

## 散寒化湿颗粒 HPLC 特征图谱研究

于桂芳<sup>1,2,3</sup>, 胡军华<sup>1,2,3</sup>, 周 茹<sup>1,2,3</sup>, 周恩丽<sup>1,2,3</sup>, 戴翠红<sup>1,2,3</sup>, 李海波<sup>1,2,3</sup>, 章晨峰<sup>1,2,3</sup>, 王振中<sup>1,2,3</sup>, 王团结<sup>1,2,3\*</sup>, 肖 伟<sup>1,2,3\*</sup>

1. 中药制药过程与智能制造技术全国重点实验室, 江苏 连云港 222001
2. 江苏康缘药业股份有限公司, 江苏 连云港 222001
3. 中成药智能制造技术国家地方联合工程研究中心, 江苏 连云港 222001

**摘要:** 目的 建立散寒化湿颗粒 (Sanhan Huashi Granules, SHG) 的 HPLC 特征图谱, 并对全部特征峰进行化学成分指认和药材来源归属, 为其整体质量评价提供科学依据。方法 采用 Waters Atlantis T3 C<sub>18</sub> 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 以甲醇-0.1%磷酸水溶液为流动相进行梯度洗脱; 体积流量为 1.0 mL/min; 柱温为 30 °C; 检测波长为 250 nm, 建立 SHG 的 HPLC 特征图谱。采用 UHPLC-QTOF MS、NMR、对照品比对及定向分离技术对 10 个特征峰进行了准确的化学成分指认并归属处方药味来源, 并对 20 批制剂进行一致性评价。结果 建立了 SHG 的 HPLC 特征图谱, 10 个特征峰得到明确化学成分指认, 分别为腺嘌呤 (1 号峰)、尿苷 (2 号峰)、鸟苷 (3 号峰)、肌苷 (4 号峰)、5-羟甲基糠醛 (5 号峰)、木兰苷 A (6 号峰)、佛手酚-5-O-β-D-吡喃葡萄糖苷峰 (7 号峰)、紫花前胡苷 (8 号峰)、6'-O-(反式阿魏酰基)-紫花前胡苷 (9 号峰)、茴香酸对羟基苯乙酯 (10 号峰), 并归属了特征峰处方药味来源, 分别为 1 号峰归属于麻黄、苦杏仁、羌活、广藿香、苍术、白术、焦六神曲、焦麦芽、地龙、徐长卿、葶苈子, 2 号峰归属于厚朴、羌活、广藿香、佩兰、苍术、白术、地龙、徐长卿、葶苈子, 3 号峰归属于羌活、广藿香、地龙、徐长卿、葶苈子, 4 号峰归属于地龙, 5 号峰归属于焦三仙 (焦山楂、焦麦芽、焦六神曲), 6 号峰归属于厚朴, 7~10 号峰归属于羌活。20 批制剂均符合特征图谱的规定, 批间一致性良好。结论 所建立的 SHG 的 HPLC 特征图谱方法简便, 稳定性、重复性好, 初步描绘了 SHG 的整体化学成分特征, 为进一步提升其质量标准奠定了基础, 同时也可为其他经典名方质量标准研究提供参考。

**关键词:** 经典名方; 散寒化湿颗粒; HPLC; 特征图谱; 腺嘌呤; 尿苷; 鸟苷; 肌苷; 5-羟甲基糠醛; 木兰苷 A; 佛手酚-5-O-β-D-吡喃葡萄糖苷; 紫花前胡苷; 6'-O-(反式阿魏酰基)-紫花前胡苷; 茴香酸对羟基苯乙酯

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2023)13-4168-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.13.010

## HPLC characteristic chromatogram of Sanhan Huashi Granules

YU Gui-fang<sup>1,2,3</sup>, HU Jun-hua<sup>1,2,3</sup>, ZHOU Mao<sup>1,2,3</sup>, ZHOU En-li<sup>1,2,3</sup>, DAI Cui-hong<sup>1,2,3</sup>, LI Hai-bo<sup>1,2,3</sup>, ZHANG Chen-feng<sup>1,2,3</sup>, WANG Zhen-zhong<sup>1,2,3</sup>, WANG Tuan-jie<sup>1,2,3</sup>, XIAO Wei<sup>1,2,3</sup>

1. State Key Laboratory of New-Tech for Chinese Medicine Pharmaceutical Process, Lianyungang 222001, China
2. Jiangsu Kanion Pharmaceutical Co., Ltd., Lianyungang 222001, China
3. National & Local Joint Engineering Research Center of TCM Intelligent Manufacturing Technology, Lianyungang 222001, China

**Abstract: Objective** To establish the characteristic chromatogram of Sanhan Huashi Granules (散寒化湿颗粒, SHG) by HPLC, identify the components of all characteristic peaks and the origin of medicinal materials, so as to provide reference for its overall quality control. **Methods** The separation was developed on Waters Atlantis T3 C<sub>18</sub> column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) by gradient elution with acetonitrile-0.1% phosphoric acid and the analytes were detected at 250 nm. The column temperature was 30 °C and the

收稿日期: 2023-01-16

基金项目: 国家重点研发计划“公共安全风险防控与应急技术装备”重点专项—散寒化湿颗粒治疗新冠肺炎的新药创制示范研究 (2022YFC0868300)

