

华盖散制剂-药材谱峰匹配指纹图谱研究

董自亮^{1,2}, 夏芳², 官柳², 徐瑞超², 冉亚东², 原欢欢², 秦少容^{2*}, 傅超美^{1*}

1. 成都中医药大学药学院, 中药资源系统研究与开发利用省部共建国家重点实验室培育基地, 四川 成都 611137

2. 太极集团有限公司, 重庆 408000

摘要: 目的 建立华盖散制剂的 HPLC 指纹图谱, 指认其特征峰, 并进行制剂-药材谱峰匹配研究。方法 对 12 个批次的样品进行 HPLC 指纹图谱相似性评价并与原药材进行谱峰匹配, 采用 HPLC-二极管阵列检测法, 检测波长 280 nm, 流动相为乙腈-0.2%磷酸水溶液, 线性梯度洗脱, 体积流量 0.6 mL/min, 柱温 30 ℃, 并采用 SPSS 19.0 统计软件进行聚类分析。结果 12 批样品色谱图中有 26 个共有峰, 其中第 4、5、10、17、18、20、21 号共有峰分别为盐酸麻黄碱、盐酸伪麻黄碱、绿原酸、甘草苷、甘草酸、柚皮芸香苷和橙皮苷, 麻黄、桑白皮、陈皮、苦杏仁、甘草、紫苏子分别有 6、3、6、1、4、1 个色谱峰与复方谱共有峰匹配。各批样品指纹图谱相似度均大于 0.960, 聚类分析表明可将华盖散样品聚为 3 类。结论 建立的华盖散指纹图谱相似度评价结合制剂用药材与制剂指纹图谱谱峰匹配相结合的方法为其鉴别与质量控制提供了科学的评价方法。

关键词: 华盖散; 高效液相色谱-二极管阵列检测法; 指纹图谱; 谱峰匹配; 相似度; 聚类分析

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2016)03-0425-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.03.012

Study on fingerprints of Huagai San-medicinal materials based on peak pattern matching

DONG Zi-liang^{1, 2}, XIA Fang², GUAN Liu², XU Rui-chao², RAN Ya-dong², YUAN Huan-huan², QIN Shao-rong², FU Chao-mei¹

1. State Key Laboratory Breeding Base of Systematic Research, Development and Utilization of Chinese Medicine Resources, School of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

2. Taiji Group Co., Ltd., Chongqing 408000, China

Abstract: Objective To establish HPLC fingerprints of Huagai San and identificate the characteristic peaks ion and preparations-medicinal materials peak pattern matching. **Methods** Similarity on 12 batches of Huagai San was estimated, and peak pattern matching of the original medicine was conducted. Sample extraction with methanol in ultrasonic condition was carried out. HPLC-DAD methods were developed, detection wave length was set at 280 nm, HPLC mobile phase consisted of acetonitrile-0.2% phosphate acid aqueous solution, volume flow-rate was delivered at 0.6 mL/min, and column temperature was kept at 30 ℃. Cluster analysis of 12 batches of Huagai San was analyzed by SPSS 19.0. **Results** The results showed that 26 common peaks were defined, the peaks No. 4, 5, 10, 17, 18, 20, and 21 were ephedrine hydrochloride, pseudoephedrine hydrochloride, chlorogenic acid, liquiritin, glycyrrhizic acid, narirutin, and hesperidin, respectively, and peak pattern matching showed that Huagai San had 6, 3, 6, 1, 4, and 1 matching peaks with *Ephedrae Herba*, *Mori Cortex*, *Citri Reticulatae Pericarpium*, *Armeniacae Semen Amarum*, *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma*, and *Perillae Fructus*, respectively. The fingerprint similarity among the samples was all over 0.960. All the samples were classified into three categories. **Conclusion** Similarity evaluation combined with the peak matching of fingerprint for Huagai San could provide the scientific methods for its identification and quality control.

