

# 基于 HPLC 指纹图谱、化学计量学和含量测定的截疫颗粒质量评价

余金兰<sup>1</sup>, 许松<sup>1</sup>, 李思琪<sup>1</sup>, 朱屹韬<sup>1</sup>, 王五兵<sup>1</sup>, 闫卓<sup>1</sup>, 李丹<sup>1</sup>, 康国娇<sup>2</sup>, 陈凌云<sup>1\*</sup>

(1. 云南中医药大学中药学院, 云南省高校外用给药系统与制剂技术研究重点实验室, 云南昆明 650500;  
2. 普洱市中医医院, 云南普洱 665000)

**摘要:** 目的 评价截疫颗粒质量。方法 建立 HPLC 指纹图谱, 采用层次聚类分析、主成分分析、正交最小偏二乘法-判别分析进行化学计量学研究, 并测定马鞭草苷、虎杖苷、连翘酯苷 A、升麻素苷、连翘苷、芹菜素的含量。结果 15 批样品指纹图谱有 21 个共有峰, 指出 12 个, 相似度均大于 0.99。各批样品聚为 2 类或 3 类, 3 个主成分累积方差贡献率为 89.582%, 6 个共有峰 VIP 值大于 1.0。6 种成分在各自范围内线性关系良好 ( $r \geq 0.9996$ ), 平均加样回收率 97.55%~100.78%。结论 该方法准确可靠, 可用于截疫颗粒的质量控制, 各批次制剂之间一致性较好。

**关键词:** 截疫颗粒; HPLC 指纹图谱; 层次聚类分析; 主成分分析; 正交最小偏二乘法判别分析; 含量测定

中图分类号: R927.2

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2025)09-3053-05

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2025.09.035

病毒性肺炎、流行性感影响人们工作和生活, 而且病毒在新宿主中传播、感染, 导致研发相关药物的成本、难度也加大<sup>[1]</sup>。西药常用抗病毒药物种类较少, 易引发严重不良反应, 增加耐药风险<sup>[2-3]</sup>, 而中药在治疗病毒感染和流行性感中有着独特的理论基础和治疗方案<sup>[4-6]</sup>, 其中截疫颗粒由连翘等 18 味中药组成, 具有益气养阴、祛风除湿、化痰止咳功效。

“安全稳定、质量可控”是中药可持续发展及国际化的关键要求<sup>[7]</sup>, 故建立截疫颗粒整体质量控制方法尤为重要。指纹图谱信息量大, 整体性及特征性强, 能直观展示中药成分组成及分布<sup>[8]</sup>, 而化学计量学可确保其稳定性和均一性, 客观反映整体质量<sup>[9-12]</sup>, 同时控制中药质量的有效方法是指纹图谱与多指标成分含量测定相结合<sup>[13-16]</sup>。因此, 本实验建立截疫颗粒 HPLC 指纹图谱, 进行层次聚类分析、主成分分析、正交最小偏二乘法-判别分析, 并测定马鞭草苷、虎杖苷、连翘酯苷 A、升麻素苷、连翘苷、芹菜素的含量<sup>[17]</sup>, 以期全面评价该制剂质量, 为后续其质量控制标准研究提供科学依据。

## 1 材料

1.1 仪器 SK2200HP 超声仪 (上海科导超声仪器有限公司); Agilent 1260 Infinity II 高效液相色谱仪 [安捷伦科技 (中国) 有限公司]; BCE224-1CCN 电子天平 (德国 Sartorius 公司); AB265-S 电子分析天平 (瑞士 Mettler-Toledo 公司)。