作者简介: 于桂芳 (1983—), 女, 硕士, 高级工程师/副主任中药师, 从事中药新药质量标准研究工作。

Tel: 15189010279 E-mail: gfyu100@126.com

\*通信作者: 肖 伟 (1959—), 男, 研究员, 博士生导师, 研究方向为中药新药创制、制药工程学。

Tel: (0518)81152337 Fax: (0518)81152327 E-mail: kanionlunwen@163.com

王团结 (1986—), 男, 硕士, 高级工程师, 从事中药新药研发。Tel: 15062986099 E-mail: union\_wang@163.com

flow rate was at 1.0 L/min. The 10 characteristic peaks were chemically identified by UHPLC-QTOF MS, NMR, reference substance and directional separation, which were also assigned to individual herbs. Furthermore, the consistency of 20 batches of preparations was evaluated. **Results** The HPLC characteristic chromatogram of SHG was established. The consistency of 20 batches was good. Ten characteristic peaks [adenine (peak 1), uridine (peak 2), guanosine (peak 3), inosine (peak 4), 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde (peak 5), magnololide A (peak 6), bergaptol-5-*O*- $\beta$ -D-glucopyranoside (peak 7), nodakenin (peak 8), 6'-*O*-feruloylnodakenin (peak 9), 4-hydroxyphenethylanisate (peak 10)] were chemically identified and assigned to individual herbs [peak 1 originated from Mahuang (*Ephedrae Herba*), Kuxingren (*Armeniacae Semen Amarum*), Qianghuo (*Notopterygii Rhizoma et Radix*, NRR), Guanghuoxiang (*Pogostemonis Herba*, PH), Cangzhu (*Atractylodis Rhizoma*, AR), Baizhu (*Atractylodis Macrocephalae Rhizoma*, AMR), Jiaoliushenqu (*Charred Massa Medicata Fermentata* (CMMF), Jiaomaya (*Charred Hordei Fructus Germinatus*, CHFG), Dilong (*Pheretima*), Xuchangqing (*Cynanchi Paniculati Radix et Rhizoma*, CPRR) and Tinglizi (*Descurainiae Semen Lepidii Semen*, DSLS), peak 2 originated from Houpo (*Magnoliae Officinalis Cortex*, MOC), NRR, PH, Peilan (*Eupatorii Herba*), AR, AMR, *Pheretima*, CPRR and DSLS, peak 3 originated from NRR, PH, *Pheretima*, CPRR and DSLS, peak 4 originated from *Pheretima*, peak 5 originated from *Charred Crataegi Fructus*, CHFG and CMMF, peak 6 originated from MOC, peak 7—10 originated from NRR]. **Conclusion** The established HPLC characteristic chromatogram method of SHG was simple, stable and repeatable, and the characteristics of the chemical composition of SHG were preliminarily described. It lays a foundation for the promotion of its quality standard, and also provides a reference for the quality standard research of other classical famous prescriptions.

**Key words:** classical famous prescription; Sanhan Huashi Granules; HPLC; characteristic chromatogram; adenine; uridine; guanosine; inosine; 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde; magnololide A; bergaptol-5-*O*- $\beta$ -D-glucopyranoside; nodakenin; 6'-*O*-feruloylnodakenin; 4-hydroxyphenethylanisate

新型冠状病毒肺炎疫情 2020 年开始席卷全球, 中国中医科学院广安门医院全小林院士基于寒湿疫理论和新冠肺炎核心病机与治法, 拟定“中医通治方”(又名寒湿疫方)。该方基于麻杏石甘汤等 5 个经典名方化裁而成<sup>[1-2]</sup>, 由厚朴、焦槟榔、煨草果、麻黄等 20 味药组成, 具有散寒化湿、宣肺透邪、辟秽化浊、解毒通络的功效, 用于寒湿郁肺所致疫病, 症见发热、乏力、咳嗽等症。临床研究显示具有预防及改善新冠症状、降低转重率的疗效, 且安全性良好<sup>[3]</sup>, 被纳入国家卫健委《新型冠状病毒肺炎诊疗方案(试行)》第六至九版。

散寒化湿颗粒(Sanhan Huashi Granules, SHG)为江苏康缘药业股份有限公司将该方按照古代经典名方中药复方制剂注册要求, 研制开发成便于临床大规模推广使用的颗粒剂, 并于 2022 年 10 月成功获批上市, 成为首个严格按照中药 3.2 类新药审评标准获批的治疗新冠肺炎的中药新药。但截至目前, 关于其质量标准的研究尚未见报道。中药指纹/特征图谱能够较为全面地体现中药复杂的物质基础, 目前广泛应用于中药的质量评价中<sup>[4-6]</sup>。

SHG 处方药味众多、成分复杂, 本实验采用 HPLC 建立 SHG 的特征图谱, 采用 20 批制剂生成对照特征图谱, 通过 UHPLC-Q-TOF-MS 对 10 个共有峰全部进行化学成分指认, 并归属其处方药味来源。此外还采用定向分离技术对其中 3 个结构较为

复杂、文献报道较少的特征峰进行定向分离, 进而采用 MS、NMR 技术进行结构确证, 首次将 2D NMR 技术应用于特征峰 7 和 10 的结构研究中。本实验建立的 HPLC 特征图谱能够较为科学全面地评价 SHG 的质量, 为其临床有效和质量可控提供保障, 为水提工艺的中药新药的药效物质基础研究奠定基础, 亦可为《中国药典》处方药味的质量控制提供有益补充。

## 1 仪器与材料

### 1.1 仪器

Thermo Fisher Ultimate 3000 型高效液相色谱仪, 美国赛默飞世尔公司; Agilent 1260 型高效液相色谱仪(DAD 紫外检测器), Agilent 1290 型超高压液相色谱仪(DAD 紫外检测器), Agilent 6538 Q-TOF-MS 质谱检测器, 电喷雾(ESI)离子源, 均为美国安捷伦公司; Bruker AscendTM 400 型超导核磁共振谱仪(自动进样器), 德国 Bruker 公司, 5 mm 核磁共振样品管; Mettler Toledo XP6 型电子分析天平, Mettler Toledo AL204 型电子分析天平, 德国梅特勒公司; KQ500DB 型数控超声波清洗机, 昆山超声仪器有限公司; HH 型数显恒温水浴锅, 常州国宇仪器制造有限公司; Milli-Q 型超纯水仪, 美国密理博公司。

### 1.2 试剂

甲醇、乙酸, 均为色谱纯, 分别购自默克公司

及赛默飞世尔科技有限公司；氘代二甲基亚砜（DMSO-D<sub>6</sub>，氘代纯度：99.8%），氘代氯仿（Chloroform-D<sub>3</sub>，氘代纯度：99.8%），均为青岛腾龙微波科技有限公司；其他试剂均为分析纯；中药色谱指纹图谱相似度评价系统（2012）。

对照品腺嘌呤（批号 B0002908，质量分数 99.4%）、尿苷（批号 B0008580，质量分数 99.4%）、鸟苷（批号 B0006767，质量分数 96.1%），均购自北京曼哈格生物科技有限公司；对照品肌苷（批号 140669-202007，质量分数 99.2%）、紫花前胡苷（批号 111821-201604，质量分数 99.6%），均购自中国食品药品检定研究院；对照品 5-羟甲基糠醛（批号 ST00720220，质量分数 89.2%）、木兰苷 A（批号 STC0610110，质量分数 99.1%），均购自上海诗丹德标准技术有限公司；对照品佛手酚-5-*O*- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷（批号 CFS202002，质量分数 98%）、6'-*O*-(反式阿魏酰基)-紫花前胡苷（批号 CFS202002，质量分数 98%），均购自武汉天植生物技术有限公司；对照品茴香酸对羟基苯乙酯，批号 A05GB156933，质量分数 99.6%，购自上海源叶生物科技有限公司。

### 1.3 SHG

共 20 批，江苏康缘药业股份有限公司生产，批号分别为 200201、200202、200203、200204、200205、200206、200207、200208、200209、200210、200211、200212、200213、200214、200601、200602、200603、210401、210402、210403，分别编号 S1~S20。其中 200201~200214、210402 为临床实践批样品。

