

香薷水煎液 HPLC 指纹图谱

杨玲^{1*}, 孙耀志², 高松², 赵卫云², 王瑞娜², 冯德文²

(1. 河南中医药大学第三附属医院, 郑州 450046; 2. 仲景宛西制药股份有限公司, 河南 南阳 473000)

[摘要] 目的:为全面控制香薷药材的质量,建立香薷水煎液的 HPLC 指纹图谱,更为新加香薷饮成品颗粒剂的质量控制奠定基础。方法:测定 10 批不同产地香薷药材水煎液的 HPLC 指纹图谱,色谱条件为采用 Phenomenex Luna C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),流动相乙腈-0.1% 磷酸水,梯度洗脱,柱温 40 ℃,流速 1 mL·min⁻¹,检测波长 269 nm。将 10 批指纹图谱导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2012.130723 版),进行色谱峰匹配,以咖啡酸峰为参照峰,采用中位数法生成对照图谱,并对 10 批指纹图谱进行相似度评价。结果:建立了香薷药材水煎液的指纹图谱,标定出 14 个共有峰;对 10 批不同产地香薷药材水煎液的指纹图谱进行相似度评价,相似度均达到 0.90 以上;由共有峰的相对峰面积结果分析,不同产地香薷药材的质量存在较小差异。结论:该研究方法重复性好,可行性强,为香薷的全面质量评价奠定了基础,更为新加香薷饮质量标准的拟订提供了参考。

[关键词] 香薷; 水煎液; 高效液相色谱指纹图谱

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)24-0096-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017240096

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170926.1127.058.html>

[网络出版时间] 2017-09-26 11:27

HPLC Fingerprint of Water Decoction of Moslae Herba

YANG Ling^{1*}, SUN Yao-zhi², GAO Song², ZHAO Wei-yun², WANG Rui-na², FENG De-wen²

(1. The Third Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China;
2. Zhongjing Wanxi Pharmaceutical Co. Ltd., Nanyang 473000, China)

[Abstract] **Objective:** To establish an HPLC fingerprint of water decoction of Moslae Herba for quality evaluation, and lay the foundation for the quality control of Xinjia Xiangruyin granules. **Method:** The chromatographic fingerprints of 10 batches of water decoction of Moslae Herba from different places of origin were obtained on Phenomenex Luna C₁₈ (4.6 mm×250 mm, 5 μm), with acetonitrile-0.1% phosphoric acid solution as the mobile phase for gradient elution. The column temperature was maintained at 40 ℃ at a flow rate of 1 mL·min⁻¹, and the detection wavelength was 269 nm. 10 batches of fingerprints were imported into *Similarity Evaluation System for Chromatographic Fingerprint of TCM* (2012.130723) for chromatographic peak matching. With caffeic acid as the reference peak, the midpoint method was used to establish the reference fingerprint, which was then compared with the fingerprint of 10 batches of Moslae Herba. **Result:** The HPLC fingerprint of Moslae Herba showed 14 common peaks. The similarities of 10 peaks from different origins were all more than 0.90. Then the analysis results on relative peak areas, showed less differences in the quality of Moslae Herba from 10 origins. **Conclusion:** With good reproducibility and feasibility, this method can be used as the means to assess the quality of Moslae Herba and provides reference for preparing the quality standard of Xinjia Xiangruyin granules.

[Key words] Moslae Herba; water decoction; HPLC fingerprint

[收稿日期] 20170808(022)

[基金项目] 国家“重大新药创制”科技重大专项(2013zx09508-105)

[通讯作者] * 杨玲, 硕士, 从事中药新药研发, E-mail: lillian0099@yeah.net

对中药复方的质量控制首先需严格控制方中各药的质量,香薷素有“夏月麻黄”之称,能发汗解暑、利湿解毒,是新加香薷饮方中重要组成,主含挥发油和黄酮类物质^[1-2]。目前,香薷的质量控制主要以挥发油含量为标准,但其稳定性、一致性和可控性仍然不足,从而造成临床疗效的一致性、稳定性较差^[3]。

