

皮肤病血毒片制备中 7 种成分转移率研究

史志辉¹,肖会敏²,何悦²,刘洋³,刘海月¹,杨旭²,王四旺²

(1. 陕西君碧莎制药有限公司, 陕西 咸阳 712000; 2. 第四军医大学药学院新药研发中心, 陕西 西安 710032; 3. 陕西中医药大学, 陕西 咸阳 712046)

摘要:目的 建立同时测定金银花、忍冬藤、红花、赤芍、白芍、川芎、当归、连翘、黄柏、甘草等药材与皮肤病血毒片中绿原酸、羟基红花色素 A、芍药苷、连翘酯苷 A、阿魏酸、小檗碱和甘草酸的含量测定方法,并探讨其在药材至皮肤病血毒片制剂间的转移率。方法 采用高效液相色谱(HPLC)及多波长方法;选取 2 批金银花、忍冬藤、红花、赤芍、白芍、川芎、当归、连翘、黄柏与甘草药材,每批对应 5 批制剂。结果 (1)建立了 HPLC 测定药材与制剂中 7 种成分的测定方法;(2)在药材至制剂间的转移率绿原酸、羟基红花色素 A、芍药苷、连翘酯苷 A、阿魏酸、小檗碱和甘草酸分别为 87.23%、86.35%、85.06%、86.95%、85.13%、91.70%、86.79%。结论 该含量测定方法简便、准确、重复性好,可作为药材与皮肤病血毒片中 7 种成分的定量方法;7 种成分的转移率高,表明制剂制备工艺有利于该有效成分的转移,为制剂疗效提供了理论依据。

关键词:皮肤病血毒片;高效液相色谱;绿原酸;芍药苷;连翘酯苷 A;小檗碱;甘草酸

doi:10.3969/j.issn.1009-6469.2017.07.009

Study on transfer rates of 7 kinds of components in the preparation of pifubingxuedu tablet

SHI Zhihui¹,XIAO Huimin²,HE Yue²,LIU Yang³,LIU Haiyue¹,YANG Xu²,WANG Siwang²

(1. Shaanxi Junbishan Pharmaceutical Co., Ltd, Xianyang, Shaanxi 712000, China; 2. The Fourth Military University, College of Pharmacy, New Drug Research and Development Center, Xi'an, Shaanxi 710032, China; 3. Shaanxi University of Traditional Chinese Medicine, Xianyang, Shaanxi 712046, China)

Abstract: Objective To establish a high performance liquid chromatography (HPLC) method for determining the contents of Chlorogenic acid, hydroxy Safflower Pigment A, paeoniflorin, forsythiaside A, ferulic acid, berberine and glycyrrhizin acid in Pifubingxuedu Tablet and the herbs of honeysuckle, honeysuckle, safflower, radix paeoniae rubra, Radix Paeoniae Alba, Rhizoma Chuanxiong, angelica, forsythia, phellodendron bark, licorice. **Methods** Using HPLC and multiwavelength method; selecting 2 batches of honeysuckle, honeysuckle, safflower, radix paeoniae rubra, Radix Paeoniae Alba, Rhizoma Chuanxiong, Radix Angelicae sinensis, Fructus Forsythiae, Cortex Phellodendri and Radix Glycyrrhizae, corresponding to each batch of 5 batch preparations. **Results** A HPLC method has been established for determining 7 components of medicinal materials and preparations; and the transfer rates of chlorogenic acid, hydroxy Safflower Pigment A, paeoniflorin, forsythiaside A, ferulic acid, berberine and glycyrrhizin were 87.23%, 86.35%, 85.06%, 86.95%, 85.13%, 91.70%, 86.79%, respectively, between the medicinal materials and preparation. **Conclusions** The HPLC method is suitable for the quality control of the preparation, and the transfer rate of the 7 components is high, which indicates that the preparation process is beneficial to the transfer of the active ingredient, and provides a theoretical basis for the preparation effect.