Key words: Huagai San; HPLC-DAD; fingerprint; peak matching; similarity; cluster analysis

收稿日期: 2015-08-04

基金项目: 国家科技重大专项课题——经典名方标准颗粒的研究 (2013ZX09508-105)

作者简介: 董自亮, 男, 在读博士, 研究方向为中药药剂学。Tel: 18225129378 Fax: (023)72801480 E-mail: dzlcutem@163.com

*通信作者 秦少容, 女, 主任药师, 研究方向为新药研究与开发。E-mail: srqin@163.com

傅超美, 男, 教授, 博士生导师, 研究方向为中药新制剂和新剂型。E-mail: chaomeifu@126.com

华盖散出自宋·陈师文《太平惠民和剂局方》，由麻黄、紫苏子、苦杏仁、陈皮、桑白皮、茯苓、甘草共 7 味药物组成。方中以麻黄为君，辛温解表、宣肺平喘以祛风寒。臣以紫苏子，辛香降气化痰，苦杏仁辛苦温，化痰止咳平喘，二药共降利肺气，祛痰止咳。佐药陈皮辛温，燥湿化痰、理气行滞；桑白皮腥味甘寒，泻肺利水平喘；茯苓健脾渗湿，杜绝生痰之源；三药联用共祛湿消痰。甘草为使，调和诸药。诸药配伍，解表与化痰并用，痰湿得消，表寒得散，诸证自愈^[1]。全方主治肺感寒邪、咳嗽上气、胸膈烦满、项背拘急、声重鼻塞、头昏目眩、痰气不利、呀呷有声^[2]，广泛用于临床感冒、咳嗽、哮喘、喘证等肺系疾病。

近年来经典方标准汤剂与标准颗粒的研究成为热点与趋势，已纳入“十二五”重大新药创制专项，标准汤剂及颗粒的开发及在现代临床应用的适宜性已然成为亟待解决的关键问题。目前对华盖散的质量控制研究主要体现在对盐酸麻黄碱、苦杏仁苷、甘草酸、甘草苷等指标成分的定量测定方面^[3-5]，而从中药本身多组分、多靶点作用特点而言，对指标成分的控制无法全面反映复方中药制剂有效成分总体特征及内在质量特征。由于能较为科学、全面反映中药所含化学成分的特征，中药指纹图谱已成为中药及其复方制剂质量控制有效方法之一。本研究首次采用 HPLC-DAD 建立华盖散指纹图谱，对特征峰进行指认，并与单味药材指纹图谱进行谱峰匹配等溯源研究，以获得专属、整体的化学特征综合信息，为指导标准颗粒的研制及其质量的系统评价提供了理论基础。

1 仪器与试剂

Agilent1200-DAD 高效液相色谱仪，Agilent 科技有限公司；BP211D 型电子分析天平，梅特勒-托利多仪器有限公司。

对照品盐酸麻黄碱（批号 110749-200714，质量分数 99.8%）、盐酸伪麻黄碱（批号 110715-200212，质量分数 99.9%）、甘草酸铵（批号 110731-201317，质量分数 93.1%）、甘草苷（批号 111610-201106，质量分数 93.7%）、橙皮苷（批号 110796-200310，质量分数 95.3%）和绿原酸（批号 110753-201314，质量分数 96.2%），均购于中国食品药品检定研究院；对照品柚皮芸香苷（批号 1345-110116，质量分数 98.0%）购于江西本草天工科技有限责任公司；药材购于重庆桐君阁大药房，经成都中医药

