

复方透骨草溶液质量标准的研究

张洁玉, 徐燕君, 范斌, 袁秀荣*, 张宁*
(上海中医药大学, 上海 201203)

摘要: 目的 建立复方透骨草溶液(透骨草、花椒、大皂角、木鳖子)的质量标准。方法 建立10批样品的指纹图谱后, TLC法定性鉴别透骨草和花椒, HPLC法测定槲皮素含量。结果 指纹图谱中有27个共有峰, 相似度0.978~0.986, 其中4个为苯甲酸钠、芦丁、金丝桃苷、槲皮素。TLC斑点清晰, 阴性无干扰。槲皮素在1.68~107.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内线性关系良好 ($R^2=0.9999$), 平均加样回收率104.3%, RSD 2.2%。结论 该方法稳定、重复性好, 可用于复方透骨草溶液的质量控制。

关键词: 复方透骨草溶液; 指纹图谱; 透骨草; 花椒; 槲皮素; TLC; HPLC

中图分类号: R927.2 文献标志码: A 文章编号: 1001-1528(2018)05-1101-05

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2018.05.019

Quality standard for Compound Tougucao Solution

ZHANG Jie-yu, XU Yan-jun, FAN Bin, YUAN Xiu-rong*, ZHANG Ning*
(Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China)

ABSTRACT: AIM To establish the quality standard for Compound Tougucao Solution [*Impatiens balsamina*L. *Zanthoxylum bungeanum* Maxim., *Gleditsia sinensis* Lam and *Momordica cochinchinensis* (Lour.) Spreng.]. **METHODS** The fingerprints of ten batches of samples were established, after which TLC was used for the qualitative identification of *I. balsamina* and *Z. bungeanum*, HPLC was adopted in the content determination of quercetin. **RESULTS** There were twenty-seven common peaks in the fingerprints with the similarities of 0.978 - 0.986, four of which were sodium benzoate, rutin, hyperoside and quercetin, respectively. The clear TLC spots were free from negative interference. Quercetin showed a good linear relationship within the range of 1.68 - 107.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($R^2=0.9999$), whose average recovery was 104.3% with the RSD of 2.2%. **CONCLUSION** This stable and reproducible method can be used for the quality control of Compound Tougucao Solution.

KEY WORDS: Compound Tougucao Solution; fingerprints; *Impatiens balsamina*L.; *Zanthoxylum bungeanum* Maxim.; quercetin; TLC; HPLC

复方透骨草溶液是夏氏中医皮肤外科传人夏涵教授组方、上海中医药大学岳阳中西医结合医院研制的院内制剂, 临床应用20余年, 治疗角化过度型手足癣(鹅掌风)显效率达90%^[1]。该方是由透骨草、花椒、大皂角、木鳖子4味药材米醋浸泡7d后过滤定容制成的中药复方外用制剂, 由于其原有质量控制仅包括透骨草TLC鉴别, 以及对相

对密度和pH值的要求, 不能全面反映其整体质量, 同时方中花椒、大皂角、透骨草在2015年版《中国药典》^[2]和1994年版上海市中药材标准^[3]中均无含量测定方法, 特征成分不明确。因此, 本实验建立复方透骨草溶液指纹图谱^[4-5], TLC法定性鉴别透骨草和花椒, HPLC法测定槲皮素含量, 以期为该方质量评价体系的建立奠定基础, 也

收稿日期: 2017-12-07

基金项目: 上海市卫生和计划生育委员会科研课题重点项目(201640025); 上海市科学技术委员会科研计划项目(15401972400)

作者简介: 张洁玉(1991—), 女, 硕士生, 研究方向为中药新剂型与质量评价。E-mail: zjy1592@126.com

*通信作者: 袁秀荣(1963—), 女, 教授, 研究方向为中药新药研发。Tel: (021) 51322044, E-mail: yuany@189.cn

张宁(1955—), 女, 教授, 研究方向为中药新剂型与质量评价。Tel: (021) 51322687, E-mail: ningzh18@126.com

为临床用药安全、有效和稳定提供保证。

1 仪器与试剂

Agilent 1200 高效液相色谱仪 (VWD 检测器)、Agilent 1260 高效液相色谱仪 (DAD 检测器) (美国安捷伦科技公司); CP225D 电子天平 (上海精密科学仪器有限公司); ATS4 全自动点样仪 (瑞士 Camag 公司); SK7200LH 超声清洗仪 (上海科导超声仪器有限公司); ZF-20 紫外灯箱 (上海宝山顾村电光仪器厂)。

