

- 谱对比分析[J]. 分析实验室, 2016, 35(11): 1326-1329.
- [18] 任佳佳, 张学顺, 褚志杰. 马钱子减毒增效研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报, 2016, 18(1): 221-224.
- [19] 李峻宽, 丁 盛, 何昌国. 中药杜仲炮制方法及与续断不同配伍的化学研究[J]. 中国生化药物杂志, 2016, 36(12): 189-191.

HPLC 法同时测定退银合剂中 6 种成分

鲁 静, 牛晓静, 段晓颖*

(河南中医药大学第一附属医院, 河南 郑州 450000)

摘要: **目的** 建立 HPLC 法同时测定退银合剂(牡丹皮、赤芍、忍冬藤等)中绿原酸、马钱苷、芍药苷、黄芩苷、丹酚酸 B、丹皮酚的含有量。**方法** 该药物甲醇提取液的分析采用 ZORBAX SB-Aq 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 以乙腈-0.1% 磷酸为流动相, 梯度洗脱; 体积流量 1.0 mL/min; 检测波长 235 nm; 柱温 30 °C。**结果** 6 种成分在各自范围内线性关系良好($r \geq 0.9997$), 平均加样回收率 97.1% ~ 100.6%, RSD 1.35% ~ 2.28%。**结论** 该方法简便准确, 重复性好, 可用于退银合剂的质量控制。

关键词: 退银合剂; 绿原酸; 马钱苷; 芍药苷; 黄芩苷; 丹酚酸 B; 丹皮酚; HPLC

中图分类号: R927.2

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2018)05-1093-04

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2018.05.017

Simultaneous determination of six constituents in Tuiyin Mixture by HPLC

LU Jing, NIU Xiao-jing, DUAN Xiao-ying*

(The First Affiliated Hospital of Henan University of CM, Zhengzhou 450000, China)

ABSTRACT: **AIM** To establish an HPLC method for the simultaneous content determination of chlorogenic acid, loganin, paeoniflorin, baicalin, salvianolic acid B and paeonol in Tuiyin Mixture (*Moutan Cortex*, *Paeoniae Radix Rubra*, *Lonicerae japonicae Caulis*, etc.). **METHODS** The analysis of methanol extract of this drug was performed on a 30 °C thermostatic ZORBAX SB-Aq column (4.6 mm×250 mm, 5 μm), with the mobile phase comprising of acetonitrile - 0.1% phosphoric acid flowing at 1.0 mL/min in a gradient elution manner, and the detection wavelength was set at 235 nm. **RESULTS** Six constituents showed good linear relationships within their own ranges ($r \geq 0.9997$), whose average recoveries were 97.1% - 100.6% with the RSDs of 1.35% - 2.28%. **CONCLUSION** This simple, accurate and reproducible method can be used for the quality control of Tuiyin Mixture.

KEY WORDS: Tuiyin Mixture; chlorogenic acid; loganin; paeoniflorin; baicalin; salvianolic acid B; paeonol; HPLC

银屑病俗称牛皮癣, 中医名“白疔”, 是一种常见易发的慢性顽固性皮肤病, 为皮肤科领域重点研究和防治的疾病之一, 目前对该病尚无理想疗

法, 而中医药治疗有其独到之处^[1]。退银合剂是在归纳分析传统中药治疗银屑病用药特点的基础上^[2-4], 结合河南中医药大学第一附属医院长期治

收稿日期: 2017-08-23

基金项目: 2014 年河南省中医药科学研究专项课题(2014ZY02041)

作者简介: 鲁 静(1984—), 女, 博士, 主管药师, 从事药物分析和药物制剂研究。Tel: (0371) 66251204, E-mail: lujing1@msn.com

* 通信作者: 段晓颖(1966—), 女, 硕士, 主任药师, 从事中药检验分析和中药制剂研究。Tel: (0371) 66233639, E-mail: dxy1378@163.com

疗银屑病的经验研制开发而成,经多年临床验证表明,其疗效确切。该方由牡丹皮、赤芍、忍冬藤、大青叶、黄芩、丹参、鸡血藤、薏苡仁等药材组成,具有清热凉血、解毒、活血化瘀、健脾利湿的功效,临床用于血热型银屑病,症见红斑、丘疹、脱屑,其中以牡丹皮、赤芍为君药,清在营血之热毒;以忍冬藤、大青叶、黄芩为臣药,清热解毒,助君药之力;佐以丹参、鸡血藤活血化瘀,薏苡仁健脾利湿,组方配伍合理,具有寒凉而不伤脾胃的特点。

