

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2020.13.015

祛风消癥合剂质量标准研究*

焦红军¹,董凤其¹,陶明晖¹,王皖军¹,黄上林¹,马超亚¹,唐进法^{2△}

(1. 郑州大学第二附属医院,河南 郑州 450014; 2. 河南中医药大学第一附属医院,河南 郑州 450000)

摘要:目的 建立祛风消癥合剂的质量标准。方法 采用薄层色谱(TLC)法对祛风消癥合剂中忍冬藤、防风、炙甘草进行定性鉴别。采用超高效液相色谱(UPLC)法对该制剂中的原儿茶醛、马钱苷和5-O-甲基维斯阿米醇苷进行含量测定,色谱柱为Waters Acquity UPLC® BEH C₁₈柱(100 mm×2.1 mm,1.7 μm),流动相为乙腈-0.2%磷酸水溶液,梯度洗脱,流速为0.3 mL/min,检测波长为232 nm,柱温为30℃,进样量为1 μL。结果 忍冬藤、防风、炙甘草的TLC图斑点清晰,分离度较好,阴性无干扰。原儿茶醛、马钱苷和5-O-甲基维斯阿米醇苷进样量分别在2.86~28.56 μg,12.32~123.20 μg,4.44~44.40 μg范围内与峰面积线性关系良好($r=0.999\ 9$);平均加样回收率分别为97.86%,99.46%,100.41%,RSD分别为3.20%,0.84%,3.24%($n=6$)。结论 该方法简便可行,专属性、重复性好,可用于祛风消癥合剂的质量控制。

关键词:祛风消癥合剂;薄层色谱法;超高效液相色谱法;原儿茶醛;马钱苷;5-O-甲基维斯阿米醇苷

中图分类号:R932;R284.1;R286.0

文献标识码:A

文章编号:1006-4931(2020)13-0056-04

Quality Standard of Qufeng Xiaodian Mixture

JIAO Hongjun¹, DONG Fengqi¹, TAO Minghui¹, WANG Wanjuan¹, HUANG Shanglin¹, MA Chaoya¹, TANG Jinfa²

(1. The Second Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan, China 450014; 2 The First Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou, Henan, China 450000)

Abstract: Objective To establish the quality standard of Qufeng Xiaodian Mixture. **Methods** Rendongteng, Fangfeng and Zhigancao in Qufeng Xiaodian Mixture were qualitatively identified by thin layer chromatography(TLC). The contents of protocatechuic aldehyde, loganin and 5-O-methylvisammoside in the Mixture were determined by ultra-high performance liquid chromatography(UPLC). The chromatographic column was Waters ACQUITY UPLC® BEH C₁₈ column(100 mm×2.1 mm,1.7 μm) with mobile phase of acetonitrile-0.2% phosphoric acid solution flowing at 0.3 mL/min in a gradient elution, the detection wavelength was 232 nm, the column temperature was 30℃, and the injection volume was 1 μL. **Results** TLC images of Rendongteng, Fangfeng and Zhigancao showed clear spots, good separation and no interference from the negative control. The linear ranges of protocatechuic aldehyde, loganin and 5-O-methylvisammoside detection were 2.86-28.56 μg, 12.32-123.20 μg and 4.44-44.40 μg respectively($r=0.999\ 9$). The average recoveries were 97.86%, 99.46% and 100.41%, and the RSDs were 3.20%, 0.84% and 3.24%, respectively($n=6$). **Conclusion** The method is simple and feasible with good specificity and repeatability, and can be used for the quality control of Qufeng Xiaodian Mixture.

Key words: Qufeng Xiaodian Mixture; thin layer chromatography; ultra-high performance liquid chromatography; protocatechuic aldehyde; loganin; 5-O-methylvisammoside

临床实践证实,中医药辨证治疗过敏性紫癜具有特色和优势^[1-2]。过敏性紫癜的中医证候以风热伤络证(占29.5%)为主,仅次于血热妄行证(占68.9%),为较常见证型^[3]。祛风消癥合剂源自河南中医药大学第一附属医院儿科临床治疗过敏性紫癜风热伤络证的多年经验方,由忍冬藤、荆芥、防风、徐长卿、茜草、海风藤、丹参、炙甘草8味药材组方,具有祛风消癥、清热止痒、化瘀通络的功效,用于过敏性紫癜、色素性紫癜、荨麻疹等疾病,辨证属风热伤络者。经临床应用,该方疗效显著,不良反应少,为治疗过敏性紫癜风热伤络证的良方。为更好地促进该方院内制剂的开发和研制,推广临床应用,亟需对其质量标准进行研究。本研究中采用薄层色谱(TLC)法对制剂中忍冬藤、防风、炙甘草进行定性鉴