Key words: Pifubingxuedu tablet; HPLC; Chlorogenic acid; Paeoniflorin; Forsythiaside A; Berberine; Glycyrrhizin acid

皮肤病血毒片系陕西省君碧莎制药有限公司独家生产的标准制剂,由金银花、忍冬藤、赤芍、白芍、川芎、当归、连翘、黄柏、红花、甘草等 39 味中药组成,其适应证主要为经络不和,温热血燥引起的风疹,湿疹,皮肤刺痒等皮肤疾病。方中金银花、忍冬藤均含绿原酸^[1],其有抗炎、抑制免疫等作用^[2];红花含有羟基红花色素 A 等,具有抗菌等活性^[3];

赤芍与白芍均含芍药苷,具有抗氧化等效应^[4];连翘主要含有连翘酯苷与连翘苷等成分,具有抗炎、抗病毒等作用^[5];川芎与当归均含阿魏酸,具有抗菌消炎等作用^[6];黄柏含小檗碱等,有抗菌等作用^[7];甘草具有抗菌、消炎等作用^[8-9],其含有甘草酸等^[10]。经文献检索,未见对该制剂中绿原酸、羟基红花色素 A、芍药苷、连翘酯苷 A、阿魏酸、小檗碱、甘草酸等 7 种成分研究报道,因此,笔者采用高效液相色谱(HPLC)法测定其在多批制剂中的含量

通信作者:王四旺,男,教授,博士生导师,研究方向:中药学,E-mail:

wangsiw@fmmu.edu.cn

及其药材至制剂间的转移情况。

1 仪器与试药

1.1 仪器 岛津高效液相色谱仪 (Prominence HPLC), 日本岛津公司; 电子分析天平, 型号 ME235S, 德国塞多利斯公司; KQ-300DE 数控超声波发生器, 昆山超声仪器有限公司。

1.2 试药 绿源酸、羟基红花色素 A、芍药苷、连翘酯苷 A、阿魏酸、小檗碱、甘草酸对照品, 均购自中国食品药品检定研究院; 金银花、忍冬藤、红花、赤芍、白芍、川芎、当归、连翘、黄柏、甘草, 批号分别为 20160416、20160417; 皮肤病血毒片 (批号 20160506、20160507、20160508、20160509、20160510、20160511、20160512、20160513、20160514、20160515), 由陕西君碧莎制药有限公司提供。乙腈、甲醇, 色谱纯, 美国 Honeywell 公司; 超纯水, 自制。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱为 Kromasil C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈 (A)-0.5% 磷酸水溶液溶液 (B), 梯度洗脱, 0 ~ 20 min, B 97% → 85%; 20 ~ 40 min, B 85% → 75%; 40 ~ 45 min, B 75% → 70%; 45 ~ 70 min, B 70% → 40%。记录时间为 70 min。流速: 0.8 mL · min⁻¹; 柱温: 25 °C; 检测波长: 245, 325 和 403 nm; 进样量 20 μL。

2.2 对照品溶液的配制 分别精密称取羟基红花色素 A 8.00 mg、连翘酯苷 A 8.00 mg、阿魏酸 6.00 mg 置 50 mL 量瓶中, 加 50% 甲醇至刻度, 摇匀, 即得三个对照品混合溶液, 浓度分别为 160.00、160.00、120.00 mg · L⁻¹ 作为储备液 A; 再精密称取绿源酸 4.00 mg、芍药苷 8.00 mg、小檗碱 4.00 mg、甘草酸 4.00 mg 置 10 mL 量瓶中, 加储备液 A 至刻度, 摇匀, 即得 7 个对照品混合溶液, 作为储备液 B (图 1 ~ 3)。

2.3 皮肤病血毒片供试品溶液的制备 取本品粉末 5 g, 精密称定, 置于具塞锥形瓶中, 加 50% 甲醇 50 mL, 密塞, 称定重量, 超声处理 (功率 250 kW, 频率 40 kHz) 30 min, 放凉, 再称定重量, 用 50% 甲醇补足减失的重量, 摇匀, 静置, 取上清液滤过, 取续滤液, 即得。

2.4 阴性对照溶液的制备 依据处方, 分别制备缺金银花与忍冬藤药材的制剂、缺红花药材的制剂、缺赤芍与白芍药材的制剂、缺连翘药材的制剂、缺川芎与当归药材的制剂、缺黄柏药材的制剂与缺甘草药材的制剂, 再依据“2.1”项分别制备相应的阴性对照溶液。

