

清肺愈痤丸 HPLC 指纹图谱建立及 4 种成分测定

梁少梅, 张 鑫*, 李敏婷, 陈兴兴, 董丽艳
(南方医科大学中西医结合医院, 广东 广州 510315)

摘要: **目的** 建立清肺愈痤丸(黄芩、枇杷叶、赤芍等) HPLC 指纹图谱, 并测定 4 种成分的含有量。**方法** 清肺愈痤丸甲醇提取液的分析采用 Agilent HC-C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相乙腈-0.4% 磷酸, 梯度洗脱; 体积流量 0.8 mL/min; 检测波长 230 nm; 柱温为 35 ℃。**结果** 10 批样品 HPLC 指纹图谱中有 11 个共有峰, 相似度均大于 0.9。芍药苷、橙皮苷、黄芩苷、丹酚酸 B 分别在 0.08~0.25、0.07~0.22、0.2~0.60、0.06~0.18 μg 范围内线性关系良好, 平均加样回收率分别为 98.7%、96.9%、97.4%、98.2%, RSD 分别为 0.98%、1.09%、0.82%、1.66%。**结论** 该方法灵敏度高, 专属性强, 可用于清肺愈痤丸的质量控制。

关键词: 清肺愈痤丸; HPLC 指纹图谱; 芍药苷; 橙皮苷; 黄芩苷; 丹酚酸 B

中图分类号: R927.2

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2017)01-0090-04

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2017.01.017

Establishment of HPLC fingerprints of Qingfeiyucuo Pills and determination of four constituents

LIANG Shao-mei, ZHANG Xin*, LI Min-ting, CHEN Xing-xing, DONG Li-yan
(Hospital of Integrated Chinese and Western Medicine of Southern Medical University, Guangzhou 510315, China)

ABSTRACT: **AIM** To establish the HPLC fingerprints of Qingfeiyucuo Pills (an agent for the management of acne, containing *Scutellariae Radix*, *Eriobotryae Folium*, *Paeoniae Radix Rubra*, etc.) and to determine the contents of four constituents. **METHODS** The analysis of methanol extract of Qingfeiyucuo Pills was carried out on a 35 ℃ thermostatic Agilent HC-C₁₈ column (4.6 mm×250 mm, 5 μm), with the mobile phase comprising of acetonitrile-0.4% phosphoric acid flowing at 0.8 mL/min in a gradient elution manner, and the detection wavelength was set at 230 nm. **RESULTS** Eleven common peaks with the similarities of more than 0.9 were observed in the HPLC fingerprints of ten batches of samples. Paeoniflorin, hesperidin, baicalin and salvianolic acid B showed good linear relationships within the ranges of 0.08-0.25 μg, 0.07-0.22 μg, 0.2-0.60 μg and 0.06-0.18 μg, whose average recoveries were 98.7%, 96.9%, 97.4% and 98.2% with the RSDs of 0.98%, 1.09%, 0.82% and 1.66%, respectively. **CONCLUSION** This sensitive and specific method can be used for the quality control of Qingfeiyucuo Pills.

KEY WORDS: Qingfeiyucuo Pills; HPLC fingerprints; paeoniflorin; hesperidin; baicalin; salvianolic acid B

清肺愈痤丸是南方医科大学中西医结合医院的重点医院制剂(批准文号粤药制字 Z20110020), 已入选《2015 中医药强省专项资金中药制剂建设项目》, 故计划将其作进一步研究开发, 培育成为

拥有自主知识产权的中药新药。它由黄芩、枇杷叶、白花蛇舌草、赤芍、丹参、茵陈、夏枯草、当归、陈皮、甘草 10 味中药组成, 具有清肺祛湿, 活血化瘀的功效, 用于寻常痤疮、酒渣鼻、脂溢性

收稿日期: 2016-05-10

基金项目: 南方医科大学中西医结合医院院长基金资助项目 (1201302002)