本实验研究内容属于国家科技重大新药创制专项经典名方标准颗粒研究——新加香薷饮课题研究的分支。为遵循原处方、原用法、原适用症原则^[4],新加香薷饮颗粒采用水煎煮法制备,故香薷水煎液的质量控制是本课题研究的重点之一。中药指纹图谱研究是使用多学科交叉、综合技术手段对复杂物质组成体系质量稳定性进行评价的检测方法,现代中药质量标准体系需要采用中药指纹图谱作为核心技术来构建整体框架^[5]。本实验通过建立香薷药材水煎液的标准指纹图谱模板,并对 10 个不同产地药材的相似性进行分析,为全面控制香薷药材的质量提供参考,更为新加香薷饮颗粒剂的成品质量控制奠定基础。

1 材料

2695 型高效液相色谱仪(2998 DAD 检测器,美国 Waters 公司);MS 105 型 1/10 万,AL 104 型 1/1 万电子天平(瑞士梅特勒托利多公司),煎药壶(天野电器);中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件(2012.130723 版本,国家药典委员会)。

咖啡酸对照品(批号 110885)购于中国食品药品检定研究院。香薷药材经河南中医药大学陈随清教授鉴定为唇形科植物石香薷 *Mosla chinensis* 或江香薷 *M. chinensis* ‘jiangxiangru’ 的干燥地上部分,10 批样品分别于 2015 年 6 月收集于浙江衢州石香薷 *M. chinensis* (S1, S2),江西新余石香薷 *M. chinensis* (S3, S4),安徽亳州江香薷 *M. chinensis* ‘jiangxiangru’ (S5, S6),浙江临安江香薷 *M. chinensis* ‘jiangxiangru’ (S7, S8),浙江长兴石香薷 *M. chinensis* (S9),河南郑州江香薷 *M. chinensis* ‘jiangxiangru’ (S10)。乙腈为色谱纯,磷酸为分析纯,水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 采用 Phenomenex Luna C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈(A)-0.1% 磷酸水(B),梯度洗脱(0 ~ 30 min, 5% ~ 11% A; 30 ~ 45 min, 11% ~ 12% A; 45 ~ 50 min, 12% ~ 14% A; 50 ~ 80 min, 14% A; 80 ~ 105 min, 14% ~ 22% A;

105 ~ 120 min, 22% A),流速 1.0 mL·min⁻¹,检测波长 269 nm,柱温 40 °C,进样量 10 μL。

2.2 溶液的制备

2.2.1 供试品溶液制备 称取各批次香薷药材 30 g,置煎药壶内,加水 500 mL,煎煮至药液减少一半,滤过,药液至 250 mL 量瓶加水定容,过 0.45 μm 微孔滤膜,冷藏备用。

2.2.2 对照品溶液制备 精密称取咖啡酸对照品适量于棕色量瓶中,加甲醇制成每 1 mL 含该成分 96.20 μg 的对照品溶液,冷藏备用。

2.3 方法学考察

2.3.1 系统适应性试验 取 2.2.2 项下对照品溶液,按 2.1 项下色谱条件测定,进样量 10 μL,记录色谱图。见图 1。

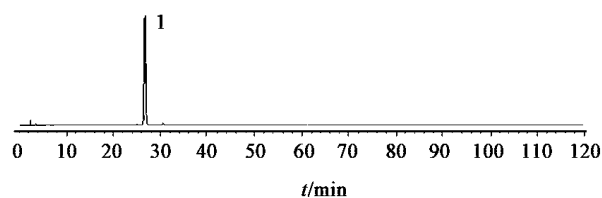


图 1 咖啡酸(1)对照品的 HPLC

Fig.1 HPLC chromatograms of caffeic acid

2.3.2 精密度试验 取香薷样品(S1)供试品溶液,依 2.1 项下色谱条件连续进样 6 次,每次 10 μL,记录指纹图谱,以咖啡酸的保留时间和峰面积为参照,测得各主要色谱峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均 < 3.0%,各指纹图谱相似度均在 0.995 ~ 1.000,表明仪器的精密度良好。