2.5 药材供试品溶液的制备 金银花、忍冬藤、红

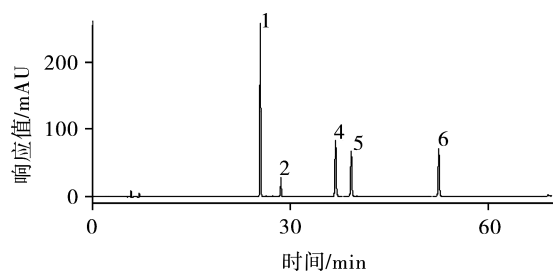
花、赤芍、白芍、川芎、当归、连翘、黄柏、甘草等药材在投料前随机取样, 干燥粉碎, 分别按照中国药典 2015 年版一部相应项下含量测定项中“供试品的制备”方法制备供试品溶液^[1]。

2.6 方法学考察

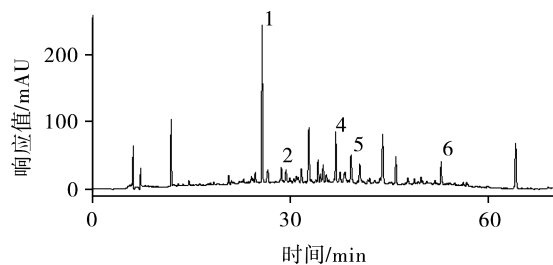
2.6.1 线性关系 分别精密量取储备液 B 0.025、0.050、0.100、0.125、0.250 和 0.500 mL 置于各个 1 mL 量瓶中并加 50% 甲醇稀释至刻度, 用 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 进样。以各对照品的质量浓度 (X , mg · L⁻¹) 为横坐标, 峰面积值 (Y) 为纵坐标, 通过计算, 得线性方程, 结果表明, 各对照品在相应浓度范围内线性关系良好, 见表 1 和图 1 ~ 3。

表 1 对照品的线性方程及其质量浓度范围

对照品名称	线性范围/mg · L ⁻¹	线性方程	r 值
绿源酸	10.00 ~ 200.00	$Y_1 = 59\,288X_1 - 49\,168$	0.999 3
羟基红花色素 A	4.00 ~ 80.00	$Y_2 = 79\,076X_2 + 15\,361$	0.999 4
芍药苷	20.00 ~ 400.00	$Y_3 = 37\,203X_3 + 58\,056$	0.999 6
连翘酯苷 A	4.00 ~ 80.00	$Y_4 = 56\,197X_4 + 16\,944$	0.999 2
阿魏酸	3.00 ~ 60.00	$Y_5 = 46\,290X_5 - 6\,389$	0.999 5
小檗碱	10.00 ~ 200.00	$Y_6 = 21\,399X_6 + 2\,222$	0.999 6
甘草酸	10.00 ~ 200.00	$Y_7 = 10\,003X_7 + 834$	0.999 5



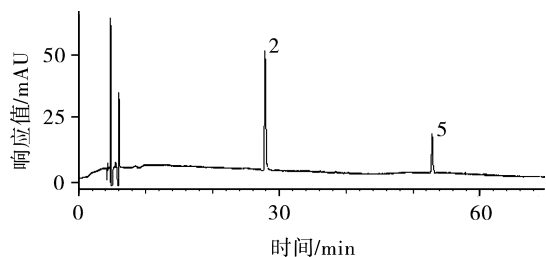
A. 混合对照品



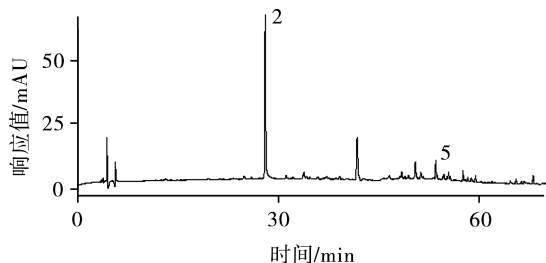
B. 皮肤病血毒片

注: 1. 绿源酸; 2. 羟基红花色素 A; 4. 连翘酯苷 A; 5. 阿魏酸; 6. 小檗碱。

图 1 绿源酸、连翘酯苷 A、阿魏酸和小檗碱定量 HPLC 图谱 (325 nm)



