

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2021.20.015

除湿丸质量评价方法研究

周德勇, 龚 韬[△], 杨 薇, 严文利, 朱 青, 王 夏, 宋京美

(北京市临床药理学研究所, 北京 100035)

摘要:目的 探讨除湿丸的质量评价方法。方法 采用高效液相色谱法测定制剂中5种主成分的含量,色谱柱为DIKMA Spursil 5 C₁₈柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为乙腈-0.1%磷酸水溶液(梯度洗脱),流速为1.0 mL/min,检测波长为238 nm,柱温为40℃,进样量为5 μL;采用聚类分析法和主成分分析法对不同批次样品的质量进行分析与评价。结果 栀子苷、连翘酯苷A、黄芩苷、黄芩素、丹皮酚进样量分别在0.037 24~0.744 8 μg、0.025 2~0.504 μg、0.021 444~0.428 88 μg、0.040 48~0.809 6 μg、0.026 1~0.522 μg范围内与相应峰面积线性关系良好(r 均大于0.999 6),精密度、稳定性、重复性试验的RSD均小于2.0%,平均加样回收率分别为100.49%, 100.86%, 99.81%, 100.08%, 101.67%, RSD分别为2.50%, 2.87%, 2.13%, 1.70%, 1.83% ($n=9$);15批样品按5种主成分含量之和可聚为两类;主成分黄芩素、丹皮酚、栀子苷为影响除湿丸质量评价的主要因子。结论 该方法简便、快速,结果准确、可靠,可用于评价除湿丸的质量。

关键词:除湿丸;高效液相色谱法;聚类分析;主成分分析;质量评价

中图分类号:R932;R284.1;R286.0

文献标志码:A

文章编号:1006-4931(2021)20-0057-04

Quality Evaluation Method of Chushi Pills

ZHOU Deyong, GONG Tao, YANG Wei, YAN Wenli, ZHU Qing, WANG Xia, SONG Jingmei

(Institute of Clinical Pharmacology of Beijing Municipal, Beijing, China 100035)

Abstract: Objective To investigate the quality evaluation method of Chushi Pills. **Methods** The contents of five principal components in the preparation were determined by the high-performance liquid chromatography (HPLC) method, the chromatographic column was DIKMA Spursil 5 C₁₈ column (150 mm × 4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was acetonitrile-0.1% phosphoric acid solution (gradient elution), the flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelength was 238 nm, the column temperature was 40℃, and the injection volume was 5 μL. Cluster analysis and principal component analysis were used to analyze and evaluate the quality of different batches of samples. **Results** The linear ranges of geniposide, forsythoside A, baicalin, baicalein and paeonol were 0.037 24-0.744 8 μg, 0.025 2-0.504 μg, 0.021 444-0.428 88 μg, 0.040 48-0.809 6 μg, 0.026 1-0.522 μg ($r > 0.999 6$), respectively. The RSDs of precision, stability and repeatability tests were less than 2.0%. The average recoveries of geniposide, forsythoside A, baicalin, baicalein and paeonol were 100.49%, 100.86%, 99.81%, 100.08% and 101.67% with RSDs of 2.50%, 2.87%, 2.13%, 1.70% and 1.83% ($n=9$), respectively. According to the total content of five principal components, 15 batches of samples could be grouped into two categories. Baicalein, paeonol and geniposide were the main factors affecting the quality evaluation of Chushi Pills. **Conclusion** The method is simple, rapid, accurate and reliable, which can be used for the quality evaluation of Chushi Pills.

