

藿香正气滴丸 UFLC 指纹图谱研究

张永志^{1,2}, 佟玲², 李东翔², 孟文婷², 于治国¹, 赵云丽^{1*}

1. 沈阳药科大学药学院, 辽宁 沈阳 110016

2. 天津天士力集团研究院, 天津 300402

摘要: 目的 建立藿香正气滴丸(HZDP)的超快速液相色谱(UFLC)指纹图谱, 为该制剂的质量控制提供参考依据。

方法 采用 Waters Acquity UPLC BEH C₁₈ 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm); 流动相为乙腈-0.2%甲酸水溶液, 梯度洗脱: 0~6 min, 10%~15%乙腈; 6~9 min, 15%~20%乙腈; 9~14 min, 20%~30%乙腈; 14~19 min, 30%~50%乙腈; 19~21 min, 50%~65%乙腈; 21~26 min, 65%~75%乙腈; 26~28 min, 75%乙腈; 28~30 min, 75%~10%乙腈; 30~32 min, 10%乙腈; 体积流量为 0.4 mL/min; 柱温 30 ℃; 检测波长 300 nm。采用中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件(2004A 版)分析 11 批 HZDP 样品。**结果** 建立了 11 批 HZDP 的对照指纹图谱, 确定了 18 个共有峰; 其中 13 个归属到药材, 6、7、9、10、12 号共有峰来源于白芷, 4、5、8 号共有峰来源于陈皮, 1、2、11、13 号共有峰来源于厚朴, 17 号共有峰来源于苍术, 并通过对照品对照法和超快速液相色谱-离子阱-飞行时间串联质谱仪(UFLC-IT-TOF/MS)鉴定了其化学成分。**结论** 该方法操作简便、准确可靠、重复性好, 可为 HZDP 的物质基础研究和质量控制提供参考。

关键词: 藿香正气滴丸; 指纹图谱; 相似度; UFLC-IT-TOF/MS; 质量控制; 白芷; 陈皮; 厚朴; 苍术

中图分类号: R286 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2015)15-2246-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.15.012

UFLC fingerprint of Huoxiang Zhengqi Dripping Pill

ZHANG Yong-zhi^{1,2}, TONG Ling², LI Dong-xiang², MENG Wen-ting², YU Zhi-guo¹, ZHAO Yun-li¹

1. School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China

2. Tasly R&D Institute, Tianjin Tasly Group Co., Ltd., Tianjin 300402, China

Abstract: Objective To establish the ultra-fast liquid chromatographic (UFLC) fingerprint of Huoxiang Zhengqi Dripping Pill (HZDP) for evaluating the quality of the preparation. **Methods** The UFLC separation was achieved on an Waters Acquity UPLC BEH C₁₈ column (100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm) with acetonitrile (A)-0.2% formic acid solution (B) as mobile phase at the flow rate of 0.4 mL/min by gradient elution of 0—6 min, 10% → 15% A, 6—9 min, 15% → 20% A, 9—14 min, 20% → 30% A, 14—19 min, 30% → 50% A, 19—21 min, 50% → 65% A, 21—26 min, 65% → 75% A, 26—28 min, 75% A, 28—30 min, 75% → 10% A, 30—32 min, 10% A. The column temperature was 30 ℃. The UV detection wavelength was 300 nm. The similarity of 11 batches of HZDP was analyzed with similarity evaluation system for chromatographic fingerprint of tradition Chinese medicine (Version 2004 A). **Results** Fingerprints of 11 batches of HZDP were established and 18 common peaks were identified, 13 of which belonged to herbs and were identified by the reference substance and UFLC-IT-TOF/MS. Among them, five common peaks (peaks 6, 7, 9, 10, and 12) came from *Angelicae Dahuricae Radix*, three common peaks (peaks 4, 5, and 8) came from *Citri Reticulatae Pericarpium*, four common peaks (peak 1, 2, 11, and 13) came from *Magnoliae Officinalis Cortex*, and one common peak (peak 17) came from *Atractylodis Rhizoma*. **Conclusion** The method is rapid, accurate, reliable, and reproducible. The established fingerprint could provide the references for the study of substance basis and quality control of HZDP.