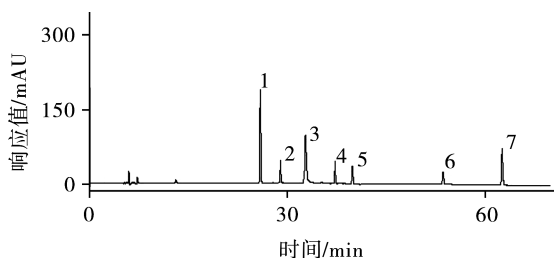
A. 混合对照品



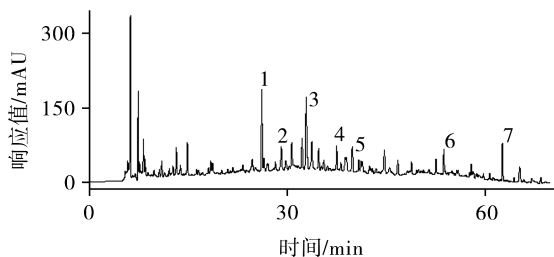
B. 皮肤病病毒片

注:2. 羟基红花色素 A; 5. 阿魏酸。

图2 羟基红花色素 A 定量 HPLC 图谱(403 nm)



A. 混合对照品



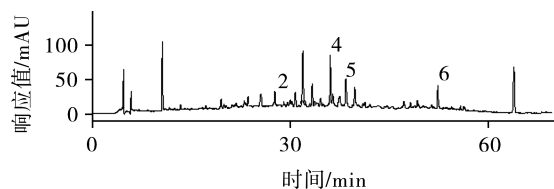
B. 皮肤病病毒片

注:1. 绿源酸; 2. 羟基红花色素 A; 3. 芍药苷; 4. 连翘酯苷 A; 5. 阿魏酸; 6. 小檗碱; 7. 甘草酸。

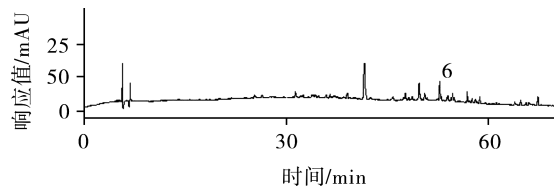
图3 芍药苷与甘草酸定量 HPLC 图谱(245 nm)

2.6.2 专属性试验 分别按“2.4”项下方法制备各个阴性对照溶液,按“2.1”项下色谱条件进样测定。结果,阴性对照溶液均无干扰,见图4。

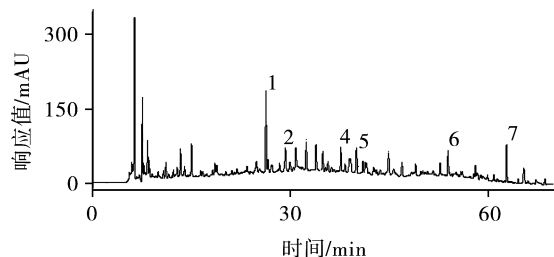
2.6.3 精密度试验 精密吸取供试品溶液(批号20160506),重复进样5次,测得绿源酸,羟基红花色素 A,芍药苷,连翘酯苷 A,阿魏酸,小檗碱,甘草酸的相对标准差(RSD)分别为0.84%、0.78%、0.91%、1.10%、0.94%、0.93%、0.96%,表明该方法精密度良好。