Key words: Chushi Pills; HPLC; cluster analysis; principal component analysis; quality evaluation

除湿丸是北京中医医院用量最大的院内制剂^[1],由栀子、连翘、黄芩、牡丹皮、地黄等药材组方,有清热凉血、祛湿解毒功效,主要用于治疗大便黏滞、小便短赤、急性湿疹和脂溢性皮炎等症^[2]。方中主要含有连翘酯苷A、栀子苷、黄芩苷、黄芩素、丹皮酚等化学成分,均有明显的解热、抗炎、抗氧化作用^[3-4]。除湿丸的质量标准中仅有薄层色谱定性鉴别^[5]。本研究中参考文献[6-7],根据中医配伍理论及中药质量标志物的确认原则^[8],将上述5种主要化学成分确认为定量测定的目标成分^[9-12],用于除湿丸的质量控制和评价。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

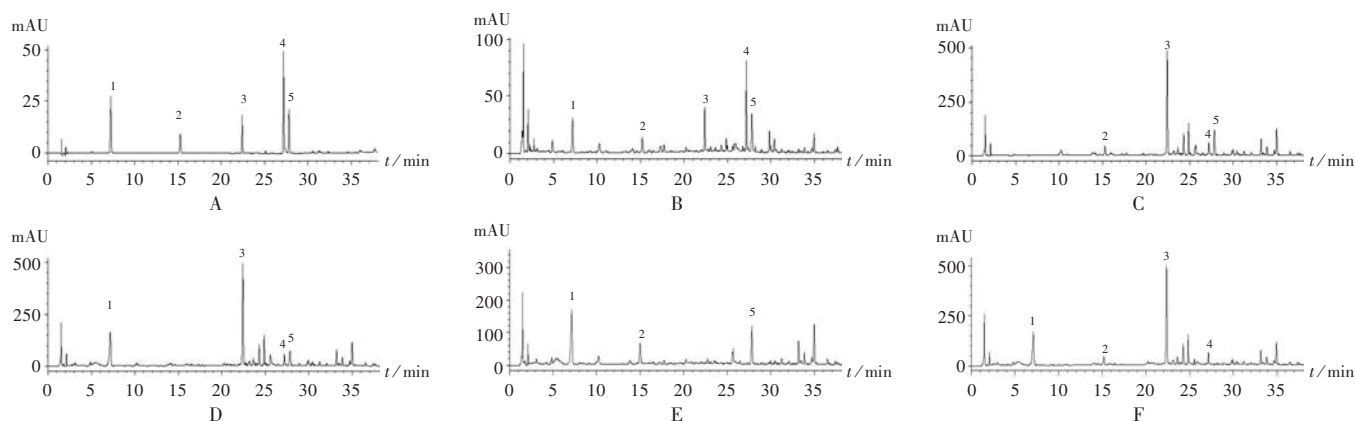
Nexera XR型高效液相色谱仪(日本Shimadzu公司);XP105DR型电子天平(瑞士Mettler Toledo公司);KX-2127QT型超声波清洗机(北京科玺世纪科技有限公司);TGL-16C型离心机(上海安亭科学仪器厂)。

1.2 试剂

栀子苷对照品(批号为110749-200410,含量98.7%),连翘酯苷A对照品(批号为110820-201707,含量97.2%),黄芩苷对照品(批号为110715-201821,含量95.4%),黄芩素对照品(批号为111595-201808,

第一作者:周德勇,男,研究实习员,研究方向为中药制剂工艺及质量分析,(电子信箱)237104818@qq.com。

[△]通信作者:龚韬,女,副研究员,研究方向为中药新药开发及质量控制,(电话)010-83227445。



1. 栀子苷 2. 连翘酯苷 A 3. 黄芩苷 4. 黄芩素 5. 丹皮酚
A. 混合对照品溶液 B. 供试品溶液 C-F. 阴性对照品溶液(分别缺栀子、连翘、黄芩、牡丹皮)

图1 高效液相色谱图

1. geniposide 2. forsythoside A 3. baicalin 4. baicalein 5. paeonol

A. Mixed reference solution B. Test solution C-F. Negative reference solution without Gardeniae Fructus, Forsythiae Fructus, Scutellariae Radix, Moutan Cortex

Fig. 1 HPLC chromatograms

含量 97.9%),丹皮酚对照品(批号为 110708-201407,含量 99.9%),均购自中国食品药品检定研究院;除湿丸(北京中医医院,批号分别为 1902035,1902019,1901057,1902047,1902017,1902018,1902030,1901061,1902012,1912007,190362,1904009,1810069,2007007,2007008);甲醇、乙腈、磷酸均为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:DIKMA Spursil 5 C₁₈ 柱(150 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈(A)-0.1%磷酸水溶液(B),梯度洗脱(0~10 min 时 10% A→15% A,10~15 min 时 15% A→18% A,15~20 min 时 18% A→25% A,20~25 min 时 25% A→40% A,25~30 min 时 40% A→60% A,30~38 min 时 60% A→75% A);流速:1.0 mL/min;检测波长:238 nm;柱温:40℃;进样量:5 μL。