1.2 试剂、药材与药物 截疫颗粒共 15 批, 由云南中医药大学提供 (批号 20220501、20220502、20230503、20220509、20220515、20220818、20220819、20220822、20221002、20221006、20221019、20221104、20221106、20221109、20221116)。黄芪 (批号 C220907003)、香薷 (批号 C200528001)、紫苏叶 (批号 2201102) 均购自云南宗顺生物科技有限公司; 麸炒白术 (批号 211101)、甘草 (批号 211101) 均购自昆明道地中药饮片厂; 北沙参 (批号 20090303)、连翘 (批号 20072103) 均购自云南井田生物科技有限公司; 金银花 (批号 20210801)、蝉蜕 (批号 20220201) 均购自桂林中南药业科技有限公司; 灵芝 (批号 2109021)、马鞭草 (批号 2105070) 均购自云南和合中药饮片有限公司; 天花粉 (批号 20101210)、蜘蛛香 (批号 20300506) 均购自安徽致良中药饮片有限公司; 虎杖 (批号 20200401)、广藿香 (批号 20200501)、草果 (20190801)、防风 (批号 20200501) 均购自云南健安堂生物科技有限公司, 经云南中医药大学陈凌云教授鉴定为正品。马鞭草苷 (批号 110715-202122)、咖啡酸 (批号 110885-200102)、升麻素苷 (批号 112002-202303)、绿原素 (批号 110753-201817)、连翘苷 (批号 110821-201615)、连翘酯苷 A (批号 111810-201707)、芦丁 (批号 100080-200707)、虎杖苷 (批号 111575-201603)、橙皮苷 (批号 110721-201316)、芹菜素 (批号 11610-201108)、黄芩苷 (批号 110715-201821)、毛蕊异黄酮葡萄糖苷 (批号

收稿日期: 2024-09-11

基金项目: 云南省科技攻关计划项目 (202001AZ070001-079)

作者简介: 余金兰 (1996—), 女, 硕士生, 研究方向为中药药剂学。E-mail: 319400945@qq.com

\* 通信作者: 陈凌云 (1970—), 男, 教授, 研究方向为中药药剂学。E-mail: 498507628@qq.com

网络出版日期: 2024-11-21

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.1368.R.20241121.0949.002.html>

110885-200102) 对照品均购自中国食品药品检定研究院。甲醇为色谱纯;磷酸为分析纯;水为超纯水。

## 2 方法与结果

### 2.1 HPLC 指纹图谱建立

2.1.1 色谱条件 Diamonsil C<sub>18</sub> 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相甲醇 (A) -水 (含 0.2% 磷酸) (B), 梯度洗脱 (0~20 min, 13% A; 20~40 min, 13%~17% A; 40~50 min, 17%~25% A; 50~85 min, 25%~28% A; 85~105 min, 28%~40% A; 105~120 min, 40%~48% A; 120~130 min, 48%~60% A; 130~140 min, 60%~90% A; 140~150 min, 90% A); 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 30 ℃; 检测波长 230 nm; 进样量 10 μL。

2.1.2 对照品溶液制备 精密称取各对照品适量, 置于量瓶中, 70% 甲醇溶解, 制成分别含绿原素 0.021 mg/mL、咖啡酸 0.018 mg/mL、马鞭草苷 0.017 mg/mL、虎杖苷 0.049 mg/mL、毛蕊异黄酮葡萄糖苷 0.007 mg/mL、连翘苷 0.012 mg/mL、升麻素苷 0.010 mg/mL、芦丁 0.006 mg/mL、连翘酯苷 A 0.063 mg/mL、橙皮苷 0.050 mg/mL、黄芩苷 0.052 mg/mL、芹菜素 0.082 mg/mL 的溶液, 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 取续滤液, 即得。

2.1.3 供试品溶液制备 将本品研细, 精密称取 3 g, 置于具塞锥形瓶中, 精密加入 50 mL 70% 甲醇, 称定质量, 超声处理 30 min, 放冷, 70% 甲醇补足缺失的质量, 摇匀, 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 取续滤液, 即得。

2.1.4 单味饮片、阴性样品溶液制备 取各单味饮片及阴性样品, 按“2.1.3”项下方法制备, 即得。

2.1.5 精密密度试验 精密称取本品 (S1) 适量, 按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液, 在“2.1.1”项色谱条件下连续进样测定 6 次, 以虎杖苷为参照, 测得各成分共有峰保留时间、相对峰面积 RSD 为 0.160%~2.241%, 表明仪器精密密度良好。