## 2 方法与结果

### 2.1 检测条件

**2.1.1 HPLC 色谱条件** 色谱柱为 Waters Atlantis T3 C<sub>18</sub>（250 mm×4.6 mm，5  $\mu$ m）；流动相为甲醇-0.1%磷酸水溶液，梯度洗脱：0~5 min，0%甲醇；5~25 min，0%~15%甲醇；25~60 min，15%~55%甲醇；60~75 min，55%~100%甲醇；75~80 min，100%甲醇；检测波长为 250 nm；体积流量为 1.0 mL/min；柱温为 30  $^{\circ}$ C；进样量为 10  $\mu$ L。用于质谱检测时 0.1%磷酸水溶液改为 0.1%醋酸水溶液。

**2.1.2 质谱条件**：电喷雾 ESI 离子源，正、负离子模式，毛细管电压为 4000 V，雾化器压力为 344.738 kPa（50 psi），干燥气体积流量 10 L/min，干燥气温度 350  $^{\circ}$ C，源内裂解电压 150 V，传输电压 65 V，质量数扫描范围  $m/z$  50~2000。

### 2.2 溶液的配制

**2.2.1 特征图谱对照品溶液的制备** 取紫花前胡苷对照品适量，精密称定，加 50%甲醇制成含紫花前胡苷 0.15 mg/mL 的对照品溶液，即得。

#### 2.2.2 特征峰指认对照品溶液的制备

(1) 单标对照品储备液的制备：分别取对照品适量，精密称定，用 50%甲醇制成含腺嘌呤、尿苷、鸟苷、肌苷、5-羟甲基糠醛、木兰苷 A、佛手酚-5-*O*- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷、紫花前胡苷、6'-*O*-(反式阿魏酰基)-紫花前胡苷、茴香酸对羟基苯乙酯（用甲醇为溶剂）各 200  $\mu$ g/mL 的溶液，即得单标对照品储备液。

(2) 单标对照品溶液的制备：精密量取各单标对照品储备液适量，用 50%甲醇稀释为约含茴香酸对羟基苯乙酯 5  $\mu$ g/mL，腺嘌呤、尿苷、鸟苷、佛手酚-5-*O*- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷各 20  $\mu$ g/mL，5-羟甲基糠醛、肌苷、木兰苷 A、紫花前胡苷、6'-*O*-(反式阿魏酰基)-紫花前胡苷各 40  $\mu$ g/mL 的溶液，即得各单标对照品溶液。

(3) 混合对照品溶液的制备：精密量取各单标对照品储备液适量至同一量瓶中，用 50%甲醇稀释得混合对照品溶液，质量浓度同单标对照品溶液。

#### 2.2.3 供试品溶液的制备

(1) SHG 供试品溶液的制备：取本品适量，混匀，研细，取约 1 g，精密称定，置具塞锥形瓶中，精密加入水 25 mL，超声处理（功率 500 W、频率 40 kHz）30 min，摇匀，离心，取上清液，即得。

(2) 各药味供试品溶液的制备：取 19 个处方药味（石膏除外）各 1 g，参照 SHG 的制备工艺及供试品溶液制备方法，制得各药味的供试品溶液。

### 2.3 特征图谱的建立

**2.3.1 专属性实验** 取批号为 200602 的 SHG，按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液，并取 1 份空白溶剂（水）按“2.1.1”项下 HPLC 色谱条件分别进行检测。经考察，空白溶剂对供试品溶液的测试不存在干扰，专属性良好。

**2.3.2 精密度试验** 取同一批（批号 200602）SHG，按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液，按“2.1.1”项下 HPLC 色谱条件进行检测，连续进样 6 次，记录所得色谱图。以紫花前胡苷为参照峰（分离良好，峰面积较大且为所有样品共有），计算主要色谱峰相对保留时间和相对峰面积，并计算相应的 RSD。结果显示，各主要色谱峰相对保留时间的 RSD 不高于

0.10%，相对峰面积的 RSD 不高于 1.20%，表明仪器精密度良好，符合特征图谱的技术要求。

**2.3.3 重复性试验** 取同一批(批号 200602)SHG，按“2.2.3”项下方法平行制备 6 份供试品溶液，按“2.1.1”项下 HPLC 色谱条件进行检测，每份样品进样 1 次，记录所得色谱图。以紫花前胡苷为参照峰，计算主要色谱峰相对保留时间和相对峰面积，并计算相应的 RSD。结果显示，各主要色谱峰相对保留时间的 RSD 不高于 0.33%，相对峰面积的 RSD 不高于 2.55%，表明方法重复性良好，符合特征图谱的技术要求。

**2.3.4 稳定性试验** 取同一批(批号 200602)SHG，按“2.2.3”项下方法制备 1 份供试品溶液，按“2.1.1”项下 HPLC 色谱条件分别于制备后 0、3、6、9、12、18、24、30、36 h，每个时间点进样 1 次进行检测，记录所得色谱图。以紫花前胡苷为参照峰，计算主要色谱峰相对保留时间和相对峰面积，并计算相应的 RSD。结果显示，各主要色谱峰相对保留时间的 RSD 不高于 0.40%，相对峰面积的 RSD 不高于 2.90%，表明供试品溶液常温下在 36 h 内性质稳定，符合特征图谱的技术要求。

**2.3.5 多批次测定及对照特征图谱生成** 取 20 批 SHG，按“2.2.3”项下方法制备各批次供试品溶液，按“2.1.1”项下色谱条件分别进行检测，并记录生成的 HPLC 特征图谱，将 20 批特征图谱数据导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统系统(2012)”，

选定 10 个共有峰为特征峰，生成对照特征图谱(R)，并计算各批次特征图谱中各特征峰的相对保留时间，结果见图 1 和表 1。

根据多批次结果，拟定 SHG 特征图谱标准：供试品特征图谱中应呈现 10 个特征峰，与参照物峰相应的峰为 S 峰，计算各特征峰与 S 峰的相对保留时间，应在规定值的±10%之内。相对保留时间规定值为 0.11(峰 1)、0.27(峰 2)、0.36(峰 3)、0.38(峰 4)、0.41(峰 5)、0.84(峰 6)、0.92(峰 7)、1.00 [峰 8(S)]、1.19(峰 9)、1.29(峰 10)。结果显示，20 批制剂的批间一致性良好，质量稳定。

**2.4 特征峰的化学成分指认和组方药味相关性研究**

取“2.2.2”及“2.2.3”项下各对照品溶液及供试品溶液，按“2.1”项下检测条件分别进行 HPLC 及 UPLC-Q-TOF-MS 测定，对照品及供试品溶液的正、负总离子流图及紫外色谱图见图 2、3。