大学马逾英教授鉴定，分别为麻黄科植物草麻黄 *Ephedra sinica* Stapf 的干燥根和根茎、唇形科植物紫苏 *Perilla frutescens* (L.) Britt. 的干燥成熟果实、蔷薇科植物山杏 *Prunus amemaca* L. var. *ansu* Maxim. 的干燥成熟种子、芸香科植物橘 *Citrus reticulata* Blanco 的干燥成熟果皮、桑科植物桑 *Morus alba* L. 的干燥根皮、多孔菌科真菌茯苓 *Poria cocos* (Schw.) Wolf 的干燥菌核、豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的干燥根和根茎，每味药材 3 批。乙腈、磷酸为色谱纯，其他试剂均为分析纯，水为三重水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Inertsil ODS-3 C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱；流动相为乙腈-0.2%磷酸水溶液，梯度洗脱程序为 0~60 min，5%~50%乙腈，线性梯度洗脱。检测波长为 280 nm；体积流量 0.6 mL/min，柱温 30 ℃，进样量 20 μL。

2.2 对照品溶液制备

精密称取上述各对照品适量，分别置 100 mL 量瓶中，加甲醇溶解，定容，作为对照品溶液。各对照品的质量浓度分别为盐酸麻黄碱 103.8 μg/mL、盐酸伪麻黄碱 124.0 μg/mL、绿原酸 369.6 μg/mL、甘草苷 411.2 μg/mL、甘草酸铵 304.6 μg/mL、柚皮芸香苷 122.8 μg/mL、橙皮苷 107.9 μg/mL。

2.3 华盖散样品溶液的制备

按每服剂量取华盖散处方，依《太平惠民和剂局方》记载加入适量纯化水，以“先文火后武火”方式煎煮一定时间后，放冷，即得华盖散标准汤剂。精密量取标准汤剂样品溶液适量，冷冻干燥后加甲醇溶解，0.45 μm 滤膜滤过，即得供试品溶液。选取符合《中国药典》2010 年版要求的不同批次单味药材组方，依前法得 S1~S12 不同批次华盖散样品溶液。每个样品平行处理 3 份。组成 12 批样品的各味药材的具体批次及来源见表 1。

2.4 药材样品溶液的制备

分别取上述总方对应的各单味药材，粉碎成细粉，取细粉适量，并按其在总方中对应的处方量取样，加水适量，按华盖散复方煎煮方式煎煮一定时间，取滤液按“2.3”项下制备方法，制得单味药材供试品溶液。

2.5 方法学考察

2.5.1 精密度试验 取 S1 样品按“2.1”项色谱条

表 1 不同批次样品中单味药材批号及来源

Table 1 Batch numbers and origins of herbs in different batch samples

样品	麻黄		紫苏子		苦杏仁		茯苓		桑白皮		陈皮		甘草	
	编号	来源	编号	来源	编号	来源	编号	来源	编号	来源	编号	来源	编号	来源
S1	001	内蒙古包头	001	河北安国	001	甘肃平凉	001	云南丽江	001	四川凉山	001	湖南怀化	001	甘肃庆阳
S2	001	内蒙古包头	001	河北安国	001	甘肃平凉	001	云南丽江	001	四川凉山	001	湖南怀化	001	甘肃庆阳
S3	001	内蒙古包头	001	河北安国	001	甘肃平凉	001	云南丽江	001	四川凉山	001	湖南怀化	001	甘肃庆阳
S4	001	内蒙古包头	001	河北安国	001	甘肃平凉	001	云南丽江	001	四川凉山	001	湖南怀化	001	甘肃庆阳
S5	002	内蒙古鄂尔多斯	002	河南禹县	002	河南洛阳	002	云南腾冲	002	广西玉林	002	湖北宜昌	002	甘肃盐池
S6	002	内蒙古鄂尔多斯	002	河南禹县	002	河南洛阳	002	云南腾冲	002	广西玉林	002	湖北宜昌	002	甘肃盐池
S7	002	内蒙古鄂尔多斯	002	河南禹县	002	河南洛阳	002	云南腾冲	002	广西玉林	002	湖北宜昌	002	甘肃盐池
S8	002	内蒙古鄂尔多斯	002	河南禹县	002	河南洛阳	002	云南腾冲	002	广西玉林	002	湖北宜昌	002	甘肃盐池
S9	003	内蒙古鄂托克前	003	安徽亳州	003	河北承德	003	云南瑞丽	003	云南禄丰	003	重庆江津	003	甘肃中卫
S10	003	内蒙古鄂托克前	003	安徽亳州	003	河北承德	003	云南瑞丽	003	云南禄丰	003	重庆江津	003	甘肃中卫
S11	003	内蒙古鄂托克前	003	安徽亳州	003	河北承德	003	云南瑞丽	003	云南禄丰	003	重庆江津	003	甘肃中卫
S12	003	内蒙古鄂托克前	003	安徽亳州	003	河北承德	003	云南瑞丽	003	云南禄丰	003	重庆江津	003	甘肃中卫

