

香砂和中丸的质量标准改进研究^Δ

王晓伟^{1*},王艳伟¹,王海波¹,宋汉敏¹,刘瑞新²,石岩^{3#}(1.河南省食品药品检验所,郑州 450008;2.河南中医药大学第一附属医院药学部,郑州 450099;3.中国食品药品检定研究院,北京 100050)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2020)02-0153-07
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2020.02.06

摘要 目的:提高香砂和中丸的药品质量标准。方法:在香砂和中丸原质量标准的基础上,修订性状观察和显微鉴定项目;建立组方药材姜厚朴、广藿香、苍术(土炒)的薄层色谱法(TLC)鉴定方法;建立橙皮苷、厚朴酚、和厚朴酚的高效液相色谱法(HPLC)含量测定方法。结果:香砂和中丸的外观性状描述修改为“黄棕色或棕褐色的水丸”。对显微鉴别项目的表述进行了少量调整。姜厚朴、广藿香、苍术(土炒)的TLC图谱均与相应的对照品或对照药材在相同位置上显现相同颜色的斑点,且阴性样品无干扰。HPLC法采用色谱柱为Phenomenex Luna C₁₈柱,柱温为30℃,流动相分别为甲醇-水(40:60, V/V,橙皮苷)、乙腈-1%冰醋酸(52:48, V/V,厚朴酚、和厚朴酚),流速为1.0 mL/min,检测波长分别为284 nm(橙皮苷)、294 nm(厚朴酚、和厚朴酚)。橙皮苷、厚朴酚、和厚朴酚进样量分别在0.201 8~2.018、0.035 7~0.357 4、0.028 2~0.282 4 μg范围内线性关系良好(r 均为0.999 9);检测限分别为2.0、0.72、0.45 ng,定量限分别为7.0、2.45、1.61 ng;精密性、重复性、稳定性、耐用性试验的RSD均小于3%;平均回收率分别为99.92%、100.49%、102.08%,RSD均小于3%。结论:本研究在香砂和中丸原质量标准基础上修订了性状观察、显微鉴别项目的表述,增加了姜厚朴、苍术(土炒)、广藿香的TLC鉴别方法,并采用HPLC法测定了橙皮苷、厚朴酚、和厚朴酚的含量,能够有效地提高该制剂的质量控制标准。

关键词 香砂和中丸;鉴别;含量测定;薄层色谱法;高效液相色谱法;质量标准

- acid oxidation inhibitor, in patients with heart failure[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2006, 48(5):992-998.
- [4] 王永霞,任红杰,朱明军,等.参附益心颗粒对慢性心力衰竭大鼠血清心钠素、脑钠素的影响[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(4):118-120.
- [5] 王永霞,任红杰,李彬,等.参附益心颗粒对慢性心力衰竭大鼠心肌血管紧张素Ⅱ1型受体和2型受体表达的影响[J].中华中医药杂志,2013,28(9):2710-2712.
- [6] 李彬,王新陆,谢世阳,等.参附益心方对缺氧原代心肌细胞活性氧和能量代谢的影响[J].中国药房,2019,30(8):1018-1024.
- [7] 陶志强,高想,姜卫东,等.曲美他嗪对心衰大鼠心脏功能和脂肪酸代谢的影响[J].中国老年学杂志,2014,34(17):4913-4915.
- [8] 邓洁,倪晶宇,黄钰婷,等.心力衰竭与心肌能量代谢关系的研究进展[J].中国临床药理学杂志,2019,35(11):1213-1216.
- [9] 李玲巧.瑞舒伐他汀联合辅酶Q₁₀治疗对慢性心衰心功能的影响[J/CD].临床医药文献电子杂志,2018,5(A1):89-90.
- [10] 薄俊霞,李敬达,刘庆平.脂肪酸移位酶FAT/CD36与长链脂肪酸的结合机制[J].中国动脉硬化杂志,2018,26(1):25-28.
- [11] 张治宇,李振东,殷仁富.脂肪酸转运体FAT/CD36在心肌脂肪酸代谢中的作用[J].同济大学学报(医学版),2006,27(S):25-27.
- [12] 张云,何秋霞,侯海荣,等.过氧化物酶体增殖物激活受体 α 的研究进展[J].现代生物医学进展,2013,13(29):5798-5800.
- [13] 胡鸣旭.参芪益心方对H9C2心肌细胞能量代谢的影响及机制研究[D].哈尔滨:黑龙江中医药大学,2014.
- [14] MORGAN EE, CHANDLER MP, YOUNG ME, et al. Dissociation between gene and protein expression of metabolic enzymes in a rodent model of heart failure[J]. *Eur J Heart Fail*, 2006, 8(7):687-693.
- [15] 胡承,贾伟平. PPAR δ 与脂代谢及胰岛素抵抗[J].国际内分泌代谢杂志,2006,26(6):385-387.
- [16] CHENG L, DING G, QIN Q, et al. Cardiomyocyte-restricted peroxisome proliferator-activated receptor-delta deletion perturbs myocardial fatty acid oxidation and leads to cardiomyopathy[J]. *Nat Med*, 2004, 10(11):1245-1250.
- [17] 邓悦.中医药在诊治心力衰竭中的地位[J].中国中西医结合杂志,2017,37(10):1162-1163.
- [18] 谢世阳,王幼平,王小晓,等.参附益心颗粒对心力衰竭大鼠心肌ATP含量及解偶联蛋白2的影响[J].中华中医药杂志,2017,32(10):4412-4415.

