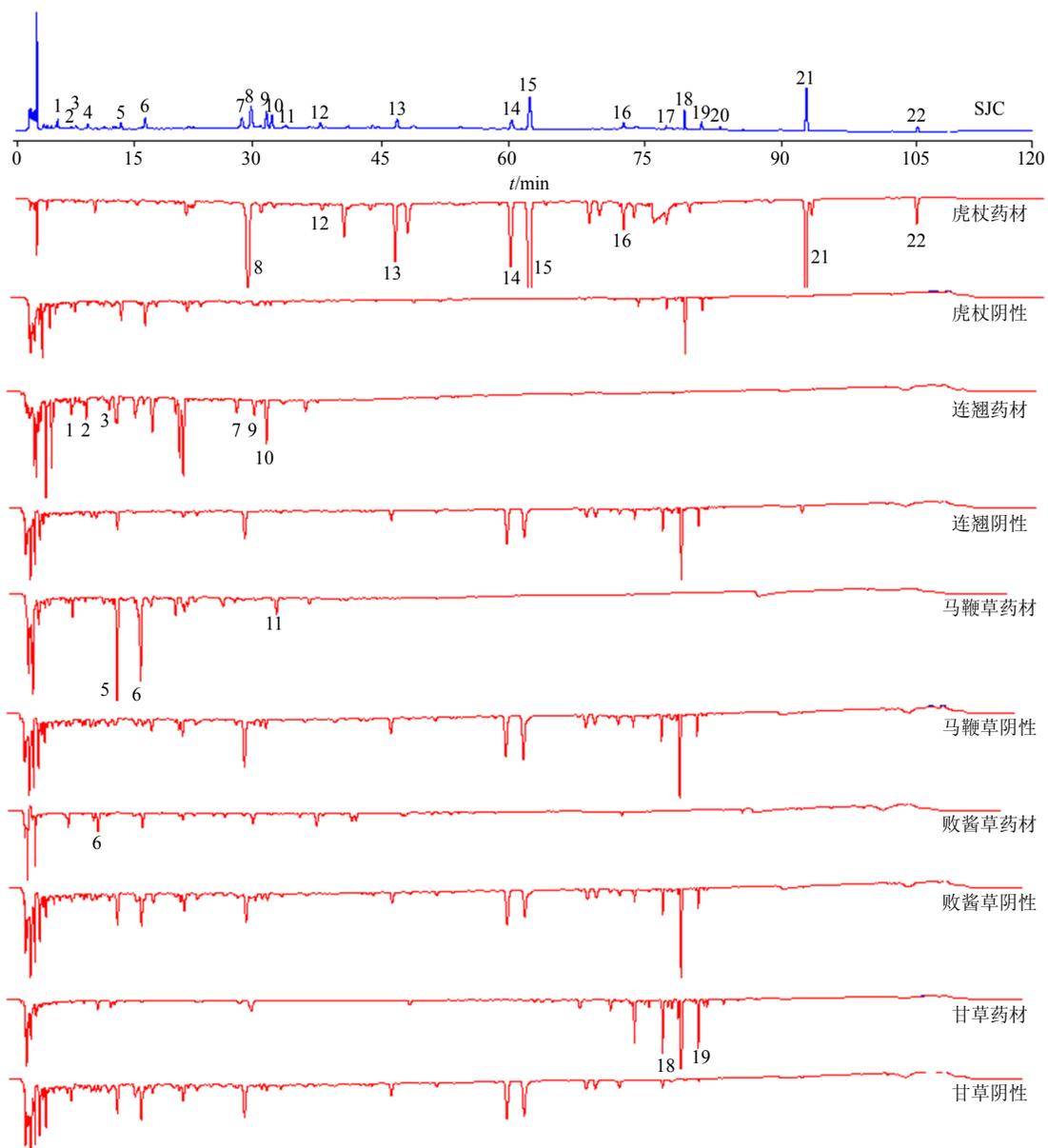


图 2 SJC 指纹图谱中各共有峰归属色谱图  
Fig. 2 HPLC of each common peak attribution in fingerprint of SJC