2.3.3 稳定性试验 取香薷样品(S1)供试品溶液,置室温条件下,按 2.1 项下色谱条件,分别于 0, 4, 8, 12, 24, 36 h 进样测定,记录指纹图谱,以咖啡酸的保留时间和峰面积为参照,测得各主要色谱峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均 < 3%,各指纹图谱相似度均在 0.994 ~ 1.000,表明供试品溶液于 36 h 内稳定性良好。

2.3.4 重复性试验 取香薷样品(S1),平行 6 份,按 2.2.1 项下方法制备供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件分别进样测定,记录指纹图谱,测得各主要色谱峰的相对保留时间和相对峰面积 RSD 均 < 3%,各指纹图谱相似度均在 0.999 ~ 1.000,表明本方法重复性良好。

2.4 HPLC 指纹图谱的建立与共有峰的标定

2.4.1 指纹图谱的建立 取各批次香薷药材,分别按 2.2.1 项下方法制备供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件进行测定,进样量 10 μL,得到 10 批香薷药

材水煎液的 HPLC 指纹图谱,根据色谱图中各色谱峰的相对保留时间,确定共有峰,并选取其中 14 个共有峰作为特征指纹图谱,见图 2。

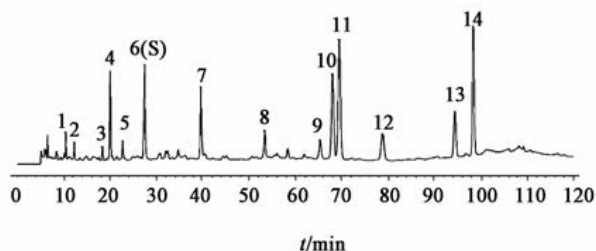


图 2 香薷 S1 样品 HPLC 指纹谱

Fig 2 HPLC fingerprint of *Mosla chinensis* from S1

表 1 10 批香薷药材水煎液指纹图谱共有峰的相对保留时间

Table 1 Relative retention time of common peaks of 10 samples of HPLC fingerprint of water decoction of *Moslae Herba*

No.	1	2	3	4	5	6	8	9	10	11	12	13	14
S1	0.378	0.445	0.665	0.727	0.825	1.439	1.935	2.368	2.467	2.520	2.864	3.420	3.563
S2	0.379	0.446	0.666	0.729	0.828	1.444	1.940	2.378	2.476	2.529	2.880	3.426	3.567
S3	0.379	0.448	0.668	0.726	0.826	1.440	1.945	2.377	2.474	2.526	2.859	3.442	3.589
S4	0.379	0.448	0.669	0.726	0.826	1.441	1.947	2.378	2.474	2.525	2.858	3.445	3.592
S5	0.379	0.448	0.669	0.725	0.825	1.438	1.946	2.378	2.474	2.526	2.857	3.454	3.607
S6	0.378	0.445	0.665	0.727	0.824	1.442	1.942	2.379	2.478	2.532	2.880	3.433	3.572
S7	0.385	0.452	0.672	0.735	0.835	1.447	1.948	2.387	2.488	2.540	2.889	3.448	3.593
S8	0.384	0.451	0.671	0.733	0.835	1.447	1.946	2.386	2.486	2.538	2.889	3.446	3.588
S9	0.380	0.448	0.668	0.727	0.827	1.443	1.948	2.385	2.483	2.535	2.877	3.451	3.597
S10	0.380	0.447	0.668	0.726	0.826	1.442	1.946	2.379	2.476	2.529	2.866	3.444	3.590

注:6 号峰均为 1.000。表 2 同。峰 7 均为 1.000。

表 2 10 批香薷药材水煎液 HPLC 指纹图谱共有峰的相对峰面积

Table 2 Relative peak areas of common peaks of 10 samples of HPLC fingerprint of water decoction of *Moslae Herba*