作者简介: 梁少梅 (1989—), 女, 中药师, 研究方向为中药资源与开发。E-mail: 344373882@qq.com

* 通信作者: 张 鑫 (1965—), 男, 副教授, 研究方向为天然药物化学成分的提取分离。E-mail: 252089553@qq.com

皮炎等^[1-2]，其疗效显著，价格合理，深受患者欢迎。课题组前期曾对该制剂进行了 TLC 定性鉴别，以及通过 HPLC 法测定黄芩苷含量^[3]，但难以全面反映其整体质量，故本实验建立其 HPLC 指纹图谱，并测定芍药苷、橙皮苷、黄芩苷、丹酚酸 B 含量，旨在为该制剂的质量评价和控制提供科学有效的参考依据。

1 仪器与试药

1.1 仪器 Agilent 1100 series 高效液相色谱仪（美国 Agilent 公司）；电子天平（德国赛多利斯公司）；超声波清洗器（昆山禾创超声仪器有限公司）。
1.2 试药 黄芩苷（批号 110715-200212）、芍药苷（批号 110736-201438）、丹酚酸 B（批号 115939-25-8）、橙皮苷（批号 110721-200512）对照品均购自中国食品药品检定研究院。清肺愈痤丸（6 g/袋）由南方医科大学中西医结合医院研发，广州市康源药业有限公司生产，批号 121201（S1）、130113（S2）、130320（S3）、130501（S4）、130703（S5）、130922（S6）、131002（S7）、131101（S8）、140212（S9）、140602（S10）。甲醇为色谱纯和分析纯；乙腈为色谱纯；磷酸为分析纯；水为重蒸馏水。

2 指纹图谱建立

2.1 色谱条件 Agilent HC-C₁₈ 色谱柱（4.6 mm × 250 mm，5 μm）；柱温 35 ℃；流动相乙腈-0.4% 磷酸，梯度洗脱（程序见表 1）；体积流量 0.8 mL/min；检测波长 230 nm；分析时间 90 min；进样量 10 μL。

表 1 梯度洗脱程序

Tab. 1 Gradient elution programs

时间/min	乙腈/%	0.4% 磷酸/%
0	5	95
40	20	80
50	24	76
60	30	70
70	35	65
85	5	95

2.2 供试品溶液制备 将清肺愈痤丸研细，精密称取 5.50 g，置于具塞锥形瓶中，精密加入 25 mL 甲醇，称定质量，超声（100 W、40 kHz）40 min，放冷，甲醇补足减失的质量，摇匀，0.45 μm 微孔滤膜过滤，取续滤液，即得。
2.3 对照品溶液制备 精密称取各对照品适量，甲醇配制成含芍药苷 0.21 mg/mL、橙皮苷

0.18 mg/mL、黄芩苷 0.50 mg/mL、丹酚酸 B 0.15 mg/mL 的对照品贮备液。精密量取各 1.0 mL，置于同一 10 mL 量瓶中，混匀，用甲醇定容，即得含芍药苷 0.021 mg/mL、橙皮苷 0.018 mg/mL、黄芩苷 0.050 mg/mL、丹酚酸 B 0.015 mg/mL 的混合对照品溶液。

2.4 方法学考察

2.4.1 稳定性试验 将供试品（批号 140602）溶液于 0、2.5、5、10、24 h 进样，以 2 号峰为校正峰，测得共有峰相对保留时间 RSD 小于 1.3%，相对峰面积 RSD 小于 2.4%，表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。
2.4.2 精密度试验 将供试品（批号 140602）溶液连续进样 5 次，以 2 号峰为校正峰，测得共有峰相对保留时间 RSD 小于 1%，相对峰面积 RSD 小于 2.3%，表明仪器精密度良好。
2.4.3 重复性试验 将供试品（批号 140602）溶液连续进样 5 次，以 2 号峰为校正峰，测得共有峰相对保留时间 RSD 小于 1.5%，相对峰面积 RSD 小于 2.6%，表明该方法重复性良好。
2.5 HPLC 分析 将 10 批样品按“2.2”项下方法制成供试品溶液，在“2.1”项色谱条件下分析。结果，发现有 11 个共有峰，再通过与对照品色谱峰比较，确定 2 号峰为芍药苷，5 号峰为橙皮苷，7 号峰为黄芩苷，8 号峰为丹酚酸 B。具体见图 1。