质谱信息结合化合物色谱行为、对照品比对并参考相关文献完成 10 个特征峰指认，并归属处方药味来源，结果见图 4 和表 2。指认的特征峰依次为腺嘌呤(1 号峰)、尿苷(2 号峰)、鸟苷(3 号峰)、肌苷(4 号峰)、5-羟甲基糠醛(5 号峰)、木兰苷 A(6 号峰)、佛手酚-5-O-β-D-吡喃葡萄糖苷(7 号峰)、紫花前胡苷(8 号峰)、6'-O-(反式阿魏酰基)-紫花前胡苷(9 号峰)及茴香酸对羟基苯乙酯(10 号峰)，其中腺嘌呤归属于麻黄、苦杏仁、羌活、广藿香、苍术、白术、焦六神曲、焦麦芽、地龙、徐长卿、

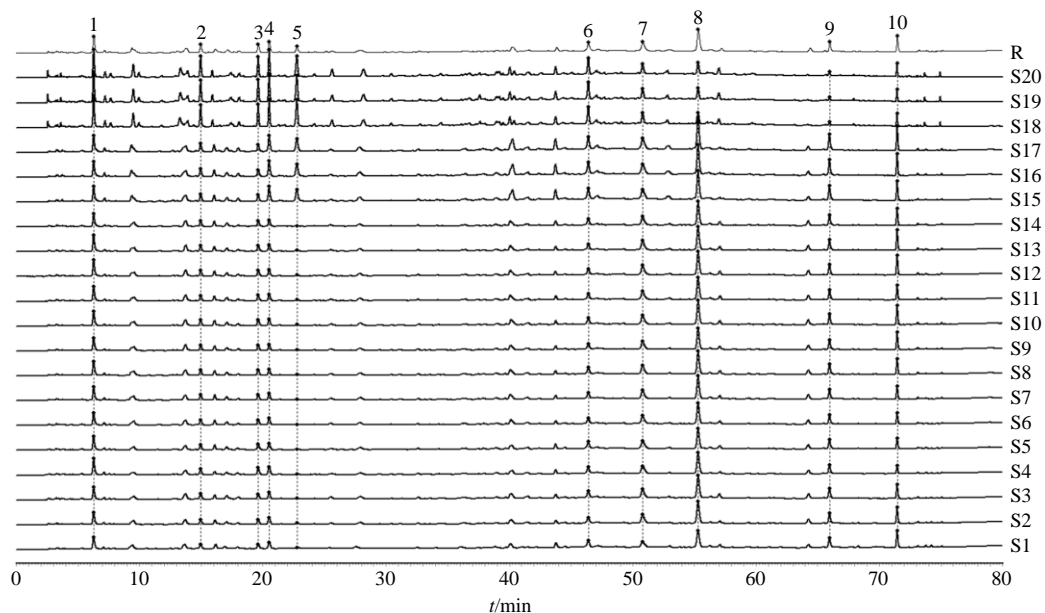


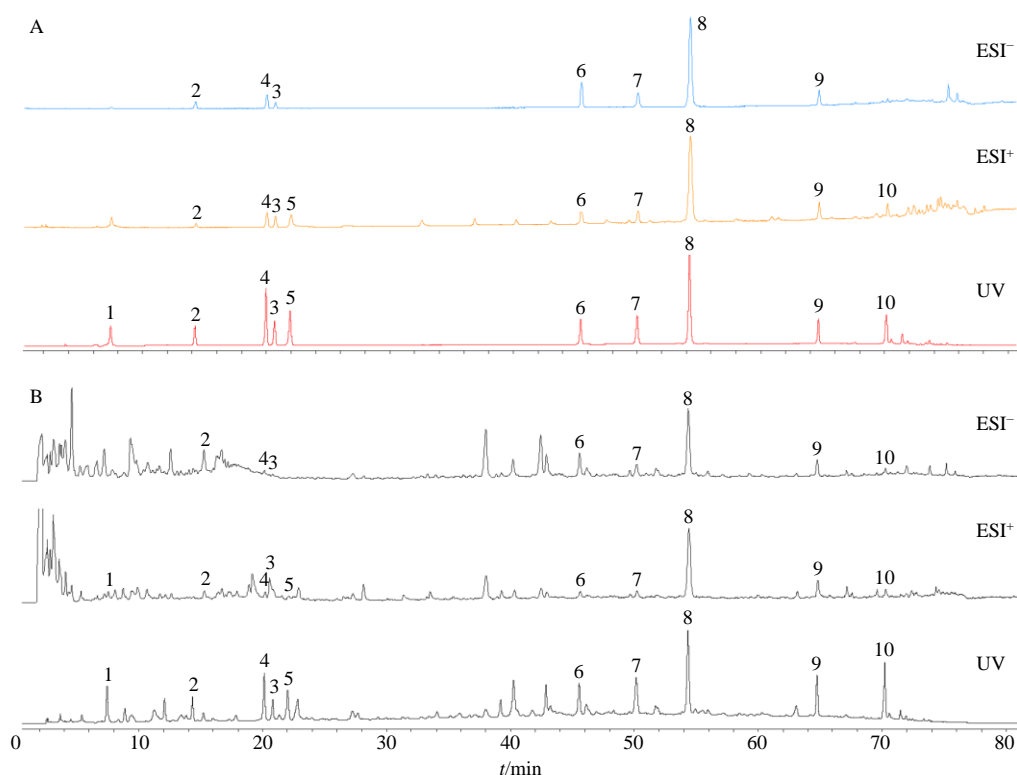
图 1 20 批制剂的 HPLC 特征图谱及其对照特征图谱 (R)

Fig. 1 HPLC characteristic chromatogram of 20 batches of samples and reference characteristic chromatogram (R)

表 1 20 批制剂的相对保留时间

Table 1 Relative retention time of 20 batches of samples

序号	相对保留时间										序号	相对保留时间									
	峰1	峰2	峰3	峰4	峰5	峰6	峰7	峰8	峰9	峰10		峰1	峰2	峰3	峰4	峰5	峰6	峰7	峰8	峰9	峰10
S1	0.114	0.270	0.356	0.372	0.411	0.841	0.923	1.000	1.187	1.285	S11	0.113	0.269	0.355	0.371	0.410	0.841	0.923	1.000	1.187	1.285
S2	0.114	0.270	0.356	0.372	0.411	0.841	0.923	1.000	1.187	1.285	S12	0.113	0.270	0.355	0.372	0.410	0.841	0.923	1.000	1.187	1.285
S3	0.113	0.270	0.356	0.372	0.411	0.841	0.923	1.000	1.187	1.285	S13	0.113	0.270	0.355	0.371	0.410	0.841	0.923	1.000	1.187	1.285
S4	0.113	0.270	0.356	0.372	0.411	0.841	0.923	1.000	1.187	1.285	S14	0.113	0.270	0.355	0.371	0.410	0.841	0.923	1.000	1.187	1.284
S5	0.113	0.270	0.355	0.371	0.410	0.841	0.923	1.000	1.187	1.285	S15	0.113	0.269	0.354	0.371	0.410	0.841	0.923	1.000	1.187	1.285
S6	0.113	0.270	0.355	0.371	0.410	0.841	0.923	1.000	1.187	1.285	S16	0.113	0.270	0.355	0.371	0.410	0.841	0.923	1.000	1.187	1.285
S7	0.113	0.269	0.355	0.371	0.410	0.841	0.923	1.000	1.187	1.285	S17	0.113	0.270	0.355	0.371	0.410	0.841	0.923	1.000	1.187	1.285
S8	0.113	0.270	0.355	0.371	0.410	0.841	0.923	1.000	1.187	1.285	S18	0.117	0.268	0.352	0.369	0.409	0.84	0.922	1.000	1.194	1.300
S9	0.113	0.270	0.355	0.371	0.410	0.841	0.923	1.000	1.187	1.285	S19	0.117	0.268	0.352	0.369	0.409	0.84	0.922	1.000	1.194	1.300
S10	0.113	0.270	0.355	0.371	0.410	0.841	0.923	1.000	1.187	1.285	S20	0.117	0.269	0.352	0.370	0.409	0.84	0.922	1.000	1.194	1.300