别,采用超高效液相色谱(UPLC)法对制剂中的原儿茶醛、马钱苷和5-O-甲基维斯阿米醇苷进行含量测定,以建立祛风消癥合剂的质量标准。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Waters Acquity UPLC H-Class 型超高效液相色谱仪,包括PDA检测器、Empower2色谱工作站(美国Waters公司);XS105型电子天平(梅特勒-托利多集团,精度为十万分之一);KQ-100DE型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司,功率为100 W,频率为40 kHz);TLC VISUALIZER2型薄层成像仪(瑞士卡玛公司)。

1.2 试剂

祛风消癥合剂(河南中医药大学第一附属医院自

*基金项目:河南省二〇一八年科技发展计划项目[182102410085]。

第一作者:焦红军,大学本科,副主任药师,研究方向为中药的合理用药,(电子信箱)13673668808@163.com。

△通信作者:唐进法,博士研究生,副主任药师,研究方向为中药的安全、合理用药,(电子信箱)a0519@163.com。

制,批号分别为 181127, 181130, 181201, 规格为每瓶 100 mL); 马钱苷对照品(批号为 R23D7F27552), 5-O-甲基维斯阿米醇苷对照品(批号为 P05M8F35478), 原儿茶醛对照品(批号为 P05M7F14533), 均购自上海源叶生物有限公司; 甘草苷对照品(批号为 PRF8110742, 成都普瑞法科技开发有限公司); 硅胶 G 薄层板(青岛海洋化工有限公司); 甲醇、乙腈和磷酸均为色谱纯, 其余试剂均为分析纯, 水为娃哈哈纯净水。

2 方法与结果

2.1 薄层鉴别

忍冬藤^[4-5]: 取本品 10 mL, 水浴蒸干至 2~3 mL, 加甲醇 3 mL, 超声处理(功率为 100 W, 频率为 40 kHz) 10 min, 离心 5 min(3 500 r/min), 取上清液, 蒸干至 2 mL, 加硅胶粉 5 g, 混匀, 置水浴锅蒸干, 加于装有 2 g 硅胶的 G 柱(15 g, 内径为 1.5~2.0 cm), 取三氯甲烷-甲醇-水(65:35:10, V/V/V) 10 °C 放置的下层溶液 50 mL 作为流动相洗脱, 收集洗脱液, 蒸干, 残渣加 2 mL 50% 甲醇溶解, 作为供试品溶液; 按处方制备缺忍冬藤的阴性样品, 再按供试品溶液制备方法制备阴性对照品溶液; 另取马钱苷对照品适量, 加 50% 甲醇制成每 1 mL 含 1 mg 的溶液, 作为对照品溶液。照 2015 年版《中国药典(一部)》附录 VI B 中 TLC 法试验, 分别吸取供试品、阴性对照品溶液各 10 μ L, 对照品溶液 5 μ L, 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 以三氯甲烷-甲醇-水(65:35:10, V/V/V) 10 °C 放置的下层溶液为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 喷以 10% 硫酸乙醇溶液, 在 105 °C 加热至斑点显色清晰, 置可见光下检视。供试品溶液色谱中, 在与对照品溶液色谱相应位置上显相同颜色的斑点, 且阴性对照无干扰, 详见图 1 A。

防风^[4,6]: 取本品 20 mL, 加丙酮 40 mL, 混匀, 过滤, 滤液水浴蒸至 2 mL, 加入 5 g 硅胶 G, 混匀, 置水浴锅蒸干, 加于装有 2 g 硅胶 G 的硅胶 G 柱(15 g, 内径为 1.5~2 cm)上, 取三氯甲烷-甲醇(4:1, V/V)混合溶液 50 mL 作为流动相洗脱, 收集洗脱液, 水浴蒸干, 残渣