2.1.6 重复性试验 精密称取本品 (S1) 6 份, 按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液, 在“2.1.1”项色谱条件下进样测定, 以虎杖苷为参照, 测得各成分共有峰保留时间、相对峰面积 RSD 为 0.246%~2.382%, 表明该方法重复性良好。

2.1.7 稳定性试验 精密称取本品 (S1) 适量, 按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液, 于 0、3、6、9、12、24 h 在“2.1.1”项色谱条件下进样测定, 以虎杖苷为参照, 测得各成分共有峰保留时间、相对峰面积 RSD 为 0.352%~2.537%, 表明溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.1.8 图谱生成 精密称取 15 批样品 (S1~S15) 适量, 按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液, 在“2.1.1”项色谱条件下进样测定, 将数据导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2012 版), 以 S1 为参照, 设定时间窗宽度为 0.1 s, 采用平均数法建立对照图谱, 见图 1。再计算相似度, 测得其范围为 0.992~1.000, 表明各批样品制备工艺稳定, 质量可控。

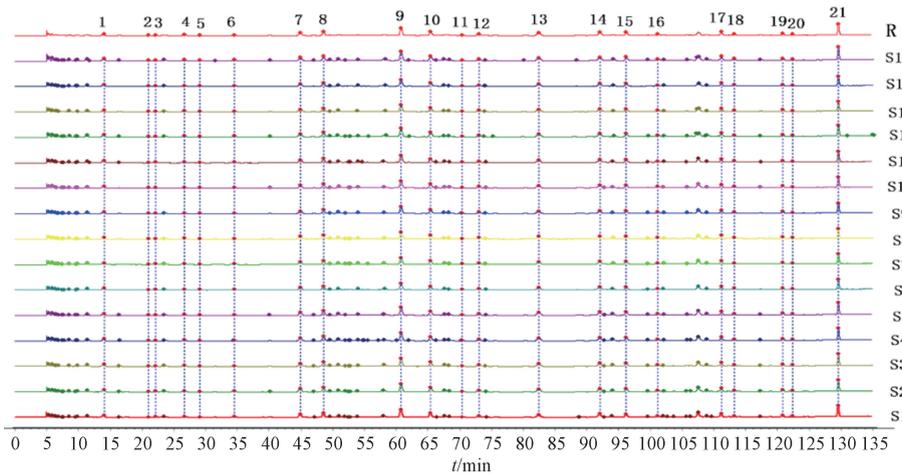


图 1 15 批截疫颗粒 HPLC 指纹图谱

对指纹图谱色谱峰进行归属, 共标定了 21 个共有峰, 见图 2。其中, 1 号峰来自紫苏叶和连翘, 2 号峰来自黄芪和炒白术, 3 号峰来自甘草, 4 号峰来自连翘、蜘蛛香和金银花, 5、6 号峰来自紫苏叶, 7 号峰来自马鞭草、草果和金银花, 8 号峰来自马鞭草, 9、18、19、21 号峰来自虎杖, 10 号峰来自紫苏叶和金银花, 11 号峰来自黄芪, 12 号峰来自防风, 13、15、17 号峰来自连翘, 14 号峰来自马鞭草和金银花, 16 号峰来自广藿香, 20 号峰来自金银花。

通过与对照品溶液、供试品溶液 (S1) 比对, 共指出 12 个色谱峰, 见图 3。其中, 4 号峰为绿原素, 8 号峰为

马鞭草苷, 5 号峰为咖啡酸, 9 号峰为虎杖苷, 11 号峰为毛蕊异黄酮葡萄糖苷, 12 号峰为升麻素苷, 14 号峰为芦丁, 15 号峰为连翘酯苷 A, 16 号峰为橙皮苷, 17 号峰为连翘苷, 18 号峰为黄芩苷, 21 号峰为芹菜素, 并且 9 号峰保留时间、峰面积较稳定, 并选择其作为参照。