研究表明,牡丹皮、赤芍中的丹皮酚和芍药苷能抑制银屑病模型炎症因子,并且芍药苷能上调细胞因子信号转导抑制因子1基因表达水平^[5];忍冬藤中的绿原酸和马钱苷能通过抑制NF- κ B的表达来发挥抗炎作用^[6];黄芩中的黄芩苷能明显抑制Jurkat T细胞的体外活化,可能是该药材治疗银屑病的作用机制之一^[7];丹参中的丹酚酸B具有抗炎、抗氧化等活性^[8]。因此,本实验拟建立HPLC法同时测定退银合剂中绿原酸、马钱苷、芍药苷、黄芩苷、丹酚酸B、丹皮酚的含有量,以期为全面有效控制其质量提供依据。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 Waters e2695型高效液相色谱仪,配置Waters 2998检测器、Empower色谱工作站(美国Waters公司);CP225D型电子天平(德国赛多利斯公司)。

1.2 试剂 丹酚酸B(批号111562-201514,含有量93.7%)、丹皮酚(批号110708-201407,含有量99.9%)、芍药苷(批号110736-201337,含有量94.9%)、黄芩苷(批号110715-201318,含有量93.3%)、马钱苷(批号111640-201005,含有量99.2%)、绿原酸(批号110753-201415,含有量96.2%)对照品均购自中国食品药品检定研究院。退银合剂由河南中医药大学第一附属医院制剂室制备(棕黄至棕褐色液体,100 mL/瓶,批号161209、161107、161012)。乙腈、磷酸为色谱纯;其他试剂为分析纯;水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Agilent ZORBAX SB-Aq色谱柱(250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m);流动相乙腈(A)-0.1%磷酸(B),梯度洗脱(0~20 min, 5%~15% A; 20~30 min, 15%~25% A; 30~45 min, 25%~30% A; 45~60 min, 45%~55% A);体积流量1.0 mL/min;检测波长235 nm;柱温30 $^{\circ}$ C;

进样量20 μ L。

2.2 退银合剂制备 按处方比例称取各药材,加水煎煮3次,每次1.5 h,过滤,合并滤液,浓缩至适量后加入苯甲酸钠3 g,放冷,加水至1 000 mL,混匀,灌装,灭菌,即得。

2.3 对照品溶液制备 精密称取绿原酸、马钱苷、芍药苷、黄芩苷、丹酚酸B、丹皮酚对照品适量,加50%甲醇制成贮备液(质量浓度分别为0.956、1.032、5.602、10.08、3.318、2.072 mg/mL),精密量取2、5、10、10、10、5 mL,置于同一50 mL量瓶中,50%甲醇稀释并定容,即得(质量浓度分别为38.24、103.2、1120、2016、663.6、207.2 μ g/mL)。

2.4 供试品溶液制备 精密吸取合剂5 mL,置于50 mL量瓶中,加甲醇40 mL,超声(250 W、40 kHz)30 min,放冷,甲醇定容,摇匀,放置,取上清液,过滤,取续滤液,即得。

2.5 阴性样品溶液制备 按“2.2”项下方法分别制备不含牡丹皮、牡丹皮和赤芍、忍冬藤、黄芩、丹参的阴性样品,按“2.4”项下方法制备供试品溶液。

2.6 系统适用性试验 取对照品、供试品、阴性样品溶液适量,在“2.1”项色谱条件下进样测定,结果见图1。由图可知,6种成分的理论塔板数均大于5 000,与相邻峰的分度均大于1.5,阴性无干扰。

2.7 线性关系考察 精密吸取“2.3”项下对照品溶液0.5、1、2、4、8、16 mL,置于25 mL量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,得到系列质量浓度的对照品溶液(绿原酸质量浓度分别为0.765、1.530、3.059、6.118、12.24、24.47 μ g/mL;马钱苷质量浓度分别为2.064、4.128、8.256、16.51、33.02、66.05 μ g/mL;芍药苷质量浓度分别为22.40、44.80、89.60、179.2、358.4、716.8 μ g/mL;黄芩苷质量浓度分别为40.32、80.64、161.3、322.6、645.1、1 290 μ g/mL;丹酚酸B质量浓度分别为13.27、26.54、53.09、106.2、212.4、424.7 μ g/mL;丹皮酚质量浓度分别为4.144、8.288、16.58、33.15、66.30、132.6 μ g/mL),在“2.1”项色谱条件下进样20 μ L测定。以质量浓度为横坐标(X),峰面积为纵坐标(Y)进行回归,结果见表1,可知各成分在各自范围内线性关系良好。

