

复方肤清洗剂质量标准研究

祝宇, 张晓燕, 骆霞, 周灿, 魏娟* (湖北医药学院附属人民医院药学部, 湖北 十堰 442000)

摘要: 目的 建立复方肤清洗剂内控标准, 使临床用药更合理安全。方法 采用薄层色谱法(TLC)对方中的蒲公英、赤芍进行定性鉴别; 采用高效液相色谱法同时测定复方肤清洗剂中芍药苷、异绿原酸 A、咖啡酸的含量。色谱条件: Inertsil ODS-SP 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-0.02%磷酸水溶液(11:89), 流速为 1.2 mL·min⁻¹, 检测波长为 230, 323 nm。结果 在 TLC 中能检出赤芍、蒲公英的特征斑点; 芍药苷、异绿原酸 A 和咖啡酸分别在 14.06~225, 7.5~120, 2.5~40 μg·mL⁻¹ 内与峰面积线性关系较好, 相关系数分别为 0.999 9, 0.999 8, 0.999 7, 加样回收率的平均值分别为 94.5%, 98.6%, 99.2%, RSD 分别为 0.98%, 1.66%, 0.65%(n=6)。结论 所建立的 TLC 鉴别方法简单、准确, 且 HPLC 含量测定方法专属性强, 可用于复方肤清洗剂的质量控制。

关键词: 复方肤清洗剂; 薄层色谱法; 高效液相色谱法; 芍药苷; 异绿原酸 A; 咖啡酸; 质量标准

中图分类号: R284.1; R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2018)07-1046-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2018.07.022

引用本文: 祝宇, 张晓燕, 骆霞, 等. 复方肤清洗剂质量标准研究[J]. 中国现代应用药学, 2018, 35(7): 1046-1049.

Study on Quality Standard for Fufang Fuqing Lotion

ZHU Yu, ZHANG Xiaoyan, LUO Xia, ZHOU Can, WEI Juan* (Department of Pharmacy of Renmin Hospital, Hubei University of Medicine, Shiyan 442000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish the internal control standard of Fufang Fuqing Lotion, which makes the clinical medicine more reasonable and safe. **METHODS** Dandelion and Paeoniae Rubra were identified by TLC. Simultaneous determination of paeoniflorin, isochlorogenic acid A and caffeic acid in Fufang Fuqing Lotion by HPLC. The samples of Fufang Fuqing Lotion were separated on Inertsil ODS-SP column(4.6 mm×250 mm, 5 μm). The mobile phase was set as acetonitrile-0.02% phosphoric acid(11:89), and the flow rate was 1.0 mL·min⁻¹. The detection wavelength were set at 230 and 323 nm. **RESULTS** In TLC could be detected Paeoniae Rubra Radix and dandelion characteristics of the spots. The calibration curves of paeoniflorin, isochlorogenic acid A and caffeic acid showed a good linear relationship over the range of 14.06–225 μg·mL⁻¹($r=0.999\ 9$), 7.5–120 μg·mL⁻¹($r=0.999\ 8$) and 2.5–40 μg·mL⁻¹($r=0.999\ 7$). The average recovery rate were 94.5%, 98.6%, 99.2% with RSD 0.98%, 1.66%, 0.65%. **CONCLUSION** The established TLC identification method is simple, accurate, and the content of HPLC method is specific, which can be used for quality control of Fufang Fuqing Lotion.

KEY WORDS: Fufang Fuqing Lotion; TLC; HPLC; paeoniflorin; isochlorogenic acid A; caffeic acid; quality standard

复方肤清洗剂是十堰市人民医院名老中医的经验方, 全方由赤芍、蒲公英、金银花、当归、滑石等 10 味中药材组成, 可用于风热湿毒所致的湿疹、过敏性皮炎的治疗。

本处方中以清热凉血、散瘀止痛的赤芍^[1]为君药, 以清热解毒、散结消痈的金银花^[2]和蒲公英^[3]为臣药。故本实验采用薄层色谱法对方中的蒲公英、赤芍进行定性鉴别; 采用 HPLC 同时测定方中芍药苷^[4]、异绿原酸 A^[5]、咖啡酸^[6]的含量, 为复方肤清洗剂质量标准的建立提供实验依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器