Δ 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81773892);河南省自然科学基金资助项目(No.162300410187)

* 主管药师,硕士。研究方向:中药材及饮片质量控制。电话:0371-65566039。E-mail:wxw0357@163.com

通信作者:研究员,博士。研究方向:中药质量控制。电话:010-67095995。E-mail:san0373@163.com

(收稿日期:2019-05-08 修回日期:2019-09-02)

(编辑:张元媛)

Study on Quality Standard Improvement for Xiangsha Hezhong Pills

WANG Xiaowei¹, WANG Yanwei¹, WANG Haibo¹, SONG Hanmin¹, LIU Ruixin², SHI Yan³(1. Henan Provincial Institute for Food and Drug Control, Zhengzhou 450008, China; 2. Dept. of Pharmacy, the First Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450099, China; 3. National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To improve the quality standard of Xiangsha hezhong pills. METHODS: Based on previous quality standard of Xiangsha hezhong pills, the items of property observation and microscopic identification were revised. TLC identification methods were established for ginger-processed *Magnolia officinalis*, *Pogostemon cablin* and *Atractylodes Lancea* (stir-fried with earth). HPLC methods were adopted for contents determination of hesperidin, magnolol and honokiol. RESULTS: The description of the appearance of Xiangsha hezhong pills should be modified to "yellow brown or brown water pill". The description of microscopical identification was adjusted slightly. TLC chromatogram of ginger-processed *M. officinalis*, *P. cablin* and *Atractylodes Lancea* (stir-fried with earth) all showed the same color spots in the same position as the corresponding substance control or reference medicinal material, and the negative samples had no interference. The contents determination were performed on Phenomenex Luna C₁₈ column with mobile phase consisted of methanol-water (40:60, V/V, hesperidin) or acetonitrile-1% glacial acetic acid (52:48, V/V, magnolol and honokiol) at the flow rate of 1.0 mL/min. The column temperature was 30 °C. The detection wavelengths were set at 284 nm (hesperidin) or 294 nm (magnolol and honokiol). The linear ranges of hesperidin, magnolol and honokiol were 0.201 8-2.018 μg, 0.035 7-0.357 4 μg and 0.028 2-0.282 4 μg (all $r=0.999\ 9$). The detection limits were 2.0, 0.72, 0.45 ng; the limits of quantitation were 7.0, 2.45, 1.61 ng. RSDs of precision, reproducibility, stability and durability tests were all lower than 3%. The average recoveries were 99.92%, 100.49% and 102.08% (all $RSD<3\%$). CONCLUSIONS: The study verifies the description of character observation and microscopical identification, adds TLC identification methods for ginger-processed *M. officinalis*, *P. cablin* and *Atractylodes Lancea* (stir-fried with earth) based on previous quality standard of Xiangsha hezhong pills. HPLC methods were adopted to determine the contents of hesperidin, magnolol and honokiol, and can effectively improve the quality control standard of the preparation.

KEYWORDS Xiangsha hezhong pills; Identification; Content determination; TLC; HPLC; Quality standard

香砂和中丸是由陈皮、姜厚朴、苍术(土炒)、麸炒枳壳、醋青皮、焦山楂、砂仁、炙甘草、广藿香、清半夏、白术(土炒)、茯苓、六神曲(炒)等13味药材组方而成的中成药制剂,于2002年被国家食品药品监督管理局发布的《第三批非处方药目录》所收录,其具有健脾燥湿、和中消食等功能,主要用于脾胃不和、不思饮食、胸满腹胀、恶心呕吐、噎气吞酸等症的治疗^[1]。该品种目前有5个国家药准字文号,分别来自5家生产企业,规格均为每500丸重30g。

香砂和中丸的质量标准最早于1977年被《河南省药品标准》收载,但其项下仅有性状及丸剂检查等项目^[2];到20世纪80~90年代,其质量标准被收录于《卫生部药品标准中药成方制剂(第二册)》,与《河南省药品标准》相比,该版标准的检验项目中仅增加了显微鉴别项^[1-3],显然,该标准已不适用于现代中药质量评价与控制的需求。药品的质量标准是对药品进行质量评价与控制的基础,为使香砂和中丸的质量标准与现代药品质量标准接轨,并提高该品种质量评价的水平,笔者对香砂和中丸的质量标准进行了系统性研究,包括采用显微鉴定和薄层色谱法(TLC)对主要组方药材进行鉴定,并建立了高效液相色谱法(HPLC)测定组方药材陈皮、麸炒枳壳、醋青皮中的活性成分橙皮苷和姜厚朴中的活性成分厚朴酚、和厚朴酚的含量,以期对相关研究人员提供参考,

更好地推动中药质量监管工作。

1 材料

1.1 仪器

Waters 2695型高效液相色谱仪,包括Waters 2998型光电二极管阵列(PDA)检测器(美国Waters公司);Digistore 2型薄层色谱数码相机系统(瑞士CAMAG公司);XPE 205型电子天平(美国Mettler-Toledo公司);GZX-DH-400-BS II型电热恒温干燥箱、XMTD-204型数显式电热恒温水浴锅(上海市跃进医疗器械有限公司);IKA C-MAG HP 7型加热器(德国IKA公司);KQ-300型超声波仪(昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 试剂与药品