磷酸 (20161116)、甲醇 (20140513)、乙酸 (20160909)、乙酸乙酯 (20150615)、石油醚 (20160503)、甲酸 (T20091118)、硫酸 (20150126) 均为分析纯 (国药集团化学试剂有限公司); 乙腈为色谱纯 (德国默克公司); 乙醇 (P1257655)、苯甲酸钠 (P1043973) (上海泰坦化学有限公司); 水为纯水 (杭州娃哈哈百立食品有限公司)。金丝桃苷 (111521-201205)、芦丁 (100080-201408)、槲皮素 (100081-201610)、花椒 (121106-201305) 对照品 (中国食品药品检定研究院)。

透骨草 (160201) 购于上海同济堂药业有限公司, 花椒 (151113)、大皂角 (150806) 购于上海康桥中药饮片有限公司, 木鳖子 (160706) 购于上海虹桥中药饮片有限公司, 经上海中医药大学中药鉴定教研室张红梅副教授鉴定为正品, 由以上药材制备 10 批复方透骨草溶液。缺透骨草、花椒、大皂角、木鳖子阴性溶液, 500 mL/瓶, 均为实验室自制。

2 方法与结果

2.1 指纹图谱建立

2.1.1 色谱条件 Waters Symmetry Shield RP₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相乙腈 (A) -0.1% 磷酸 (B), 梯度洗脱 (0 ~ 15 min, 3% ~ 9% A; 15 ~ 50 min, 9% ~ 15% B; 50 ~ 90 min, 15% ~ 25% B; 90 ~ 100 min, 25% ~ 30% B; 100 ~ 140 min, 30% ~ 38% B; 140 ~ 155 min, 38% ~ 70% B; 155 ~ 170 min, 70% B); 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 25 °C; 检测波长 210 nm; 进样量 20 μL。

2.1.2 溶液制备

2.1.2.1 供试品溶液 取溶液 1 mL, 加入 3 mL 甲醇摇匀, 静置, 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 即得。

2.1.2.2 对照品溶液 称取各对照品适量, 甲醇溶解后定容, 即得。

2.1.3 方法学考察

2.1.3.1 精密度试验 取同一份样品 (1707121), 在“2.1”项色谱条件下进样测定 6 次, 测得各色谱图相似度不低于 0.956。再以 12 号峰为参照峰, 测得相对保留时间 RSD ≤ 0.52%, 表明仪器精密度良好。

2.1.3.2 重复性试验 取同一份样品 (1707121), 在“2.1”项色谱条件下进样测定 6 次, 测得各色谱图相似度不低于 0.943。再以 12 号峰为参照峰, 测得相对保留时间 RSD ≤ 0.23%, 表明该方法重复性良好。

2.1.3.3 稳定性试验 取同一份样品 (1707121), 在“2.1”项色谱条件下于 0、3、6、12、24、48 h 在“2.1”项色谱条件下进样测定 6 次, 测得各色谱图相似度不低于 0.935。再以 12 号峰为参照峰, 测得相对保留时间 RSD ≤ 0.690%, 表明溶液在 48 h 内稳定性良好。

2.1.4 建立方法 通过上述方法建立 10 批样品的指纹图谱, 将其导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2012.130723 版”软件, 以批号 1703022 样品图谱为参照, 选择保留时间作为参数, 时间窗宽度 0.5, 使用平均数进行自动匹配, 并以多点校正方法生成对照指纹图谱^[6-7], 见图 1, 可知有 27 个共有特征峰, 其中第 12 ~ 14、20 号峰分别为苯甲酸钠、芦丁、金丝桃苷、槲皮素。

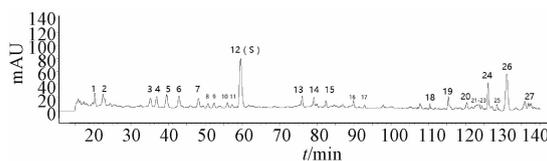
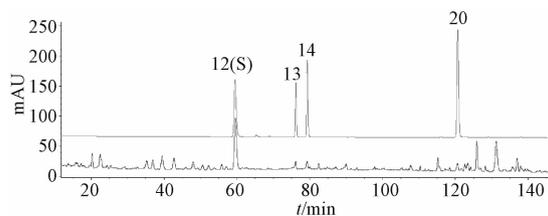


