·中药工业·

复方鱼腥草合剂的 HPLC 指纹图谱建立△

应珂[1]，王建方[1]，查慧军[1]，郑亚纯[1]，金汉台[2]，姚建标[1*]

1. 浙江康恩贝制药股份有限公司/浙江省中药制药技术重点实验室，浙江　杭州　310052；
2. 浙江康恩贝中药有限公司，浙江　丽水　323400

［摘要］ **目的**：建立复方鱼腥草合剂的 HPLC 指纹图谱，实现对其质量进行整体高精度的控制。**方法**：以 Besil 5 C_{18}-B(250 mm×4.6 mm，5 μm)为色谱柱，以甲醇为流动相 A，以 0.1%磷酸溶液为流动相 B，梯度洗脱；检测波长为 210 nm，柱温为 40 ℃，进样量为 5 μL，流速为 1.0 mL·min^{-1}。建立复方鱼腥草合剂的指纹图谱，并通过对照品和液相色谱-质谱法(LC-MS)对共有峰进行指认和归属。检测 3 个厂家 15 批样品，并采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”软件进行分析。**结果**：建立了复方鱼腥草合剂的 HPLC 指纹图谱，标定了 16 个共有峰，15 批样品相似度均不低于 0.95。**结论**：该方法样品处理简便，色谱条件简单、结果准确、重复性好，可以作为复方鱼腥草合剂质量控制的方法之一。

［关键词］ 复方鱼腥草合剂；指纹图谱；高效液相色谱；黄芩苷

［中图分类号］ R289　［文献标识码］ A　［文章编号］ 1673-4890(2020)12-2059-05

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.20191104003

Fingerprints Analysis of Compound Yuxingcao Mixture by HPLC

YING Ke[1], WANG Jian-fang[1], ZHA Hui-jun[1], ZHENG Ya-chun[1], JIN Han-tai[2], YAO Jian-biao[1*]

1. *Zhejiang CONBA Pharmaceutical Co., Ltd., Zhejiang Provincial Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Pharmaceutical Technology, Hangzhou* 310052, *China*;
2. *Zhejiang CONBA Chinese Medicine Co., Ltd., Lishui* 323400, *China*

［**Abstract**］ **Objective**: To establish an HPLC for fingerprints analysis of compound Yuxingcao Mixture for its overall high accuracy quality control. **Methods**: The HPLC analysis was performed on Besil 5 C_{18}-B (250 mm×4.6 mm, 5 μm) with the mobile phase of methanol-0.1% phosphoric acid with gradient elution at the flow rate of 1.0 mL·min^{-1}. The detection wavelength was set at 210 nm, the column temperature was at 40 ℃, and the injection volume was 5 μL. The common peaks were identified and attributed by combining the reference substance with LC-MS. 15 batches of samples which were made by three different manufacturers were determined and analyzed by *Similarity Evaluation System for chromatographic Fingerprint of TCM*. **Results**: The HPLC fingerprint of compound Yuxingcao Mixture was established. Totally 16 common characteristic peaks were identified. And the similarity of HPLC fingerprints was above 0.95 for all samples. **Conclusion**: The method is simple and repeatable, which can be used for the quality control of compound Yuxingcao Mixture.

［**Keywords**］ compound Yuxingcao Mixture; fingerprints; HPLC; baicalin

复方鱼腥草合剂是由鱼腥草、黄芩、板蓝根、连翘、金银花经提取、浓缩、醇沉、配制等步骤制备而成，具有清热解毒的功效，用于外感风热所致的急喉痹、急乳蛾，症见咽部红肿、咽痛；急性咽炎、急性扁桃体炎见上述证候者[1]。现代临床研究表明，复方鱼腥草合剂可用于小儿急性上呼吸道感染[2-3]、手足口病[4-5]、流行性腮腺炎[6]、儿童疱疹性咽峡炎[7]等疾病的治疗。

复方鱼腥草合剂的执行标准是国家食品药品监督管理局颁布的国家药品标准［WS-10821(ZD-0821)-2002-2012Z］，其中检验内容主要包括对鱼腥草、黄芩的薄层鉴别项，相对密度、pH 等检查项，

△［基金项目］ 浙江省重大科技专项重点社会发展项目(2013C03005)