### 2.2 化学模式识别研究

2.2.1 层次聚类分析 将 21 个共有峰相对峰面积导入 SPSS 26.0 软件, 采取组间连接法, 通过欧氏距离进行分析<sup>[18]</sup>, 结果见图 4。由此可知, 平方欧式距离为 10 时, 各批样品聚为 3 类, S6~S11、S13~S14 为 I 类, S1~S5、S12

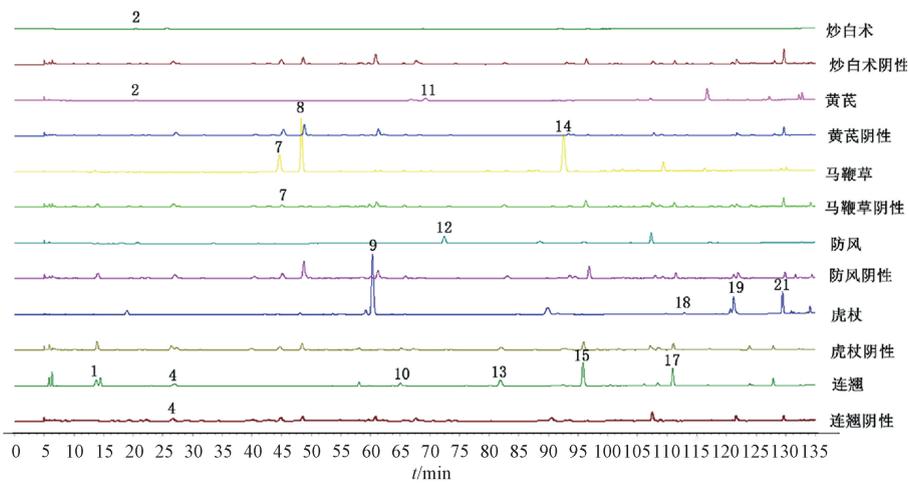
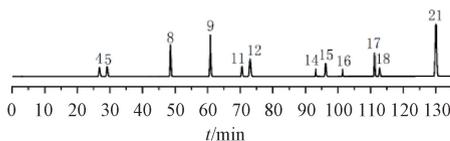
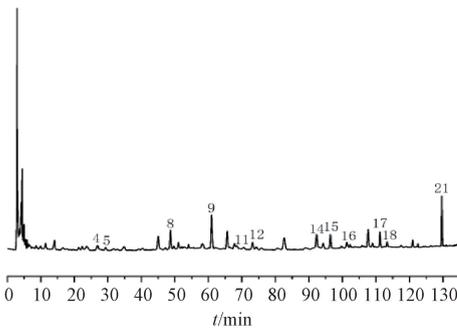


图2 各单味饮片、阴性样品共有峰归属



A 对照品



B 供试品

4. 绿原酸 5. 咖啡酸 8. 马鞭草苷 9. 虎杖苷 11. 毛蕊异黄酮葡萄糖苷 12. 升麻素苷 14. 芦丁 15. 连翘酯苷 A 16. 橙皮苷  
17. 连翘苷 18. 黄芩苷 21. 芹菜素

图3 各成分HPLC色谱图(I)

为Ⅱ类, S15为Ⅲ类;平方欧式距离为15时,各批样品聚为2类, S1~S14为Ⅰ类, S15为Ⅱ类。

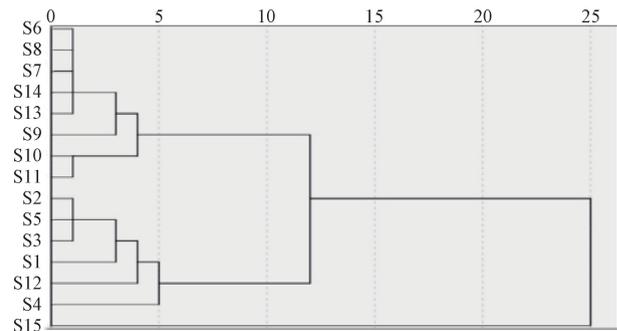


图4 15批截疫颗粒层次聚类分析

2.2.2 主成分分析 采用SIMCA 14.1软件,以21个共有峰相对峰面积为变量进行分析,得到3个主成分,累积方

差贡献率为89.582%,可反映指纹图谱共有峰信息,见表1。另外,11、6、4号峰在载荷图中距离原点较远,对制剂整体质量起到主要作用。

表1 主成分特征值与方差贡献率

主成分	方差贡献率/%	累积方差贡献率/%	特征值
1	74.950	74.950	15.739
2	9.451	84.401	1.985
3	5.181	89.582	1.088