橙皮苷对照品(批号:110721-200512,纯度:>98%)、厚朴酚对照品(批号:110729-200411,纯度:>98%)、和厚朴酚对照品(批号:110730-201112,纯度:>98%)、百秋李醇对照品(批号:110772-200404,纯度:>98%)、苍术素对照品(批号:111924-201006,纯度:>98%)、广藿香对照药材(批号:121135-200904)、苍术对照药材(批号:120932-199202)均购自中国食品药品检定研究院;硅胶G和硅胶GF 254预制片薄层色谱板分别购自青岛海洋化工厂和烟台市化学工业研究所;甲醇、乙腈(德国Merck公司,色谱纯);其余试剂为分析纯,水为超纯水。

香砂和中丸样品共9批,分别来自2家生产企业(企业代码为X、Y),样品信息详见表1。

表1 样品信息

Tab 1 Sample information

序号	样品编号	批号	生产企业	规格
1	X1	081203	X	每500丸重30 g
2	X2	090601	X	每500丸重30 g
3	X3	090901	X	每500丸重30 g
4	Y1	071003	Y	每500丸重30 g
5	Y2	080101	Y	每500丸重30 g
6	Y3	080302	Y	每500丸重30 g
7	Y4	100301	Y	每500丸重30 g
8	Y5	100802	Y	每500丸重30 g
9	Y6	110401	Y	每500丸重30 g

2 方法与结果

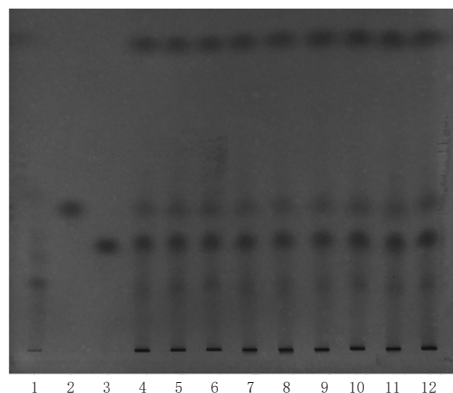
2.1 外观性状

原标准对香砂和中丸的描述为“土黄色的水丸”^[4],但笔者对样品实际观察后认为其颜色比土黄色更深,因此将香砂和中丸的外观性状描述修改为“黄棕色或棕褐色的水丸”。

2.2 TLC鉴别

2.2.1 姜厚朴的TLC鉴别 取本品10 g,研细,加石油醚(30~60 ℃)50 mL,水浴加热回流30 min,滤过;滤液用1%氢氧化钠溶液萃取2次,每次15 mL,合并氢氧化钠溶液层,加稀盐酸溶液调节pH值至2~3;用乙酸乙酯萃取2次,每次20 mL,合并乙酸乙酯液层,水浴挥去溶剂浓缩至1 mL,即得供试品溶液。取相应量的缺姜厚朴阴性样品(由Y厂家提供,以下同),按供试品溶液制备方法处理,即得阴性对照溶液。分别取厚朴酚对照品、和厚朴酚对照品各适量,加乙酸乙酯制成每1 mL含1 mg的溶液,即得对照品溶液。吸取上述供试品溶液、阴性对照溶液各8 μL,厚朴酚对照品、和厚朴酚对照品溶液各2 μL,分别点于同一硅胶GF 254预制薄层板上,以环己烷-丙酮(10:3, V/V)为展开剂展开,取出,晾干,置于紫外光灯(波长254 nm)下检视。结果显示,在与对照品色谱相应的位置上,样品色谱均显相同颜色的斑点,且阴性样品无干扰,详见图1。

2.2.2 广藿香的TLC鉴别 取本品10 g,研细,置于500 mL圆底烧瓶中,加入沸石数粒,加水200 mL,连接挥发油测定器;自测定器上端加水至刻度,再加入乙酸乙酯1 mL,连接回流冷凝管,电热套加热提取3 h,分离乙酸乙酯层,即得供试品溶液。取相应量的缺广藿香阴性样品,按供试品溶液制备法处理,即得阴性对照溶液。取广藿香对照药材1 g,按供试品溶液制备法处理,即得对照药材溶液。取百秋里醇对照品适量,加甲醇制成每1 mL含1 mg的溶液,即得对照品溶液。吸取上述供试品溶液、阴性对照溶液各2 μL,对照药材溶液、对照品溶液各1 μL,分别点于同一硅胶G预制薄层板上,以石油醚(30~60 ℃)-乙酸乙酯-冰醋酸(95:5:0.2, V/V)为



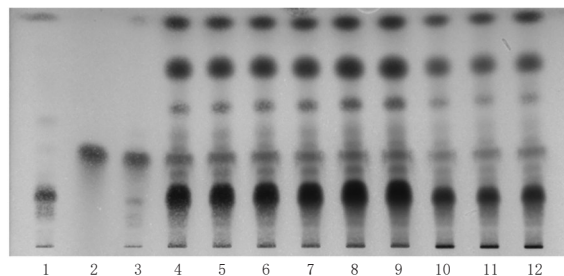
注:1.缺姜厚朴阴性样品;2.厚朴酚对照品;3.和厚朴酚对照品;4~12.样品(批号:081203、090601、090901、071003、080101、080302、100301、100802、110401)

Note: 1. negative sample without ginger-processed *M. officinalis*; 2. magnolol control; 3. honokiol control; 4-12. samples (batch number: 081203, 090601, 090901, 071003, 080101, 080302, 100301, 100802, 110401)