No.	1	2	3	4	5	7	8	9	10	11	12	13	14
S1	0.123	0.081	0.089	0.735	0.185	0.698	0.270	0.293	1.780	2.035	0.788	0.799	2.122
S2	0.123	0.079	0.091	0.750	0.189	1.684	0.259	0.284	1.772	1.998	0.784	0.786	2.122
S3	0.125	0.081	0.097	0.761	0.178	0.722	0.251	0.286	1.777	2.078	0.785	0.818	2.110
S4	0.126	0.085	0.098	0.783	0.191	0.691	0.270	0.299	1.775	2.084	0.801	0.826	2.099
S5	0.124	0.084	0.099	0.784	0.192	0.724	0.270	0.297	1.769	2.086	0.786	0.819	2.109
S6	0.125	0.090	0.098	0.779	0.190	0.694	0.273	0.281	1.751	2.042	0.799	0.811	2.098
S7	0.110	0.139	0.110	0.326	0.086	0.535	0.255	0.198	0.437	1.862	0.081	0.373	0.730
S8	0.107	0.122	0.100	0.296	0.077	0.524	0.250	0.183	0.464	1.829	0.081	0.373	0.730
S9	0.239	0.169	0.116	1.064	0.103	1.023	0.323	0.451	1.495	2.969	0.415	1.032	1.809
S10	0.239	0.164	0.120	1.072	0.098	1.017	0.312	0.447	1.484	2.977	0.401	1.038	1.797

图谱相比较,其相似度均达到 0.90 以上,表明药材质量稳定,差异较小;另外,从指纹图谱反映的成分信息看,样品 S3 和 S4 的指纹信息较丰富,均来自江西贵溪,提示该产地的香薷药材所含化学成分较多。

3 讨论

3.1 样品处理方法考察 目前,针对香薷的研究多以挥发油类成分^[6-9]为主,而对其水煎液研究较少。

2.4.2 共有指纹峰的标定 香薷 HPLC 指纹图谱中,共有指纹峰 14 个,以 6 号峰(咖啡酸)为参照峰(S),计算各色谱峰保留时间和保留峰面积与同一图谱中 S 峰的保留时间和保留峰面积比值,得到的相对保留时间和相对峰面积见表 1,2。

2.5 相似度评价 将 10 批香薷指纹图谱导入国家药典委员会颁布的“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2012.130723 版),进行色谱峰匹配,以咖啡酸峰为参照峰,采用中位数法生成共有模式,10 批香薷药材水煎液 HPLC 指纹图谱见图 3,相似度结果见表 3。由相似度结果可知,以上样品与对照

含香薷的方剂(新加香薷饮、四味香薷饮、柴胡香薷饮等)多以水煎煮入药用,现代经方研发为保证临床疗效,遵循古方亦多采用水为提取溶媒,且现代药理试验证明,香薷水煎液具有解热、抗菌、抗病毒和增强免疫等药理作用^[10-11]。曾对比甲醇超声,70% 甲醇超声,50% 甲醇超声,甲醇回流提取香薷粉末,结果显示不同批次香薷之间差异较大,这与香薷挥

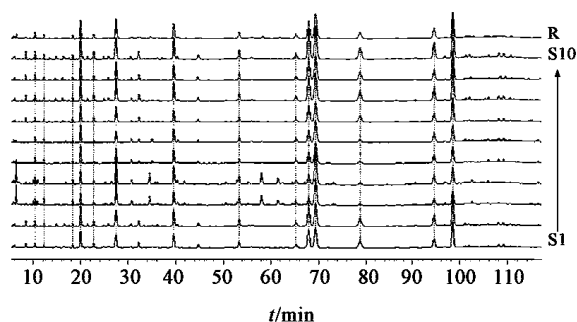


图 3 10 批香薷药材水煎液 HPLC 指纹谱

Fig. 3 HPLC fingerprint of water decoction of Moslae Herba

表 3 10 批香薷药材水煎液 HPLC 指纹图谱相似度

Table 3 Similarities of HPLC fingerprint of 10 batches Moslae Herba water decoction