*［通信作者］ 姚建标，高级工程师，研究方向：中药研发；E-mail：yaojb@conbagroup.com

黄芩苷含量测定项，无法对制剂整体质量进行客观评价，目前也没有相关文献报道相关方法。

本研究采用 HPLC，根据《中国人民共和国药典》2015 年版通则[8]要求，进行多成分指纹图谱研究，建立复方鱼腥草合剂的指纹图谱，并对主要的色谱峰进行归属性研究，采用国家药典委员会推荐的“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2012.130723 版)进行相似度评价，以此建立更全面可控的质量标准，以更有效地控制制剂整体质量。

1　仪器与试药

1.1　仪器

Shimadzu LC-20AD$_{XR}$型高效液相色谱仪；Thermo UPLC-LTQ-Orbitrap 型液质联用仪；MSA225S-1CE-DU 型电子天平(德国赛多利斯，d = 0.01 mg，max = 220 g)；Milli-QA10 型纯水仪(密里博中国有限公司)；LG10-2.4A 型高速离心机(北京京立离心机有限公司)。

1.2　试药

复方鱼腥草合剂(批号分别为 A180244、B180155、180207、B180222、A180105，浙江康恩贝中药有限公司)；复方鱼腥草合剂(批号分别为 180308、180305、180122、180414、180125，浙江惠松制药有限公司)；复方鱼腥草合剂(批号分别为 180500501、V171105、180100701、180403102、180502401，浙江国镜药业有限公司)；5-羟甲基糠醛对照品(批号：111626-201610)、苯甲酸钠对照品(批号：100433-200301)、羟苯乙酯对照品(批号：100847-201604)、槲皮苷对照品(批号：111538-200504)、黄芩苷对照品(批号：110715-201318)、汉黄芩苷对照品(批号：112002-201702)、汉黄芩素对照品(批号：111514-201706)、连翘酯苷 A 对照品(批号：111810-201707)、连翘苷对照品(批号：110821-200508)、绿原酸对照品(批号：110753-201817)、鱼腥草对照药材(批号：121046-201607)、黄芩对照药材(批号：120955-201810)、板蓝根对照药材(批号：121177-201608)、连翘对照药材(批号：120908-201216)、金银花对照药材(批号：121060-201608)均由中国食品药品检定研究院提供；连翘酯苷 E 对照品(成都曼斯特科技有限公司，批号：DST180412-083)；隐绿原酸对照品(上海源叶生物科技有限公司，批号：Y12O8H45678)；甲醇为色谱纯；水为超纯水；其他试剂均为分析纯。

2　方法与结果

2.1　供试品溶液的制备

取本品，5000 r·min^{-1}离心 5 min(离心半径为 8.5 cm)，取上清液，即得。

2.2　单味药溶液的制备

参照复方鱼腥草合剂制备工艺，分别制备方中各单味药材的单味药制剂，即得。

2.3　对照品溶液的制备

精密称取 5-羟甲基糠醛、苯甲酸钠、羟苯乙酯、槲皮苷、黄芩苷、汉黄芩苷、汉黄芩素、连翘酯苷 A、连翘苷、绿原酸对照品适量，分别置量瓶中，加 50% 甲醇制成 0.1 mg·mL^{-1}的溶液，即得。

2.4　指纹图谱参照峰

所建立的指纹图谱中，黄芩苷所示峰具有最大的峰面积、适中的保留时间以及稳定的峰形，因此选择此峰作为参照峰。在后续研究中，均以此峰作为参照，用来计算其余峰的相对峰面积及相对保留时间。

2.5　色谱条件

以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂(Besil 5 C_{18}-B 250 mm × 4.6 mm，5 μm)；以甲醇作为流动相 A，以 0.1% 磷酸溶液作为流动相 B，梯度洗脱(0 ~ 15 min，20% ~ 30% A；15 ~ 40 min，30% ~ 55% A；40 ~ 45 min，55% ~ 65% A；45 ~ 50 min，65% ~ 80% A；50 ~ 55 min，80% A)；检测波长为 210 nm，柱温为 40 ℃，进样量为 5 μL，流速为 1.0 mL·min^{-1}。