2.2 溶液制备

分别取栀子苷、连翘酯苷 A、黄芩苷、黄芩素、丹皮酚对照品适量,精密称定,置同一 10 mL 容量瓶中,用 80% 甲醇制成质量浓度分别为 0.3724,0.2520,0.2144,0.4048,0.2610 mg/mL 的混合对照品贮备液;取 1 mL 置 10 mL 容量瓶中,用 80% 甲醇定容,摇匀,滤过,即得混合对照品溶液。取样品适量,研细,过 2 号筛,取约 0.25 g,精密称定,置 50 mL 具塞锥形瓶中,精密加入 80% 甲醇溶液 15 mL,称定质量,超声(功率 250 W,频率 30 kHz)处理 90 min,取出,放冷,用 80% 甲醇溶液补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得供试品溶液。按除湿丸的处方工艺分别制备不含栀子、连翘、黄芩、牡丹皮的 4 种阴性样品,按供试品溶液制备方法制备 4 种阴

性对照品溶液。

2.3 方法学考察

系统适用性试验:精密吸取 2.2 项下混合对照品溶液、供试品溶液及 4 种阴性对照品溶液各适量,按照 2.1 项下色谱条件进样测定。结果显示,5 个被测成分分离度均良好,阴性对照无干扰。详见图 1。

线性关系考察:精密吸取 2.2 项下混合对照品溶液适量,制成系列混合对照品溶液,按 2.1 项下色谱条件进样测定,记录峰面积;以待测成分的进样量($X, \mu\text{g}$)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程及线性范围,结果见表 1。

表1 各成分线性关系考察结果

Tab. 1 Results of linear relation test of each component

成分	回归方程	r	线性范围(μg)
栀子苷	$Y_1 = 1\,673\,169.9 X_1 + 8\,130.8$	0.999 7	0.037 24 ~ 0.744 8
连翘酯苷 A	$Y_2 = 1\,005\,339.2 X_2 + 481.7$	0.999 9	0.025 2 ~ 0.504
黄芩苷	$Y_3 = 1\,644\,868.0 X_3 + 762.3$	0.999 8	0.021 444 ~ 0.428 88
黄芩素	$Y_4 = 2\,163\,945.2 X_4 + 15\,072.3$	0.999 9	0.040 48 ~ 0.809 6
丹皮酚	$Y_5 = 1\,926\,022.9 X_5 + 1\,660.6$	0.999 9	0.026 1 ~ 0.522

精密度试验:取 2.2 项下供试品溶液适量,按 2.1 项下色谱条件重复进样 6 次,测定。结果栀子苷、连翘酯苷 A、黄芩苷、黄芩素、丹皮酚峰面积的 RSD 分别为 0.15%,0.49%,0.25%,0.20%,0.30% ($n=6$),表明方法精密度良好。

稳定性试验:取 2.2 项下供试品溶液适量,室温放置 0,6,12,18,24 h 时分别按 2.1 项下色谱条件进样测定。结果栀子苷、连翘酯苷 A、黄芩苷、黄芩素、丹皮酚峰面积的 RSD 分别为 0.46%,0.65%,0.35%,0.54%,1.20% ($n=5$),表明室温下供试品溶液在 24 h 内稳定。

重复性试验:取样品(批号为 1904009)适量,共 6 份,按 2.2 项下方法制备供试品溶液,再按 2.1 项下色谱条件进样测定。结果栀子苷、连翘酯苷 A、黄芩苷、黄芩素和丹皮酚平均含量分别为 0.175%,0.133%,0.166%,0.225%,0.172%,RSD 分别为 0.49%,0.92%,0.88%,0.98%,1.55%($n=6$),表明方法重复性良好。