	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	R
S1	1.000	0.998	0.838	0.839	0.959	0.957	0.998	0.999	0.997	0.999	0.989
S2	0.998	1.000	0.840	0.841	0.960	0.959	1.000	0.998	0.997	0.998	0.989
S3	0.838	0.840	1.000	0.998	0.918	0.918	0.844	0.845	0.846	0.843	0.906
S4	0.839	0.841	0.998	1.000	0.918	0.918	0.845	0.846	0.847	0.843	0.907
S5	0.959	0.960	0.918	0.918	1.000	0.999	0.963	0.964	0.963	0.962	0.985
S6	0.957	0.959	0.918	0.918	0.999	1.000	0.962	0.962	0.962	0.960	0.984
S7	0.998	1.000	0.844	0.845	0.963	0.962	1.000	0.999	0.998	0.998	0.991
S8	0.999	0.998	0.845	0.846	0.964	0.962	0.999	1.000	0.998	0.999	0.991
S9	0.997	0.997	0.846	0.847	0.963	0.962	0.998	0.998	1.000	0.997	0.990
S10	0.999	0.998	0.843	0.843	0.962	0.960	0.998	0.999	0.997	1.000	0.990
R	0.989	0.989	0.906	0.907	0.985	0.984	0.991	0.991	0.990	0.990	1.000

且保留时间符合要求。利用二极管阵列检测器全波长扫描考察了不同吸收波长下的指纹图谱特征,重点考察了 236,254,269,280,330 nm 吸收波长下的指纹图谱。结果表明,在 269 nm 下检测到的香薷指纹图谱信息量较大,特征性强,而且不同成分的响应值较为均匀,因此选择 269 nm 为检测波长。

香薷水煎液 HPLC 指纹图谱方法的精密度、稳定性和重复性试验结果表明此测定条件安全稳定、可靠、重复性良好,符合中药指纹图谱分析测定的要求。由试验结果分析得出,不同产地香薷药材质量差异较小,可以依据与标准指纹图谱模板的相似性与相关性来评价和使用药材,为新加香薷饮成品颗粒剂的质量控制提供参考。本实验尚存在化学成分指认不明确、样品的多样性较小的不足,亟待进一步研究。

[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,2010:242.
[2] 陈钟文,吴文茂,刘华,等. 药用香薷类植物化学成分的研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(24):260-264.

发油质量不稳定有关;亦对香薷水煎液进行除杂处理方法,显示将香薷水煎液直接过滤进样后,所得图谱特征指纹峰较多,分离度较好,其可控性、可行性以及适用性均较好。

3.2 色谱条件考察^[12] 在所建立的色谱条件下,色谱峰分离比较理想。本实验考察了甲醇-水、甲醇-乙酸水、乙腈-水以及乙腈-乙酸水梯度洗脱系统,以指标成分色谱峰的性质作为参考指标,当流动相为乙腈-磷酸水溶液时,各色谱峰能达到较好分离,

[3] 曹进,王义明,罗国安,等. 中药指纹图谱获取方法验证及实际应用[J]. 世界科学技术—中医药现代化,2002,4(5):31-38.
[4] 谢佳佳,孙耀志,高松,等. 新加香薷饮标准汤剂的 HPLC 指纹图谱[J]. 国际药学研究杂志,2017,44(3):288-291.
[5] 涂兴明,吴涵,吴康郁,等. 中药指纹图谱的研究与应用[J]. 海峡医学,2016,28(5):1-3.
[6] 葛冰,卢向阳,易克,等. 石香薷的研究概况[J]. 中药材,2004,27(4):302-305.
[7] 丁晨旭,纪兰菊. 香薷化学成分及药理作用研究进展[J]. 上海中医药杂志,2005,39(5):63-65.
[8] 蒋红梅,卢向阳,方俊,等. 湘产石香薷化学成分分析及挥发油提取工艺优化[J]. 天然产物研究与开发,2007,19(5):869-873,853.
[9] 李保印,周秀梅,郝峰鸽,等. 我国香薷属植物研究进展[J]. 河南科技学院学报,2012,40(1):37-40,44.
[10] 周辉. 石香薷挥发油及其主要成分抗菌作用研究及挥发油微胶囊研制[D]. 长沙:湖南农业大学,2007.
[11] 葛冰,卢向阳,蒋红梅,等. 石香薷挥发油体外抗病毒作用研究[J]. 中兽医医药杂志,2005,24(2):3-5.
[12] 陈根顺,李鹏,徐丽芳. 香薷高效液相指纹图谱研究[J]. 中华中医药学刊,2009,27(4):772-774.

[责任编辑 顾雪竹]