草, 4 号峰来自于败酱草, 18、19 号峰来自于甘草, 17、20 号峰未能归属到药材。

**2.6.4 主要色谱峰的成分指认** 利用 HPLC-MS<sup>n</sup> 方法对 SJC 指纹图谱中各色谱峰进行检测, 在对相关

质谱数据进行数据分析和参照相关文献<sup>[13]</sup>的基础上, 对其中的 16 个主要色谱峰进行了结构鉴定和成分指认, 相关实验数据及结果见表 3。

HPLC-MS<sup>n</sup> 分析条件: Thermo Fishier LCQ

表 3 SJC 指纹图谱主要色谱峰的指认结果<sup>[10]</sup>

Table 3 Identification results of main peaks in SJC fingerprint

峰号	$t_R$ /min	质谱数据	分子式	相对分子质量	鉴定结果
1	7.281	463 [M+H] <sup>+</sup>	C <sub>20</sub> H <sub>30</sub> O <sub>12</sub>	462.451 0	连翘酯苷 E
5	13.040	243 [M+H-Glu] <sup>+</sup>	C <sub>17</sub> H <sub>24</sub> O <sub>11</sub>	404.371 0	戟叶马鞭草苷
6	15.848	227 [M+H-Glu] <sup>+</sup> , 195 [M+H-Glu-CH <sub>4</sub> O] <sup>+</sup>	C <sub>17</sub> H <sub>24</sub> O <sub>10</sub>	388.371 6	马鞭草苷
7	27.324	641 [M+H] <sup>+</sup>	C <sub>29</sub> H <sub>36</sub> O <sub>16</sub>	640.196 2	羟基化连翘酯苷 A
8	28.659	391 [M+H] <sup>+</sup>	C <sub>20</sub> H <sub>22</sub> O <sub>8</sub>	390.383 9	虎杖苷
9	30.060	557 [M+Na] <sup>+</sup> , 355 [M+H-Glu] <sup>+</sup>	C <sub>27</sub> H <sub>34</sub> O <sub>11</sub>	534.560 4	连翘苷
10	30.648	643 [M+H <sub>2</sub> O+H] <sup>+</sup>	C <sub>29</sub> H <sub>36</sub> O <sub>15</sub>	624.595 8	连翘酯苷 A
11	32.343	643 [M+H <sub>2</sub> O+H] <sup>+</sup>	C <sub>29</sub> H <sub>36</sub> O <sub>15</sub>	624.595 8	毛蕊花糖苷
12	36.230	643 [M+H <sub>2</sub> O+H] <sup>+</sup> , 625 [M+H] <sup>+</sup>	C <sub>29</sub> H <sub>36</sub> O <sub>15</sub>	624.595 8	异连翘酯苷 A
13	45.268	271 [M+H] <sup>+</sup>	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	270.236 9	芦荟大黄素
14	58.174	433 [M+H] <sup>+</sup>	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>20</sub>	432.110 4	大黄素-8- <i>O</i> -葡萄糖苷
15	60.562	285 [M+H] <sup>+</sup>	C <sub>15</sub> H <sub>8</sub> O <sub>6</sub>	284.220 4	大黄酸
18	78.012	841 [M+H] <sup>+</sup>	C <sub>42</sub> H <sub>65</sub> NO <sub>16</sub>	839.962 6	甘草酸单铵盐
19	79.813	409 [M+H] <sup>+</sup>	C <sub>25</sub> H <sub>28</sub> O <sub>5</sub>	408.494 3	3-羟基光甘草酚
21	92.305	271 [M+H] <sup>+</sup> , 243 [M+H-CO] <sup>+</sup>	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	270.241 4	大黄素
22	105.207	255 [M+H] <sup>+</sup>	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	254.230 4	大黄酚

Advantage Max 离子阱液质联用仪。Nitary C<sub>18</sub> 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-0.1%甲酸水溶液; 检测波长 250 nm; 体积流量 1 mL/min; 柱温 30 °C; 进样体积 5 μL。流动相梯度为 0~65 min, 10%~30%乙腈; 65~105 min, 30%~80%乙腈; 105~107 min, 80%~10%乙腈; 107~120 min, 10%~10%乙腈。离子化模式为 ESI; 离子检测模式为全扫描; 分析模式为正离子模式; 采集范围为  $m/z$ : 100~1 000; 毛细管温度为 250 °C; 喷雾电压为 4.5 kV; 毛细管电压为 25 V; 鞘气体积流量为 3.5 L/min; 辅助气体积流量为 2.0 L/min。