2.6　UPLC-LTQ-Orbitrap 分析条件

以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂(Besil 5 C_{18}-B 250 mm × 4.6 mm，5 μm)；以甲醇作为流动相 A，以 0.1% 甲酸溶液作为流动相 B，梯度洗脱(0 ~ 15 min，20% ~ 30% A；15 ~ 40 min，30% ~ 55% A；40 ~ 45 min，55% ~ 65% A；45 ~ 50 min，65% ~ 80% A；50 ~ 55 min，80% A)；检测波长为 210 nm，柱温为 40 ℃，进样量为 5 μL，流速为 1.0 mL·min^{-1}。

电喷雾离子源(ESI)，负离子模式检测，加热温度为 350 ℃，鞘气流速为 12 L·min^{-1}，辅助气流速为 3 L·min^{-1}，吹扫气流速为 0 L·min^{-1}，喷雾电压为 3.20 kV，离子传输管温度为 325 ℃。鞘气和辅助气均为高纯氮气(纯度≥99.99%)，碰撞气为高纯氦气；采用傅里叶变换高分辨全扫描方式，质量扫描

范围 *m/z* 50 ~ 1200；多级质谱采用数据依赖式扫描，诱导碰撞解离(CID)模式，碰撞能为 35 V。

2.7　方法学验证

2.7.1　精密度试验　取复方鱼腥草合剂(批号：A180244)样品，根据 **2.1** 项下方法制备供试品溶液，使用 **2.5** 项下色谱条件连续进样检测 6 次，记录色谱图，以 6 针平均值为模板计算其相似度，结果各图谱共有峰与对照指纹图谱相似度均达 1.000，表明本方法仪器精密度良好。

2.7.2　重复性试验　取复方鱼腥草合剂(批号：A180244)样品，根据 **2.1** 项下方法制备 6 份供试品溶液，使用 **2.5** 项下色谱条件进样分析，记录色谱图，以 6 份平均值为模板计算其相似度，结果各图谱共有峰的相似度均达 0.999 以上，表明本方法重复性良好。

2.7.3　稳定性试验　取复方鱼腥草合剂(批号：A180244)样品，根据 **2.1** 项下方法制备供试品溶液，分别于 0、6、12、24 h 使用 **2.5** 项下色谱条件进样分析，记录色谱图，以不同时间点的平均值为模板计算其相似度，结果各图谱共有峰的相似度均达 1.000，表明供试品溶液在室温下放置 24 h 内稳定。

2.8　对照指纹图谱的建立

2.8.1　对照模板及相似度　选取 15 批复方鱼腥草合剂样品，根据 **2.1** 项下方法分别制备供试品溶液，使用 **2.5** 项下色谱条件测定，将所得色谱图导入到“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2012.130723 版)，使用平均数法生成复方鱼腥草合剂指纹图谱的对照模板，见图 1。

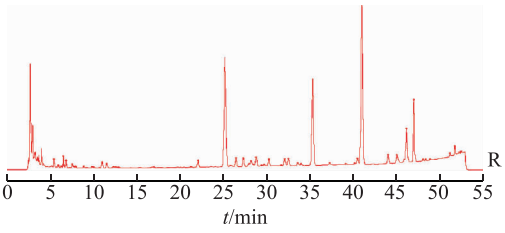


图 1　复方鱼腥草合剂对照指纹图谱

取 15 批复方鱼腥草合剂样品，根据 **2.1** 项下方法分别制备供试品溶液，使用 **2.5** 项下色谱条件测定，将所得色谱图与对照模板一同导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2012.130723 版)，以对照模板作为参照图谱，设相似度为 1.000，计算 15 批复方鱼腥草合剂的相似度，结果见表 1、图 2。

表 1　复方鱼腥草合剂样品相似度测定结果

来源	编号	批号	相似度
浙江康恩贝中药有限公司	S2	A180244	0.99
	S3	B180155	0.99
	S4	180207	1.00
	S5	B180222	1.00
	S6	A180105	0.99
浙江惠松制药有限公司	S7	180308	0.99
	S8	180305	0.95
	S9	180122	0.98
	S10	180414	0.95
	S11	180125	0.99
浙江国镜药业有限公司	S12	180500501	0.97
	S13	V171105	1.00
	S14	180100701	1.00
	S15	180403102	1.00
	S16	180502401	1.00