加乙醇 2 mL 使溶解, 作为供试品溶液。按处方工艺制备缺忍冬藤的阴性样品, 再按供试品溶液制备方法制备阴性对照品溶液; 取 5-O-甲基维斯阿米醇苷对照品适量, 加乙醇制成每 1 mL 含 1 mg 的对照品溶液。照 2015 年版《中国药典(一部)》附录 VI B 中 TLC 法试验, 吸取上述 3 种溶液各 10 μ L, 分别点于同一硅胶 GF₂₅₄ 薄层板上, 以三氯甲烷-甲醇(4:1, V/V)为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 置紫外光灯(254 nm)下检视。供试品溶液色谱中, 在与对照品溶液色谱相应位置上显相同颜色的斑点, 且阴性对照无干扰, 详见图 1 B。

炙甘草^[4]: 取本品 10 mL, 加水饱和正丁醇溶液 20 mL, 萃取 2 次, 合并正丁醇溶液, 水浴蒸干, 残渣加 2 mL 乙醇溶解, 作为供试品溶液; 按处方工艺制备缺炙甘草的阴性样品, 再按供试品溶液制备方法制备阴性对照品溶液; 另取甘草苷对照品, 加乙醇制成每 1 mL 含 1 mg 的溶液, 作为对照品溶液。照 2015 年版《中国药典(一部)》附录 VI B 中 TLC 法试验, 分别吸取上述 3 种溶液各 2 μ L, 分别点于同一用 1% 氢氧化钠溶液制备的硅胶 G 薄层板上, 以乙酸乙酯-甲酸-冰醋酸-水(15:1:1:2, V/V/V/V)为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 喷以 10% 硫酸乙醇溶液, 在 105 °C 加热至斑点显色清晰, 置紫外光灯(365 nm)下检视。供试品溶液色谱中, 在与对照品溶液色谱相应位置上显相同颜色的斑点, 且阴性对照无干扰, 详见图 1 C。

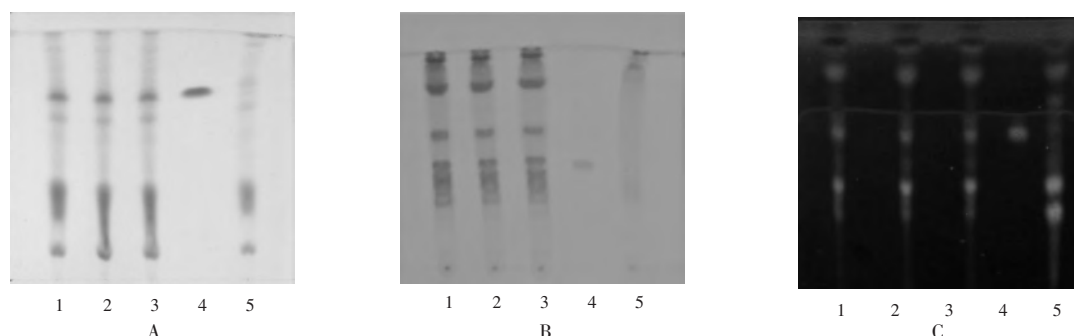
2.2 含量测定

2.2.1 色谱条件

色谱柱: Waters Acquity UPLC BEH C₁₈ 柱(100 mm × 2.1 mm, 1.7 μ m); 流动相: 乙腈(A)-0.2% 磷酸水溶液(B), 梯度洗脱, 0~3 min 时 10% A, 3~8 min 时 10%~20% A, 8~15 min 时 20%~25% A, 15~18 min 时 25%~100% A; 柱温: 30 °C; 流速: 0.3 mL/min; 检测波长: 232 nm; 进样量: 1 μ L。