图1 姜厚朴TLC鉴别色谱图

Fig 1 TLC chromatogram for identification of ginger-processed *M. officinalis*

展开剂展开,取出,晾干,喷以5%香草醛硫酸溶液,热风吹至斑点显色清晰,置于日光下检视。结果显示,在与对照品和对照药材色谱相应的位置上,样品色谱均显相同颜色的斑点,且阴性样品无干扰,详见图2。



注:1.缺广藿香阴性样品;2.百秋里醇对照品;3.广藿香对照药材;4~12.样品(批号:081203、090601、090901、071003、080101、080302、100301、100802、110401)

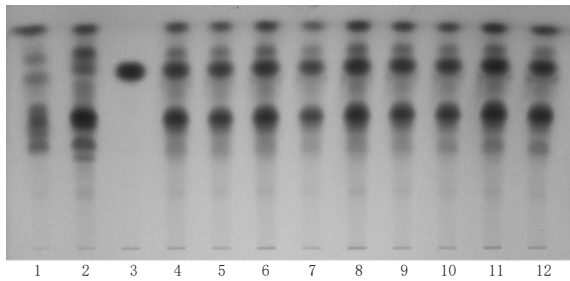
Note: 1. negative sample without *P. cablin*; 2. patchouli alcohol control; 3. *P. cablin* reference medicinal material; 4-12. samples (batch number: 081203, 090601, 090901, 071003, 080101, 080302, 100301, 100802, 110401)

图2 广藿香TLC鉴别色谱图

Fig 2 TLC chromatogram for identification of *P. cablin*

2.2.3 苍术(土炒)的TLC鉴别 取“2.2.2”项下供试品溶液作为供试品溶液。取相应量的缺苍术(土炒)阴性样品,按“2.2.2”项下供试品溶液制备方法处理,即得阴性对照溶液。取苍术对照药材1 g,按“2.2.2”项下供试品溶液制备法处理,即得对照药材溶液。取苍术素对照品适量,加甲醇制成每1 mL含0.1 mg的溶液,即得对照品溶液。吸取上述溶液各6~8 μL,分别点于同一硅胶G预制薄层板上,以石油醚(60~90 ℃)-丙酮(9:2, V/V)

为展开剂展开,取出,晾干,喷以5%香草醛硫酸试液,于105℃下加热至斑点显色清晰,置于日光下检视。结果显示,在与对照品和对照药材色谱相应的位置上,样品色谱显相同颜色的斑点,且阴性样品无干扰,详见图3。



注:1.缺苍术(土炒)阴性样品;2.苍术对照药材;3.苍术素对照品;4~12.样品(批号:081203、090601、090901、071003、080101、080302、100301、100802、110401)

Note: 1. negative sample without *Atractylodes Lancea* (stir-fried with earth); 2. *Atractylodes Lancea* reference medicinal material; 3. atracylodin control; 4-12. samples (batch number: 081203, 090601, 090901, 071003, 080101, 080302, 100301, 100802, 110401)

图3 苍术(土炒)TLC鉴别色谱图

Fig 3 TLC chromatogram for identification of *Atractylodes Lancea* (stir-fried with earth)

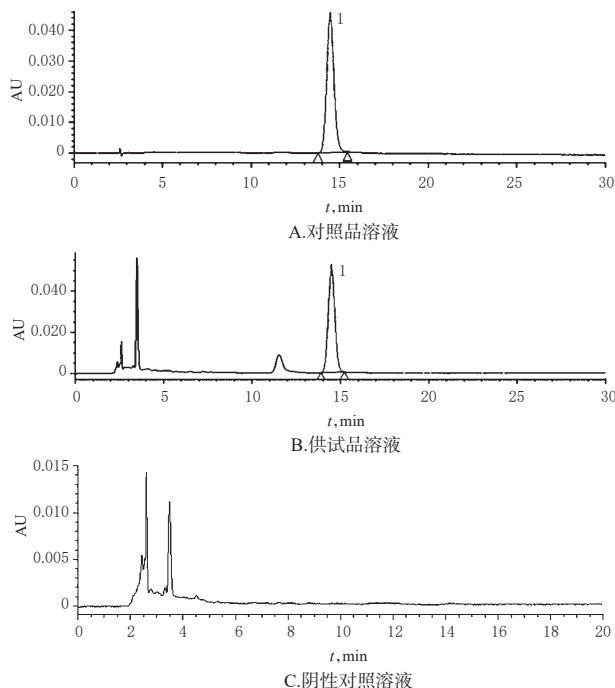
2.3 橙皮苷含量测定

2.3.1 溶液制备 取橙皮苷对照品适量,加甲醇制成每1 mL含60 μg的溶液,即得对照品溶液。取本品适量,研细,取约0.1 g置于锥形瓶中,精密称定,精密加入甲醇50 mL,称定质量,水浴加热回流1 h,放冷,再次称定质量,加甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得供试品溶液。按处方比例称取相应量的缺陈皮、醋青皮、麸炒枳壳的阴性样品,按供试品溶液制备方法处理,即得阴性对照溶液。

2.3.2 色谱条件 色谱柱:Phenomenex Luna C₁₈柱(250 mm×4.6 mm,5 μm);柱温:30℃;流动相:甲醇-水(40:60, V/V);流速:1.0 mL/min;检测波长:284 nm。

2.3.3 系统适用性及专属性试验 取“2.3.1”项下对照品溶液、供试品溶液和阴性对照溶液各适量,按“2.3.2”项下色谱条件进样测定。结果显示,各色谱峰分离良好,理论板数按橙皮苷峰计不低于2 000,阴性对照溶液在橙皮苷对照品色谱峰相应的位置上无干扰色谱峰,表明本方法系统适用性及专属性均良好。色谱图见图4。