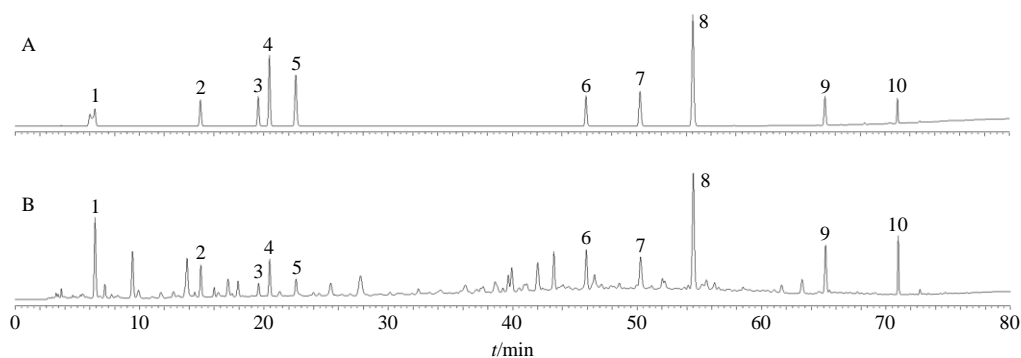
图 2 混合对照品溶液 (A) 及供试品溶液 (B) 的总离子流图 (ESI<sup>-</sup> 和 ESI<sup>+</sup>) 及紫外色谱图 (UV)Fig. 2 TIC (ESI<sup>-</sup> and ESI<sup>+</sup>) and UV chromatogram of mixed reference substances (A) and samples (B)

葶苈子多味药材, 尿苷归属于厚朴、羌活、广藿香、佩兰、苍术、白术、地龙、徐长卿、葶苈子多味药材, 鸟苷属于羌活、广藿香、地龙、徐长卿、葶苈子多味药材, 肌苷归属于地龙, 5-羟甲基糠醛归属于焦三仙(焦山楂、焦六神曲、焦麦芽), 木兰苷 A 归属于厚朴, 佛手酚-5-O-β-D-吡喃葡萄糖苷、紫花前胡苷、6'-O-(反式阿魏酰基)-紫花前胡苷及茴香酸对羟基苯乙酯 4 个成分归属于羌活。

## 2.5 3 个特征峰的定向分离及结构确证

### 2.5.1 3 个特征峰的定向分离

制备色谱柱为 Waters Atlantis T3 C<sub>18</sub> (250 mm×50 mm, 10 μm); 流动相为甲醇-0.1%磷酸水溶液, 梯度洗脱: 0~5 min, 0%甲醇; 5~25 min, 0%~15%甲醇; 25~60 min, 15%~55%甲醇; 60~75 min, 55%~100%甲醇; 75~80 min, 100%甲醇; 检测波长为 250 nm; 进样量为 10 mL; 体积流量为 15 mL/min; 进样质



1-腺嘌呤 2-尿苷 3-鸟苷 4-肌苷 5-5-羟甲基糠醛 6-木兰苷 A 7-佛手酚-5-O-β-D-吡喃葡萄糖苷 8-紫花前胡苷 9-6'-O-(反式阿魏酰基)-紫花前胡苷 10-茴香酸对羟基苯乙酯  
1-adenine 2-uridine 3-guanosine 4-inosine 5-5-hydroxymethyl-2-furaldehyde 6-magnolioside A 7-bergaptol-5-O-β-D-glucopyranoside 8-nodakenin 9-6'-O-feruloylnodakenin 10-4-hydroxyphenethylanisate

图3 混合对照品溶液 (A) 及供试品溶液 (B) 的 HPLC 图  
Fig. 3 HPLC of mixed reference substances (A) and samples (B)

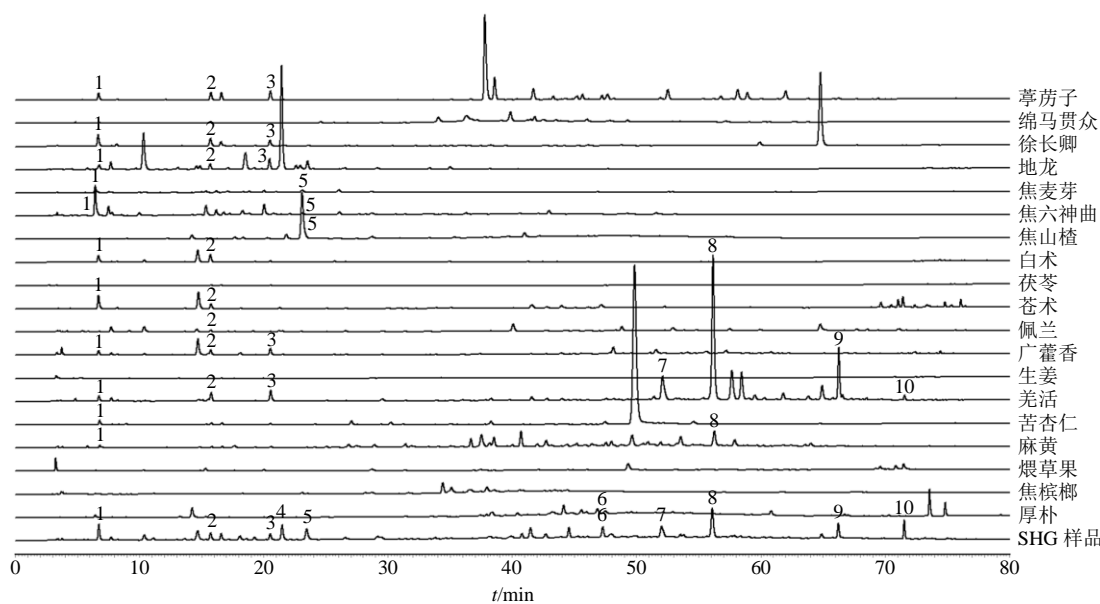


图4 SHG 及 19 个处方药味的 HPLC 图  
Fig. 4 HPLC of SHG and its relevant herbs

量浓度为 200 mg/mL; 出峰收集, 结合分析型液相进行峰确认。合并多次收集的 3 个成分, 进一步纯化后待用。

**2.5.2 3 个特征峰的结构确证** 采用 NMR (<sup>1</sup>H-NMR、<sup>13</sup>C-NMR、DEPT、COSY、HSQC、HMBC) 测定, 结合 MS 结果进行结构确证。质谱数据见表 2, 氢谱及碳谱数据如下。