2.2.3 正交最小偏二乘法判别分析 VIP值大于1.0,表明变量对模型具有较高的贡献度,对样本分类的影响具有统计学意义<sup>[19]</sup>。由图5可知,21个共有峰中有6个VIP值大于1.0,由大到小依次为14号峰(芦丁)、11号峰(毛蕊异黄酮葡萄糖苷)、17号峰(连翘苷)、1号峰、16号峰(橙皮苷)、6号峰,可作为质量标志物。

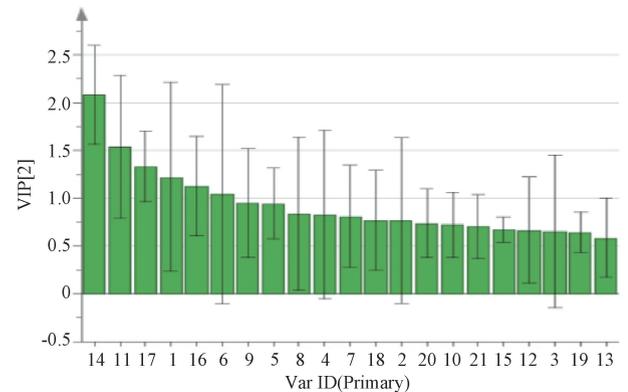


图5 15批截疫颗粒VIP值

DMod X、Hotelling's T2 统计量互补,作为批间差异性评价指标有不同的监控作用<sup>[20]</sup>。由图6~7可知,DCrit(0.05)上限为1.611,控制限T2Crit(99%)的上限为14.4329,警戒限T2Crit(95%)的上限是8.1966,表明各批样品均在控制限内,即为正常批次。