2.3.4 线性关系考察 取橙皮苷对照品适量,加甲醇制成每1 mL含橙皮苷201.8 μg的对照品母液;分别精密吸取该母液1、2、3、4、5、6、7.5、10 mL置于10 mL量瓶中,以甲醇稀释定容,即得系列线性对照品溶液。分别取上述线性对照品溶液各适量,按“2.3.2”项下色谱条件进样测定。以橙皮苷峰面积(X)为横坐标、进样量($Y, \mu\text{g}$)为纵坐标进行线性回归,得橙皮苷回归方程为 $Y=1.93 \times 10^6 X - 9.72 \times 10^4 (r=0.9999)$ 。结果表明,橙皮苷进样量在0.2018~2.018 μg范围内线性关系良好。



注:1.橙皮苷

Note: 1. hesperidin

图4 橙皮苷的高效液相色谱图

Fig 4 HPLC chromatograms of hesperidin

2.3.5 精密度试验 精密吸取同一份供试品溶液(编号:X1)适量,按“2.3.2”项下色谱条件连续进样6次。结果,橙皮苷峰面积RSD为0.1% ($n=6$),表明仪器精密度良好。

2.3.6 重复性试验 取同一批样品(编号:Y3)共6份,每份0.1 g,按“2.3.1”项下方法制备供试品溶液,再按“2.3.2”项下色谱条件分别进样测定,以外标法计算橙皮苷含量。结果,橙皮苷平均含量为30.2 mg/g, RSD为1.2% ($n=6$),表明方法重复性良好。

2.3.7 加样回收试验 取已知橙皮苷含量的样品(编号:Y3)共6份,每份约0.05 g,分别置于锥形瓶中,精密称定,分别精密加入每1 mL含橙皮苷177.02 μg的对照品溶液(按“2.3.1”项下方法重新配制)10 mL、甲醇40 mL,按“2.3.1”项下供试品溶液制备法处理,然后按照“2.3.2”项下色谱条件进样测定并计算加样回收率,结果见表2。

表2 橙皮苷加样回收率试验结果

Tab 2 Results of recovery tests of hesperidin

取样量, g	样品中橙皮苷含量, mg	加入橙皮苷量, mg	总测得量, mg	加样回收率, %	平均加样回收率, %	RSD, %
0.0509	1.538	1.770	3.297	99.38	99.92	2.2
0.0483	1.459	1.770	3.202	98.47		
0.0473	1.429	1.770	3.200	100.06		
0.0489	1.477	1.770	3.219	98.42		
0.0563	1.701	1.770	3.451	98.87		
0.0473	1.429	1.770	3.275	104.29		

2.3.8 检测限与定量限考察 取“2.3.1”项下对照品溶

液适量,以甲醇逐级稀释,按“2.3.2”项下色谱条件进样测定,分别以信噪比3:1、10:1计算检测限和定量限。结果,橙皮苷的检测限和定量限分别为2.0、7.0 ng。

2.3.9 稳定性试验 取同一供试品溶液(编号:Y3)适量,分别在室温下放置0、2、4、6、10、12 h时,按“2.3.2”项下色谱条件进样测定。结果,橙皮苷峰面积RSD为2.3% ($n=6$),表明供试品溶液在室温下放置12 h内稳定性良好。

2.3.10 色谱柱耐用性试验 取同一供试品溶液(编号:X1)适量,参照“2.3.2”项下色谱条件,分别使用3种不同品牌的色谱柱,即Phenomenex Luna(250 mm×4.6 mm, 5 μm)、YMC-Pack ODS-A(250 mm×4.6 mm, 5 μm)、Kromasil C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm)进样测定并计算橙皮苷含量。结果,橙皮苷含量的RSD为0.5% ($n=3$),表明本方法中色谱柱耐用性良好。

2.3.11 样品含量测定 取各批次样品各0.1 g,精密称定,按“2.3.1”项下供试品溶液制备法处理,再按“2.3.2”项下色谱条件进样测定并计算橙皮苷含量,平行操作2次,取平均值,结果见表3。

表3 橙皮苷含量测定结果($n=2$)

Tab 3 Results of content determination of hesperidin ($n=2$)

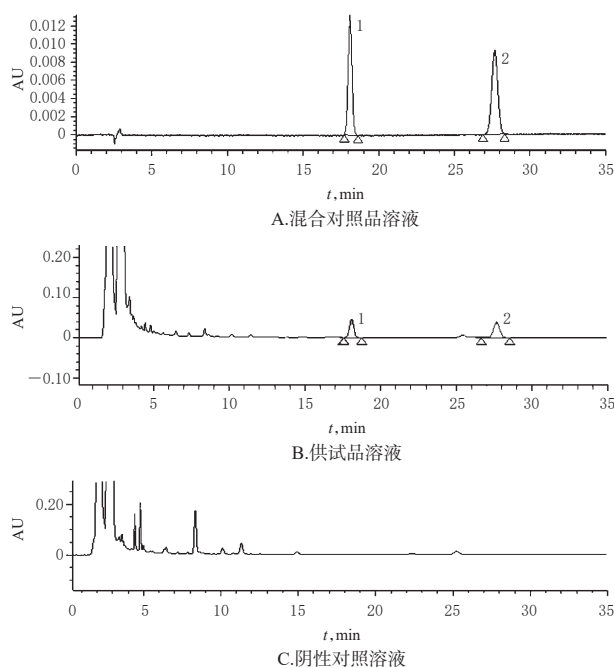
样品编号	橙皮苷含量,mg/g	样品编号	橙皮苷含量,mg/g
X1	27.7	Y3	30.2
X2	18.0	Y4	45.6
X3	18.8	Y5	35.1
Y1	33.4	Y6	37.6
Y2	49.7		