峰 7 的 <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 6.38 (1H, d, *J* = 9.8 Hz, H-3), 8.49 (1H, dd, *J* = 9.8, 0.5 Hz, H-4), 7.49 (1H, s, H-8), 7.33 (1H, dd, *J* = 2.3, 0.9 Hz, H-9), 8.03 (1H, d, *J* = 2.3 Hz, H-10), 4.95 (1H, d, *J* = 7.7 Hz, H-1'), 3.40 (1H, m, H-2'), 3.28 (1H, m, H-3'),

3.20 (1H, m, H-4'), 3.35 (1H, m, H-5'), 3.74 (1H, ddd, *J* = 11.6, 5.0, 1.8 Hz, H-6'), 3.51 (1H, m, H-6'), 5.65 (1H, d, *J* = 5.7 Hz, 2'-OH), 5.08 (1H, d, *J* = 5.3 Hz, 3'-OH), 5.17 (1H, d, *J* = 4.9 Hz, 4'-OH), 4.68 (1H, dd, *J* = 6.1, 5.1 Hz, 6'-OH); <sup>13</sup>C-NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 160.54 (C-2), 113.25 (C-3), 140.61 (C-4), 108.00 (C-4a), 152.25 (C-5), 115.64 (C-6), 157.63 (C-7), 95.47 (C-8), 147.67 (C-8a), 105.95 (C-9), 146.97 (C-10), 104.43 (C-1'), 74.29 (C-2'), 76.65 (C-3'), 70.16 (C-4'), 77.95 (C-5'), 61.32 (C-6'). 质谱、氢谱及碳谱数据与文献报道基本一致<sup>[16-18]</sup>, 判断特征峰 7 为化合物佛手酚-5-O-β-D-吡喃葡萄糖苷, 分

表2 SHG中10个特征峰的UHPLC-QTOF MS鉴定

Table 2 Identification of chemical components in SHG by UHPLC-QTOF MS

峰号	$t_R$ / min	相对分子质量		误差 ( $\times 10^{-6}$ )	正离子 ESI <sup>+</sup>	负离子 ESI <sup>-</sup>	分子式	化合物	主要来源
		测定值	理论值						
1	7.52	135.061 1	135.054 5	4.9	136.061 1 [M+H] <sup>+</sup>	/	C <sub>5</sub> H <sub>5</sub> N <sub>5</sub>	腺嘌呤 <sup>[7-8]</sup>	麻黄、苦杏仁、羌活、广藿香、苍术、白术、焦六神曲、焦麦芽、地龙、徐长卿、葶苈子
2	14.40	244.062 6	244.069 5	-2.8	245.075 6 [M+H] <sup>+</sup> , 113.034 1 [M-C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> O <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	243.062 6 [M-H] <sup>-</sup> , 487.131 9 [2M-H] <sup>-</sup>	C <sub>9</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub>	尿昔 <sup>[7-8]</sup>	厚朴、羌活、广藿香、佩兰、苍术、白术、地龙、徐长卿、葶苈子
3	20.79	283.084 9	283.091 7	-2.4	284.098 2 [M+H] <sup>+</sup>	282.084 9 [M-H] <sup>-</sup> , 565.176 0 [2M-H] <sup>-</sup>	C <sub>10</sub> H <sub>13</sub> N <sub>5</sub> O <sub>5</sub>	鸟昔 <sup>[7-8]</sup>	羌活、广藿香、地龙、徐长卿、葶苈子
4	20.19	268.087 4	268.080 8	2.5	269.087 4 [M+H] <sup>+</sup> , 537.167 3 [2M+H] <sup>+</sup> , 137.045 1 [M-C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> O <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	267.074 2 [M-H] <sup>-</sup> , 535.154 9 [2M-H] <sup>-</sup>	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> N <sub>4</sub> O <sub>5</sub>	肌昔 <sup>[7]</sup>	地龙
5	22.11	126.038 6	126.031 7	5.5	127.038 6 [M+H] <sup>+</sup>	/	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	5-羟甲基糠醛 <sup>[9]</sup>	焦山楂、焦六神曲、焦麦芽
6	45.67	624.200 0	624.205 4	-0.9	647.193 9 [M+Na] <sup>+</sup>	623.200 0 [M-H] <sup>-</sup>	C <sub>29</sub> H <sub>36</sub> O <sub>15</sub>	木兰昔 A <sup>[10-12]</sup>	厚朴
7	50.16	364.085 8	364.079 4	1.8	365.085 8 [M+H] <sup>+</sup> , 387.067 4 [M+Na] <sup>+</sup> , 751.145 9 [2M+Na] <sup>+</sup> , 203.033 1 [M-glc+H] <sup>+</sup>	423.094 7 [M+CH <sub>3</sub> COO] <sup>-</sup> , 201.019 9 [M-glc-H] <sup>-</sup>	C <sub>17</sub> H <sub>16</sub> O <sub>9</sub>	佛手酚-5-O-β-D-吡喃葡萄糖苷 <sup>[13]</sup>	羌活
8	54.35	408.150 0	408.142 0	2.0	409.150 0 [M+H] <sup>+</sup> , 431.130 8 [M+Na] <sup>+</sup> , 247.095 9 [M-glc+H] <sup>+</sup> , 839.273 1 [2M+Na] <sup>+</sup>	407.135 9 [M-H] <sup>-</sup> , 467.157 8 [M+CH <sub>3</sub> COO] <sup>-</sup> , 815.279 3 [2M-H] <sup>-</sup>	C <sub>20</sub> H <sub>24</sub> O <sub>9</sub>	紫花前胡昔 <sup>[13-14]</sup>	羌活
9	64.74	584.183 9	584.189 4	-1.0	607.177 6 [M+Na] <sup>+</sup> , 1 191.365 9 [2M+Na] <sup>+</sup>	583.183 9 [M-H] <sup>-</sup>	C <sub>30</sub> H <sub>32</sub> O <sub>12</sub>	6'-O-(反式阿魏酰基)-紫花前胡昔 <sup>[13]</sup>	羌活
10	70.28	272.093 3	272.104 9	-4.3	295.093 3 [M+Na] <sup>+</sup>	/	C <sub>16</sub> H <sub>16</sub> O <sub>4</sub>	茴香酸对羟基苯乙酯 <sup>[13-15]</sup>	羌活