LC-20AD 高效液相色谱仪(日本岛津); FA2004 万分之一电子分析天平(上海天平仪器厂); KWD-10 恒温干燥箱(武汉市武昌实验仪器厂); STARTER 2100 通用 pH 计(美国 Ohaus); 硅胶 G 预制板(10 cm×20 cm, 山东青岛海洋化工厂)。

1.2 材料

蒲公英对照药材(批号: 121195-200902)、赤芍对照药材(批号: 120995-200503); 对照品芍药苷、异绿原酸 A、咖啡酸(批号分别为 110736-

基金项目: 2017 年十堰市科学技术研究与开发项目(17K73)

作者简介: 祝宇, 男, 硕士, 药师 Tel: (0719)8637625 E-mail: fireflieszhuyu@163.com *通信作者: 魏娟, 女, 硕士, 药师 Tel: (0719)8637251 E-mail: 247314073@qq.com

201438, 110853-201426, 110885-200102, 纯度分别为 99.9%, 99.7%, 99.9%)均购自中国食品药品检定研究院; 复方肤清洗剂(十堰市人民医院制剂室, 批号分别为 20160920, 20161014, 20161123, 20161218, 20170125); 乙腈、甲醇为色谱纯; 其他试剂均为分析纯; 水为屈臣氏纯净水。

2 方法

2.1 TLC 定性鉴别

2.1.1 蒲公英薄层鉴别 取 3 批复方肤清洗剂(批号: 20160920, 20161014, 20161123)各 10 mL, 加稀盐酸调至 pH 2~3, 用乙酸乙酯萃取 2 次, 分取乙酸乙酯液, 合并酯层并浓缩至 1 mL, 作为供试品溶液。取蒲公英对照药材 1 g, 加水 30 mL, 回流提取 1 h, 放冷, 按上述方法制成蒲公英对照药材溶液。取缺蒲公英药材的阴性样品, 同法制得蒲公英阴性对照溶液。分别吸取 3 μ L 上述 3 批供试品溶液、阴性对照溶液和 5 μ L 的对照药材溶液, 点于同一硅胶 G 薄层板上, 以甲苯-乙酸乙酯-甲酸(5:4:1)混合溶剂为展开剂展开, 取出, 晾干, 喷以 1%三氯化铝乙醇溶液显色, 置室温下晾干。在紫外光灯(365 nm)下检视, 在薄层色谱板上, 蒲公英对照药材与供试品有对应的斑点, 且蒲公英阴性对照无干扰, 见图 1。

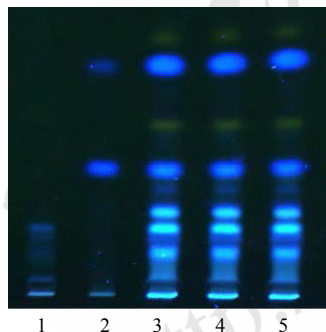


图 1 制剂中蒲公英 TLC 图谱

1-阴性对照; 2-对照药材; 3-供试品(批号: 20160920); 4-供试品(批号: 20161014); 5-供试品(批号: 20161123)。

Fig. 1 The TLC chromatogram of dandelion

1-negative control; 2-control; 3-sample(batch No.20160920); 4-sample(batch No.20161014); 5-sample(batch No.20161123).

2.1.2 赤芍薄层鉴别 取批号分别为 20160920, 20161014, 20161123 的 3 批复方肤清洗剂各 10 mL, 用正丁醇 10 mL 萃取, 合并浓缩至 1 mL, 作为供试品溶液。取赤芍对照药材 0.5 g, 加水 50 mL, 回流提取 1 h, 放冷, 按上述方法制成赤芍对照药材溶液。取缺赤芍药材的阴性样品, 同法制得赤芍阴性对照溶液。分别吸取 15 μ L 上述 3

批供试品溶液、阴性对照溶液和 3 μ L 的对照药材溶液, 点于同一薄层板上, 以三氯甲烷-乙酸乙酯-甲醇-甲酸(40:5:10:0.2)混合溶剂为展开剂展开, 取出, 晾干, 喷以 5%香草醛硫酸溶液, 置烘箱, 加热 105 $^{\circ}$ C 至斑点清晰, 放于日光灯下检视。在薄层板上, 赤芍对照药材与供试品有对应的斑点, 且赤芍阴性对照无干扰^[7], 见图 2。

