

藿香正气系列制剂指纹图谱研究

罗廷顺^{1,2}, 石桂兰³, 耿玲^{1*} (1.大理大学基础医学院, 云南 大理 671000; 2.大理州食品药品检验所, 云南 大理 671000; 3.大理州第二人民医院, 云南 大理 671000)

摘要: 目的 建立藿香正气系列制剂统一的 HPLC 指纹图谱。方法 采用 HPLC, 色谱柱为 Waters Symmetry® C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈(A)-0.5%的冰醋酸水溶液(B)梯度洗脱, 流速为 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长为 290 nm, 柱温为 40 °C。结果 初步建立了藿香正气系列制剂 HPLC 指纹图谱共有模式, 共标定了 18 个共有峰, 通过对照品归属法, 确定了橙皮苷、欧前胡素、和厚朴酚、异欧前胡素、厚朴酚和苍术素共 6 个化合物, 13 批藿香正气系列制剂相似度为 0.802~0.999。结论 本法分析时间短, 重复性好, 精密度高, 可用于藿香正气系列制剂的质量控制。

关键词: 藿香正气; 高效液相色谱; 指纹图谱

中图分类号: R284.1

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2020)14-1714-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2020.14.009

引用本文: 罗廷顺, 石桂兰, 耿玲. 藿香正气系列制剂指纹图谱研究[J]. 中国现代应用药学, 2020, 37(14): 1714-1718.

Study on Fingerprint of Huoxiang Zhengqi Series Preparations

LUO Tingshun^{1,2}, SHI Guilan³, GENG Ling^{1*} (1.College of Basic Medicine of Dali University, Dali 671000, China; 2.Dali Institute for Food and Drug Control, Dali 671000, China; 3.Dali Second People's Hospital, Dali 671000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish the unified fingerprint of Huoxiang Zhengqi series preparations by HPLC. **METHODS** The HPLC method was performed on the Waters Symmetry® C₁₈ column (250 mm×4.6 mm, 5 μm), with acetonitrile and 0.5% glacial acetic acid aqueous solution as mobile phase A and B respectively for gradient elution. The flow rate was 1.0 mL·min⁻¹, the detection wavelength was 290 nm, the column temperature was set as 40 °C. **RESULTS** The common mode of HPLC fingerprint of Huoxiang Zhengqi series preparations was set up preliminary. There were 18 common peaks in the fingerprints. Six chemical compound as hesperidin, imperatorin, honokiol, isopeulustrin, magnolol and atretylodin were identified by reference standard attribution method. The similarities of 13 batches Huoxiang Zhengqi series preparations were between 0.802–0.999. **CONCLUSION** This method has advantages of short time, good reproducibility and high precision, it can be used for the quality control of Huoxiang Zhengqi series preparation.

KEYWORDS: Huoxiang Zhengqi; HPLC; fingerprint

藿香正气系列制剂处方主要由苍术、陈皮、厚朴(姜制)、白芷、茯苓、大腹皮、生半夏、甘草浸膏、广藿香油、紫苏叶油组成。本处方中广藿香油为君药; 白芷为臣药, 有效成分为欧前胡素与异欧前胡素; 陈皮、厚朴、苍术为佐药, 有效成分分别为橙皮苷、和厚朴酚、厚朴酚和苍术素; 甘草浸膏为使药, 有效成分为甘草酸^[1]。具有解表化湿、理气和中的功效, 临床用于外感风寒、内伤湿滞、头痛昏重、脘腹胀痛、呕吐泄泻, 被称为“祛湿圣药”。现代药理研究证明其具有抗真菌、细菌、病毒; 增强胃肠动力、改善胃电节律、保护肠屏障等作用^[2]。藿香正气先后出现了水、颗粒、软胶囊、胶囊、片、口服液、滴丸