2.3 含量测定 采用HPLC法。

2.3.1 对照品溶液制备 精密称取各对照品适量,置于量

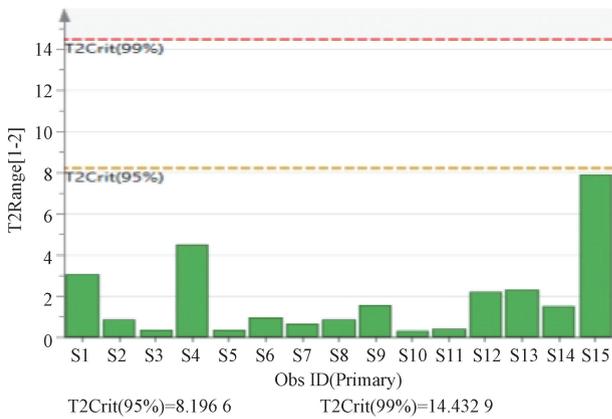


图6 15批截疫颗粒 Hotelling's T2图

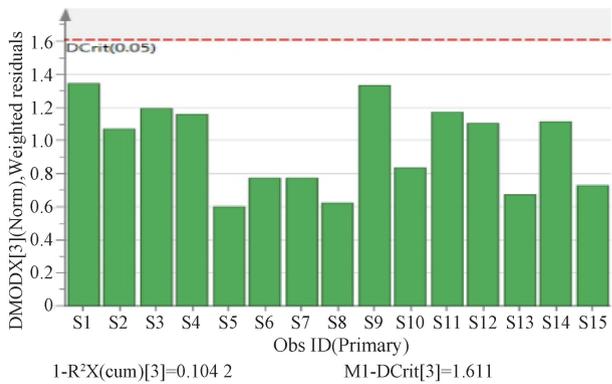


图7 15批截疫颗粒 DMod X图

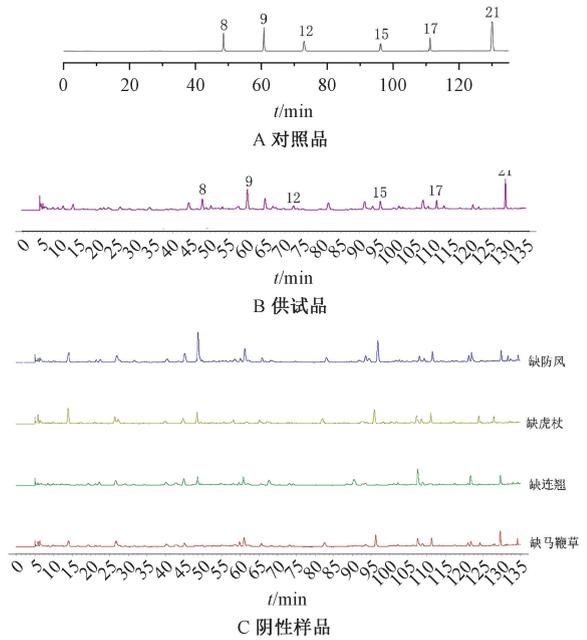
瓶中，70%甲醇溶解，制成每1 mL分别含马鞭草苷0.48 mg、虎杖苷1.70 mg、升麻素苷0.50 mg、连翘酯苷A 0.75 mg、连翘苷0.77 mg、芹菜素2.24 mg的溶液，精密吸取适量，置于量瓶中，制成每1 mL分别含各成分0.048、0.17、0.05、0.075、0.077、0.224 mg的溶液，即得。

2.3.2 系统适用性试验 分别按“2.1.3”“2.1.4”项下方法制备供试品、阴性样品溶液，在“2.1.1”项色谱条件下进样测定，结果见图8。由此可知，马鞭草苷（8号峰）、虎杖苷（9号峰）、升麻素苷（12号峰）、连翘酯苷A（15号峰）、连翘苷（17号峰）、芹菜素（21号峰）均无阴性干扰，表明该方法系统适用性良好。

2.3.3 线性关系考察 分别精密吸取“2.3.1”项下对照品溶液1、3、5、7、9、12 μL，在“2.1.1”项色谱条件下进样测定。以对照品质量浓度为横坐标（X），峰面积为纵坐标（Y）进行回归，结果见表2，可知各成分在各自范围内线性关系良好。

表2 各成分线性关系

成分	回归方程	r	线性范围/(mg·mL <sup>-1</sup> )
虎杖苷	Y=14 010X-5.273 8	0.999 9	0.016~0.210
马鞭草苷	Y=25 552X-12.037 0	0.999 6	0.005~0.063
升麻素苷	Y=28 183X-5.936 5	0.999 9	0.014~0.061
连翘酯苷A	Y=4 356.9X-9.217 6	0.999 8	0.059~0.519
连翘苷	Y=23 042X-5.205 4	0.999 7	0.013~0.090
芹菜素	Y=8 014.3X-5.686 0	0.999 8	0.011~0.134



8. 马鞭草苷 9. 虎杖苷 12. 升麻素苷 15. 连翘酯苷 A  
17. 连翘苷 21. 芹菜素

图8 各成分 HPLC 色谱图 ( II )

2.3.4 精密度试验 精密吸取“2.3.1”项下对照品溶液适量，在“2.1.1”项色谱条件下进样测定6次，测得虎杖苷、马鞭草苷、升麻素苷、连翘酯苷A、芹菜素、连翘苷峰面积RSD分别为0.36%、0.38%、0.39%、1.66%、0.56%、0.42%，表明仪器精密度良好。

2.3.5 重复性试验 取本品（S1）适量，按“2.1.3”项下方法平行制备6份供试品溶液，在“2.1.1”项色谱条件下进样测定，测得虎杖苷、马鞭草苷、升麻素苷、连翘酯苷A、芹菜素、连翘苷峰面积RSD分别为1.38%、0.96%、1.13%、1.06%、0.62%、0.86%，表明该方法重复性良好。