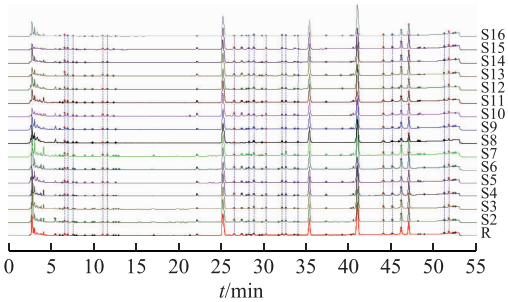
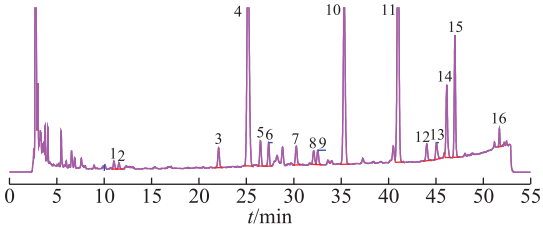


图 2　复方鱼腥草合剂样品相似度测定色谱图

经统计分析，此 15 批复方鱼腥草合剂的指纹图谱相似度均大于 0.95，表明本方法稳定、可行，所得到的复方鱼腥草合剂的指纹图谱相似度良好。

2.8.2　共有峰归属　取 15 批复方鱼腥草合剂样品，以及根据 **2.1 ~ 2.3** 项下方法分别制备的供试品溶液、单味药溶液对照品溶液，使用 **2.5** 项下色谱条件下测定，将所得色谱图进行对比。结合质谱数据，确定了 16 个共有峰，并对其进行归属。

对成分进行分析，5-羟甲基糠醛可能来源于辅料炼蜜；苯甲酸钠和羟苯乙酯为添加的辅料；通过对照品比对，归属于鱼腥草的为槲皮苷；归属于黄芩的为黄芩苷、汉黄芩苷和汉黄芩素；归属于连翘的为连翘酯苷 E、连翘酯苷 A 和连翘苷；归属于金银花的为绿原酸和隐绿原酸；样品中无归属于板蓝根的化合物，16 个化合物的归属见图 3、表 2。



注：1. 绿原酸；2. 隐绿原酸；3. 毛蕊花糖苷；4. 苯甲酸钠；5. 连翘酯苷Ⅰ；6. 连翘酯苷 A；7. 罗汉松脂苷；8. 白杨素-6-*C*-葡萄糖-8-*C*-阿拉伯糖苷；9. 槲皮苷；10. 羟苯乙酯；11. 黄芩苷；12. 黄芩苷异构体；13. 白杨素-7-*O*-葡萄糖苷酸；14. oroxyloside；15. 汉黄芩苷；16. 汉黄芩素。

图 3　复方鱼腥草合剂色谱峰归属图

表 2　复方鱼腥草合剂 HPLC 指纹图谱共有峰的指纹与归属

峰号	化合物	t_R/min	相对分子质量	ESI⁻	归属
1	绿原酸*	11.67	353	[M－H]⁻	金银花
2	隐绿原酸*	12.27	353	[M－H]⁻	金银花
3	毛蕊花糖苷或其异构体	22.98	623	[M－H]⁻	连翘
4	苯甲酸钠*	26.21	121	[M－H]⁻	辅料
5	连翘酯苷Ⅰ	27.34	623	[M－H]⁻	连翘
6	连翘酯苷 A*	28.23	623	[M－H]⁻	连翘
7	罗汉松脂苷	30.25	519	[M－H]⁻	连翘
8	白杨素-6-C-葡萄糖-8-C-阿拉伯糖苷或其异构体	32.95	547	[M－H]⁻	黄芩
9	槲皮苷*	33.87	447	[M－H]⁻	鱼腥草
10	羟苯乙酯*	36.28	165	[M－H]⁻	辅料
11	黄芩苷*	41.32	445	[M－H]⁻	黄芩
12	黄芩苷异构体	44.55	445	[M－H]⁻	黄芩
13	白杨素-7-*O*-葡萄糖苷酸	45.39	429	[M－H]⁻	黄芩
14	oroxyloside	46.42	459	[M－H]⁻	黄芩
15	汉黄芩苷*	47.37	459	[M－H]⁻	黄芩
16	汉黄芩素*	52.17	283	[M－H]⁻	黄芩