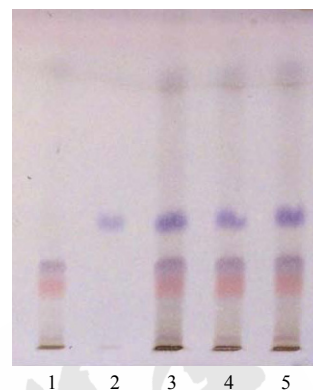


图 2 制剂中赤芍 TLC 图谱

1-阴性对照; 2-对照药材; 3-供试品(批号: 20160920); 4-供试品(批号: 20161014); 5-供试品(批号: 20161123)。

Fig. 2 The TLC chromatogram of Paoniae Rubra Radix

1-negative control; 2-control; 3-sample(batch No.20160920); 4-sample(batch No.20161014); 5-sample(batch No.20161123).

2.2 含量测定

2.2.1 色谱条件 色谱柱: Inertsil ODS-SP 柱 (4.6 mm $\times$ 250 mm, 5 μ m); 流动相: 乙腈-0.02% 磷酸水溶液(11:89); 流速: 1.2 mL $\cdot$ min⁻¹; 检测波长: 230, 323 nm; 柱温: 30 $^{\circ}$ C; 进样量: 10 μ L。

2.2.2 混合对照品溶液的制备 取芍药苷、异绿原酸 A、咖啡酸对照品适量, 精密称定, 分别用 25 mL 量瓶定容, 超声处理 10 min, 过 0.45 μ m 微孔滤膜, 置于 5 $^{\circ}$ C 冰箱中备用。量取绿原酸、咖啡酸、芍药苷对照品溶液适量, 配制质量浓度分别为 60, 10, 56 μ g $\cdot$ mL⁻¹的混合对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液的制备 用移液管吸取复方肤清洗剂样品 10 mL, 用饱和正丁醇萃取 3 次(20, 20, 20 mL), 合并萃取液, 水浴蒸干, 残渣用 50% 的甲醇溶液定容至 10 mL 量瓶中, 精密吸取 5 mL, 定容至 10 mL 量瓶中, 摇匀, 过微孔滤膜(0.45 μ m), 取续滤液, 即得。

2.2.4 阴性对照溶液的制备 按照处方比例分别称取除赤芍、金银花、蒲公英以外的其他各味药材, 按复方肤清洗剂制备工艺进行提取, 制得阴性制剂。按“2.2.3”项下方法制得阴性对照溶液。

2.2.5 专属性考察 精密吸取混合对照品溶液、复方肤清洗剂(批号: 20160920)样品溶液、阴性对照品溶液 10 μL 注入高效液相色谱仪进行测定。色谱峰结果显示, 对照品溶液和供试品溶液 3 种成分的保留时间一致, 且阴性对照品溶液无干扰, 表明该方法专属性良好, 见图 3。