件连续进样 6 次,以橙皮苷峰为参照,考察各主要色谱峰相对保留时间及峰面积的一致性,结果表明,色谱图中各主要色谱峰的相对保留时间的 RSD 均小于 1.3%,相对峰面积的 RSD 均小于 2.2%,结果表明该法精密度良好。

2.5.2 稳定性试验 取 S1 样品按“2.1”项色谱条件分别在 0、2、4、6、12、24 h 依次进行检测,考察各主要色谱峰相对保留时间及峰面积的一致性,结果表明,色谱图中各主要色谱峰的相对保留时间的 RSD 均小于 1.5%,峰面积的 RSD 均小于 3.4%,结果表明样品在 24 h 内稳定。

2.5.3 重复性试验 取 S1 处方按“2.3”项平行制备样品 6 份,按“2.1”项色谱条件进样,考察各主要色谱峰相对保留时间及峰面积的一致性,结果表明,色谱图中各主要色谱峰的相对保留时间的 RSD 均小于 2.1%,峰面积的 RSD 均小于 3.0%,结果表明该法重复性良好。

2.6 指纹图谱的建立

12 批华盖散 S1~S12 按照“2.3”项平行制备供试品溶液,按照“2.1”项色谱条件测定对照品溶液和供试品溶液,并记录 60 min 内的色谱图,将 12 批样品色谱图导入药典委员会“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(版本 2004A)”软件,见图 1。12 批样品共有 26 个共有峰,通过与对照品色谱图中的保留时间比对,可指认 7 个共有峰,其中 4、5、10、17、18、20、21 号共有峰分别为盐酸麻黄碱、