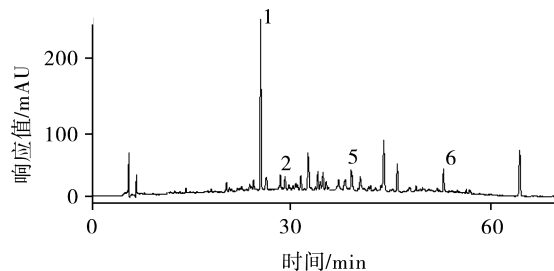
A. 缺金银花与忍冬藤药材



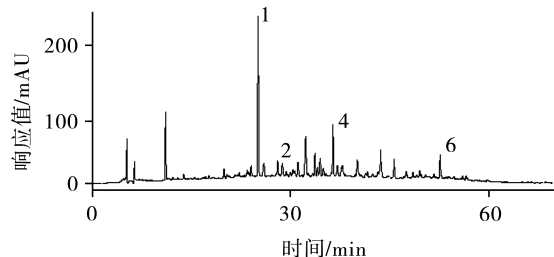
B. 缺红花



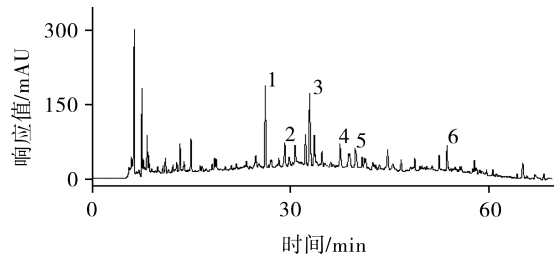
C. 缺赤芍与白芍药材



D. 缺连翘药材



E. 缺川芎与当归药材



F. 缺甘草药材

注:1. 绿源酸; 2. 羟基红花色素 A; 3. 芍药苷; 4. 连翘酯苷 A; 5. 阿魏酸; 6. 小檗碱; 7. 甘草酸。

图4 阴性对照 HPLC 图谱

2.6.4 稳定性试验 精密吸取供试品溶液(批号 20160506),分别在第 0、2、4、8、12 和 24 h 进样。结果,绿源酸、羟基红花色素 A、芍药苷、连翘酯苷 A、阿魏酸、小檗碱、甘草酸的峰面积的 RSD 值分别为 0.85%、1.15%、1.00%、1.03%、1.16%、0.86%、0.98%,表明该溶液在 24 h 内稳定性。

2.6.5 重复性试验 精密称取 6 份样品(批号 20160506),分别按 2.3 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,绿源酸、羟基红花色素 A、芍药苷、连翘酯苷 A、阿魏酸、小檗碱、甘草酸平均含量分别为 0.570 4、0.139 6、0.871 2、0.077 2、0.030 4、0.412 8、0.537 2 mg·g⁻¹,RSD 值分别为 1.04%、1.05%、0.97%、1.11%、0.99%、1.01%、1.21%,表明该方法具有良好重复性。

2.6.6 加样回收率试验 精密量取皮肤病血毒片(批号 20160506,其中绿源酸、羟基红花色素 A、芍药苷、连翘酯苷 A、阿魏酸、小檗碱、甘草酸平均含量分别为 0.570 4、0.139 6、0.871 2、0.077 2、0.030 4、0.412 8、0.537 2 mg·g⁻¹)5.0 g,分别添加混合对照品溶液(精密称取绿源酸、羟基红花色素 A、芍药苷、连翘酯苷 A、阿魏酸、小檗碱、甘草酸适量,制成每 1 mL 50% 甲醇中含量分别为 1.450、0.350、2.200、0.200、0.075、1.000、1.350 mg)1.60 mL 或 2.00 mL 或 2.40 mL,再加 50% 甲醇至刻度,按照 2.3 项下方法制备供试品溶液,共制备 6 份样品,按照 2.1 项下色谱条件进样测定。该方法回收率良好,见表 2。

2.6.7 药材与制剂含量测定 (1)分别按照“2.5”项下方法制备供试品,按照“2.1”项下色谱条件测定。各批药材样品中绿源酸、羟基红花色素 A、芍药苷、连翘酯苷 A、阿魏酸、小檗碱、甘草酸的平均含量、RSD 见表 3。(2)精密量取 10 批制剂样品,分别按照“2.3”项下方法制备供试品,按照“2.1”项下色谱条件测定。各批样品中绿源酸、羟基红花色素 A、芍药苷、连翘酯苷 A、阿魏酸、小檗碱、甘草酸的平均含量(0.5 克/片)、RSD 见表 4。

2.6.8 转移率结果 转移率计算公式如下:

转移率(%) =
$$\frac{\text{制剂中成分平均含量(毫克/片)} \times 1\,000(\text{片})}{\text{处方药材中成分总含量(毫克/1\,000 片)}} \times 100\%$$

制剂中组方药材的处方量:赤芍 13.3 g,当归 13.3 g,连翘 13.3 g,金银花 13.3 g,黄柏 6.7 g,白芍 13.3 g,忍冬藤 13.3 g,川芎(酒炙)6.7 g,甘草 13.3 g,红花 6.7 g。7 种成分的平均转移率分别为 87.23%、86.35%、85.06%、86.95%、85.13%、91.70%、86.79%,见表 4。