Key words: Huoxiang Zhengqi Dripping Pill; fingerprint; similarity; UFLC-IT-TOF/MS; quality control; *Angelicae Dahuricae Radix*; *Citri Reticulatae Pericarpium*; *Magnoliae Officinalis Cortex*; *Atractylodis Rhizoma*

藿香正气滴丸(Huoxiang Zhengqi Dripping Pill, HZDP)由苍术、陈皮、厚朴(姜制)、白芷、茯苓、大腹皮、生半夏、甘草浸膏、广藿香油和紫苏叶油

10 种药物组成。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^[1]。临床应用起效快、口感舒适, 对

收稿日期: 2015-04-08

基金项目: 国家“十二五”科技重大专项“重大新药创制”资助(2013zx09402202)

作者简介: 张永志(1987—), 男, 硕士研究生, 研究方向为现代药物分析。Tel: (022)26736585 E-mail: yongzhi4620@sina.com

*通信作者 赵云丽, 副教授, 硕士生导师。Tel: (024)23986295 E-mail: yunli76@163.com

胃肠道无刺激,疗效较好。中药制剂的疗效是多味药材多种成分整体作用的结果,临床用药强调整体性,因此仅对其中的1种或几种指标性成分进行定性、定量分析,无法整体表征中药制剂的化学成分,也难以用于中药制剂的全面质量控制。指纹图谱技术作为一种多组分复杂样品的有效控制方法,克服了依赖部分指标成分鉴定中药制剂质量的局限性,可以整体反映中药制剂的化学成分,可用于中药制剂的一致性评价及整体质量控制^[2-6]。目前关于HZDP全方的研究报道较少^[7],为全面评价HZDP的质量,本实验采用超快速液相色谱(UFLC)法^[8]进行了HZDP的指纹图谱研究,并对其共有峰进行了药材归属和鉴别分析,为HZDP的化学物质基础研究和质量控制提供了参考。

1 仪器与材料

XS105型电子分析天平,瑞士Mettler Toledo公司;KQ-500DE型数控超声波清洗器,昆山市超声仪器有限公司;超快速液相色谱-离子阱-飞行时间串联质谱仪(UFLC-IT-TOF/MS),包括CBM-20A系统控制器,SIL-30AC自动进样器,LC-20AB二元泵,CTO-30A柱温箱,DGU-20A5在线脱气机,SPD-M20A PDA检测器,LC-solution 3.6色谱工作站,日本岛津公司;R210旋转蒸发器,瑞士Buchi公司;Simplicity超纯水系统,美国Millipore公司。

对照品欧前胡素(批号110826-201214,质量分数99.5%)、异欧前胡素(批号110827-201109,质量分数99.6%)、橙皮苷(批号110721-201115,质量分数95.3%)、柚皮苷(批号111610-201106,质量分数94.7%)、和厚朴酚(批号110730-201313,质量分数99.1%)、厚朴酚(批号110729-200412,质量分数100.0%)、苍术素(批号11924-201303,质量分数99.5%)均购自中国食品药品检定研究院。广藿香油、紫苏叶油、白芷、陈皮、厚朴、苍术、半夏、茯苓、大腹皮和甘草10种药物由天津天士力现代中药资源有限公司提供,广藿香油为唇形科植物广藿香 *Pogostemon cablin* (Blanco) Benth. 的干燥地上部分经水蒸气蒸馏提取的挥发油;紫苏叶油为唇形科植物紫苏 *Perilla frutescens* (L.) Britt. 的干燥叶(或带嫩枝叶)经水蒸气蒸馏提取的挥发油;白芷是伞形科植物白芷 *Angelica dahurica* (Fisch. ex Hoffm.) Benth. et Hook. f. 的干燥根;陈皮为芸香科植物橘 *Citrus reticulata* Blanco 的干燥成熟果皮;厚朴为木兰科植物厚朴 *Magnolia officinalis* Rehd. et