图 1 样品对照指纹图谱

Fig. 1 Reference fingerprint of samples

图 2 显示, 各图谱共有峰的相对保留时间无显著差异。按“2.1.2”项下方法制备阴性对照溶液, 在“2.1.1”项色谱条件下进样测定, 结果见图 3; 同法处理米醋, 结果见图 4。通过保留时间确认, 第 3、6 ~ 11、13 ~ 17、20、26 号峰来源于花椒, 第 18、19、21 ~ 25、27 号峰来源于大皂角, 第 1、2、4、5、12 号峰来源于米醋。

2.1.5 相似度评价 将对照指纹图谱的相似度设定为 1.000, 10 批样品相似度见表 1。再根据中药注射剂指纹图谱研究的技术要求 (暂行)^[8] 比较其指纹图谱 (图 5), 以 12 号峰为参照峰 (S), 计算其保留时间、相对保留时间, 结果见表 2, 可知不



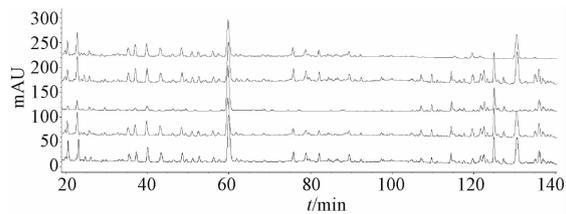
注：由上至下，依次为对照品、样品

12. 苯甲酸钠 13. 芦丁 14. 金丝桃苷 20. 槲皮素

12. sodium benzoate 13. rutin 14. hyperoside 20. quercetin

图2 各成分HPLC色谱图

Fig. 2 HPLC chromatogram of various constituents



注：由上至下，依次为缺大皂角、透骨草、花椒、木鳖子阴性对照、样品

图3 阴性对照HPLC色谱图

Fig. 3 HPLC chromatogram of negative references

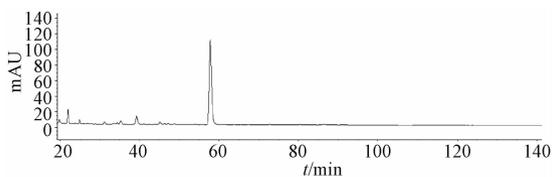


图4 米醋HPLC色谱图

Fig. 4 HPLC chromatogram of rice vinegar

同批次样品共有指纹图谱色谱峰的相对保留时间稳定，相似度高，符合相关要求。

表1 10批样品相似度

Tab. 1 Similarities of ten batches of samples

批号	相似度	批号	相似度
1703021(S1)	0.983	1707071(S6)	0.978
1703022(S2)	0.982	1707121(S7)	0.986
1703023(S3)	0.986	1707122(S8)	0.982
1703061(S4)	0.981	1707123(S9)	0.986
1703062(S5)	0.981	1707171(S10)	0.981

2.2 TLC定性鉴别

2.2.1 供试品溶液制备 取透骨草、花椒粉末各约1g，加入20mL甲醇，超声(53kHz)提取30min，滤过，滤液蒸干，加入1mL甲醇溶解，即得相应对照药材供试品溶液。取供试品、缺透骨草、花椒阴性药液各20mL，加入乙酸乙酯振荡提取2次，每次20mL，合并乙酸乙酯层后减压回收溶剂至干，残渣加1mL甲醇溶解，即得。

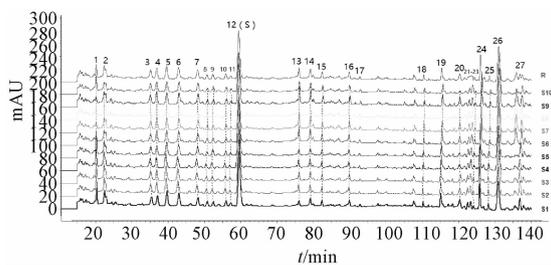


图5 10批样品指纹图谱

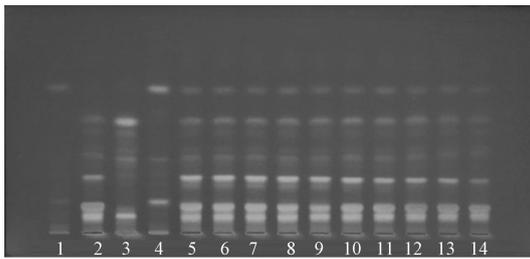
Fig. 5 Fingerprints of ten batches of samples