2.8 精密度试验 取同一供试品溶液(批号161209),在“2.1”项色谱条件下进样测定6次,

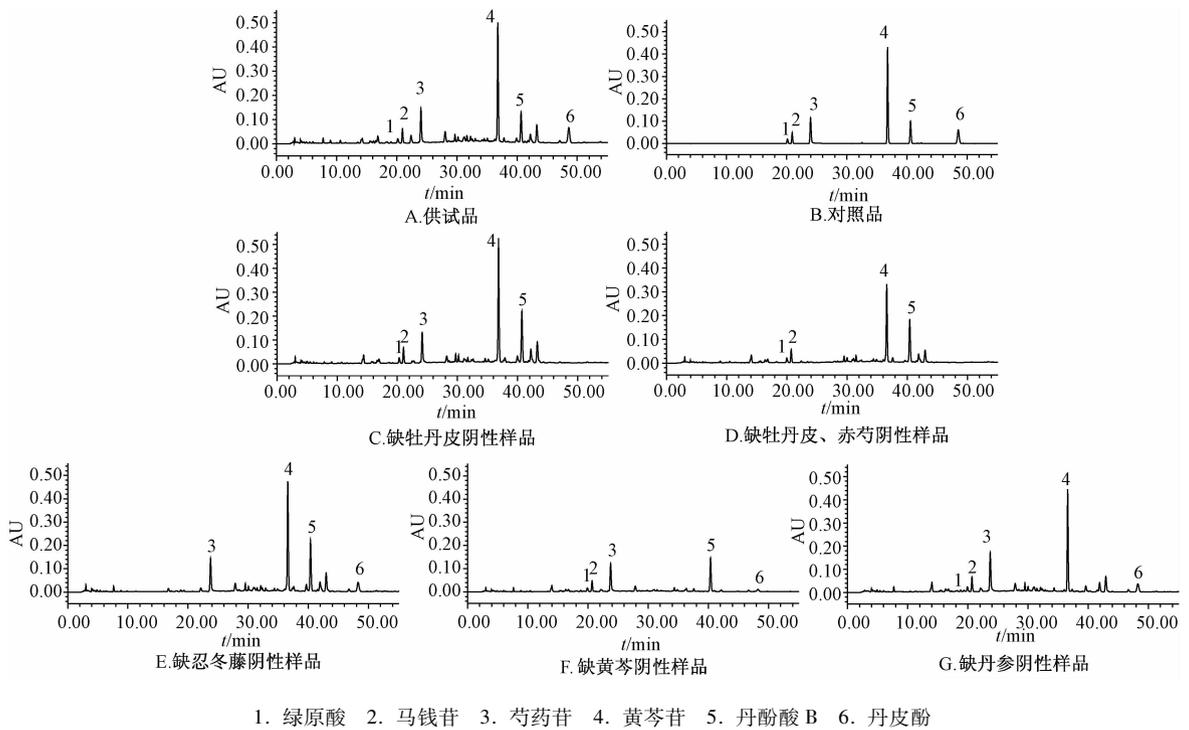


图1 各成分 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of various constituents

测得绿原酸、马钱苷、芍药苷、黄芩苷、丹酚酸 B、丹皮酚峰面积 RSD 分别为 0.91%、0.64%、0.78%、1.02%、1.13%、1.09%，表明仪器精密度良好。

表1 各成分线性关系

Tab. 1 Linear relationships of various constituents

成分	回归方程	线性范围/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	<i>r</i>
绿原酸	$Y=67\ 006X-2\ 800$	0.765~24.47	0.999 8
马钱苷	$Y=50\ 982X-10\ 032$	2.064~66.05	0.999 8
芍药苷	$Y=14\ 185X-93\ 692$	22.40~716.8	0.999 7
黄芩苷	$Y=22\ 293X-63\ 464$	40.32~1 290	0.999 9
丹酚酸 B	$Y=20\ 077X-26\ 877$	13.27~424.7	0.999 8
丹皮酚	$Y=61\ 754X-27\ 275$	4.144~132.6	0.999 8