Wils. 的干燥干皮、根皮及枝皮;苍术为菊科植物茅苍术 *Atractylodes lancea* (Thunb.) DC. 的干燥根茎;半夏为天南科植物半夏 *Pinellia ternata* (Thunb.) Breit. 的干燥块茎;茯苓为多孔菌科真菌茯苓 *Poria cocos* (Schw.) Wolf 的干燥菌核;大腹皮为棕榈科植物槟榔 *Areca catechu* L. 的干燥果皮;甘草为豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的干燥根和根茎;均由沈阳药科大学药学院于治国教授鉴定为正品。11批HZDP(编号S1~S11),批号分别为2014C08、131128、131201、131202、131203、131204、131205、131206、131207、131208、131209,由天津天士力制药股份有限公司提供。

甲醇、乙腈,色谱级,Merck公司;甲酸、冰乙酸、磷酸,色谱纯,天津康科德有限公司;水为纯化水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为Acquity UPLC BEH C₁₈色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm);流动相为乙腈-0.2%甲酸水溶液,梯度洗脱:0~6 min, 10%~15%乙腈;6~9 min, 15%~20%乙腈;9~14 min, 20%~30%乙腈;14~19 min, 30%~50%乙腈;19~21 min, 50%~65%乙腈;21~26 min, 65%~75%乙腈;26~28 min, 75%乙腈;28~30 min, 75%~10%乙腈;30~32 min, 10%乙腈;体积流量为0.4 mL/min;检测波长300 nm;柱温30℃;进样量2 μL。

2.2 质谱条件

电喷雾电离源(ESI⁺和ESI⁻),雾化气(N₂)体积流量1.5 L/min;干燥气压力0.1 MPa;毛细管电压:正离子模式4.5 kV、负离子模式3.5 kV;曲线形脱溶剂管(CDL)温度:200℃;加热模块温度:200℃;检测器电压:1.65 kV;IT真空度:0.018 Pa;TOF真空度:0.19 mPa;离子累计时间30 ms;扫描质量范围 *m/z* 100~1 000;三氟醋酸钠溶液为内标校正。

2.3 溶液制备

2.3.1 混合对照品溶液的制备 分别精密称取欧前胡素、异欧前胡素、橙皮苷、柚皮苷、和厚朴酚、厚朴酚、苍术素对照品适量,将其转移至20 mL量瓶中,用甲醇溶解并定量稀释,制成质量浓度分别为21.5、6.0、158.0、103.0、106.0、77.0、11.5 μg/mL混合对照品溶液,过0.22 μm微孔滤膜,取续滤液作为混合对照品溶液。

2.3.2 供试品溶液的制备 取 HZDP 约 1.0 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 20 mL, 称定质量, 超声 (500 W, 40 kHz) 处理 20 min, 放至室温后, 用甲醇补足减失的质量, 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得指纹图谱供试品溶液。滤液置 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱内冷冻 12 h 后, 析出滴丸辅料聚乙二醇 (PEG), 10 000 r/min 离心 10 min, 上清液使用 Microcon YM-3 离心超滤管 10 000 r/min 离心 30 min, 超滤除去辅料 PEG, 取超滤液, 即得质谱鉴定供试品溶液。

2.3.3 各药材供试品溶液的制备 取苍术、陈皮、厚朴、白芷、茯苓、大腹皮、生半夏、甘草药材粉末及广藿香油、紫苏叶油各约 1.0 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 20 mL, 称定质量, 超声 (500 W, 40 kHz) 处理 20 min, 放至室温后, 用甲醇补足减失的质量, 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得药材供试品溶液。

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度试验 精密称定 HZDP (批号 2014C08) 约 1.0 g, 按“2.3.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件连续进样 5 次, 记录色谱图, 以 5 号峰 (橙皮苷) 为参照峰, 考察各共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD。结果各共有峰相对保留时间的 RSD 均小于 0.90%, 相对峰面积的 RSD 均小于 4.0%, 表明仪器精密度良好。

2.4.2 重复性试验 精密称定 HZDP (批号 2014C08) 约 1.0 g, 按“2.3.2”项下方法制备供试品溶液 5 份, 按“2.1”项下色谱条件进样分析, 以 5 号峰 (橙皮苷) 为参照峰, 考察各共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD。结果各共有峰相对保留时间的 RSD 均小于 0.62%, 相对峰面积的 RSD 均小于 4.4%, 表明方法的重复性良好。