加样回收试验:称取已知含量的样品(批号为 1904009)0.125 g,精密称定,置 50 mL 具塞锥形瓶中,平行 9 份,精密加入已知含量不同质量浓度的混合对照品溶液各 15 mL,按 2.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件进样测定。结果见表 2。

2.4 样品含量测定

取 15 批样品,按 2.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件进样测定,以外标法计算 5 个主成分的含量。结果见表 3。

2.5 质量分析

2.5.1 聚类分析

15 批样品按 5 个指标性成分含量之和可被聚为第 1~11 批次和第 12~15 批次两类(见图 3),后者含量之和相对较高。进一步分析发现,生产时间越近(即存储时间越短)的样品中 5 个指标性成分含量之和越高。

2.5.2 主成分分析

将 15 批样品的 5 个指标性成分的含量测定结果导入 SPSS 26.0 统计学软件,进行主成分分析,结果见表 4。可知,前 3 个主成分特征值大于 0.5,累计方差贡献率大于 85%,故可用于样品的质量评价。

3 讨论

预试验中对超声提取法和连续回流提取法进行了考察,发现超声提取法效果较好;进一步考察了甲醇、80% 甲醇、50% 甲醇对提取效果的影响,发现 80% 甲醇提取效率较高,且色谱峰基本无干扰,故选择 80% 甲醇提取;并对提取时间(30,60,90,120 min)和加水量(40,60,80,100 倍)进行了考察,确定提取时间为 90 min,加 60 倍水;还考察了甲醇-水溶液、甲醇-0.1% 磷酸水溶液、乙腈-水溶液、乙腈-0.1% 醋酸水溶液、乙腈-0.1% 磷酸水溶液等不同流动相的分离效果,结果表明乙腈-0.1% 磷酸水溶液对 5 个主成分的分离效果最好;对柱温(30,35,40℃)的考察结果显示,柱温为 40℃ 时分离效果最好。

15 批样品中,丹皮酚含量差异最小,其次为栀子苷、黄芩素、连翘酯苷 A、黄芩苷,黄芩苷含量最低,且差异最大。对批号相近的 7 批样品(1902012~1902047)进行分析,发现其 5 个主成分的含量差异明显小于 15 批样品,表明这 7 批样品的药材来源可能相同,同时也表明,除湿丸的制备工艺稳定。根据除湿丸处方工艺中的

表 2 加样回收试验结果($n=9$)
Tab. 2 Results of the recovery test($n=9$)