注：* 为经对照品确认的化合物。

3　讨论

本实验建立了复方鱼腥草合剂的 HPLC 指纹图谱，并且鉴定了 16 个共有峰，通过对照品确认了其中 9 个峰的化学本质，分别为绿原酸、隐绿原酸、苯甲酸钠、连翘脂苷 A、槲皮苷、羟苯乙酯、黄芩苷、汉黄芩苷、汉黄芩素。同时测定了 15 批复方鱼腥草合剂的指纹图谱，其相似度高，表明此方法可以作为复方鱼腥草合剂质控的依据。

该指纹图谱的共有峰中，5-羟甲基糠醛可能来源于辅料炼蜜，防腐剂苯甲酸钠和羟苯乙酯响应均较大，且属于辅料，拟在合成对照指纹图谱中扣除上述 3 个色谱峰。另外，由于黄芩药材中的黄芩苷含量较高，峰响应较强，对指纹图谱的建立影响较大。故在建立对照指纹图谱模板时，扣除 5-羟甲基糠醛、苯甲酸钠、羟苯乙酯和黄芩苷色谱峰。

考虑到本制剂中主要成分为酚酸类和黄酮类，选择使用酸溶液作为水相。本方法考察了不同浓度的甲酸水溶液、磷酸水溶液作为水相，结果显示，0.1% 磷酸水溶液有较好的洗脱和分离能力，故选择其为水相。同时比较了甲醇和乙腈 2 种有机相，结果发现，甲醇可以较好地洗脱和分离样品，故选择甲醇为有机相。

复方鱼腥草合剂由 5 种中药组合而成，物质成分较为复杂，所以采用光电二极管阵列检测器（PDA）在 200～400 nm 对复方鱼腥草合剂的供试品溶液进行紫外扫描检测，结果供试品在 210 nm 检测波长下色谱峰信息量较大，各成分较稳定，分离效果较好，且鱼腥草中特征性成分槲皮苷响应较大，故选择 210 nm 作为测定波长[9]。此外，本实验比较了3 种不同的色谱柱（Besil 5 C_{18}-B、Kromasil C_{18}、资生堂 Capcellpak C_{18}，规格均为 250 mm×4.6 mm，5 μm）和不同柱温对特征峰分离度的影响，最终确定为 Besil 5 C_{18}-B，柱温 40 ℃。

指纹图谱是一种能较为全面地呈现出样品复杂性的方法[10]，近年来被广泛应用于中药研究的质量控制和评价[11-12]，具有整体性、模糊性、专属性等特点[13]。结果表明，3 个厂家 15 批复方鱼腥草合剂 HPLC 指纹图谱相似度均大于 0.95，具有较好的一致性。综上所述，本研究建立了复方鱼腥草合剂的 HPLC 指纹图谱，该方法样品处理简便、色谱条件简单、结果准确、重复性好，可以作为复方鱼腥草合剂质量控制的方法之一。

参考文献

[1]　国家药典委员会. 中华人民共和国药典：一部[M]. 北京：中国医药科技出版社，2020：1328-1329.

[2]　王海平. 安儿宁颗粒与复方鱼腥草颗粒治疗小儿上呼吸道感染的成本-效果分析[J]. 亚太传统医药，2016，12(11)：123-125.

[3]　肖亚. 复方鱼腥草合剂治疗小儿急性上呼吸道感染（外感风热证）临床疗效观察[J]. 中国保健营养（中旬刊），2013(5)：441-442.

（下转第 2067 页）

(PAD)对样品进行全波长扫描，通过对比不同检测波长色谱图发现，当检测波长为 254 nm 时，火麻仁标准汤剂水溶性成分色谱峰最多，且各色谱峰的响应值均较高，因此选择 254 nm 为检测波长。另考察了乙腈-水、乙腈-0.1% 磷酸水和乙腈-0.1% 甲酸水 3 种流动相的分离效果，结果表明，在乙腈-0.1% 甲酸水梯度洗脱下，色谱图基线平稳，色谱峰分离度良好。以峰 3 为参照峰，20 批火麻仁标准汤剂水溶性成分指纹图谱的其余 5 个特征峰相对保留时间 RSD 为 0.7% ~0.9%，均小于 3.0%。

3.1.2　水溶性指纹图谱Ⅰ的评价　本研究标示了火麻仁标准汤剂水溶性成分的 6 个共有峰，并通过相似度评价软件计算出 20 批火麻仁标准汤剂的对照图谱的相似度，结果均大于 0.90。各批次火麻仁标准汤剂水溶性成分的图谱整体上基本一致。