2.4.3 稳定性试验 精密称定 HZDP (批号 2014C08) 约 1.0 g, 按“2.3.2”项下方法制备供试品溶液, 分别于 0、2、4、8、12、24 h 进样, 以 5 号峰 (橙皮苷) 为参照峰, 考察各共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD。结果各共有峰相对保留时间的 RSD 均小于 2.0%, 相对峰面积的 RSD 均小于 4.8%, 表明 HZDP 供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.5 指纹图谱的建立与共有峰的确定

按“2.3.2”项下方法分别制备 11 批 HZDP 指纹图谱供试品溶液, 按“2.1”项色谱条件测定, 记录色谱图。根据 11 批 HZDP UFLC 指纹图谱的检测

结果, 采用中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件 (2004A 版), 以批号为 2014C08 的图谱作为参照图谱, 采用中位数法, 时间窗宽度 0.10, 多点校正生成 HZDP 共有模式的对照指纹图谱, 见图 1。分析比较 11 批 HZDP UFLC 色谱图, 共标定了 18 个共有峰, 共有峰的选取原则为分离度好、峰形明显、重复性稳定性好。5 号峰 (橙皮苷) 与相邻峰分离较好、其量高且相对稳定, 因此将 5 号峰作为参照峰 (S 峰)。

2.6 指纹图谱的相似度评价

采用中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件 (2004A 版), 计算 11 批 HZDP 指纹图谱与对照指纹图谱的相似度, 结果 S1~S11 的相似度分别为 0.981、0.998、0.998、0.999、1.000、0.999、0.999、1.000、0.994、0.999、1.000。结果表明 11 批 HZDP 的相似度均大于 0.98, 相似度良好, 说明 HZDP 不同批次之间化学成分稳定, 质量一致性较好。