成分	取样量 (g)	样品含量 (mg)	加入量 (mg)	测得量 (mg)	回收率 (%)	$\bar{X}$ (%)	RSD (%)
栀子苷	0.125 7	0.220 0	0.335 2	0.563 4	102.45	100.49	2.50
	0.124 8	0.218 4	0.335 2	0.565 9	103.67		
	0.126 0	0.220 5	0.335 2	0.562 3	101.97		
	0.125 2	0.219 1	0.223 4	0.447 9	102.42		
	0.126 4	0.221 2	0.223 4	0.448 3	101.66		
	0.126 6	0.221 6	0.223 4	0.444 2	99.64		
	0.126 1	0.220 7	0.111 7	0.330 7	98.48		
	0.126 1	0.220 7	0.111 7	0.329 7	97.58		
	0.126 0	0.220 5	0.111 7	0.328 3	96.51		
连翘酯苷 A	0.125 7	0.167 2	0.245 7	0.409 4	98.58	100.86	2.87
	0.124 8	0.166 0	0.245 7	0.406 2	97.76		
	0.126 0	0.167 6	0.245 7	0.408 5	98.05		
	0.125 2	0.166 5	0.165 0	0.332 5	100.61		
	0.126 4	0.168 1	0.165 0	0.333 1	100.00		
	0.126 6	0.168 4	0.165 0	0.332 0	99.15		
	0.126 1	0.167 7	0.082 5	0.254 1	104.73		
	0.126 1	0.167 7	0.082 5	0.254 2	104.85		
	0.126 0	0.167 6	0.082 5	0.253 4	104.00		
黄芩苷	0.125 6	0.208 5	0.307 8	0.514 2	99.32	99.81	2.13
	0.124 8	0.207 2	0.307 8	0.521 2	102.01		
	0.125 1	0.207 7	0.307 8	0.526 0	103.41		
	0.125 7	0.208 7	0.205 2	0.415 7	100.88		
	0.126 4	0.209 8	0.205 2	0.415 5	100.24		
	0.126 9	0.210 7	0.205 2	0.414 8	99.46		
	0.125 5	0.208 3	0.136 8	0.341 1	97.08		
	0.125 8	0.208 8	0.136 8	0.341 6	97.08		
	0.124 9	0.207 3	0.136 8	0.342 5	98.83		
黄芩素	0.125 7	0.282 8	0.455 4	0.736 4	99.60	100.08	1.70
	0.124 8	0.280 8	0.455 4	0.746 3	102.22		
	0.126 0	0.283 5	0.455 4	0.747 5	101.89		
	0.125 2	0.281 7	0.303 6	0.592 3	102.31		
	0.126 4	0.284 4	0.303 6	0.587 8	99.93		
	0.126 6	0.284 9	0.303 6	0.585 3	98.95		
	0.126 1	0.283 7	0.151 8	0.433 1	98.42		
	0.126 1	0.283 7	0.151 8	0.431 9	97.63		
	0.126 0	0.283 5	0.151 8	0.435 0	99.80		
丹皮酚	0.125 6	0.216 0	0.318 3	0.535 3	100.31	101.67	1.83
	0.124 8	0.214 7	0.318 3	0.529 4	98.87		
	0.125 1	0.215 2	0.318 3	0.531 7	99.43		
	0.125 7	0.216 2	0.212 2	0.432 0	101.70		
	0.126 4	0.217 4	0.212 2	0.437 0	103.49		
	0.126 9	0.218 3	0.212 2	0.433 1	101.23		
	0.125 5	0.215 9	0.141 5	0.361 3	102.76		
	0.125 8	0.216 4	0.141 5	0.362 1	102.97		
	0.124 9	0.214 8	0.141 5	0.362 3	104.24		

表3 15批样品中5种主成分含量

Tab. 3 Determination results of five principal components in 15 batches of samples

序号	批号	栀子苷(%)	连翘酯苷A(%)	黄芩苷(%)	黄芩素(%)	丹皮酚(%)
1	1810069	0.144	0.132	0.055	0.276	0.242
2	1901057	0.148	0.112	0.091	0.281	0.221
3	1901061	0.149	0.120	0.107	0.261	0.214
4	1902012	0.162	0.128	0.106	0.254	0.217
5	1902017	0.167	0.135	0.093	0.225	0.209
6	1902018	0.150	0.111	0.083	0.281	0.211
7	1902019	0.160	0.113	0.095	0.256	0.227
8	1902030	0.169	0.123	0.099	0.270	0.213
9	1902035	0.164	0.119	0.084	0.250	0.218
10	1902047	0.178	0.132	0.088	0.253	0.213
11	1903062	0.163	0.150	0.081	0.302	0.218
12	1904009	0.175	0.133	0.166	0.225	0.172
13	1912007	0.168	0.145	0.183	0.274	0.238
14	2007007	0.187	0.141	0.196	0.236	0.233
15	2007008	0.185	0.147	0.195	0.211	0.242

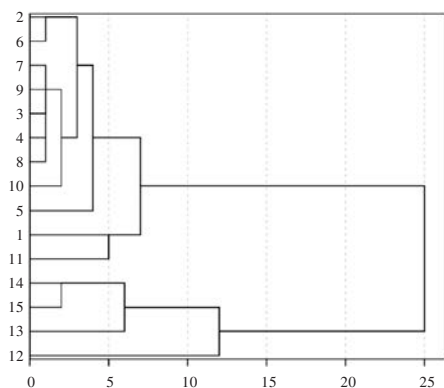


图3 15批除湿丸聚类分析图

Fig. 3 Dendrogram of 15 batches of Chushi Pills

表4 主成分特征值和方差贡献率

Tab. 4 Characteristic value and variance contribution rate of principal components