2.3.6 稳定性试验 取“2.1.3”项下供试品溶液（S1）适量，于0、3、6、9、12、24 h在“2.1.1”项色谱条件下进样测定，测得虎杖苷、马鞭草苷、升麻素苷、连翘酯苷A、芹菜素、连翘苷峰面积RSD分别为2.67%、0.47%、1.82%、1.39%、0.42%、0.59%，表明溶液在24 h内稳定性良好。

2.3.7 加样回收率试验 精密称取各成分含量已知的本品（S1）1.5 g，按100%水平精密加入对照品溶液，按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液，在“2.1.1”项色谱条件下进样测定，计算回收率。结果，马鞭草苷、虎杖苷、连翘苷、芹菜素、升麻素苷、连翘酯苷A平均加样回收率分别为99.98%、100.10%、100.78%、97.55%、100.49%、99.10%，RSD分别为2.05%、1.62%、1.65%、1.28%、2.06%、1.21%。

2.3.8 样品含量测定 取15批样品，按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液，在“2.1.1”项色谱条件下进样测定，计算含量，结果见表3。

表 3 各成分含量测定结果 (mg/g)

批号	马鞭草苷	虎杖苷	升麻素苷	连翘酯苷 A	连翘苷	芹菜素
S1	0.290	0.915	0.125	1.386	0.233	1.515
S2	0.292	0.912	0.124	1.215	0.219	1.498
S3	0.290	0.945	0.128	1.210	0.213	1.537
S4	0.302	1.012	0.130	1.224	0.225	1.535
S5	0.282	0.951	0.127	1.270	0.209	1.540
S6	0.238	0.797	0.110	1.087	0.174	1.277
S7	0.244	0.825	0.110	1.091	0.185	1.284
S8	0.251	0.785	0.107	1.085	0.185	1.283
S9	0.242	0.782	0.111	1.071	0.176	1.278
S10	0.256	0.838	0.114	1.119	0.191	1.338
S11	0.250	0.862	0.114	1.092	0.190	1.341
S12	0.298	1.099	0.135	1.368	0.199	1.683
S13	0.239	0.848	0.108	1.047	0.174	1.286
S14	0.234	0.786	0.099	1.072	0.168	1.222
S15	0.319	1.155	0.142	1.393	0.229	1.758

### 3 讨论

本实验分别考察了不同提取方式(加热回流、超声提取)、提取溶剂(无水乙醇、50%乙醇、70%乙醇、甲醇、50%甲醇、70%甲醇)、提取时间(0.25、0.5、0.75、1 h)、提取溶剂体积(25、50、75、100 mL)、检测波长(210、230、250、280、300、320 nm)、流动相(乙腈、甲醇、0.1%磷酸、0.1%甲酸、0.2%磷酸),依据分离度、峰数、峰形等参数,确定最优供试品溶液制备方法为50%甲醇超声处理30 min,最佳流动相为甲醇-水(含0.2%磷酸)。再将HPLC指纹图谱结合化学模式识别进行分析,发现15批截疫颗粒 Hotelling's T<sub>2</sub>、DMod X 均在控制限内,提高了质控效率。然后,通过共有峰归属、成分指认及专属性研究,本实验筛选无阴性干扰、峰形良好、对共有峰贡献度较大的化学成分,最终确定为马鞭草苷、虎杖苷、升麻素苷、连翘酯苷 A、连翘苷、芹菜素。另外,15批截疫颗粒 HPLC 指纹图谱中有 21 个共有峰,并指认出 12 个,相似度均大于 0.99,表明各批样品一致性良好。

### 4 结论

本实验首次将 HPLC 指纹图谱、化学计量学和含量测定相结合来评价截疫颗粒质量,该方法稳定可靠,并设定控制限和警戒限来更好地监测不同批次样品质量<sup>[13]</sup>,可为后续该制剂质量标准研究提供科学依据。

### 参考文献:

[1] Degrace M M, Ghedin E, Frieman M B, et al. Defining the risk of SARS-CoV-2 variants on immune protection[J]. *Nature*, 2022, 605(7911): 640-652.