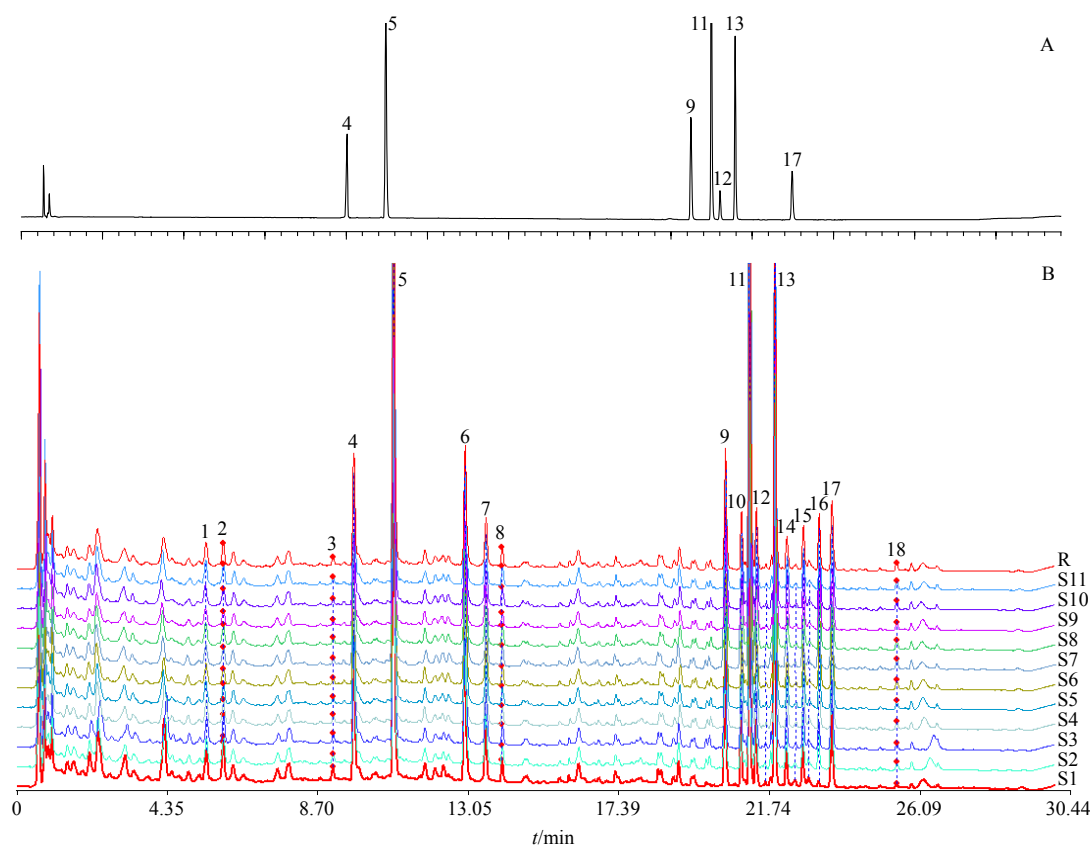
2.7 指纹图谱共有峰归属

分别精密吸取供试品溶液及单味药材溶液, 注入高效液相色谱仪, 按“2.1”项色谱条件测定, 记录色谱图。根据色谱峰的保留时间、紫外光谱信息, 对指纹图谱的特征峰进行药材归属。通过 HZDP 全方与单味药材对比分析, 结果表明在 18 个特征峰中 13 个归属到药材, 峰 6、7、9、10、12 来自白芷; 峰 4、5、8 来自陈皮; 峰 1、2、11、13 来自厚朴; 峰 17 来自苍术, 结果见图 2。

2.8 共有峰的鉴定

2.8.1 对照品对照鉴定 利用对照品对各共有峰的成分进行指认, 分别精密吸取供试品溶液、混合对照品溶液各 2 μL , 注入 UFLC, 记录色谱图, 见图 1。通过保留时间和紫外光谱信息的比较, 对各共有峰进行指认。共指认了 7 个色谱峰, 分别为 4 号峰 (柚皮苷)、5 号峰 (橙皮苷)、9 号峰 (欧前胡素)、11 号峰 (和厚朴酚)、12 号峰 (异欧前胡素)、13 号峰 (厚朴酚)、17 号峰 (苍术素)。

2.8.2 UFLC-IT-TOF/MS 鉴定 为进一步阐明 HZDP 的化学物质成分, 采用 UFLC-IT-TOF/MS 技术对各共有峰进行指认。采用正、负离子模式同时扫描, 通过质谱一级扫描得到的精确相对分子质量和二级质谱碎片信息, 结合紫外光谱信息以及相关文献报道^[9-15], 鉴定了 HZDP 指纹图谱中 6 个色谱峰的化学成分, 结果见表 1。综合上述对照品的指认结果, 18 个共有峰中 13 个峰已确定了成分。



4-柚皮苷 5-橙皮苷 9-欧前胡素 11-和厚朴酚 12-异欧前胡素 13-厚朴酚 17-苍术素
4-naringin 5-hesperidin 9-imperatorin 11-honokiol 12-isoimperatorin 13-magnolol 17-atrctylodine

图 1 混合对照品 (A) 和 11 批 HZDP (B) 的 UFLC 指纹图谱以及对照指纹图谱 (R)

Fig. 1 UFLC fingerprints of mixture reference substances (A), 11 batches of HZDP (B), and reference fingerprint (R)