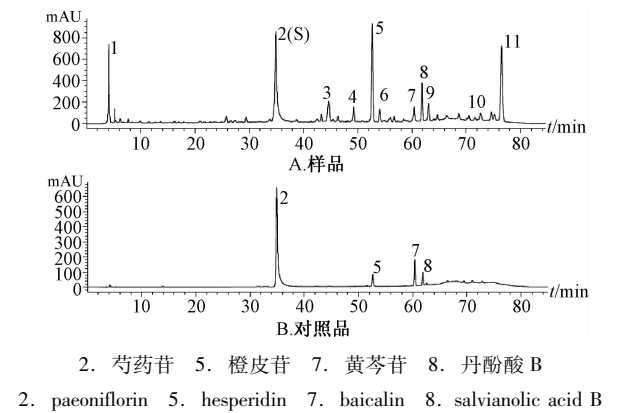


图 1 HPLC 色谱图
Fig. 1 HPLC chromatograms

2.6 HPLC 指纹图谱建立

2.6.1 共有峰标定 对 10 批样品指纹图谱进行比较分析，共标定出 11 个共有峰，以 2 号峰（芍药苷）为参照峰（S），计算各色谱峰的相对保留时间与相对峰面积，结果见表 2。

表 2 共有峰的相对保留时间和相对峰面积

Tab. 2 Relative retention time and relative peak areas of common peaks

峰号	相对保留时间		相对峰面积	
	平均值	RSD/%	平均值	RSD/%
1	0.117	0.270	0.250	3.289
2	1	0	1	0
3	1.279	0.066	0.232	14.224
4	1.410	0.089	0.095	3.713
5	1.509	0.109	0.603	1.883
6	1.566	1.673	0.080	9.559
7	1.732	0.133	0.092	8.653
8	1.773	0.151	0.210	6.333
9	1.808	0.128	0.120	3.524
10	2.080	0.512	0.080	15.394
11	2.196	0.165	0.711	3.125

2.6.2 相似度分析 将所得指纹图谱导入“中药

色谱指纹图谱相似度评价系统（2004 A 版）”，以 S1 批样品为参照图谱，多点校正后自动匹配，生成对照图谱（R），见图 2，再计算各样品指纹图谱与所生成对照品图谱的相似性系数，见表 3。由表可知，10 批样品相似度在 0.9 以上，表明该指纹图谱具有代表性。

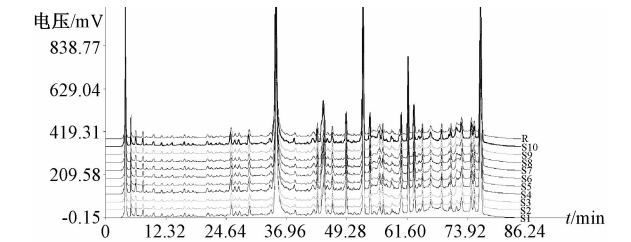


图 2 10 批样品的 HPLC 指纹图谱

Fig. 2 HPLC fingerprints of ten batches of samples

表 3 10 批样品的相似度

Tab. 3 Similarities of ten batches of samples

样品	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	R
S1	1.000										
S2	0.997	1.000									
S3	0.992	0.99	1.000								
S4	0.962	0.958	0.965	1.000							
S5	0.995	0.992	0.997	0.968	1.000						
S6	0.994	0.991	0.998	0.968	0.998	1.000					
S7	0.995	0.993	0.998	0.968	0.999	0.998	1.000				
S8	0.996	0.993	0.997	0.962	0.997	0.998	0.997	1.000			
S9	0.994	0.991	0.997	0.967	0.999	0.998	0.999	0.997	1.000		
S10	0.962	0.959	0.966	0.998	0.971	0.969	0.97	0.963	0.97	1.000	
R	0.995	0.992	0.996	0.98	0.998	0.997	0.998	0.996	0.997	0.982	1.000