[2] 黄 兰,周剑芳,韦 红,等. 流感病毒神经氨酸酶抑制剂药物耐药现状及机制研究进展[J]. *病毒学报*, 2012, 28(5): 572-576.

[3] Lampejo T. Influenza and antiviral resistance: an overview[J]. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2020, 39(7): 1201-1208.

[4] 史鹏辉,曲新艳,周 喆,等. 中药复方抗流感病毒的研究进展[J]. *中华中医药杂志*, 2017, 32(3): 1172-1175.

[5] 王小强,谢兴文,赵 军,等. 具有抗病毒作用的中药多糖化合物的研究进展[J]. *时珍国医国药*, 2023, 34(7): 1717-1720.

[6] 杜正彩,郝二伟,韦桢婷,等. 中国-东盟传统药用植物抗呼吸道常见病毒研究进展[J]. *中成药*, 2022, 44(11): 3579-3587.

[7] 赵 娟,谢世静,赵兴华,等. 中药指纹图谱质控方法研究进展[J]. *云南中医中药杂志*, 2020, 41(1): 82-86.

[8] 黄 博,姚 力,林燕翔,等. 基于指纹图谱及多指标成分定量分析的肿节风配方颗粒质量标准研究[J]. *中草药*, 2019, 50(13): 3058-3064.

[9] 孙莹莹,孙 巍,王 萍,等. 基于 UPLC 指纹图谱的逍遥片批次一致性评价研究[J]. *中草药*, 2020, 51(20): 5154-5165.

[10] Yang L, Li Y, Hou Y F, et al. Multicomponent analysis of Liuwei Dihuang Pills by a single marker quantification method and chemometric discrimination of fingerprints[J]. *J Anal Methods Chem*, 2023, 2023: 6648668.

[11] Lu P F, Chen Y, Tan M L, et al. Chemical profiling by LCMS/MS and HPLC fingerprint combined with chemometrics and simultaneous determination of 16 characteristic ingredients for the quality consistency evaluation of Shaoyao-Gancao Decoction[J]. *Biomed Chromatogr*, 2019, 33(2): e4401.

[12] 郭正红,陈 山,何 琪,等. HPLC 指纹图谱和多成分定量结合化学模式识别法评价黔钩藤质量[J]. *药物评价研究*, 2023, 46(3): 583-591.

[13] 胡 晶,丁亚明,刘 爽,等. 引火汤冻干粉 HPLC 指纹图谱建立及 8 种成分含量测定[J]. *中成药*, 2024, 46(8): 2499-2505.

[14] 张东方,鲁晓光. 健肝乐颗粒质量评价[J]. *中成药*, 2024, 46(3): 927-931.

[15] 高紫薇,吴 磊,林欣荣,等. 强心合剂 HPLC 指纹图谱建立及 11 种成分测定[J]. *中成药*, 2023, 45(12): 3895-3901.

[16] 张艳欣,江美芳,王丹丹. 荆银颗粒 HPLC 指纹图谱建立及 13 种成分测定[J]. *中成药*, 2023, 45(10): 3205-3209.

[17] 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.

[18] 朱志坤,郭媛媛,王 飘,等. 丹参粉 HPLC 指纹图谱的建立及化学计量学方法评价[J]. *中华中医药杂志*, 2023, 38(2): 857-861.

[19] 项 锋,叶继锋,侯齐书,等. 基于 PCA 和 PLS-DA 算法的不同生长阶段贯叶金丝桃药材 HPLC 指纹图谱研究[J]. *药物分析杂志*, 2020, 40(3): 568-576.

[20] 侯一哲,黎 翩,肖红敏,等. 血塞通滴丸皂苷类成分含量测定及批次一致性评价研究[J]. *中草药*, 2019, 50(11): 2552-2559.