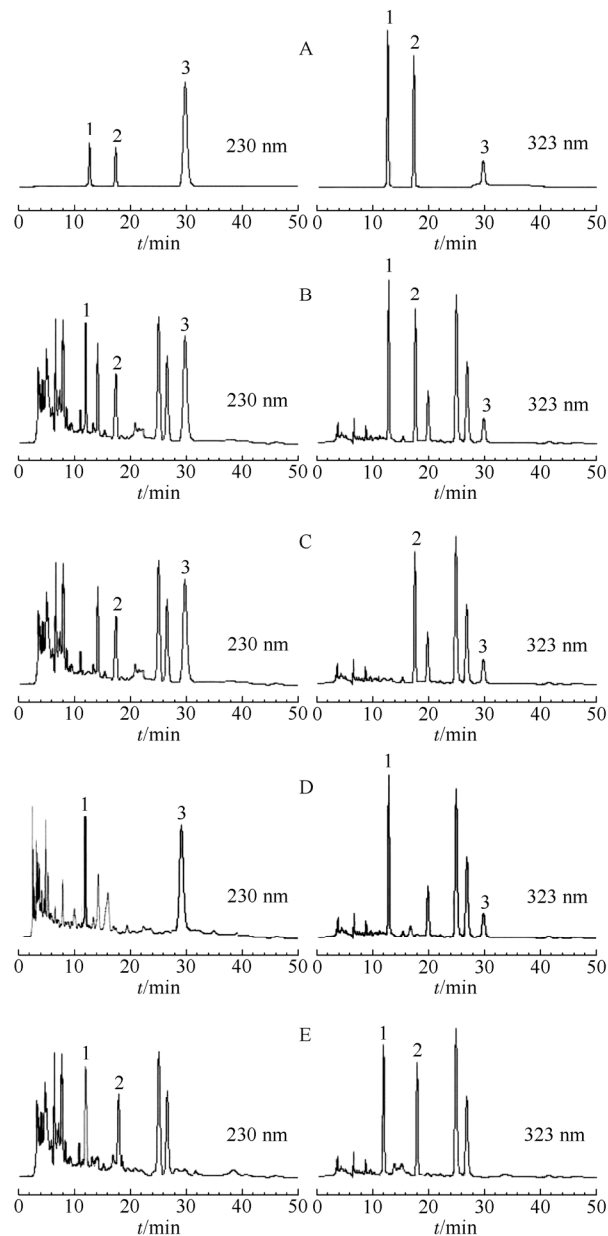


图 3 复方肤清洗剂高效液相色谱图
A-混合对照品溶液; B-供试品溶液; C-缺金银花样品溶液; D-缺蒲公英样品溶液; E-缺赤芍样品溶液; 1-异绿原酸 A; 2-咖啡酸; 3-芍药苷。

Fig. 3 HPLC chromatogram of Fufang Fuqing Lotion
A-reference substance; B-sample; C-sample without Lonicerae Japonicae Flos; D-sample without dandelion; E-sample without Paeoniae Rubra Radix; 1-isochlorogenic acid A; 2-caffeic acid; 3-peoniflorin.

2.2.6 线性考察 分别精密称取混合对照品适量, 制成不同浓度的对照品溶液, 按“2.2.1”项下色谱条件进样分析, 以峰面积(Y)为纵坐标、进样质量(X , μg)为横坐标进行线性回归, 绘制标准曲线。结果见表 1。

表 1 芍药苷、异绿原酸 A、咖啡酸线性回归方程
Tab. 1 The linear relationship of peoniflorin, isochlorogenic acid A and caffeic acid

成分	回归方程	线性系数 r	线性范围/ μg
芍药苷	$Y=1.1 \times 10^4 X - 10\ 013$	0.999 9	14.06~225
异绿原酸 A	$Y=1.7 \times 10^4 X - 19\ 853$	0.999 8	7.5~120
咖啡酸	$Y=3.8 \times 10^4 X - 13\ 306$	0.999 7	2.5~40

2.2.7 仪器精密度试验 取“2.2.2”项下制备的混合对照品溶液, 按“2.2.1”项下色谱条件连续进样 6 次, 计算芍药苷、异绿原酸 A、咖啡酸峰面积的 RSD 分别为 0.95%, 1.32%, 0.97%, 表明仪器精密度良好。

2.2.8 稳定性试验 取复方肤清洗剂(批号: 20160920)制备的供试品溶液, 按“2.2.1”项下色谱条件进样分析。分别于 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 进样, 计算芍药苷、异绿原酸 A、咖啡酸峰面积的 RSD 分别为 0.68%, 1.24%, 1.10%。表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.2.9 重复性试验 取复方肤清洗剂(批号: 20160920), 按“2.2.3”项下方法配制 6 份供试品溶液, 按“2.2.1”项下色谱条件进样。记录各数据, 计算芍药苷、异绿原酸 A、咖啡酸的平均含量分别为 54.38, 49.90, 5.49 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; RSD 分别为 0.96%, 1.42%, 1.53%, 重复性符合要求。

2.2.10 加样回收率试验 取复方肤清洗剂(批号: 20160920), 精密加入适量绿原酸、咖啡酸、芍药苷, 平行 6 份, 按“2.2.3”项下方法制成加样回收供试品溶液, 按“2.2.1”项下色谱条件测定, 记录数据并计算。结果见表 2。

2.2.11 供试品含量测定 取批号为 20160920, 20161014, 20161123, 20161218, 20170125 的 5 批复方肤清洗剂各 1 瓶, 按“2.2.3”项下方法配制样品, 按“2.2.1”项下色谱条件进样分析, 结果见表 3。根据上述测定结果, 拟定本品中芍药苷、异绿原酸 A、咖啡酸的含量分别不得少于 43.48, 39.89, 4.32 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 作为含量控制指标较为合理。