表2 共有峰保留时间

Tab. 2 Retention time of common peaks

峰号	保留时间/min	RSD/%	相对保留时间	RSD/%
1	20.216	0.300	0.340	0.205
2	22.415	0.265	0.377	0.164
3	35.206	0.301	0.575	0.193
4	36.892	0.274	0.620	0.168
5	39.590	0.299	0.666	0.260
6	42.878	0.349	0.721	0.324
7	48.150	0.321	0.810	0.304
8	50.731	0.300	0.853	0.282
9	52.339	0.282	0.880	0.262
10	55.939	0.267	0.941	0.257
11	57.226	0.267	0.962	0.265
12(S)	59.474	0.130	1.000	0.000
13	76.047	0.099	1.279	0.137
14	79.189	0.098	1.331	0.129
15	82.449	0.140	1.386	0.185
16	89.895	0.119	1.512	0.137
17	92.845	0.125	1.561	0.155
18	110.429	0.161	1.857	0.235
19	115.407	0.205	1.940	0.280
20	120.356	0.058	2.024	0.110
21	122.785	0.188	2.065	0.261
22	123.616	0.195	2.079	0.268
23	124.473	0.211	2.093	0.256
24	126.108	0.200	2.120	0.271
25	128.495	0.201	2.161	0.272
26	131.106	0.071	2.204	0.147
27	137.219	0.207	2.307	0.267

2.2.2 鉴别方法 按照2015年版《中国药典》四部薄层色谱法(通则0502)，取“2.2.1”项下供试品溶液各5μL，点于同一硅胶G薄层板上，以石油醚(60~90℃)-乙酸乙酯-甲酸(10:4:1)为展开剂^[9]展开，取出，晾干，喷以10%硫酸乙醇溶液，105℃加热至斑点清晰，置于紫外灯(365nm)下检视，结果见图6。由图可知，溶液供试品色谱在2种对照药材色谱相应位置上显相同颜色斑点，R_f分别为0.66和0.50，阴性无干扰。



1. 缺花椒阴性样品 2. 缺透骨草阴性样品 3. 花椒
4. 透骨草 5~14. 样品
1. negative sample without *Z. bungeanum* 2. negative sample without *I. balsamina* 3. *Z. bungeanum* 4. *I. balsamina* subsp. *asiatica* 5-14. samples

图6 样品 TLC 色谱图

Fig. 6 TLC chromatogram of samples

2.3 HPLC 法测定槲皮素含量

2.3.1 色谱条件 Kromasil 100-5C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相乙腈 (A)-0.2% 乙酸 (B), 梯度洗脱^[10] (0~10 min, 25% A; 10~20 min, 25%~32% A; 20~35 min, 32%~25% A); 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 25 ℃; 检测波长 245 nm; 进样量 10 μL。色谱图见图 7。

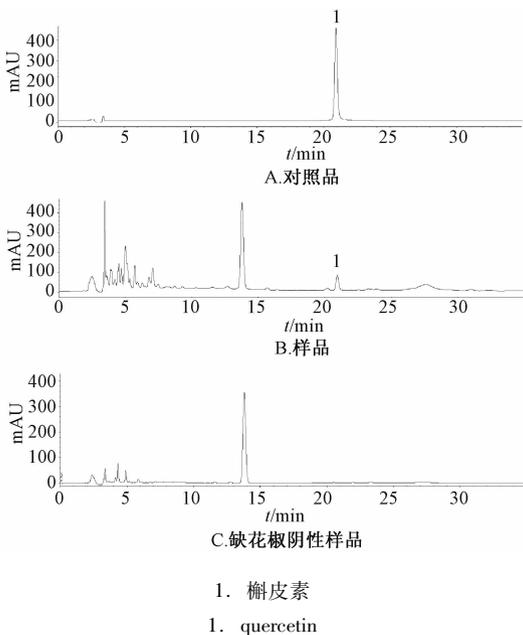


图7 槲皮素 HPLC 色谱图

Fig. 7 HPLC chromatograms of quercetin

2.3.2 溶液制备

2.3.2.1 对照品溶液 精密称取槲皮素对照品适量, 甲醇溶解并定容, 即得 (质量浓度 59.3 μg/mL)。

2.3.2.2 供试品溶液 精密量取溶液 10 mL, 乙酸乙酯振摇提取 4 次, 每次 10 mL, 合并乙酸乙酯液, 蒸干, 残渣加甲醇溶解, 转移至 5 mL 量瓶中,