等多种制剂。

藿香正气系列制剂系由多味药组成的中药复方制剂, 其化学成分复杂多样, 由于中药指纹图谱具有特征性, 能有效鉴别药品的真伪, 控制药品质量, 保证药品质量的相对稳定^[3]。因此, 为了更好地对藿香正气系列制剂进行质量控制, 保证药品质量, 建立 HPLC 指纹图谱方法至关重要。本课题旨在对藿香正气系列制剂进行 HPLC 分析, 并在方法学考察合格的基础上, 建立藿香正气系列制剂的指纹图谱方法。同时, 以保留时间为指标, 通过比对藿香正气不同剂型的指纹图谱, 确定了 18 个共有峰, 并对其中 6 个共有峰进行归属指认。

作者简介: 罗廷顺, 男, 硕士, 主管药师 Tel: (0872)2322664
Tel: (0872)2322664 E-mail: ynxwgl@163.com

E-mail: lanshunzi@126.com

*通信作者: 耿玲, 女, 硕士, 实验师

1 仪器与试药

1.1 仪器

岛津LC-20AT型高效液相色谱仪(日本岛津公司); AND GH-252 电子天平(日本艾安得公司); SB-5200 型双频超声仪(宁波新芝生物科技股份有限公司)。

1.2 试药

橙皮苷对照品(批号: 110721-201014; 纯度: 95.1%)、欧前胡素对照品(批号: 110826-201415; 纯度: 99.7%)、和厚朴酚对照品(批号: 110730-8702; 纯度: 99.1%)、异欧前胡素对照品(批号: 20160324; 纯度: 99.9%)、厚朴酚对照品(批号: 110729-201513; 纯度: 98.8%)、苍术素对照品(批号: 11924-201404; 纯度: 99.7%)均购自中国药品生物制品鉴定所; 乙腈为色谱纯; 水为超纯水。各剂型的样品收集情况见表1。

表1 各剂型的样品收集情况

Tab. 1 List of sample collections for each preparation

编号	样品批号	剂型	生产企业
S1	160903	水剂	云南腾药制药
S2	160715	水剂	云南腾药制药
S3	20150101	水剂	云南腾药制药
S4	WTGA1605	水剂	云南白药
S5	16060430	口服液	太极集团
S6	15070576021	口服液	太极集团
S7	16080710	口服液	太极集团
S8	8520079	软胶囊	天津中新药业
S9	8520081	软胶囊	天津中新药业
S10	16052031	软胶囊	神威药业
S11	160303	滴丸	天津天士力
S12	160312	滴丸	天津天士力
S13	150316	滴丸	天津天士力

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Waters Symmetry® C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相 A 为乙腈, 流动相 B 为 0.5%的冰醋酸水溶液, 梯度洗脱程序: 0~8 min, 15%→28%A; 8~15 min, 28%→42%A; 15~22 min, 42%→66%A; 22~35 min, 66%→70%A; 35~40 min, 70%→85%A; 40~45 min, 85%→15%A; 45~50 min, 15%A。检测波长为 290 nm, 柱温为 40 °C, 进样量为 10 μL。

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液的制备 精密称取橙皮苷对照品 10.45 mg, 厚朴酚对照品 5.12 mg, 和厚朴酚对照品 5.50 mg, 欧前胡素对照品 4.85 mg, 异欧前胡素对照品 5.56 mg, 苍术素对照品 5.40 mg, 置于 100 mL 量瓶中, 加甲醇超声(功率 250 W, 频

率 40 kHz)溶解并定容至刻度, 摇匀, 滤过, 即得混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备^[4-7] 藿香正气软胶囊、滴丸: 精密称取本品 0.5 g, 于 20 mL 量瓶中, 加甲醇适量, 超声(功率 250 W, 频率 40 kHz)提取 40 min, 放冷, 加甲醇定容至刻度, 过滤, 即得供试品溶液。藿香正气水、口服液: 精密移取本品 5 mL, 于 20 mL 量瓶中, 加 80%甲醇适量, 超声(功率 250 W, 频率 40 kHz)提取 10 min, 放冷, 加 80%甲醇定容至刻度, 过滤, 即得供试品溶液。