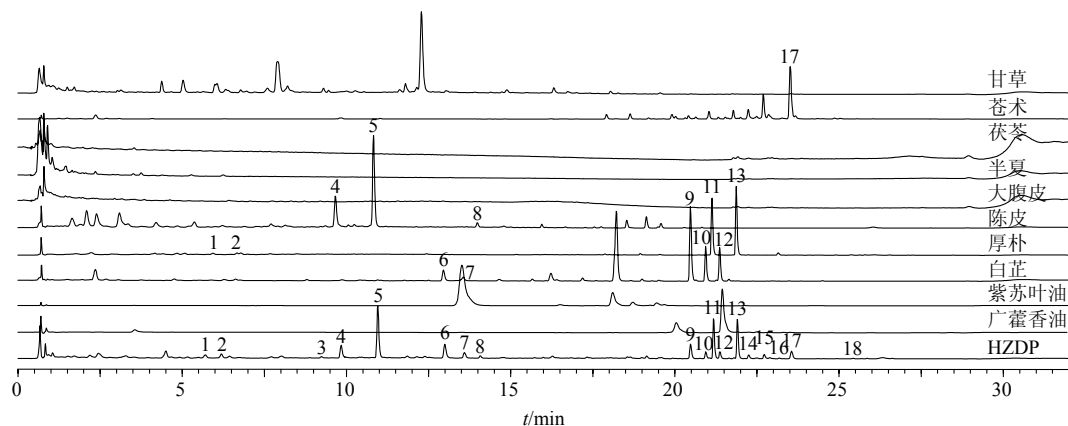


图 2 HZDP 与各单味药材 UFLC 图

Fig. 2 UFLC of HZDP and its single herb medicines

3 讨论

3.1 提取条件的优化

提取溶剂考察了甲醇、50%甲醇、水、乙醇、50%乙醇, 结果甲醇为溶剂提取效率最高; 提取方式分别考察了超声和回流, 2 种方式提取率相近, 选用提取简便的超声提取方式; 加甲醇超声提取 1

次 HZDP 就能够溶解, 因此未考察提取次数; 同时对甲醇溶液用量 10、20、40 mL 以及超声时间 10、20、30、40 min 进行考察, 最终确定采用 20 mL 甲醇超声 20 min 作为提取条件。

3.2 色谱条件的优化

分别考察了甲醇-水、乙腈-水 2 种流动相系统,

表1 HZDP 指纹图谱化学成分质谱归属

Table 1 MS attribution of chemical components in UFLC fingerprint of HZDP

峰号	t/min	分子式	选定离子	实际值 (m/z)	理论值 (m/z)	误差	鉴定化合物
1	5.41	C ₁₉ H ₂₃ NO ₄	[M+H] ⁺	330.169 0	330.170 0	-3.0×10 ⁻⁶	牛心果碱
2	5.91	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₅	[M-H] ⁻	623.198 0	623.198 1	-0.2×10 ⁻⁶	毛蕊花糖苷
6	12.94	C ₁₆ H ₁₆ O ₆	[M+H] ⁺	305.101 5	305.102 0	-1.6×10 ⁻⁶	水合氧化前胡内酯
7	13.54	C ₁₇ H ₁₆ O ₆	[M+H] ⁺	317.101 2	317.102 0	-2.5×10 ⁻⁶	白当归脑
8	14.03	C ₂₈ H ₃₄ O ₁₄	[M+H] ⁺	595.203 0	595.202 1	1.5×10 ⁻⁶	枸橼苷
10	20.94	C ₁₂ H ₈ O ₅	[M+H] ⁺	233.043 3	233.044 4	-4.7×10 ⁻⁶	8-甲氧基异欧前胡内酯

乙腈-水系统色谱分离效果较好；进一步考察甲酸、乙酸和磷酸对峰形的影响，发现加入 0.2% 甲酸后，峰形较好，分离良好。由于 HZDP 所含成分复杂，极性相差较大，采用梯度洗脱获得较理想的分离效果。采用 PDA 检测器对样品在 200~400 nm 波长范围内扫描，综合比较发现，在 300 nm 波长下检测出峰多，大部分色谱峰达到基线分离，且各主要特征峰峰吸收强度较大，故选定 300 nm 作为检测波长。

实验中考察了 3 种不同型号的色谱柱：Phenomenex kinetex C₁₈ 色谱柱（100 mm×2.1 mm，1.7 μm）、Dikma Endeavorsil C₁₈ 色谱柱（150 mm×2.1 mm，1.8 μm）和 Acquity UPLC BEH C₁₈ 色谱柱（100 mm×2.1 mm，1.7 μm），结果表明 Acquity UPLC BEH C₁₈ 色谱柱的柱效较高，色谱峰峰形对称，分离效果好，因此选用该色谱柱。