### 3 讨论

本实验考察对比了不同的流动相系统, 包括甲醇-水、乙腈-水、甲醇-0.1%甲酸水溶液、乙腈-0.1%甲酸水溶液, 结果表明, 以乙腈-0.1%甲酸水溶液体系为流动相, 采用梯度洗脱方法, 能够达到较好的洗脱效果, 各色谱峰的峰形和分离度较好, 故选用乙腈-0.1%甲酸水溶液作为流动相系统。

利用 DAD 检测器对供试品溶液在 200~400

nm 进行全波长扫描, 并分析比较在 230、250、330 nm 波长下 HPLC 色谱图, 结果显示在 250 nm 波长下色谱峰信息较多, 基线平稳, 因此选择 250 nm 为检测波长。

本实验通过对比分析供试品溶液 HPLC 色谱图优选了供试品溶液制备方法, 分别对提取方式、提取溶剂、提取时间、提取次数进行逐个考察, 结果表明, 采用 70%乙醇回流提取 2 h 时, 供试品色谱图中色谱峰数量较多, 提取收率较高, 故选择此法作为供试品溶液制备方法。

本实验建立了 SJC 的 HPLC 指纹图谱, 共标定了 22 个共有峰, 计算了 14 批 SJC 的相似度均大于 0.9, 表明不同批次 SJC 在化学成分组成上差异较小, 质量稳定。同时采用 HPLC-MS<sup>2</sup> 方法对其中主要色谱峰进行了药材归属和成分指认。

本实验所建立的方法操作简单、稳定性好、结果可靠, 能够全面反映 SJC 中多种成分的有无及成分间的比例, 将建立的 SJC 特征图谱用于其生产过程, 可为该产品提供更全面可靠的控制手段。

## 参考文献

- [1] 刘颖, 时瀚, 金亚宏, 等. 疏风解毒胶囊防治流感体内药效学研究 [J]. 世界中西医结合杂志, 2010, 5(2): 107-110.
- [2] 郭姗姗, 金亚宏, 王意忠, 等. 疏风解毒颗粒防治手足口病的体内外药效学研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(2): 206-209.
- [3] 吕伟伟, 朱童娜, 邱欢, 等. 疏风解毒胶囊抗病毒及抗菌的体外药效学实验研究 [J]. 中药新药与临床药理, 2013, 24(3): 234-238.
- [4] 薛明明, 高静琰, 陈东旭, 等. 疏风解毒胶囊对 *D*-氨基半乳糖/脂多糖诱导大鼠急性肝损伤保护作用 [J]. 中草药, 2015, 46(9): 1348-1353.
- [5] 张亚平, 陶振刚, 宋振举, 等. 疏风解毒胶囊对小鼠病毒性心肌炎模型的影响 [J]. 中草药, 2016, 47(1): 110-113.
- [6] 陶振钢, 高静炎, 薛明明, 等. 疏风解毒胶囊对于内毒素诱导大鼠急性肺损伤模型中 MARK/NF- $\kappa$ B 通路的抑制作用 [J]. 中华中医药杂志, 2014, 29(3): 911-915.
- [7] 奚肇庆, 周建中, 梅建强, 等. 疏风解毒胶囊治疗病毒性上呼吸道感染发热患者 130 例临床观察 [J]. 中医杂志, 2010, 51(5): 426-427.
- [8] 叶祥庆, 曾德志, 罗世芳, 等. 疏风解毒胶囊治疗感冒风热证临床观察 [J]. 安徽医药, 2013, 17(4): 664-666.
- [9] 胡蓉, 王丽华, 张珺珺, 等. 疏风解毒胶囊治疗急性咽炎风热证的临床观察 [J]. 药物评价研究, 2014, 37(5): 460-462.
- [10] 李文. 疏风解毒胶囊治疗小儿急性上呼吸道感染的疗效观察 [J]. 现代药物与临床, 2015, 30(9): 1140-1143.
- [11] 中国食品药品监督管理局标准 [S]. YB200652009. 2006.
- [12] 郭倩, 田成旺, 朱月信, 等. HPLC 法同时测定疏风解毒胶囊中 7 种活性成分 [J]. 中草药, 2015, 46(8): 1174-1177.
- [13] 吴寿金, 赵泰, 秦永祺. 现代中草药处方化学 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2002.