盐酸伪麻黄碱、绿原酸、甘草苷、甘草酸、柚皮芸香苷和橙皮苷。

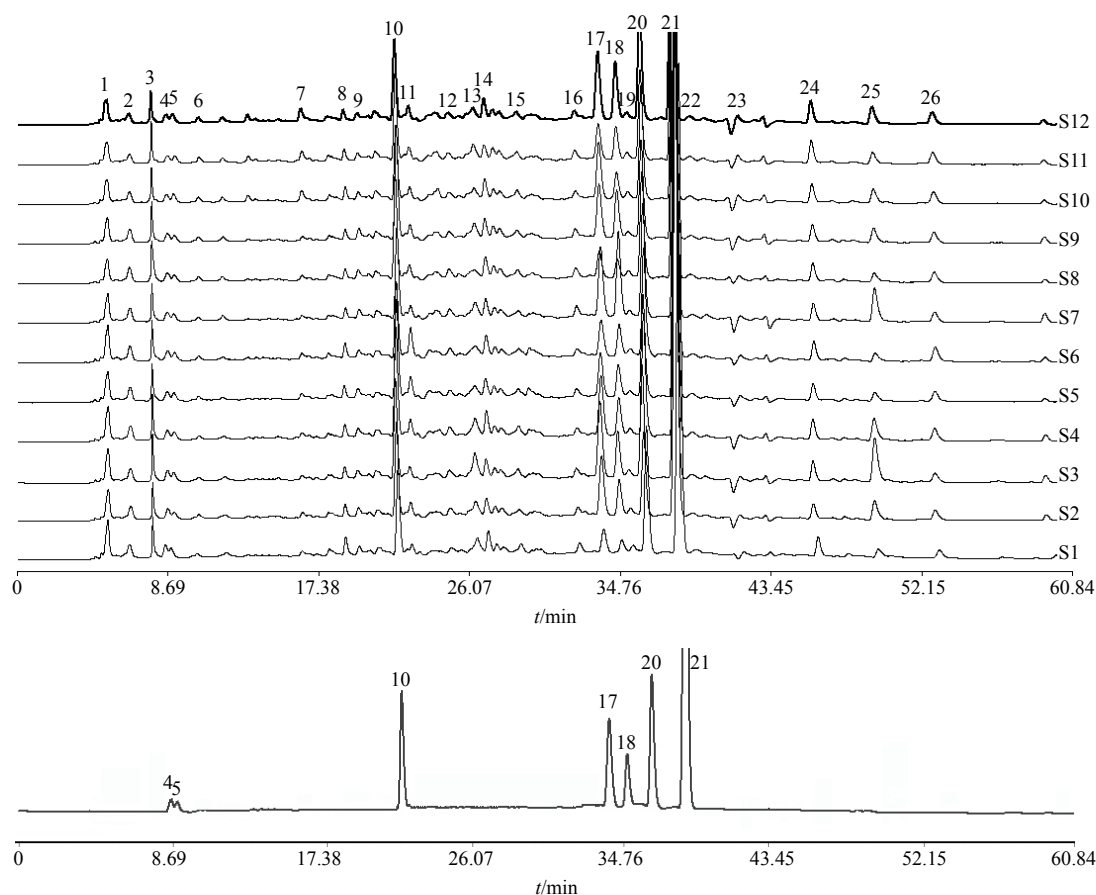
在各批次样品图谱中,橙皮苷峰的色谱峰(21 号峰)均分离良好,保留时间稳定,峰面积较大且为所有样品图谱所共有,所以确定橙皮苷为参照峰。

将所得指纹图谱导入药典委员会“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(版本 2004A)”软件,计算得 12 批样品的相似度值依次为 0.978、0.965、0.979、0.990、0.992、0.988、0.998、0.982、0.998、0.984、0.990、0.995,12 批样品与对照图谱比较相似度均大于 0.960。结果由整体化学谱峰信息可以看出,12 批次华盖散样品质量相对稳定。

2.7 样品的系统聚类分析

系统聚类分析是在分类情况未知时对数据结构进行分析,根据相似程度的统计量把样品或指标进行归类,目前已广泛应用于中药的真伪鉴别、质量评价等方面^[6-9]。本研究分别以华盖散指纹图谱中标定的 26 个共有峰的相对峰面积为变量,运用 SPSS 19.0 统计软件,采用组间均连法,以欧氏距离的平方(squared euclidean distance)为测度,进行系统聚类分析,结果见图 2。

可见,12 批样品可以分为 3 类,即 S3~S10 被聚为第 1 类,S1、S11、S12 被聚为第 2 类,S2 被聚为第 3 类,可能与药材批次间差异及产地不同有关。该系统聚类分析结果与样品的相似度分析结果基本一致。



4-盐酸麻黄碱 5-盐酸伪麻黄碱 10-绿原酸 17-甘草苷 18-甘草酸 20-柚皮芸香苷 21-橙皮苷

4-ephedrine hydrochloride 5-pseudoephedrine hydrochloride 10-chlorogenic acid 17-liquiritin 18-glycyrrhizic acid 20-narirutin 21-hesperidin