主成分	特征值	方差贡献率(%)	累计方差贡献率(%)
1	2.682	53.634	53.634
2	1.201	24.012	77.646
3	0.591	11.818	89.464
4	0.327	6.530	95.995
5	0.200	4.005	100.000

药材比例,按2020年版《中国药典(一部)》各药材成分的含量限度进行折算,各批次样品中栀子苷、丹皮酚、连翘酯苷A均符合药典中的含量规定^[8],而15批样品中黄芩苷含量均不符合药典关于黄芩药材的含量限度要求,推测可能是由于原料药材的黄芩苷含量较低,或是在制剂制备过程中黄芩苷大量损失。另外,15批样品中黄芩素的含量远高于黄芩苷,但文献[13-16]报道,黄

芩药材中黄芩苷的含量应远高于黄芩素,可能是由于黄芩苷在制剂制备过程中被其他药材中的酶水解,或烘干温度高和时间长造成黄芩苷水解,也有可能是两者共同作用。因此,如何保证黄芩苷在除湿丸生产过程中的稳定性,还有待进一步研究。

综上所述,该方法简便、快速,结果稳定、可靠,可用于评价除湿丸的质量。

参考文献

- [1] 北京中医医院. 赵炳南临床经验集[M]. 北京:人民卫生出版社,1975:298.
- [2] 田刚,李超,吴菲,等. 基于一测多评法对小儿豉翘清热颗粒中9个成分的质量控制[J]. 药物分析杂志,2018,38(11):1922-1930.
- [3] 许庆,安艳苏,毕秋左. 一测多评法测定栀榆洗剂中4个组分含量[J]. 中国药业,2020,29(15):58-61.
- [4] 辛文好,宋俊科,何国荣,等. 黄芩素和黄芩苷的药理作用及机制研究进展[J]. 中国新药杂志,2013,22(6):647-653.
- [5] 北京市食品药品监督管理局. 北京市医疗机构制剂规程(第1册)[M]. 北京:中国商业出版社,2014:凡例.
- [6] 张铁军,白钢,陈常青,等. 基于“五原则”的复方中药质量标志物(Q-marker)研究路径[J]. 中草药,2018,49(1):1-13.
- [7] 刘昌孝,陈士林,肖小河,等. 中药质量标志物(Q-marker):中药产品质量控制的新概念[J]. 中草药,2016,47(9):1443-1457.
- [8] 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,2020:1-1902.
- [9] 吴志芳,聂黎行. HPLC-波长切换法同时测定牛黄清胃丸中7个成分的含量[J]. 中国药房,2019,30(13):1744-1748.
- [10] 胡云飞,徐国兵. 牡丹皮及其主要成分丹皮酚的药理作用研究进展[J]. 安徽医药,2014,18(4):589-592.
- [11] 李沁,杨臣,游勇基. HPLC-DAD法同时测定小儿退热合剂中绿原酸、栀子苷、黄芩苷和丹皮酚的含量[J]. 药物分析杂志,2017,37(1):153-160.
- [12] 陈路,翟炎妹,闫炳雄,等. 高效液相色谱法测定妇炎灵洗剂中连翘苷含量[J]. 中国药业,2018,27(4):23-25.
- [13] 刘金欣,孟繁蕴,张胜海,等. UPLC同时测定黄芩中黄芩苷、黄芩素、汉黄芩苷、汉黄芩素、千层纸素A[J]. 中草药,2014,45(10):1477-1480.
- [14] 连中学,刘玉,柴俊雯,等. UPLC法同时测定黄芩中9种黄酮类成分的含量[J]. 中国中医药科技,2017,24(5):604-606.
- [15] 龙宇,向燕,谭裕君,等. 黄芩苷药理作用及新剂型的研究进展[J]. 中草药,2019,50(24):6142-6148.
- [16] 罗群,杨思进,蒲清荣,等. 清肺排毒合剂(新冠1号)质量标准研究[J]. 中国药业,2020,29(21):52-55.

(收稿日期:2020-12-15;修回日期:2021-04-03)