3.2　火麻仁标准汤剂脂溶性成分指纹图谱Ⅱ

3.2.1　色谱条件的选择　火麻仁油脂类成分如亚油酸、α-亚麻酸等成分分子结构中仅含有非共轭双键，因此只有末端吸收，在 205 nm 附近具有较强吸收，因此选择 205 nm 作为火麻仁脂溶性指纹图谱Ⅱ的检测波长。另考察了乙腈-水、乙腈-0.1% 磷酸水和甲醇-水 3 种流动相的分离效果，结果在乙腈-水梯度洗脱下，色谱图基线平稳，色谱峰分离度良好。以峰 4 亚油酸为参照峰，20 批火麻仁标准汤剂脂溶性成分指纹图谱的其余 3 个特征峰相对保留时间 RSD 为 0.2% ~0.8%，均小于 2.0%。

3.2.2　脂溶性指纹图谱Ⅱ的评价　本研究标示了火麻仁标准汤剂脂溶性成分的 4 个共有峰，并通过相似度评价软件计算出 20 批火麻仁标准汤剂的对照图谱的相似度，结果均大于 0.90。各批次火麻仁标准汤剂脂溶性成分的图谱整体上基本一致。

上述研究结果表明，不同产地火麻仁标准汤剂水溶性及脂溶性成分指纹图谱相似度均较高，说明不同产地火麻仁药材质量差异较小；研究建立的方法简单、重复性高，为评价火麻仁药材质量提供了新的方法，并为制定火麻仁配方颗粒质量标准提供了参考。

参考文献

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:80.

[2] 贺海波. 火麻仁的化学成分和药理活性研究进展[D]. 宜昌:三峡大学医学院,2010.

[3] 金贤兰. 火麻仁的药理作用与临床应用[J]. 现代医药卫生,2007,23(17):2624-2625.

[4] 陈宁园. 火麻仁提取液对 *D*-半乳糖致衰老大鼠空间学习和记忆的干预作用及其机制研究[D]. 南宁:广西医科大学,2017.

[5] 陈成. 火麻仁抑制血管紧张素转化酶和抗氧化活性的研究[D]. 重庆:重庆大学,2015.

[6] 杨素华,马子牧,马晓旋. 火麻仁馏油治疗 116 例神经性皮炎临床观察[J]. 临床皮肤科杂志,1997,26(1):30-31.

(收稿日期：2019-12-05　　编辑：王笑辉)

(上接第 2062 页)

[4] 陈晓玲,艾玲,王宇,等. 复方鱼腥草口服液联合利巴韦林治疗小儿手足口病的疗效观察[J]. 临床合理用药杂志,2012,5(1):5-6.

[5] 王傲雪. 探讨复方鱼腥草口服液联用利巴韦林对患儿手足口病改善情况的优势[J]. 中国现代药物应用,2013,7(9):112-113.

[6] 郭倩梅. 复方鱼腥草治疗流行性腮腺炎疗效观察[J]. 中原医刊,2003,30(13):39-40.

[7] 刘潇,代金珠,张伟. 复方鱼腥草糖浆治疗儿童疱疹性咽峡炎的疗效分析[J]. 中国处方药,2017,15(12):109-110.

[8] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:四部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:512-513.

[9] 刘春海,张妮瑜,欧金秀. HPLC 测定乌鸡白凤丸(水蜜丸)中芍药苷含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2008,14(12):13-15.

[10] 余芳,熊鑫. 通腑排气合剂 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中国药师,2019,22(5):857-860.

[11] 刘敏,范蕾,陈桂云,等. 降脂舒心合剂 HPLC 指纹图谱的建立及制剂安全性项目的影响因素检测[J]. 中国医药导报,2019,16(9):117-122.

[12] 熊鑫,程璐,黄传奇,等. 元通合剂的高效液相色谱指纹图谱[J]. 医药导报,2018,37(9):1115-1118.

[13] 杨丽娜,曾棋平,蔡小辉,等. 复方首乌藤合剂高效液相指纹图谱研究[J]. 中南药学,2018,16(1):27-30.

(收稿日期：2019-11-04　　编辑：王笑辉)