图1 12批华盖散样品的指纹图谱叠加图

Fig. 1 Fingerprints of 12 batches of Huagai San

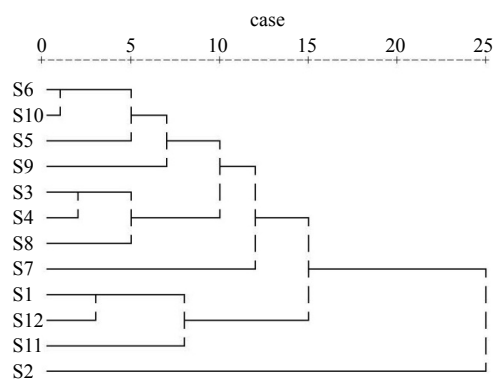


图2 12批华盖散样品的系统聚类分析

Fig. 2 Hierarchical cluster analysis of 12 batches of Huagai San

2.8 制剂与药材谱峰匹配

按照“2.1”项色谱条件测定各麻黄、桑白皮、陈皮、苦杏仁、甘草、茯苓、紫苏子等药材饮片样品溶液，记录0~60 min色谱图，并在同纬度与华盖散复方色谱图进行叠加，见图3。根据华盖散样

品指纹图谱及对照品出峰源数据，比较各单味药材样品色谱峰的相对保留时间，结合紫外光谱信息，并在多波长下寻找匹配峰。结果显示麻黄、桑白皮、陈皮、苦杏仁、甘草、紫苏子分别有6、3、6、1、4、1个色谱峰与华盖散样品共有峰匹配。经过色谱图比对，峰3来自麻黄、陈皮、桑白皮、紫苏子，峰4、5、8、11、26来自麻黄药材，峰10、15来自桑白皮药材，峰2、14、20、21、24来自陈皮药材，峰9来自苦杏仁药材，峰13、17、18、25来自甘草药材。

3 讨论

本实验建立了华盖散指纹图谱检测方法，12批华盖散图谱有26个共有特征峰，并初步对主要谱图的特征峰进行了指认，4、5、10、17、18、20、21号峰分别为盐酸麻黄碱、盐酸伪麻黄碱、绿原酸、甘草苷、甘草酸、柚皮芸香苷和橙皮苷。麻黄、桑白皮、陈皮、苦杏仁、甘草、紫苏子与华盖散模式