加甲醇至刻度, 即得。同法制备缺花椒阴性样品溶液。

2.3.3 方法学考察

2.3.3.1 线性关系考察 精密称取槲皮素对照品适量, 加甲醇制成 107.6 μg/mL 对照品溶液, 再稀释至 53.8、26.9、13.5、6.73、3.36、1.68 μg/mL, 在“2.3.1”项色谱条件下进样测定。以质量浓度为横坐标 (X), 峰面积为纵坐标 (Y) 进行线性回归, 得回归方程为 $Y = 68.71X - 21.75$ ($R^2 = 0.9999$), 在 1.68~107.6 μg/mL 范围内线性关系良好。

2.3.3.2 稳定性试验 按“2.3.2.2”项下方法制备供试品溶液, 于 0、1.5、3、6、9、12、18、24、36、48 h 在“2.3.1”项色谱条件下进样测定, 测得峰面积 RSD 为 0.75%, 表明溶液在 48 h 内稳定性良好。

2.3.3.3 精密度试验 取同一供试品溶液, 在“2.3.1”项色谱条件下进样测定 6 次, 测得峰面积 RSD 为 0.39%, 表明仪器精密度良好。

2.3.3.4 重复性试验 平行制备 6 份供试品溶液, 在“2.3.1”项色谱条件下进样测定, 测得峰面积 RSD 为 0.68%, 表明该方法重复性良好。

2.3.3.5 加样回收率试验^[11] 取样品 10 mL, 按含有量的 50%、100%、150% 分别加入对照品, 平行 3 份, 按“2.3.2.2”项下方法制备供试品溶液, 在“2.3.1”项色谱条件下进样测定, 计算回收率, 结果见表 3。

表3 槲皮素加样回收率试验结果 (n=9)

Tab. 3 Results of recovery tests for quercetin (n=9)

原有量/ μg	加入量/ μg	测得量/ μg	回收率/ %	平均回收 率/%	RSD/ %
105.9	53.8	162.4	105.1		
105.9	53.8	161.1	102.8		
105.9	53.8	159.8	100.2		
105.9	107.6	218.1	104.4		
105.9	107.6	220.6	106.6	104.3	2.2
105.9	107.6	220.5	106.6		
105.9	161.4	273.4	103.8		
105.9	161.4	271.2	102.5		
105.9	161.4	278.4	106.9		

2.3.4 样品含有量测定 取 10 批样品, 按“2.3.2.2”项下方法制备供试品溶液, 另取“2.3.2.1”项下对照品溶液, 均在“2.3.1”项色谱条件下进样测定, 结果见表 4。

表4 槲皮素含量测定结果

Tab. 4 Results of content determination of quercetin

批号	槲皮素/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	批号	槲皮素/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
1703021	16.9	1707071	19.9
1703022	15.6	1707121	21.8
1703023	17.2	1707122	22.1
1703061	12.7	1707123	25.1
1703062	9.9	1707171	11.5

3 讨论

中药复方组成复杂,仅检识少数几种成分并不能全面反映中药制剂质量。本实验建立了复方透骨草溶液指纹图谱,对10批制剂样品进行对比分析,可在一定程度上体现药材与制剂之间的关系及不同批次制剂之间的差异,对其质量评价方法的建立具有重要作用。

本实验初期曾选择280 nm^[12]作为检测波长,测定时基线平稳,峰分离情况良好,但专属性试验发现,该条件下色谱峰主要来源于花椒,其他药材中未能发现,无法反映出指纹图谱表达复方多药味多成分的特点,故再考察了210 nm^[13]、245 nm^[10]、254 nm^[14]、280 nm检测波长下的出峰情况和色谱峰归属,发现在210 nm波长下能得到更多色谱峰信号,并且归属于制剂中2种药材和辅料醋,故选择其作为检测波长。