2.2.3 阴性样品溶液的制备 去除苍术、陈皮、厚朴、白芷几味药材, 按处方比例和制备工艺制备阴性样品, 按“2.2.2”项下方法制备阴性样品溶液。

2.3 方法学考察

2.3.1 系统适用性试验及专属性考察 分别精密吸取“2.2.1”“2.2.2”“2.2.3”项下溶液, 按“2.1”项下色谱条件进行分析, 记录色谱图, 结果见图1。表明各特征峰分离度良好, 无干扰, 方法专属性良好。

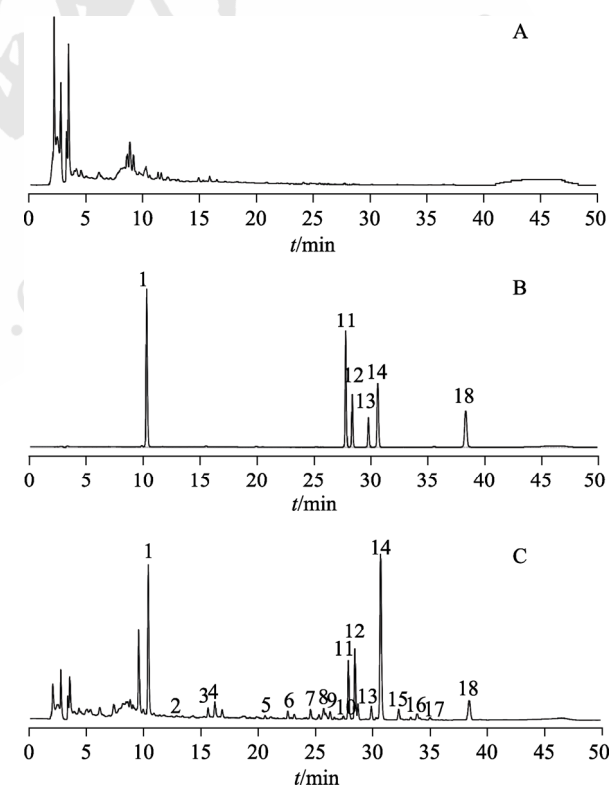


图1 HPLC 色谱图

A-阴性样品; B-对照品; C-供试品; 1-橙皮苷; 11-欧前胡素; 12-和厚朴酚; 13-异欧前胡素; 14-厚朴酚; 18-苍术素。

Fig. 1 HPLC chromatograms

A-negative sample; B-reference substances; C-sample; 1-hesperidin; 11-imperatorin; 12-honokiol; 13-isolimperatorin; 14-magnolol; 18-atractylodin.

2.3.2 仪器精密度试验 取藿香正气滴丸(批号: 160303), 按“2.2.2”项下方法制备, 按“2.1”项下色谱条件分析, 连续进样 6 次, 以橙皮苷峰为基准峰(1 号峰), 计算各特征峰相对保留值, 考察仪器精密度。各峰相对保留时间 RSD 均<0.7%, 相对峰面积 RSD 均<1.9%, 结果表明仪器精密度良好。

2.3.3 重复性试验 取藿香正气滴丸(批号: 160303) 6 份, 按“2.2.2”项下方法制备样品, 按“2.1”项下色谱条件分析, 以橙皮苷峰为基准峰(1 号峰), 计算各特征峰相对保留值, 考察方法重复性。结果各相关峰相对保留时间 RSD 均<1.0%, 相对峰面积 RSD 均<2.5%, 表明方法重复性良好。

2.3.4 稳定性试验 取“2.3.3”项下藿香正气滴丸溶液(批号: 160303), 分别于 0, 2, 4, 8, 16, 24, 48 h 时, 按“2.1”项下色谱条件进行分析, 以橙皮苷峰为基准峰(1 号峰), 计算各特征峰相对保留值, 考察稳定性。结果各特征峰相对保留时间 RSD 均<1.6%, 相对峰面积 RSD 均<2.4%, 表明该供试品溶液在 48 h 内稳定。