2.4 厚朴酚、和厚朴酚含量测定

2.4.1 溶液制备 取厚朴酚对照品、和厚朴酚对照品各适量,加甲醇制成每1 mL分别含厚朴酚60 μg、和厚朴酚40 μg的溶液,即得2种成分的混合对照品溶液。取本品适量,研细,取约2 g置于索氏提取器中,精密称定,加甲醇适量,水浴加热回流提取3 h,提取液以水浴挥去溶剂浓缩后,转移至25 mL量瓶中,用甲醇稀释至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,即得供试品溶液。按处方比例称取相应量的缺姜厚朴阴性样品,按供试品溶液制备方法处理,即得阴性对照溶液。

2.4.2 色谱条件 色谱柱:Phenomenex Luna C₁₈柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);柱温:30 ℃;流动相:乙腈-1%冰醋酸(52:48, V/V);流速:1.0 mL/min;检测波长:294 nm。

2.4.3 系统适用性及专属性试验 取“2.4.1”项下混合对照品溶液、供试品溶液和阴性对照溶液各适量,按“2.4.2”项下色谱条件进样测定。结果显示,各色谱峰分离良好,理论板数按厚朴酚或和厚朴酚计均不低于2 000,阴性对照溶液在混合对照品色谱峰相应的位置上无干扰色谱峰,表明本方法系统适用性及专属性均良好。色谱图见图5。



注:1.和厚朴酚;2.厚朴酚

Note:1. honokiol;2. magnolol

图5 厚朴酚、和厚朴酚的高效液相色谱图

Fig 5 HPLC chromatograms of magnolol and honokiol

2.4.4 线性关系考察 取厚朴酚、和厚朴酚对照品各适量,加甲醇制成每1 mL含厚朴酚35.74 μg、和厚朴酚28.24 μg的混合对照品母液;精密吸取上述混合对照品母液1、2、3、4、5、6、7、8、10 mL置于10 mL量瓶中,以甲醇稀释定容,即得系列线性对照品溶液。分别吸取上述系列对照品溶液各适量,按“2.4.2”项下色谱条件进样测定。分别以厚朴酚、和厚朴酚峰面积(X)为横坐标、两者对应的进样量($Y, \mu\text{g}$)为纵坐标进行线性回归,得厚朴酚回归方程为 $Y=1.22 \times 10^4 X - 9.91 \times 10^4$ ($r=0.9999$),和厚朴酚回归方程为 $Y=1.68 \times 10^4 X - 1.04 \times 10^4$ ($r=0.9999$)。结果表明,厚朴酚、和厚朴酚进样量分别在0.035 7~0.357 4 μg、0.028 2~0.282 4 μg范围内线性关系良好。

2.4.5 精密密度试验 精密吸取同一供试品溶液(编号:Y4)10 μL,按“2.4.2”项下色谱条件连续进样6次。结果,厚朴酚、和厚朴酚峰面积RSD分别为1.4%、1.0% ($n=6$),表明仪器精密密度良好。

2.4.6 重复性试验 取同一批样品(编号:Y4)共6份,每份2 g,按照“2.4.1”项下方法制备供试品溶液,并按照“2.4.2”项下色谱条件分别进样测定,以外标法计算厚朴酚、和厚朴酚的含量。结果,厚朴酚、和厚朴酚的平均含量分别为0.46、0.33 mg/g, RSD分别为2.0%、2.0% ($n=6$),表明方法重复性良好。

2.4.7 加样回收率试验 取已知厚朴酚、和厚朴酚含量的样品(编号:Y4)共6份,每份约1 g,置于索氏提取器中,精密称定,分别精密加入每1 mL含厚朴酚17.868 μg、和厚朴酚14.120 μg的混合对照品溶液(按“2.4.1”项下方

法重新配制)25 mL,按“2.4.1”项下供试品溶液制备法处理,再按“2.4.2”项下色谱条件进样测定并计算加样回收率,结果见表4、表5。

表4 厚朴酚加样回收率试验结果

取样量, g	样品中厚朴酚含量, mg	加入厚朴酚量, mg	总测得量, mg	加样回收率, %	平均加样回收率, %	RSD, %
1.028 1	0.472 9	0.446 7	0.940	104.57		
1.018 0	0.468 3	0.446 7	0.902	97.09		
0.990 7	0.455 7	0.446 7	0.909	101.48		
0.995 1	0.457 7	0.446 7	0.894	97.67	100.49	2.8
0.996 3	0.458 3	0.446 7	0.914	102.01		
1.032 1	0.474 8	0.446 7	0.922	100.11		

表5 和厚朴酚加样回收率试验结果

取样量, g	样品中和厚朴酚含量, mg	加入和厚朴酚量, mg	总测得量, mg	加样回收率, %	平均加样回收率, %	RSD, %
1.028 1	0.339 3	0.353 0	0.701	102.46		
1.018 0	0.335 9	0.353 0	0.678	96.91		
0.990 7	0.326 9	0.353 0	0.696	104.56		
0.995 1	0.328 4	0.353 0	0.684	100.74	102.08	2.9
0.996 3	0.328 8	0.353 0	0.698	104.59		
1.032 1	0.340 6	0.353 0	0.705	103.23		