2.9 稳定性试验 取同一供试品溶液（批号 161209），于室温下放置 0、2、4、8、12、24 h 后在“2.1”项色谱条件下进样测定，测得绿原酸、马钱苷、芍药苷、黄芩苷、丹酚酸 B、丹皮酚峰面积 RSD 分别为 1.16%、1.42%、1.29%、1.44%、1.43%、1.49%，表明溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.10 重复性试验 取同一批合剂（批号 161209），按“2.4”项下方法平行制备 6 份供试品溶液，在“2.1”项色谱条件下进样测定，测得绿原酸、马钱苷、芍药苷、黄芩苷、丹酚酸 B、丹

皮酚含有量 RSD 分别为 1.14%、1.03%、0.89%、1.21%、1.01%、1.18%，表明该方法重复性良好。

2.11 加样回收率试验 精密吸取同一批合剂（批号 161209）6 份，每份 2.5 mL，加入“2.3”项下对照品溶液 2.5 mL，按“2.4”项下方法制备供试品溶液，在“2.1”项色谱条件下进样测定，计算回收率，结果见表 2。

2.12 样品含有量测定 取合剂 3 批，按“2.4”项下方法制备供试品溶液，在“2.1”项色谱条件下进样测定，结果见表 3。

3 讨论

中医认为，银屑病由外邪内侵、七情内伤、脾胃失和等因素所致，常见的证候类型为血热证、血燥证、血瘀证、血虚风燥证、血虚证等^[9]。其中，血热型银屑病的治疗常采用具有凉血清解解毒作用的中药或方剂^[10-11]，临床疗效确切，而且安全性高。

本实验应用甲醇-0.1% 甲酸、甲醇-0.1% 磷酸、乙腈-0.1% 甲酸、乙腈-0.1% 磷酸流动相体系对绿原酸、马钱苷、芍药苷、黄芩苷、丹酚酸 B 和丹皮酚进行梯度洗脱，发现以乙腈-0.1% 磷酸的分离效果最佳，峰形最好。然后，对各成分进行全

表2 各成分加样回收率试验结果 (n=6)

Tab. 2 Results of recovery tests for various constituents (n=6)

成分	原有量/	加入量/	测得量/	回收率/	平均回收	RSD/
	mg	mg	mg	%	率/%	%
绿原酸	0.104 1	0.095 6	0.194 7	94.8	97.1	2.28
	0.104 1	0.095 6	0.198 8	99.1		
	0.104 1	0.095 6	0.194 9	95.0		
	0.104 1	0.095 6	0.195 4	95.5		
	0.104 1	0.095 6	0.199 2	99.5		
	0.104 1	0.095 6	0.198 5	98.7		
马钱苷	0.287 8	0.258 0	0.531 7	94.5	97.2	2.25
	0.287 8	0.258 0	0.538 9	97.3		
	0.287 8	0.258 0	0.544 0	99.3		
	0.287 8	0.258 0	0.543 9	99.3		
	0.287 8	0.258 0	0.541 1	98.2		
	0.287 8	0.258 0	0.531 8	94.6		
芍药苷	2.983 3	2.800 0	5.789 3	100.2	98.9	1.35
	2.983 3	2.800 0	5.697 2	96.9		
	2.983 3	2.800 0	5.760 9	99.2		
	2.983 3	2.800 0	5.753 1	98.9		
	2.983 3	2.800 0	5.721 7	97.8		
	2.983 3	2.800 0	5.792 5	100.3		
黄芩苷	5.404 5	5.040 0	10.485 7	100.8	99.1	1.77
	5.404 5	5.040 0	10.282 1	96.8		
	5.404 5	5.040 0	10.432 8	99.8		
	5.404 5	5.040 0	10.497 6	101.1		
	5.404 5	5.040 0	10.319 3	97.5		
	5.404 5	5.040 0	10.376 9	98.7		
丹酚酸 B	1.799 8	1.659	3.480 9	101.3	100.6	1.72
	1.799 8	1.659	3.429 7	98.2		
	1.799 8	1.659	3.442 4	99.0		
	1.799 8	1.659	3.471 1	100.7		
	1.799 8	1.659	3.483 6	101.5		
	1.799 8	1.659	3.506 3	102.9		
丹皮酚	0.573	0.518	1.077 3	97.4	98.1	1.97
	0.573	0.518	1.089 6	99.7		
	0.573	0.518	1.085 7	99.0		
	0.573	0.518	1.072 4	96.4		
	0.573	0.518	1.093 5	100.5		
	0.573	0.518	1.068 3	95.6		