实验分别考察了 25、30、35 ℃ 不同柱温对分离效果的影响，结果表明柱温对峰的分离效果影响不大，但随柱温升高，出峰保留时间稍微提前。为方便常规实验条件，选用 30 ℃ 柱温。

3.3 共有峰归属

HZDP 的生产工艺中，苍术、陈皮、厚朴、白芷以醇提液的形式进入复方，茯苓、生半夏、大腹皮以水提液的形式进入复方，甘草浸膏、广藿香油和紫苏叶油则是直接入药。本实验以甲醇为提取溶剂，对比分析了 HZDP 全方与单味药材的紫外吸收图，18 个共有峰中 13 个归属到以醇提液形式进入复方的苍术、陈皮、厚朴、白芷药材；而其中的 3、14、15、16、18 号 5 个共有峰，既没有归属到药材，也没有鉴定出成分，需结合生产工艺进一步研究。

3.4 小结

本实验采用 UFLC 法建立了 HZDP 的指纹图谱，标定了 18 个共有色谱峰，其中 13 个归属到药材，并明确了其化学成分。通过相似度分析评价了

11 批次的 HZDP 的相似度，结果均在 0.98 以上，表明 HZDP 生产工艺稳定，质量一致性较好。

参考文献

- [1] WS₃-223(Z-223)-2004(Z). 国家药品标准·新药转正中药标准 (第 64 册) [S]. 2004.
- [2] 姜 珊, 冯丽君, 孔 慧, 等. 养阴清肺糖浆指纹图谱研究 [J]. 中草药, 2013, 44(8): 989-994.
- [3] 罗国安, 王义明. 中药指纹图谱的分类和发展 [J]. 中国新药杂志, 2002, 11(1): 46-51.
- [4] 杨岩涛, 吴春英, 吴德智, 等. 指纹图谱段带总量统计矩法对黄连解毒汤提取过程中成分变化的研究 [J]. 中草药, 2014, 45(15): 2157-2164.
- [5] 屠鹏飞. 高效液相色谱法制定中药材和中药注射剂特征指纹图谱的探讨 [J]. 中成药, 2000, 22(7): 516.
- [6] 张海红, 王 树, 薛贵平. 四季三黄片制剂-药材谱峰匹配指纹图谱研究 [J]. 中草药, 2014, 45(21): 3087-3091.
- [7] 阚红玉, 李 昂, 葛丹丹, 等. 藿香正气滴丸的波长切换法指纹图谱研究 [J]. 现代中药研究与实践, 2014, 28(2): 55-57.
- [8] 唐 峥, 毕开顺, 韩 飞, 等. 栀子大黄汤 UFLC 指纹图谱研究 [J]. 中草药, 2014, 45(3): 367-372.
- [9] 郭 健. 厚朴中生物碱成分及炮制地厚朴化学成分影响的研究 [D]. 成都: 西南交通大学, 2012.
- [10] 韩 亮, 石忠峰, 林华庆. UPLC/Q-TOF-MS/MS 法分析厚朴化学成分 [J]. 中成药, 2013, 35(4): 766-769.
- [11] 李 文. 少毛北前胡的香豆素类化学成分研究 [J]. 中国中药杂志, 2009, 34(10): 1231-1234.
- [12] 张 梁, 周 杰, 朱 蔚, 等. HPLC-DAD-ESI-MSⁿ 和 GC-MS 比较陈皮、橘皮和霉变橘皮中的化学成分 [J]. 食品与发酵工业, 2013, 39(4): 192-199.
- [13] 刘群娣, 谢春燕, 闫李丽, 等. 化橘红化学成分的 HPLC-DAD-MS/MS 分析 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2011, 13(5): 864-867.
- [14] 蔡 敏, 周 燕, 喻世涛, 等. 禹白芷中香豆素成分的 HPLC-MS/MS 分析 [J]. 分析测试学报, 2007, 26(8): 164-165.
- [15] Zheng X G, Zhang X W, Sheng X N, et al. Simultaneous characterization and quantitation of 11 coumarins in *Radix Angelicae Dahuricae* by high performance liquid chromatography with electrospray tandem mass spectrometry [J]. *J Pharm Biomed*, 2010, 51(3): 599-605.