表 2 加样回收率测定结果(n=3)

化合物	样品体 积/g	样品原有 量/mg	对照品添 加量/mg	测定总 量/mg	回收 率/%	平均回 收率/%	RSD/ %
绿源酸	5.024 5	2.866 0	2.32	5.152 2	98.54	97.97	0.82
	5.043 4	2.876 8	2.32	5.133 8	97.28		
	5.121 6	2.921 4	2.90	5.742 5	97.28		
	5.020 8	2.863 9	2.90	5.741 1	99.21		
	5.020 4	2.863 6	3.48	6.260 5	97.61		
	5.036 6	2.872 9	3.48	6.280 2	97.91		
羟基红花 色素 A	5.024 5	0.701 4	0.56	1.249 4	97.86	98.47	0.89
	5.043 4	0.704 1	0.56	1.257 9	98.89		
	5.121 6	0.715 0	0.70	1.409 8	99.26		
	5.020 8	0.700 9	0.70	1.381 3	97.20		
	5.020 4	0.700 8	0.84	1.526 4	98.29		
	5.036 6	0.703 1	0.84	1.537 2	99.30		
芍药苷	5.024 5	4.377 3	3.52	7.803 6	97.34	98.37	0.90
	5.043 4	4.393 8	3.52	7.868 2	98.70		
	5.121 6	4.461 9	4.40	8.799 6	98.58		
	5.020 8	4.374 1	4.40	8.741 9	99.27		
	5.020 4	4.373 8	5.28	9.612 2	99.21		
	5.036 6	4.387 9	5.28	9.514 9	97.10		
连翘酯 苷 A	5.024 5	0.387 9	0.32	0.700 4	97.66	98.35	0.91
	5.043 4	0.389 4	0.32	0.704 1	98.34		
	5.121 6	0.395 4	0.40	0.785 7	97.58		
	5.020 8	0.387 6	0.40	0.781 2	98.40		
	5.020 4	0.387 6	4.80	5.189 0	100.03		
	5.036 6	0.388 8	4.80	5.097 9	98.11		
阿魏酸	5.024 5	0.152 7	0.12	0.272 7	100.00	98.63	1.06
	5.043 4	0.153 3	0.12	0.269 7	97.00		
	5.121 6	0.155 7	0.15	0.304 6	99.27		
	5.020 8	0.152 6	0.15	0.301 9	99.53		
	5.020 4	0.152 6	0.18	0.329 0	98.00		
	5.036 6	0.153 1	0.18	0.329 5	98.00		
小檗碱	5.024 5	2.074 1	1.60	3.639 7	97.85	98.21	0.86
	5.043 4	2.081 9	1.60	3.664 3	98.90		
	5.121 6	2.114 2	2.00	4.099 5	99.27		
	5.020 8	2.072 6	2.00	4.016 6	97.20		
	5.020 4	2.072 4	2.40	4.431 1	98.28		
	5.036 6	2.079 1	2.40	4.425 0	97.75		
甘草酸	5.024 5	2.699 2	2.16	4.808 4	97.65	98.35	0.94
	5.043 4	2.709 3	2.16	4.833 7	98.35		
	5.121 6	2.751 3	2.70	5.385 8	97.57		
	5.020 8	2.697 2	2.70	5.354 1	98.40		
	5.020 4	2.697 0	3.24	5.937 9	100.03		
	5.036 6	2.705 7	3.24	5.884 3	98.10		

表3 2批药材测定结果(*n* = 3)

批号	药材	成分名称	含量/	处方药材中成分总含
			mg · g ⁻¹	量/(毫克 · 1 000 片 ⁻¹)
20160416	金银花	绿原酸	24.03	342.21
	忍冬藤	绿原酸	1.70	
	红花	羟基红花色素 A	11.94	
	赤芍	芍药苷	19.84	80.02
	白芍	芍药苷	18.11	
	川芎	阿魏酸	4.04	
	当归	阿魏酸	1.41	45.91
	连翘	连翘酯苷 A	1.32	
	黄柏	小檗碱	33.90	
	甘草	甘草酸	24.24	322.33
20160417	金银花	绿原酸	24.18	344.47
	忍冬藤	绿原酸	1.72	
	红花	羟基红花色素 A	12.24	
	赤芍	芍药苷	19.82	82.01
	白芍	芍药苷	18.10	
	川芎	阿魏酸	3.87	
	当归	阿魏酸	1.36	44.03
	连翘	连翘酯苷 A	1.29	
	黄柏	小檗碱	34.13	
	甘草	甘草酸	23.02	306.12