2.2.2 溶液制备

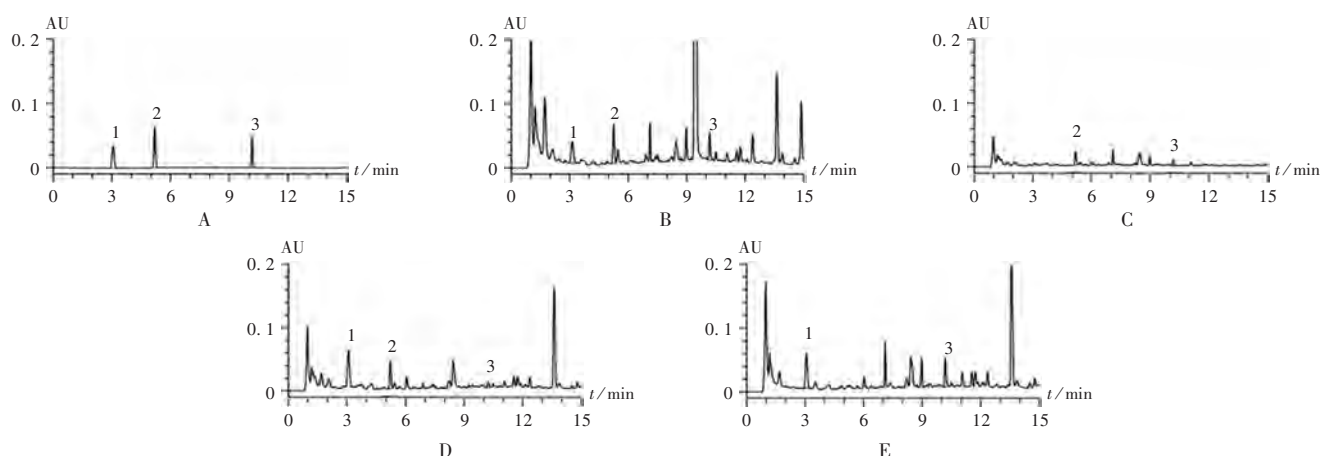
取原儿茶醛、马钱苷和 5-O-甲基维斯阿米醇苷对照



1~3. 供试品溶液 4. 对照品溶液 5. 阴性对照品溶液

A. 忍冬藤 B. 防风 C. 炙甘草

图 1 薄层色谱图



1. 原儿茶醛 2. 马钱苷 3. 5-O-甲基维斯阿米醇苷

A. 混合对照品溶液 B. 供试品溶液 C. 缺丹参阴性对照品溶液 D. 缺防风阴性对照品溶液 E. 缺忍冬藤阴性对照品溶液

图2 超高效液相色谱图

品适量,精密称定,加甲醇制成含原儿茶醛 14.28 $\mu\text{g/mL}$ 、马钱苷 61.6 $\mu\text{g/mL}$ 、5-O-甲基维斯阿米醇苷 22.2 $\mu\text{g/mL}$ 的混合对照品溶液。精密量取样品 2 mL,置 10 mL 容量瓶中,加甲醇定容,超声处理(功率 100 W,频率 40 kHz)30 min,放冷,称定质量,用甲醇补足减失质量,摇匀,滤过,取续滤液,过 0.22 μm 微孔滤膜,即得供试品溶液。按处方工艺分别制备缺丹参、缺忍冬藤和缺防风的阴性样品,按供试品溶液制备方法制备阴性对照品溶液。

2.2.3 方法学考察

专属性试验:取 2.2.2 项下 3 种溶液各 1 μL ,分别注入超高效液相色谱仪,按拟订色谱条件进行测定,结果原儿茶醛、马钱苷和 5-O-甲基维斯阿米醇苷的色谱峰与其他色谱峰分离良好,且阴性对照无干扰峰,色谱图见图 2。

线性关系考察:分别精密吸取混合对照品溶液 0.2, 0.5, 0.8, 1.1, 1.4, 1.7, 2.0 μL 注入超高效液相色谱仪中,测定峰面积,以进样量($X, \mu\text{g}$)为横纵坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归,得原儿茶醛、马钱苷和 5-O-甲基维斯阿米醇苷的回归方程分别为 $Y_{\text{原}} = 18496X_{\text{原}} - 8729$ ($r=0.9999$), $Y_{\text{马}} = 5507X_{\text{马}} - 9011$ ($r=0.9999$) 和 $Y_{\text{甲}} = 9022X_{\text{甲}} - 5258$ ($r=0.9999$)。结果原儿茶醛、马钱苷和 5-O-甲基维斯阿米醇苷进样量分别在 2.86~28.56 μg , 12.32~123.20 μg , 4.44~44.40 μg 范围内与峰面积线性关系良好($r=0.9999$)。

精密度试验:精密吸取混合对照品溶液 1 μL ,依法测定,重复进样 6 次。结果原儿茶醛、马钱苷和 5-O-甲基维斯阿米醇苷对照品峰面积的 RSD 分别为 1.33%, 1.69%, 1.66% ($n=6$),表明仪器精密度良好。

稳定性试验:取供试品溶液,分别于 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 h 时进样 1 μL ,依法测定。结果原儿茶醛、马钱苷和 5-O-甲基维斯阿米醇苷峰面积的 RSD 分别为 1.19%, 1.19%,

1.50% ($n=7$),表明供试品溶液在 12 h 内稳定。

重复性试验:精密吸取同一批(批号为 181127)样品 6 份,依法制备供试品溶液,平行测定。结果原儿茶醛、马钱苷、5-O-甲基维斯阿米醇苷峰面积的 RSD 分别为 2.96%, 3.41%, 2.87% ($n=6$),表明方法重复性良好。