3 含有量测定

3.1 色谱条件 同“2.1”项。

3.2 供试品溶液制备 同“2.2”项。

3.3 对照品溶液制备 同“2.3”项。

3.4 标准曲线绘制 精密吸取对照品溶液 4、6、8、10、12 μL ，以峰面积为纵坐标（Y），溶液质量浓度为横坐标（X）进行线性回归，得到芍药苷、橙皮苷、黄芩苷、丹酚酸 B 回归方程分别为 $Y = 524.24X + 11.886 (r = 0.9995)$ 、 $Y = 331.15X + 7.8115 (r = 0.9992)$ 、 $Y = 18.256X + 1.1964 (r = 0.9993)$ 、 $Y = 123.86X + 2.9386 (r = 0.9994)$ ，表明芍药苷在 0.08 ~ 0.25 μg 、橙皮苷在 0.07 ~ 0.22 μg 、黄芩苷在 0.2 ~ 0.60 μg 、丹酚酸 B 在 0.06 ~ 0.18 μg 范围内线性关系良好。

3.5 方法学考察

3.5.1 稳定性试验 精密吸取同一供试品溶液 10 μL ，于 0、2、4、8、12、24 h 测定，测得芍药

苷、橙皮苷、黄芩苷、丹酚酸 B 峰面积 RSD 分别为 1.4%、1.8%、0.6%、0.9%，表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

3.5.2 精密度试验 精密吸取同一混合对照品溶液 10 μL ，进样 6 次，测得芍药苷、橙皮苷、黄芩苷、丹酚酸 B 峰面积 RSD 分别为 0.6%、1.4%、1.5%、0.9%，表明仪器精密度良好。

3.5.3 重复性试验 取同一样品（批号 121201），按“2.2”项下方法平行制备 6 份供试品溶液，在“2.1”项色谱条件下测定，测得芍药苷、橙皮苷、黄芩苷、丹酚酸 B 含有量 RSD 分别为 0.7%、1.1%、1.6%、1.8%，表明该方法重复性良好。

3.5.4 加样回收率试验 精密称取含有量已知的样品（芍药苷 0.033 3 mg/g、橙皮苷 0.215 8 mg/g、黄芩苷 0.052 1 mg/g、丹酚酸 B 0.068 8 mg/g）2.75 g，加入“2.3”项下对照品贮备液（芍药苷 0.5 mL、橙皮苷 3.0 mL、黄芩苷 0.5 mL、丹酚酸

B 1.0 mL), 按“2.2”项下方法制备供试品溶液 6 份, 在“2.1”项色谱条件下测定, 计算回收率, 结果见表 4。

表 4 加样回收率试验结果 (n=6)

Tab. 4 Results of recovery tests (n=6)