2.3.5 耐用性试验 取“2.3.3”项下藿香正气滴丸溶液(批号: 160303), 按“2.1”项下色谱条件, 考察了不同品牌的色谱柱: ①Thermo Synchronic C₁₈(4.6 mm×250 mm); ②CAPCELL PAK C₁₈(4.6 mm×250 mm); ③Waters Symmetry® C₁₈(4.6 mm×250 mm)。以橙皮苷峰为基准峰(1 号峰), 计算各特征峰相对保留值, 考察方法耐用性。结果各特征峰相对保

留时间 RSD 均<2.6%, 相对峰面积 RSD 均<2.1%, 表明方法耐用性良好。

2.4 指纹图谱的建立

2.4.1 指纹图谱的制备 取藿香正气滴丸(批号: 160303), 按“2.2.2”项下方法制备, 按“2.1”项下色谱条件分析, 记录色谱图。

2.4.2 参照峰的选择 以藿香正气水、口服液、软胶囊、滴丸 4 种剂型共 13 批样品为对象, 获取所有样品的色谱图, 选择分离度良好、无干扰且各个剂型中均含有的色谱峰为特征峰, 最终选取了 18 个色谱峰作为特征峰。其中 1 号峰(橙皮苷峰)为藿香正气系列制剂的主要有效成分之一, 且与相邻峰分离度好, 峰面积较大稳定, 易于辨认, 因此选择 1 号峰为内参照峰(橙皮苷峰)。

2.4.3 指纹特征峰的确定 以藿香正气水、口服液、软胶囊、滴丸共 4 种剂型 13 批样品为分析对象, 按“2.1”项下色谱分析条件, 得出所有样品的色谱图, 橙皮苷(1 号峰)在内的 18 个指纹特征峰, 通过与对照品保留时间比对, 指认了其中 6 个色谱峰, 并以橙皮苷(1 号峰)为内参照峰, 计算不同剂型和厂家 18 个共有指纹特征峰的相对峰面积及保留时间, 从数据中可看出不同剂型或同剂型不同批号样品中共有峰的相对峰面积存在很大差异, 这可能与药材来源、采收、制药工艺及仪器响应值有关^[8]。但是样品中各共有峰的相对保留时间 RSD 均<1%。结果见表 2。

表 2 13 批藿香正气系列制剂各共有峰相对峰面积

Tab. 2 Relative peak area of consensus peaks for 13 batches of Huoxiang Zhengqi series preparations

峰号	共有峰相对峰面积													平均值
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	
1	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
2	0.139	0.085	0.151	0.126	0.215	0.204	0.165	0.004	0.003	0.008	0.005	0.005	0.004	0.086
3	0.106	0.109	0.153	0.137	0.192	0.148	0.156	0.018	0.018	0.039	0.026	0.025	0.024	0.089
4	0.116	0.119	0.253	0.127	0.421	0.352	0.312	0.025	0.022	0.092	0.055	0.053	0.052	0.154
5	0.052	0.057	0.311	0.112	0.123	0.103	0.096	0.004	0.004	0.021	0.005	0.005	0.007	0.069
6	0.073	0.075	0.116	0.178	0.078	0.065	0.046	0.006	0.004	0.032	0.007	0.008	0.008	0.054
7	0.186	0.352	0.143	0.362	0.076	0.062	0.046	0.017	0.011	0.059	0.009	0.012	0.008	0.103
8	0.026	0.006	0.165	0.082	0.090	0.067	0.039	0.019	0.011	0.050	0.016	0.013	0.013	0.046
9	0.120	0.181	0.163	0.298	0.041	0.045	0.019	0.011	0.007	0.037	0.015	0.019	0.010	0.074
10	0.033	0.056	0.037	0.084	0.022	0.014	0.003	0.004	0.003	0.020	0.002	0.003	0.002	0.022
11	0.071	0.083	0.203	0.132	0.019	0.003	0.003	0.063	0.025	0.192	0.060	0.057	0.056	0.074
12	1.423	0.645	0.879	1.635	0.492	0.439	0.530	0.735	0.356	0.229	0.077	0.073	0.149	0.589
13	0.021	0.033	0.086	0.077	0.012	0.002	0.002	0.038	0.017	0.059	0.031	0.031	0.024	0.033
14	0.635	0.527	0.799	0.992	0.616	0.512	0.543	0.878	0.427	0.710	0.246	0.236	0.215	0.564
15	0.013	0.018	0.047	0.048	0.001	0.001	0.001	0.022	0.011	0.039	0.013	0.011	0.007	0.018
16	0.001	0.003	0.003	0.007	0.001	0.002	0.002	0.003	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.002
17	0.001	0.002	0.072	0.001	0.007	0.004	0.001	0.003	0.001	0.003	0.008	0.001	0.001	0.008
18	0.017	0.022	0.048	0.067	0.029	0.013	0.017	0.067	0.031	0.090	0.024	0.024	0.012	0.035