加样回收试验:精密吸取已知含量的样品(批号为 181127)6 份,每份 1 mL,分别精密加入原儿茶醛、马钱苷和 5-O-甲基维斯阿米醇苷对照品适量,依法制备供试品溶液,按拟订色谱条件测定,计算回收率。结果见表 1。

表1 加样回收试验结果($n=6$)

成分	样品含量(mg)	加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	$\bar{X}$ (%)	RSD (%)
原儿茶醛	0.072 4	0.076 3	0.150 7	102.62	97.86	3.20
	0.072 4	0.076 3	0.149 5	101.05		
	0.072 4	0.076 3	0.145 3	95.54		
	0.072 4	0.076 3	0.145 5	95.81		
	0.072 4	0.076 3	0.145 5	95.81		
	0.072 4	0.076 3	0.145 9	96.33		
马钱苷	0.268 4	0.264	0.527 6	98.18	99.46	0.84
	0.268 4	0.264	0.529 7	98.98		
	0.268 4	0.264	0.534 1	100.64		
	0.268 4	0.264	0.531 9	99.81		
	0.268 4	0.264	0.531 7	99.73		
	0.268 4	0.264	0.530 8	99.39		
5-O-甲基 维斯阿米 醇苷	0.085 2	0.084 8	0.166	95.28	101.41	3.24
	0.085 2	0.084 8	0.173 9	104.60		
	0.085 2	0.084 8	0.172 3	102.71		
	0.085 2	0.084 8	0.170 5	100.59		
	0.085 2	0.084 8	0.171 7	102.00		
	0.085 2	0.084 8	0.172 8	103.30		

2.2.4 样品含量测定

取祛风消癥合剂 3 批,依法制备供试品溶液,每批样品平行制备 2 份,再按拟订色谱条件测定含量。结果见表 2。

表2 样品含量测定结果(mg/mL, $n=2$)

批号	原儿茶醛	马钱苷	5-O-甲基维斯阿米醇苷
181127	0.072 4	0.260 1	0.084 0
181130	0.073 3	0.270 5	0.086 4
181201	0.073 6	0.267 8	0.087 2

3 讨论

3.1 薄层鉴别样品制备方法优化

祛风消癰合剂方中药味多,成分复杂。在进行忍冬藤的薄层鉴别时,参考文献[7],分别采用水饱和正丁醇萃取、药液蒸干 50% 甲醇水溶解及乙酸乙酯萃取 3 种制备方法,结果各斑点分离效果均不理想,杂质干扰严重,最终采用以三氯甲烷-甲醇-水(65:35:10, V/V/V)10℃放置的下层溶液为流动相,过硅胶 G 柱洗脱的制备方法去除杂质,结果色谱峰分离度较好,且阴性对照无干扰。在进行防风的薄层鉴别时^[8-9],分别采用丙酮除杂法、水饱和正丁醇萃取法和乙酸乙酯萃取法制备供试品溶液,结果以上方法均不能有效除杂,经进一步试验,最终先采用丙酮除去部分杂质,再用三氯甲烷-甲醇(4:1, V/V)混合溶液 50 mL 为流动相,过硅胶 G 柱洗脱进一步除杂,制备的供试品溶液薄层色谱分离度良好,且阴性对照无干扰。

3.2 供试品提取方法和色谱条件考察

考察了 50% 甲醇、70% 甲醇、甲醇及超声处理 15, 30, 45 min 的提取效果^[10-11],发现甲醇超声处理 30 min 最好。采用 210~400 nm 波长范围内紫外光谱扫描,发现最大吸收波长原儿茶醛在 230 nm,马钱苷在 237 nm,5-O-甲基维斯阿米醇苷在 232 nm,综合考虑,最终确定检测波长为 232 nm。查阅文献[12-15],考察了甲醇-水、乙腈-水、乙腈-0.1% 磷酸水溶液和乙腈-0.2% 磷酸水溶液多种流动相系统,结果显示,以乙腈-0.2% 磷酸水溶液为流动相时色谱峰峰形对称良好,样品峰与杂质峰能达到基线分离,故选择其为流动相。