“/”表示该模式下质谱几乎无响应

“/” indicates that there is almost no MS response in this mode

子结构式如图5所示。

峰9的<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 6.16 (1H, d, *J* = 9.5 Hz, H-3), 7.82 (1H, d, *J* = 9.5 Hz, H-4), 7.39 (1H, s, H-5), 6.74 (1H, s, H-8), 3.22 (2H, d, *J* = 9.1 Hz, H-9), 4.90 (1H, d, *J* = 8.6 Hz, H-10), 1.31 (3H, s, H-12), 1.12 (3H, s, H-13), 4.50 (1H, d, *J* = 7.8 Hz, H-1'), 2.94 (1H, m, H-2'), 3.18 (1H, m, H-3'), 3.09 (1H, m, H-4'), 3.48 (1H, m, H-5'), 4.39 (1H, dd, *J* = 11.6, 1.9 Hz, H-6'), 4.17 (1H, dd, *J* = 11.7, 7.7 Hz,

H-6'), 7.16 (1H, d, *J* = 1.8 Hz, H-2''), 6.69 (1H, d, *J* = 8.1 Hz, H-5''), 6.88 (1H, dd, *J* = 8.2, 1.8 Hz, H-6''), 7.46 (1H, d, *J* = 15.9 Hz, H-7''), 6.34 (1H, d, *J* = 15.9 Hz, H-8''), 4.86 (1H, d, *J* = 4.8 Hz, 2'-OH), 5.02 (1H, d, *J* = 4.9 Hz, 3'-OH), 5.18 (1H, d, *J* = 5.4 Hz, 4'-OH), 9.57 (1H, s, 4''-OH), 3.75 (3H, s, 3''-OCH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C-NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 160.88 (C-2), 111.46 (C-3), 144.98 (C-4), 112.74 (C-4a), 124.43 (C-5), 125.69 (C-6), 163.37 (C-7), 97.29 (C-8), 155.43 (C-

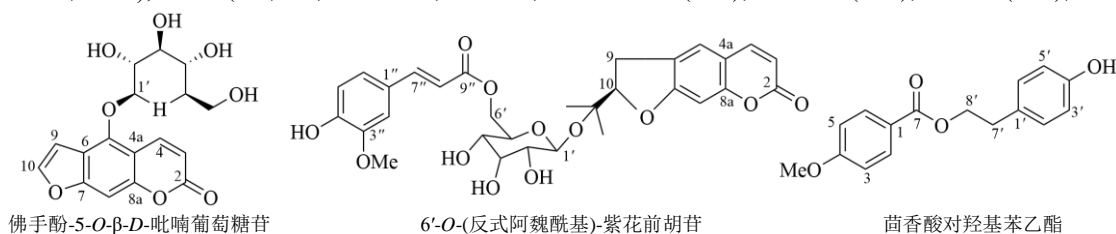


图5 3个特征峰的结构

Fig. 5 Structures of three characteristic peaks

8a), 29.67 (C-9), 90.05 (C-10), 77.66 (C-11), 23.55 (C-12), 21.31 (C-13), 97.63 (C-1'), 73.88 (C-2'), 77.13 (C-3'), 70.95 (C-4'), 73.86 (C-5'), 64.14 (C-6'), 125.82 (C-1''), 111.73 (C-2''), 148.30 (C-3''), 149.83 (C-4''), 115.82 (C-5''), 123.45 (C-6''), 145.53 (C-7''), 114.61 (C-8''), 166.90 (C-9''), 56.09 (3''-OCH<sub>3</sub>)。质谱、氢谱及碳谱数据与文献报道基本一致<sup>[19]</sup>, 判断特征峰 9 为化合物为 6'-O-(反式阿魏酰基)-紫花前胡苷, 分子结构式如图 5 所示。

峰 10 的 <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 7.97 (2H, d, *J* = 9.0 Hz, H-2, 6), 6.91 (2H, d, *J* = 9.0 Hz, H-3, 5), 7.14 (2H, d, *J* = 8.5 Hz, H-2', 6'), 6.78 (2 H, d, *J* = 8.6 Hz, H-3', 5'), 2.99 (2H, t, *J* = 7.0 Hz, H-7'), 4.45 (2H, t, *J* = 7.0 Hz, H-8'), 7.26 (1H, s, 4'-OH), 3.85 (3H, s, 4-OCH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C-NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 122.72 (C-1), 131.61 (C-2, 6), 113.63 (C-3, 5), 163.37 (C-4), 131.61 (C-6), 166.42 (C-7), 130.15 (C-1'), 130.12 (C-2', 6'), 115.38 (C-3', 5'), 154.27 (C-4'), 115.38 (C-5'), 34.43 (C-7'), 65.47 (C-8'), 55.43 (4-OCH<sub>3</sub>)。质谱、氢谱及碳谱数据与文献报道基本一致<sup>[18]</sup>, 判断峰 10 为化合物茴香酸对羟基苯乙酯, 分子结构式如图 5 所示。

## 3 讨论

### 3.1 色谱条件选择

SHG 依据原方临床用药方式及经典名方注册申报要求采用水提工艺制备, 主要含极性较大的化学成分, 因此, 采用对该类成分具有较好保留的 Waters Atlantis T3 C<sub>18</sub> 色谱柱; 采用 DAD 检测器对供试品溶液进行全波长扫描, 结果发现 250 nm 下色谱峰较丰富, 响应较好, 且基线较为平稳, 因此采用 250 nm 作为检测波长; 对比流动相乙腈-0.1% 磷酸水溶液及甲醇-0.1% 磷酸水溶液的分流效果, 结果发现甲醇由于洗脱能力较乙腈稍弱, 对于该方中极性较大的成分分离效果较好, 因此, 选择甲醇-0.1% 磷酸水溶液作为流动相。柱温、体积流量、色谱柱及液相品牌等系统考察结果显示该方法耐用性良好。

### 3.2 供试品溶液制备方法选择

本实验考察了不同提取溶剂、提取方式及提取时间的提取效果。结果以水为提取溶剂色谱图 25 min 之前的极性较大的色谱峰较丰富, 响应较均匀; 超声与回流色谱峰的丰富程度与响应无明显差异; 提取 30 min 即可提取充分。结合水提工艺特点及操