2.4.4 指纹图谱共有模式的建立和相似度评价 采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》软件(2004 年 A 版)对 13 批次不同剂型和厂家藿香正气系列制剂的色谱图进行相似度评价,以样品 S6 图谱为参照图谱,对照图谱生成采用平均数法,时间窗(min)为 0.15,多点校正后自动匹配,自动生成对照指纹图谱,见图 2~3。与对照指纹图谱比较,样品 S1~S13 的相似度分别为 0.931, 0.913, 0.905, 0.891, 0.833, 0.827, 0.802, 0.936, 0.925, 0.907, 0.999, 0.986, 0.965, 其中有 9 个批次的相似度均>0.90。说明除个别厂家外,不同厂家不同剂型藿香正气系列制剂的化学组成一致性较好,符合指纹图谱要求,可以建立 HPLC 指纹图谱共有模式。

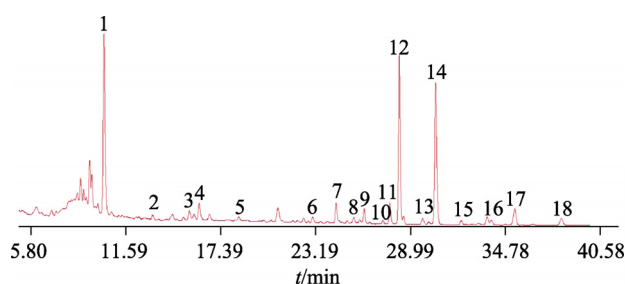


图 2 13 批藿香正气系列制剂的对照指纹图谱
1-橙皮苷; 11-欧前胡素; 12-和厚朴酚; 13-异欧前胡素; 14-厚朴酚; 18-苍术素。

Fig. 2 HPLC control fingerprint of 13 batches of Huoxiang Zhengqi series preparations
1-hesperidin; 11-imperatorin; 12-honokiol; 13-isoimperatorin; 14-magnolol; 18-atractylodin.

2.4.5 聚类分析 对 13 批藿香正气系列制剂的 HPLC 指纹图谱的 18 个共有峰峰面积组成 18×13 阶原始数据为矩阵。运用 SPSS Statistics 19.0 软件对其进行分析,采用 Ward 联接聚类分析方法,利

用平方 Euclidean 距离为样品相似性的测度,从树状聚类图中看出,当类间距离介于 10~15 时,可将 13 批藿香正气系列制剂样品分为 2 类,其中 S5, S6, S7, S11, S12, S13 号样品聚为第一类, S1, S2, S3, S4, S8, S9, S10 号样品为第二类,即藿香正气口服液和软胶囊聚为第一类,藿香正气水和滴丸聚为第二类,表明不同剂型相似性较好。聚类结果见图 4。