复方透骨草溶液的特点是药物浓度低,其中最高浓度的花椒在制剂中也仅占6% (g/mL),并且特征成分不明确,同时制剂中米醋沸点较高,难以浓缩处理,如果提高温度则可能会影响其他特征性成分的稳定性,这为指纹图谱分析方法探索以及供试品前处理带来一定难度,本实验结果也反映了其色谱峰信号峰多、峰面积小的特点,占总峰面积10%以上的共有色谱峰仅有2个,即12、26号,其中前者相对峰面积RSD \leq 1.36%,后者 \leq 6.09%,按照《中药指纹图谱研究要求与应用》中占总峰面积10%以上色谱峰的相对峰面积RSD不得大于25%的规定,可认为两者均符合要求。另外,还发现各色谱峰相对保留时间RSD均 \leq 0.324%,也符合相关要求。

米醋在复方透骨草溶液中发挥着特殊作用,它既是提取溶剂,又是成型辅料,同时还可软化角质、促进药物吸收,并在一定程度上起到杀菌作用,其质量优劣将直接影响制剂质量。它是以粮食为原料经过发酵酿造而成,主要含有碱性氨基酸、

糖、有机酸、维生素B1、维生素B2、维生素C、无机盐、矿物质等^[15],但是目前对应用于中药炮制及制剂中的米醋尚无药用标准。为了防止米醋在贮存期间变质,各生产厂家均会添加一定量防腐剂苯甲酸钠,但其用量过大会对人体健康产生影响,故本实验将制剂中米醋来源(添加剂)的色谱峰一并纳入指纹图谱进行考察,对保证复方透骨草溶液质量控制的完整性具有一定意义,也可为今后建立药用米醋多成分综合评价方法提供思路。

参考文献:

[1] 向延卫,李 苏,杨连娟,等. 复方透骨草溶液治疗角化过度型足癣临床观察[J]. 湖南中医药大学学报, 2015, 35(7): 38-39, 59.

[2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2015年版一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 21, 65, 159.

[3] 上海市卫生局. 上海市中药材标准[S]. 上海: 上海市卫生局, 1994: 173.

[4] 祝 明,陈碧莲,石上梅. 中药指纹图谱技术在中国药典2015年版一部中的应用[J]. 中国现代应用药学, 2016, 33(5): 611-614.

[5] 李 强,杜思邈,张忠亮,等. 中药指纹图谱技术进展及未来发展方向展望[J]. 中草药, 2013, 44(22): 3095-3104.

[6] 程 红,姚志红,戴 毅,等. 中药复方制剂仙灵骨葆胶囊 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中国药学杂志, 2013, 48(10): 772-776.

[7] 梁少梅,张 鑫,李敏婷,等. 清肺愈癆丸 HPLC 指纹图谱建立及4种成分测定[J]. 中成药, 2017, 39(1): 90-93.

[8] 国家药品监督管理局. 中药注射剂指纹图谱研究的技术要求(暂行)[J]. 中成药, 2000, 22(10): 671-675.

[9] 吴 浩. 透骨草质量标准研究[J]. 中国医院药学杂志, 2011, 31(23): 1987-1988.

[10] 姜洪芳,石宝俊,张峰伦,等. 高效液相色谱法同时测定凤仙花中的萘醌类和黄酮类成分[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(12): 344-346.

[11] 武 钰,李东雨,姚 军,等. 金雀花中3种黄酮成分的测定及其指纹图谱的建立[J]. 中成药, 2016, 38(10): 2204-2208.

[12] 崔美玉,赵云丽,王 婷,等. RP-HPLC法同时测定花椒提取物中3种山椒素的含量[J]. 沈阳药科大学学报, 2014, 31(4): 272-275.

[13] 杨秀培. 大皂角与猪牙皂化学成分的分析比较[J]. 淮阴师范学院学报(自然科学版), 2004, 3(2): 143-146.

[14] 余晓琴,张丽平,阚建全. 红花椒和青花椒 HPLC 指纹图谱的分析[J]. 食品与发酵工业, 2012, 38(4): 171-174.

[15] 范玛莉. 不同食醋对醋制中药的化学成分影响研究[D]. 太原: 山西大学, 2016.