作的简便性, 选择水为溶剂, 超声提取 30 min。

### 3.3 特征峰与功效关联性分析

君药厚朴中的水溶性成分 magnololide A (木兰昔 A, 峰 6) 具有抑制平滑肌痉挛的作用以及显著的抗氧化活性<sup>[10,20]</sup>; 臣药羌活中的香豆素类成分佛手酚-5-O- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷(峰 7)、紫花前胡苷(峰 8) 及 6'-O-(反式阿魏酰基)-紫花前胡苷(峰 9) 是羌活祛风解表的物质基础, 其中紫花前胡苷具有较强的抗炎镇痛活性<sup>[21]</sup>; 臣药焦三仙炮制过程中产生的新物质 5-羟甲基糠醛(峰 5) 具有抗炎、抗菌等生物活性<sup>[22-23]</sup>; 佐药地龙中的腺嘌呤(峰 1)、鸟嘌呤(峰 2)、鸟苷(峰 3)、肌苷(峰 4)、尿苷(峰 2) 等核苷类成分具有抗病毒、免疫调节及抗菌等多种生物活性, 且含量较高<sup>[24-25]</sup>。

综上所述, SHG 特征图谱中的特征峰是其潜在的药效物质, 与其功能主治具有一定的关联性, 具体研究有待后续进一步通过药动学和药效学试验进行验证。

## 4 结语

本实验基于 SHG 的水提工艺特点开展特征图谱相关研究, 建立的特征图谱较全面地反映了该方的整体化学信息, 为其质量的科学合理评价提供参考依据。但是由于时间关系, 本研究仅对 10 个特征峰进行了指认, 后续还需进行更加系统的化学成分辨识, 并对功效成分进行筛选和验证, 以期揭示 SHG 的作用机制, 并为其质量标准研究提供更完善的参考依据。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

## 参考文献

- [1] 仝小林, 李修洋, 赵林华, 等. 从“寒湿疫”角度探讨新型冠状病毒肺炎的中医药防治策略 [J]. 中医杂志, 2020, 61(6): 465-470.
- [2] 杨映映, 李青伟, 鲍婷婷, 等. 仝小林院士辨治新型冠状病毒肺炎-“寒湿疫”辨治体系的形成、创新与发展 [J]. 世界中医药, 2022, 17(6): 833-842.
- [3] Tian J, Yan S, Wang H, *et al.* Hanshiyi Formula, a medicine for Sars-CoV2 infection in China, reduced the proportion of mild and moderate COVID-19 patients turning to severe status: A cohort study [J]. *Pharmacol Res*, 2020, 161: 105127.
- [4] 倪术仁, 连云岚, 赵思俊, 等. 强力脑清素片 HPLC 指纹图谱的建立及质量标志物预测 [J]. 中草药, 2021, 52(4): 1011-1019.
- [5] 刘鹤, 贺丹彤, 邢春来, 等. 甘姜苓术汤 HPLC 指纹图



- 谱及含量测定方法的建立 [J]. 药物分析杂志, 2021, 41(1): 42-50.
- [6] 江华娟, 李敏敏, 何瑶, 等. 基于 HPLC 指纹图谱和化学模式识别的经典名方桃红四物汤制备过程质量评价研究 [J]. 中草药, 2021, 52(4): 1000-1010.
- [7] 张玉, 董文婷, 霍金海, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS 技术的广地龙化学成分分析 [J]. 中草药, 2017, 48(2): 252-262.
- [8] 蔡信福, 徐雅, 刘和平, 等. 基于液质联用技术的经典名方羌活胜湿汤标准煎液的化学成分分析 [J]. 中国中药杂志, 2022, 47(2): 343-357.
- [9] 王紫馨, 李怡然, 姜瑞文, 等. 山楂饮片及炮制品的 HPLC 特征图谱研究 [J]. 中药与临床, 2020, 11(2): 22-26.
- [10] 余盛贤. 基于水溶性成分分析的厚朴质量评价 [D]. 北京: 中国中医科学院, 2011.
- [11] 崔琳琳, 包永睿, 王帅, 等. UPLC-Q-TOF-MS/MS 快速鉴定补肺健脾方的化学成分 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(9): 184-193.
- [12] 赵慧, 严颖, 邹立思, 等. 基于超高效液相色谱-三重四极杆飞行时间串联质谱技术分析厚朴花中化学成分 [J]. 中华中医药杂志, 2017, 32(12): 5621-5624.
- [13] 杨秀伟, 严仲铠, 顾哲明, 等. 宽叶羌活化学成分的研究 [J]. 中国药理学杂志, 1994, 29(3): 141-143.
- [14] 王维皓, 严平贞, 杨滨. 羌活中香豆素类化合物 UPLC-Q-TOF 质谱裂解规律研究 [J]. 中国中药杂志, 2021, 46(5): 1179-1190.
- [15] 郭培, 郎拥军, 张国桃. 羌活化学成分及药理活性研究进展 [J]. 中成药, 2019, 41(10): 2445-2459.
- [16] Gu Z M, Zhang D X, Yang X W, *et al.* Isolation of two new coumarin glycosides from *Notopterygium forbesii* and evaluation of a Chinese crude drug, Qiang-Huo, the underground parts of *N. incisum* and *N. forbesii*, by high-performance liquid chromatography [J]. *Chem Pharm Bull*, 1990, 38(9): 2498-2502.
- [17] Ahmad S, Maharvi G M, Ashraf M, *et al.* Phytochemical studies on *Salsola baryosma* [J]. *J Chem Soc Pak*, 2006, 28(2): 176-178.
- [18] Wang R Y, Su P J, Zhang Z X, *et al.* Triterpenoids, steroids, and other constituents of the roots of *Codonopsis pilosula* [J]. *Chem Nat Compounds*, 2021, 57(6): 1160-1162.
- [19] 杨秀伟. 应用 2D NMR 技术研究羌活苷的结构 [J]. 波谱学杂志, 2006, 23(4): 429-442.
- [20] 薛珍珍. 厚朴水溶性化学成分及其活性筛选 [D]. 北京: 中国中医科学院, 2015.
- [21] 李云霞, 高春华, 沙明. 中药羌活化学成分及药理作用研究进展 [J]. 辽宁中医学院学报, 2004, 6(1): 22-23.
- [22] 郭琪, 张辉, 李海燕. HPLC 测定小儿化食丸中 5-羟甲基糠醛的含量 [J]. 食品与药品, 2015, 17(3): 198-200.
- [23] 孙静莹, 王婷, 徐瑶, 等. 焦山楂及其焦香气味协同对食积大鼠消化液及脑肠肽的影响 [J]. 华西药理学杂志, 2022, 37(1): 32-36.
- [24] 黄敬文, 高宏伟, 段剑飞. 地龙的化学成分和药理作用研究进展 [J]. 中医药导报, 2018, 24(12): 104-107.
- [25] 关水清, 周改莲, 董婧婧, 等. HPLC 同时测定广地龙中 5 种核苷类成分含量 [J]. 广西师范大学学报: 自然科学版, 2020, 38(3): 85-91.

[责任编辑 郑礼胜]