3 讨论

3.1 HPLC 检测波长的选择

在紫外波长 200~400 nm 扫描橙皮苷、和厚朴酚、厚朴酚、欧前胡素、异欧前胡素、苍术素对照品溶液。测得橙皮苷在 283.6 nm 有最大吸收;和厚朴酚在 292.5, 258, 235 nm 有最大吸收;厚朴酚在 292 nm 有最大吸收;苍术素在 335, 271.5 nm 有最大吸收;欧前胡素在 248.5, 300 nm 有最大吸收;异欧前胡素在 250, 258, 267, 309 nm 有最大吸收;且有相关研究表明欧前胡素和异欧前胡素的检测波长为 300 nm^[9],综合考虑,最终选定 HPLC 测定波长为 290 nm。

3.2 提取条件的选择

首先选用纯甲醇为提取溶剂,提取 30 min,考察了超声和加热回流 2 种方法对提取效率的影响^[4],发现超声提取的样品中有效成分异欧前胡素和苍术素的峰面积明显优于加热回流提取,其他有效成分无明显差异,考虑到超声提取具有方便快捷、效率高等特点,故本试验提取方法采用超声提取。然后对提取溶剂(50%, 60%, 80%, 90%, 100%甲醇)进行了考察,结果显示,用 100%甲醇提取固体制剂峰比较多,有效成分的峰面积均高

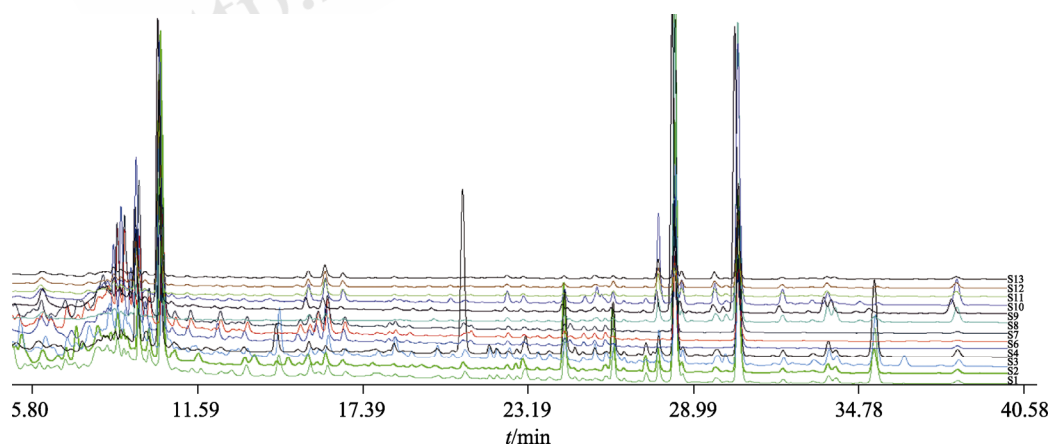


图 3 13 批藿香正气系列制剂的指纹图谱

Fig. 3 HPLC fingerprint of 13 batches of Huoxiang Zhengqi series preparations

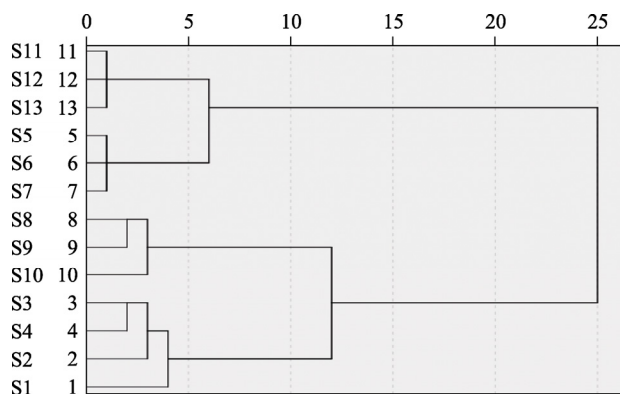


图4 13批藿香正气系列制剂的HPLC指纹图谱聚类谱系图
Fig. 4 Cluster pedigree diagram of HPLC fingerprint of 13 batches of Huoxiang Zhengqi series preparations