表 2 加样回收率试验结果(n=6)

Tab. 2 The results of recovery tests(n=6)

成分	取样量/ mL	样品含量/ mg	加入量/ mg	测得量/ mg	平均回 收率/%	RSD/ %
异 绿 原 酸	5	0.249 5	0.25	0.492 4	98.6	1.66
	5	0.249 5	0.25	0.499 0		
	5	0.249 5	0.25	0.495 3		
	5	0.249 5	0.25	0.489 7		
	5	0.249 5	0.25	0.499 3		
咖 啡 酸	5	0.027 5	0.028	0.053 6	94.5	0.98
	5	0.027 5	0.028	0.054 2		
	5	0.027 5	0.028	0.053 9		
	5	0.027 5	0.028	0.054 0		
	5	0.027 5	0.028	0.053 8		
芍 药 苷	5	0.271 9	0.28	0.550 9	99.2	0.65
	5	0.271 9	0.28	0.551 2		
	5	0.271 9	0.28	0.547 9		
	5	0.271 9	0.28	0.546 7		
	5	0.271 9	0.28	0.550 1		
	5	0.271 9	0.28	0.550 3		

表 3 复方肤清洗剂含量测定结果(n=3)

Tab. 3 The determination results of Fufang Fuqing Lotion (n=3)

批号	含量/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$		
	芍药苷	异绿原酸 A	咖啡酸
20160920	54.42	49.90	5.49
20161014	54.35	49.83	5.45
20161123	54.38	49.86	5.36
20161218	54.40	49.92	5.40
20170125	54.46	49.97	5.53

3 讨论

中药含量测定方法和内容是中药质量可控性的重要标准。现行大多数中药成方制剂中的含量测定指标选择易得、易测的指标,指标的选择及其限度的象征性意义大于质控实际意义^[8]。在复方

肤清洗剂质量标准研究中,笔者加强了对含量测定指标代表性的研究,选择处方中起主要作用的君药和臣药的有效成分为测定指标,对质控水平的提高意义重大。

中药复方制剂的质量标准含量测定项目中,含量测定的方式具有多样性的特点,多组分(多指标)测定的代表性应高于单一成分的含量测定。在复方肤清洗剂质量标准研究中,本实验以芍药苷、异绿原酸 A 和咖啡酸 3 种化学成分为中心,采用多指标成分定量分析方法,达到全面控制复方肤清洗剂质量的目的。

REFERENCES

- [1] LU X H, MA X, WANG J, et al. Research progress on chemical constituents of *Paeoniae Rubra Radix* and their pharmacological effects [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药), 2015, 46(4): 595-602.
- [2] 徐晖. 金银花药理作用研究进展[J]. *湖南中医杂志*, 2013, 29(9): 148-149.
- [3] 林云, 江林, 蒋健, 等. 蒲公英的药理作用研究进展[J]. *中国现代中药*, 2011, 13(8): 42-47.
- [4] HE F X, ZHENG H Z, SHI H C, et al. Determination of paeoniflorin in *Weiyangning* pills by HPLC [J]. *China Med Her*(中国医药导报), 2017, 14(9): 133-135.
- [5] 韩永成, 刘伟, 陈宁, 等. UHPLC 法同时测定金银花中 6 种有效成分的含量[J]. *天然产物研究与开发*, 2014, 27(1): 89-93.
- [6] SONG Y H, WANG S. Determination of caffeic acid in *taraxacum* injection by HPLC [J]. *Anhui Med Pharm J*(安徽医药), 2012, 16(11): 1596-1597.
- [7] ZHU G W, LI X W, WU L, et al. Research on preparation and quality standard of the standard decoction of *Paeoniae Radix Rubra* [J]. *World Sci Technol-Mod Tradit Chin Med*(世界科学技术-中医药现代化), 2016, 18(12): 2062-2069.
- [8] LU X G, CHEN X, LI J, et al. Simultaneous determination of tanshinol, protocatechualdehyde, salvianolic acid B, ferulic acid and puerarin in *Tongmai* Particles by HPLC [J]. *Chin J Mod Appl Pharm*(中国现代应用药学), 2017, 34(10): 1373-1376.

收稿日期: 2017-08-31

(本文责编: 曹粤锋)