2.4.8 检测限与定量限考察 取“2.4.1”项下混合对照品溶液适量,以甲醇逐级稀释,按“2.4.2”项下色谱条件进样测定,分别以信噪比3:1、10:1计算检测限和定量限。结果,厚朴酚、和厚朴酚的检测限分别为0.72、0.45 ng,定量限分别为2.45、1.61 ng。

2.4.9 稳定性试验 取同一供试品溶液(编号:Y3)适量,分别在室温下放置0、2、4、6、10、12 h时,按“2.4.2”项下色谱条件进样测定。结果,厚朴酚、和厚朴酚峰面积RSD分别为1.7%、1.1%($n=6$),表明供试品溶液在室温下放置12 h稳定性良好。

2.4.10 色谱柱耐用性试验 取同一供试品溶液(编号:Y3)适量,参照“2.4.2”项下色谱条件,分别使用3种不同品牌的色谱柱,即Phenomenex Luna(250 mm×4.6 mm, 5 μm)、YMC-Pack ODS-A(250 mm×4.6 mm, 5 μm)、Kromasil C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm)进样测定并计算厚朴酚含量。结果,厚朴酚、和厚朴酚含量的RSD分别为1.5%、1.3%($n=3$),表明本方法中色谱柱耐用性良好。

2.4.11 样品含量测定 取各批次样品各2 g,精密称定,按“2.4.1”项下供试品溶液制备法处理,再按“2.4.2”项下色谱条件进样测定并计算厚朴酚、和厚朴酚的含量,平行操作2份,取平均值,结果见表6。

3 讨论

有关中药质量标准的研究与建立是一个系统性工程,需要体现药品本身的安全、稳定和有效的必备特性,此外还应该体现中药本身的特色^[4]。作为用于评价和控制中药质量的标准而言,其本身也须具有全面性、特征性、科学性和通用性。本研究在香砂和中丸原质量标准

表6 厚朴酚、和厚朴酚含量测定结果($n=2$)

Tab 6 Results of content determination of magnolol and honokiol($n=2$)

编号	厚朴酚含量,mg/g	和厚朴酚含量,mg/g	总含量,mg/g	厚朴酚/和厚朴酚含量之比
X1	1.1	0.5	1.6	2.2
X2	0.8	0.3	1.1	2.7
X3	0.6	0.3	0.9	2.0
Y1	0.4	0.3	0.7	1.3
Y2	0.3	0.2	0.5	1.5
Y3	0.4	0.3	0.7	1.3
Y4	0.5	0.3	0.8	1.7
Y5	1.1	0.7	1.8	1.6
Y6	0.7	0.5	1.2	1.4

的基础上,开展了较为全面的系统性研究工作,项目包括显微鉴别,姜厚朴、陈皮、苍术(土炒)、白术(土炒)、广藿香等的TLC法鉴别,以及橙皮苷、厚朴酚、和厚朴酚的HPLC法含量测定。

3.1 质量标准中显微特征鉴别项的改进

原标准中显微特征鉴别较为完善,因此在本研究中仅对其中部分组分的显微特征进行了术语上的修改。本品原标准中显微鉴别项为:石细胞分枝状,壁厚,层纹明显;内种皮石细胞黄棕色或棕红色,表面观类多角形,壁厚,胞腔含硅质块;果皮表皮细胞呈类圆形或类多角形,壁稍厚,胞腔内含黄棕色或红棕色物;中果皮薄壁组织无色,细胞形状不规则,壁不均匀增厚,厚约至7 μm,角隅处较厚,细胞中可见黄色类圆形或不规则形橙皮苷结晶;非腺毛1~8细胞,壁有疣状突起;草酸钙针晶成束,长32~144 μm,存在于黏液细胞中或散在。笔者通过查询2010年版和2015年版《中国药典》砂仁的显微鉴别特征描述,将“内种皮石细胞”改为“内种皮厚壁细胞”。另经笔者调研,由于现有粉碎技术的提升,样品粉末中很难发现较为完整的陈皮中果皮薄壁组织细胞,也不易发现成片存在于中果皮薄壁细胞中的草酸钙方晶;且陈皮、醋青皮、麸炒枳壳及山楂薄壁组织细胞中均有草酸钙方晶存在,无专属性,且在成品中检出率较低。两种显微特征专属性均不强,故建议取消上述显微特征表述。

3.2 质量标准中TLC法鉴别项的改进

为了评价TLC鉴别方法的适用程度,本研究对各项TLC鉴别法均进行了耐用性试验,针对影响TLC法的主要影响因素,即温度、湿度以及不同厂家薄层板三个方面分别进行了考察:温度考察范围为7~30 ℃,湿度考察范围为25%~75%,薄层色谱预制板选用了市场相对主流的2家生产企业(青岛海洋化工厂、烟台市化学工业研究所)生产的产品。结果显示,本品各项TLC鉴别方法在上述温度、湿度以及不同品牌薄层色谱预制板等试验条件改变的情况下均能得到效果一致的鉴别结果,各阴性样品也均未出现干扰色谱斑点。