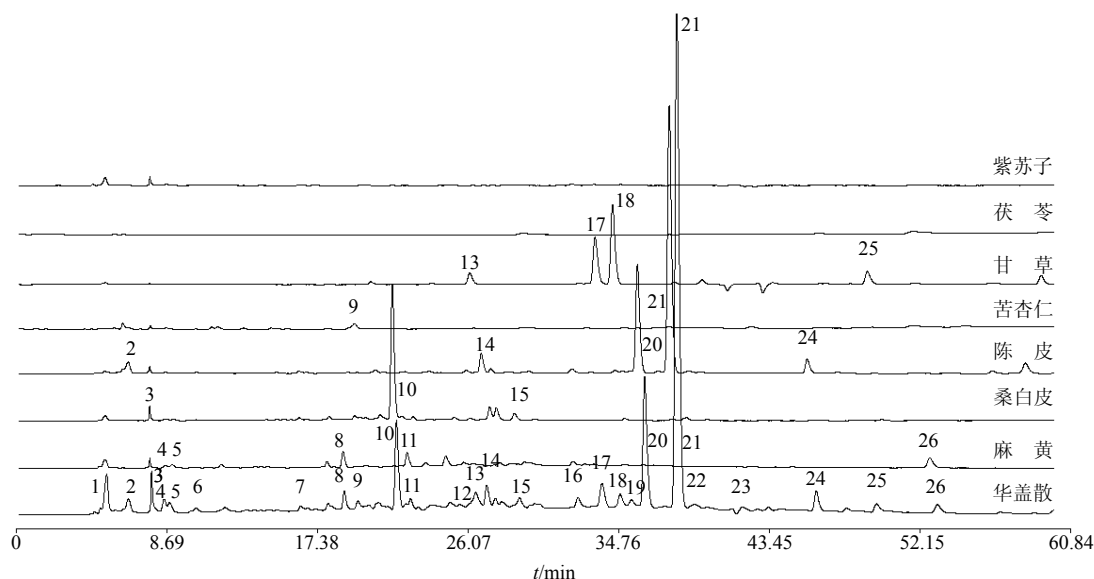


图 3 华盖散与麻黄、桑白皮、陈皮、苦杏仁、甘草、茯苓、紫苏子谱峰匹配图

Fig. 3 Peak matching fingerprints of Huagai San with *Ephedrae Herba*, *Mori Cortex*, *Citri Reticulatae Pericarpium*, *Armeniacae Semen Amarum*, *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma*, *Poria* and *Perillae Fructus*

指纹图谱分别有6、3、6、1、4、1个色谱峰相匹配。

本实验尝试了乙腈-水系统、乙腈-0.1%磷酸、乙腈-0.2%磷酸等不同流动相系统，结果以乙腈-0.2%磷酸系统得到的色谱峰峰形好且稳定。通过DAD检测器在200~400 nm扫描，结果280 nm波长下色谱图的色谱出峰信息最多，各成分分离情况相对较佳，故本研究选择280 nm作为检测波长。

通过对样品HPLC指纹图谱的相似度计算和聚类分析，12批样品相似度均大于0.960，根据共有峰面积比可被聚为3类，不同批次的样品图谱无明显差别，主要成分十分接近，这也验证了华盖散制剂所用原药材的基原一致性。

本实验首次建立华盖散HPLC-DAD指纹图谱，出峰数目、出峰强度及共有峰整体分离度等图谱评价信息均较佳，可较全面反映样品整体化学成分信息特征。进一步采用相似度计算及聚类分析对华盖散指纹图谱进行综合评价，结合药材与制剂指纹图谱谱峰匹配及指标成分的测定等控制标准汤剂质量，使得结果更为科学合理。本项目建立的成熟、稳定的华盖散标准汤剂质量控制方法将运用于华盖散标准颗粒的质量表征，为评价汤剂与颗粒的一致性提供依据。该法对中药复方制剂质量控制提供了一种新的思路。

参考文献

- [1] 石晓红. 华盖散治疗咳嗽变异型哮喘的疗效观察 [J]. 中国医药指南, 2010, 8(6): 100-101.
- [2] 段富津. 方剂学 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1993.
- [3] 胡占兴, 靳风云, 武孔云, 等. HPLC法测定华盖散传统汤剂与颗粒汤剂中盐酸麻黄碱的含量及体外抑菌作用的比较 [J]. 中华中医药学刊, 2009, 27(10): 2072-2074.
- [4] 靳风云, 贺祝英, 赵 杨, 等. HPLC测定华盖散传统汤剂与颗粒汤剂中盐酸麻黄碱、苦杏仁苷、甘草酸、甘草苷的含量 [J]. 中成药, 2008, 30(1): 80-86.
- [5] 廖 薇, 靳风云, 梁光义, 等. HPLC法测定华盖散不同煎剂中甘草酸和甘草苷的含量 [J]. 贵阳中医学院学报, 2008, 30(1): 20-23.
- [6] 高鸿彬, 刘 浩, 相秉仁. 半夏及其伪品天南星的近红外漫反射快速无损鉴别 [J]. 光谱实验室, 2012, 29(2): 899-901.
- [7] 郭怀忠, 吴 芳, 张伟泉, 等. 聚类分析辅助中药寡糖电泳分析鉴定中药 [J]. 色谱, 2013, 31(10): 1001-1004.
- [8] 吴玲芳, 林 琛, 袁永兵, 等. 叶下珠指纹图谱及模式识别研究 [J]. 中草药, 2015, 46(4): 572-575.
- [9] 魏 娟, 曾金祥, 毕 莹, 等. 吴茱萸水溶性成分HPLC指纹图谱与化学模式识别研究 [J]. 中草药, 2013, 44(23): 3400-3405.