于其他提取溶剂,效果较好;用80%甲醇提取液体制剂峰相对较多,有效成分橙皮苷和异欧前胡素的峰面积均高于其他提取溶剂提取的样品,效果较好。最后对提取时间(10, 20, 30, 40, 50 min)进行了考察研究,结果表明,固体制剂提取40 min时,各峰面积均达到最大,液体制剂提取10 min时,各峰面积均达到最高,在延长提取时间峰面积均无明显变化。最终得出藿香正气软胶囊、滴丸的提取条件:纯甲醇超声(功率250 W,频率40 kHz)提取40 min;藿香正气水、口服液的提取条件:80%甲醇超声(功率250 W,频率40 kHz)提取10 min。

本试验采用HPLC建立了藿香正气系列制剂的指纹图谱,最终标定了18个共有峰。通过中药指纹图谱相似度评价系统软件,结果得出其中9个批次藿香正气系列制剂的相似度均>0.90,表明不同剂型或同剂型不同批号样品中共有峰所对应的药材生产工艺有一定的差异,这可能由于同种剂型之间随季节的变化而变化或不同剂型之间随厂家或不同的生产工艺而有所差异。通过聚类分析发现,不同剂型间的相似性很高,当类间距离

介于10~15时,可将4种不同剂型的藿香正气系列制剂分为2类。建立中药指纹图谱方法能够较全面反映制剂质量定性上的一致性^[10],可用于中药制剂质量比较与评价,该方法操作简便快捷,重复性好,精密度高,适用性强,可作为藿香正气系列制剂质量控制。

REFERENCES

- [1] 卢建秋. 中药藿香正气水质量评价与药动学研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2007.
- [2] 黄可婧. 同处方不同剂型藿香正气制剂的质量标准研究[D]. 天津: 天津大学, 2010.
- [3] 王睿, 徐伟, 方翼. 中药指纹图谱研究进展[J]. 中国药师, 2004, 7(10): 764-767.
- [4] CAI H K, LIU X F, JIANG F R, et al. Simultaneous determination of 6 effective components in Huoxiang Zhengqi liquid by RP-HPLC [J]. Cent South Pharm(中南药学), 2014, 12(6): 577-581.
- [5] LI S X, CHEN S Q. Determination of hesperidin, honokiol, magnolol and atrcylodine in Huoxiangzhengqi Soft capsule by UPLC [J]. J Nanjing Univ Tradit Chin Med(南京中医药大学学报), 2015, 31(6): 598-600.
- [6] 中国药典. 四部[S]. 2015.
- [7] ZHANG Y Z, TONG L, LI D X, et al. Simultaneous determination of seven constituents in Huoxiang Zhengqi Dripping pill by UPLC [J]. J Shenyang Pharm Univ(沈阳药科大学学报), 2015, 32(11): 848-852.
- [8] ZHANG Y Z, TONG L, LI D X, et al. UFLC fingerprint of Huoxiang Zhengqi Dripping pill [J]. Chin Tradit Herb Drug(中草药), 2015, 46(15): 2246-2250.
- [9] MAO Z Q, MENG X L, LI Y L. Determination of xanthotoxol, bergapten, imperatorin and isoimperatorin in Angelicae Dahuricae Radix by HPLC [J]. China Pharm(中国药师), 2011, 14(2): 205-207.
- [10] YAO L W, LIU Y, ZHENG X W, et al. Application of the fingerprint and characteristic fingerprint technology in traditional Chinese medicinal materials and Chinese patent medicine [J]. Chin J New Drugs(中国新药杂志), 2018, 27(8): 934-939.

收稿日期: 2019-08-13

(本文责编: 李艳芳)