3 讨论

3.1 检测方法的选择 由于处方大,物质成分多,等度洗脱目标成分难以达到分离度要求,所以选择梯度洗脱,并分析检测时间定为 70 min,柱温调为 25 ℃。

3.2 检测波长选择 测定 7 个化合物含量检测波长的选择,根据二极管阵列对绿源酸、羟基红花色素 A、芍药苷、连翘酯苷 A、阿魏酸、小檗碱、甘草酸扫描。结果绿源酸、连翘酯苷 A、阿魏酸、小檗碱的最大吸收在 325 nm 处,羟基红花色素 A 的最大吸收在 403 nm 处,芍药苷、甘草酸的最大吸收在 245 nm 处时,各峰分离度大于 1.5,无其他峰干扰,故选择作为其检测波长。

3.3 各溶液制备方法的选择 各对照品溶液的制备依据文献[1]制备,供试品溶液的制备参照文献[1]制备;药材依据《中国药典》一部对应项下要求。

3.4 阴性对照溶液的制备 在测定的 7 个成分即金银花与忍冬藤药材均含有绿原酸^[1],赤芍与白芍均含有芍药苷^[1],当归与川芎均含有阿魏酸^[1],经过文献检索处方中其余药材中未发现有 7 种成分,故制备阴性对照溶液时应将相应药材同时去除。

3.5 7 种成分含量分析 对 10 批皮肤病血毒片含量测定结果,表明 7 种成分分别在不同批次间含量较为均一,因此可以作为该制剂功效成分的定量指标。

表4 各成分药材至皮肤病血毒片的转移率结果

药材批号	药材名称	成分名称	制剂批号					各成分	
			20160506	20160507	20160508	20160509	20160510	每片平均含量/mg	转移率/%
20160416	金银花 + 忍冬藤	绿原酸	0.285 2	0.294 6	0.305 6	0.299 8	0.303 1	0.297 7	86.98
	红花	羟基红花色素 A	0.069 8	0.068 8	0.069 3	0.070 1	0.068 7	0.069 3	86.65
	赤芍 + 白芍	芍药苷	0.435 6	0.425 8	0.427 7	0.428 5	0.430 1	0.429 5	85.09
	川芎 + 当归	阿魏酸	0.038 6	0.037 6	0.039 2	0.040 1	0.039 7	0.039 0	85.04
	连翘	连翘酯苷 A	0.015 2	0.014 6	0.014 8	0.015 1	0.015 4	0.015 0	85.24
	黄柏	小檗碱	0.206 4	0.212 6	0.213 2	0.211 2	0.202 2	0.209 1	92.07
	甘草	甘草酸	0.268 6	0.278 1	0.279 4	0.285 6	0.279 8	0.278 3	86.34
药材批号	药材名称	成分名称	制剂批号					各成分	
			20160511	20160512	20160513	20160514	20160515	每片平均含量/mg	转移率/%
20160417	金银花 + 忍冬藤	绿原酸	0.294 2	0.298 1	0.303 5	0.304 6	0.306 2	0.301 3	87.47
	红花	羟基红花色素 A	0.069 5	0.071 1	0.071 2	0.071 1	0.069 9	0.070 6	86.04
	赤芍 + 白芍	芍药苷	0.430 3	0.429 8	0.426 5	0.438 1	0.419 3	0.428 8	85.03
	川芎 + 当归	阿魏酸	0.039 9	0.040 3	0.038 1	0.038 4	0.038 9	0.039 1	88.85
	连翘	连翘酯苷 A	0.014 4	0.014 7	0.014 9	0.014 8	0.014 4	0.014 6	85.02
	黄柏	小檗碱	0.207 2	0.206 8	0.203 4	0.212 8	0.213 8	0.208 8	91.32
	甘草	甘草酸	0.268 6	0.264 2	0.268 2	0.267 6	0.266 7	0.267 1	87.24