3.3 指标成分确定

祛风消癰合剂处方中君药忍冬藤有清热解毒、疏风通络功效,以及抗菌、抗氧化、抗肿瘤等作用^[16],其主要活性成分为马钱苷,具有增强机体免疫功能及抗炎等作用;臣药防风具有祛风解表、胜湿止痛、止痉的功效,色原酮是其主要的活性成分,现代药理学研究表明,5-O-甲基维斯阿米醇苷具有良好的解热、镇痛、抗炎及抗血小板凝聚作用^[17];佐药丹参具有活血祛瘀、通经止痛、清心除烦、凉血消痛功效,其主要药效成分是脂溶性二萜类和酚酸类成分,酚酸类具有心脑血管活性、抗肿瘤活性、抗氧化活性等多种药理活性^[18],因样品中未检测到丹参酮 II_A 成分,且丹酚酸 B 有阴性干扰,故选择原儿茶醛为含量检测指标。综合考虑,最终确定对祛风消

癰合剂中的马钱苷、5-O-甲基维斯阿米醇苷和原儿茶醛进行含量测定。

3.4 方法评价

本试验中建立了祛风消癰合剂的 TLC 法和原儿茶醛、马钱苷、5-O-甲基维斯阿米醇苷的含量测定方法,该方法准确可靠、重复性好,可用于该制剂的质量控制。

参考文献:

- [1] 丁 樱,孙晓旭,毕玲莉.等.过敏性紫癜中医诊疗指南[J]. 中医儿科杂志,2011,7(6):1-4.
- [2] 任献青,郑贵珍,管志伟,等.丁樱教授从热、瘀、虚辨治小儿过敏性紫癜性肾炎经验[J]. 中华中医药杂志,2013,28(12):3586-3588.
- [3] 张 霞,徐向宇,于文静,等.1228 例过敏性紫癜儿童中医证候分布规律研究[J]. 中医杂志,2013,54(18):1577-1579.
- [4] 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,2015:86-87,149,193.
- [5] 孙晓静,杨 柳,李 力,等.热痹清颗粒的质量标准提升研究[J]. 中国医院药学杂志,2018,38(2):131-135.
- [6] 袁强华,宋 英,朱璐璐,等.感甦合剂的质量控制[J]. 中国医院药学杂志,2013,33(2):111-115.
- [7] 徐英辉,申 茹,郭玉岩.忍冬藤胶囊的制备及其质量标准[J]. 中成药,2019,41(8):1790-1794.
- [8] 张慧月,赵 妹,赵雪梅.祛湿止痒洗剂的定性定量方法研究[J]. 药物分析杂志,2017,37(5):903-910.
- [9] 赵安邦,杜晨朝,吴志生,等.过敏康颗粒质量控制方法研究[J]. 中华中医药杂志,2018,33(3):1036-1040.
- [10] 孙 玲,樊晓兰,戴小丽. HPLC-QAMS 法测定不同产地 19 批山茱萸中 5 种环烯醚萜苷类成分的含量[J]. 中国药房,2018,29(15):2063-2067.
- [11] 马慧文,邹 琦,李 春,等.滋肾育胎丸指纹图谱及其 5 种指标成分含量测定的研究[J]. 中国中药杂志,2018,43(14):2878-2883.
- [12] 肖春霞,文永盛,周世玉. HPLC 法同时测定参柏舒心颗粒中 4 种成分的含量[J]. 中国药房,2017,28(30):4265-4268.
- [13] 徐 容. 关防风 HPLC 特征指纹图谱研究及 4 个色原酮类成分一测多评法分析研究[J]. 药物分析杂志,2019,39(3):458-466.
- [14] 周丽娟,曹 巍,刘 敏,等. 正交试验法优化蒺藜防白缓释滴丸的制备工艺[J]. 中成药,2015,37(12):2655-2660.
- [15] 栗建明,杨洁瑜,侯惠婵,等. 丹参川芎嗪注射液丹参素钠和原儿茶醛的含量测定及不确定度评定[J]. 中药新药与临床药理,2015,26(4):546-549.
- [16] 赵媛媛,杨倩茹,郝江波,等. 金银花与忍冬藤及叶药理作用差异的研究进展[J]. 中国中药杂志,2016,41(13):2422-2427.
- [17] 刘双利,姜程曦,赵 岩,等. 防风化学成分及其药理作用研究进展[J]. 中草药,2017,48(10):2146-2152.
- [18] 田介峰,阎 红,王瑞静,等. 丹参多酚酸提取物化学成分分离与鉴定[J]. 中草药,2018,49(21):5024-5028.

(收稿日期:2020-03-13)