本课题组前期对样品中的姜厚朴进行TLC法鉴别

时曾采用石油醚(30~60℃)加热回流提取后浓缩的样品处理方法,但是所得供试品色谱干扰斑点过多、色谱分离效果较差,而采用本文方法后则能较好地去除干扰斑点,有效地提升了色谱分离效果。

笔者在对广藿香进行TLC鉴别研究时,曾考察乙醚冷浸法提取和乙醚回流法提取的效果,结果2种提取方法所得供试品溶液的干扰斑点过多,不易鉴别。而采用本文中的挥发油提取法进行样品处理后,能达到较好的TLC分离鉴别效果。

此外,由于本品处方中的陈皮、麸炒枳壳、醋青皮这3种药材的化学成分十分接近,均含有橙皮苷、柚皮苷和新橙皮苷等成分^[9],笔者在研究中虽曾尝试改变供试品溶液制备方法和色谱展开条件,但都无法实现这3种药材的专属性鉴别,故未纳入本研究,这3种药材的TLC鉴别法有待进一步研究完善。而在白术(土炒)的TLC鉴别研究中,笔者通过优化供试品溶液制备方法和色谱展开条件后,可使供试品色谱分离良好、斑点清晰,但阴性对照始终有干扰,故亦未纳入新标准。

3.3 质量标准中含量测定项的改进

在研究本品中橙皮苷的含量测定方法时,分别考察了不同提取溶剂(甲醇、50%甲醇、乙醇)、不同提取方法(超声提取法、加热回流提取法、索氏提取法)、不同提取时间(0.5、1、1.5 h)以及不同溶剂与药材的液料比(500:1、200:1、100:1、50:1、25:1, mL/g)的效果;在研究厚朴酚、和厚朴酚的含量测定方法时,同样分别考察了不同提取溶剂(甲醇、50%甲醇、乙醇)、不同提取方法(超声提取法、加热回流提取法、索氏提取法)、不同提取时间(3、4、5、6 h)的效果。最终,根据提取效率与提取完全程度确定了本文采用的样品提取方法进行含量测定。

中药是典型的源于自然界的产物,主要为动物、植物和菌类等生物整体或部分,并以其生物代谢产物作为药理药效以及活性作用的物质基础,其本身化学成分十分复杂。对于多组分的中成药而言,除了药材饮片原料自身的复杂性,还存在生产工艺对其品质的影响^[6-8]，“一品多家”的情况十分普遍,因此能够揭示不同生产企业产品质量差异的质量标准更有利于优劣产品的区分^[9]。本研究对不同厂家来源的9批香砂和中丸样品的含量测定结果显示,2家生产企业的产品差异明显:X企业的3批产品中橙皮苷含量范围为18.0~27.7 mg/g,而Y企业的6批产品中橙皮苷含量范围为30.2~49.7 mg/g;X企业3批产品中厚朴酚、和厚朴酚含量范围分别为0.6~1.1、

0.3~0.5 mg/g,Y企业6批产品中厚朴酚、和厚朴酚含量范围分别为0.3~1.1、0.2~0.7 mg/g。两家产品的厚朴酚、和厚朴酚含量范围看似差别不大,但将各批次样品的厚朴酚和厚朴酚含量取比值处理后可见,X企业产品中2种成分含量比值范围为2.0~2.7,而Y企业产品为1.3~1.7(如表6所示)。从以上对多批次样品含量测定结果的分析可知,所测成分可明显表征香砂和中丸产品的来源(即生产企业)特征,这些特征和香砂和中丸的药材组方原料以及生产工艺具有密切的关系。虽然本次研究受研究时限以及样本数量限制,结论可能存在一定偏差,尚需进一步收集更多样本进行分析和验证,然而通过以上初步分析结果仍可看出本研究所选取的含量测定指标成分(橙皮苷、厚朴酚、和厚朴酚)作为本产品质量控制指标具有一定的合理性和有效性。

综上所述,本研究在香砂和中丸原质量标准基础上修订了性状观察、显微鉴别项目的表述,增加了姜厚朴、苍术(土炒)、广藿香的TLC鉴别方法,并采用HPLC法测定了橙皮苷、厚朴酚、和厚朴酚的含量,能够有效地提高本品的质量控制标准。

参考文献

- [1] 国家药典委员会.药品标准:中药成方制剂标准:第二册[S].1990:173.
- [2] 河南省革命委员会卫生局.河南省药品标准[S].河南省革命委员会卫生局,1977:221.
- [3] 张伯礼,王永炎.方剂关键科学问题的基础研究:以组分配伍研制现代中药[J].中国天然药物,2005,3(5):258-261.
- [4] 张宏,夏伟,张磊,等.中药应以临床功效为导向进行质量标准研究[J].中华中医药杂志,2014,29(12):3686-3688.
- [5] 肖培根.新编中药志:第二卷[M].北京:化学工业出版社,2002:342,352,443.
- [6] 王峥涛.中药质量标准研究进展与展望[J].中国天然药物,2006,4(6):403-410.
- [7] 姚新生,叶文才,栗原博.阐明中药科学内涵 推进中药现代化与创新药物研究进程[J].化学进展,2009,21(1):2-13.
- [8] 屠鹏飞,史社坡,姜勇.中药物质基础研究思路与方法[J].中草药,2012,43(2):209-215.
- [9] 刘艳,吁海超,章军,等.以质量为核心的优质中成药评价标准研究[J].中国中药杂志,2018,43(21):4356-4360.

(收稿日期:2019-07-08 修回日期:2019-12-06)

(编辑:段思怡)