表3 各成分含有量测定结果 (mg/mL, n=3)

Tab. 3 Results of content determination of various constituents (mg/mL, n=3)

批号	绿原酸	马钱苷	芍药苷	黄芩苷	丹酚酸 B	丹皮酚
161209	0.041 64	0.115 1	1.193 3	2.161 8	0.719 9	0.229 2
161107	0.042 31	0.135 7	1.183 9	2.191 0	0.756 2	0.247 3
161012	0.042 92	0.122 3	1.187 6	2.170 2	0.760 6	0.238 1

波长 (190~400 nm) 紫外扫描, 发现其最大吸收波长分别为 326、237、231、276、286、275 nm, 即马钱苷和芍药苷在 235 nm 附近, 丹酚酸 B 在 235 nm 处的吸光度与 286 nm 处的基本一致, 绿原酸、黄芩苷、丹皮酚在 235 nm 处的吸光度虽不如

最大吸收波长处的, 但能满足定量测定要求, 综合考虑峰面积、峰形、分离度等因素, 最终确定检测波长为 235 nm。

目前, 在中药制剂质量检测中大多选择单一成分作为指标, 对其含有量进行测定。但中药制剂成分复杂, 其疗效是多种成分相互关联、共同作用的结果, 仅关注单一成分无法真实反映并控制其质量, 可能存在生产过程中药材混淆使用等情况^[12-13]。本实验建立 HPLC 法同时测定退银合剂中绿原酸、马钱苷、芍药苷、黄芩苷、丹酚酸 B、丹皮酚的含有量, 该方法简便准确, 能客观地评价控制该制剂质量, 从而确保临床用药的安全有效。

参考文献:

[1] 赵淮波, 吴闽枫, 徐蓉, 等. 中医药治疗银屑病的学术观点和机制研究[J]. 世界临床药物, 2017, 38(3): 145-148.

[2] 钟启福. 基于数据挖掘技术分析当代中医名家银屑病验方经验研究[D]. 南京: 南京中医药大学, 2016.

[3] 马友谊. 凉血消银汤治疗寻常型银屑病血热证临床观察[J]. 新中医, 2015, 47(9): 99-101.

[4] 夏庆梅. 凉血活血消银汤治疗寻常型银屑病 40 例[J]. 天津中医药, 2007, 24(1): 54.

[5] 韩朔. 芍药苷、丹皮酚对 HaCaT 细胞银屑病模型 SOCS1 及其炎症因子表达的研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2016.

[6] 潘梓焯, 常念伟, 周梦鸽, 等. 桑菊饮抗炎活性成分筛选与单体验证[J]. 中草药, 2016, 47(8): 1289-1296.

[7] 吴珺, 刘欣, 邱泽计, 等. 黄芩主要成分对 PDB + Ion 诱导的 Jurkat T 细胞 CD69 表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(9): 188-190.

[8] 赵先, 王婧雯, 陆杨, 等. 丹酚酸 B 药理作用的研究进展[J]. 西北药学杂志, 2015, 30(1): 107-110.

[9] 于晓飞, 吴秀艳, 徐雯洁, 等. 寻常型银屑病常见证候分布特点的现代文献研究[J]. 中华中医药杂志, 2012, 27(4): 1008-1011.

[10] 张云璧, 瞿幸, 牛福玲. 常用治疗银屑病的中药对肿瘤坏死因子- α 刺激后角质形成细胞生长及分泌白介素-8 的影响[J]. 中国中西医结合皮肤性病学期杂志, 2006, 5(1): 18-20.

[11] 杨晓红, 孙丹, 曾武城, 等. 清热凉血方治疗血热证银屑病的临床观察及对外周 miR-21 表达的调控研究[J]. 中华中医药杂志, 2016, 31(6): 2299-2301.

[12] 王甫成, 时维静, 龚道锋, 等. 毫菊和大马牙中绿原酸、黄酮类成分及挥发油含有量的比较[J]. 中成药, 2015, 37(7): 1534-1538.

[13] 张炜, 宋文静, 武嘉庚, 等. UPLC-MS/MS 法检测妇康宁片中掺加的山麦冬[J]. 中成药, 2017, 39(4): 867-869.