成分	原有量/ mg	加入量/ mg	测得量/ mg	回收率/ %	平均回收 率/%	RSD/ %
芍药苷	0.091 6	0.105 0	0.195 6	99.5	98.7	0.98
	0.091 2	0.105 0	0.193 1	98.4		
	0.092 6	0.105 0	0.193 8	98.1		
	0.091 9	0.105 0	0.195 7	99.4		
	0.091 2	0.105 0	0.190 7	97.2		
橙皮苷	0.091 6	0.105 0	0.195 8	99.6	96.9	1.09
	0.593 5	0.540 0	1.085 8	95.8		
	0.591 3	0.540 0	1.110 9	98.2		
	0.599 9	0.540 0	1.090 9	95.7		
	0.595 6	0.540 0	1.112 9	98.0		
黄芩苷	0.591 3	0.540 0	1.098 5	97.1	97.4	0.82
	0.593 5	0.540 0	1.099 4	97.0		
	0.143 3	0.250 0	0.383 4	97.5		
	0.142 8	0.250 0	0.386 5	98.4		
	0.144 8	0.250 0	0.381 8	96.7		
丹酚酸 B	0.143 8	0.250 0	0.382 4	97.1	98.2	1.66
	0.142 8	0.250 0	0.386 1	98.3		
	0.143 3	0.250 0	0.379 5	96.5		
	0.189 2	0.150 0	0.343 9	101.4		
	0.188 5	0.150 0	0.332 1	98.1		
	0.191 3	0.150 0	0.333 8	97.8		
	0.189 9	0.150 0	0.331 1	97.4		
	0.188 5	0.150 0	0.328 7	97.1		
	0.189 2	0.150 0	0.329 7	97.2		

3.6 样品含有量测定 取 10 批样品, 按“2.2”项下方法制备供试品溶液, 在“2.1”项色谱条件下测定, 结果见表 5。

表 5 含有量测定结果 (mg/g, n=10)

Tab. 5 Results of content determination (mg/g, n=10)

批号	芍药苷/ (mg·g ⁻¹)	橙皮苷/ (mg·g ⁻¹)	黄芩苷/ (mg·g ⁻¹)	丹酚酸 B/ (mg·g ⁻¹)
121201	0.033 3	0.215 8	0.052 1	0.068 8
130113	0.034 2	0.219 0	0.051 7	0.070 9
130320	0.031 9	0.208 7	0.051 4	0.062 5
130501	0.032 1	0.205 8	0.040 6	0.075 3
130703	0.032 7	0.203 8	0.051 3	0.078 1
130922	0.031 5	0.207 8	0.051 7	0.072 1
131002	0.031 9	0.208 4	0.051 8	0.071 1
131101	0.031 8	0.200 1	0.048 8	0.069 0
140212	0.031 4	0.205 1	0.050 1	0.068 5
140602	0.031 2	0.205 4	0.040 5	0.072 7

4 讨论与结论

参考文献 [4-10], 本实验考察了甲醇-磷酸和

乙腈-磷酸体系, 最终确定以乙腈-0.4% 磷酸为流动相梯度洗脱, 90 min 内样品组分可洗脱完全, 4 种成分的分离度和峰型都比较理想; 比较了 Agilent HC-C₁₈和 Agilent TC-C₁₈色谱柱, 发现前者色谱峰峰型理想; 研究了 230、250、280、300、320 nm波长, 发现 230 nm 波长下扫描效果理想; 测试了 20、25、30、35、40 ℃柱温, 发现 35 ℃柱温下分离效果良好, 峰型稳定。

然后, 建立了 10 批清肺愈痙丸 HPLC 指纹图谱, 标定 11 个共有峰, 并测定 2 号峰芍药苷、5 号峰橙皮苷、7 号峰黄芩苷、8 号峰丹酚酸 B 的含有量。结果, 各批次样品均具有所标示的共有峰, 表明该指纹图谱可行性较高; 相似度在 0.95 以上, 显示该制剂质量稳定。由此可知, 利用指纹图谱结合特征成分进行质量控制和评价是可行的, 比单纯测定某成分含有量更能全面地反映制剂整体质量。综上所述, 该方法方便可靠, 可为清肺愈痙丸的质量控制和进一步开发提供参考依据。

参考文献:

[1] 赖梅生, 吕志平, 杨 柳, 等. 清肺愈痙方合复方颠倒散治疗痤疮 150 例疗效观察[J]. 新中医, 2012, 44(10): 47-49.

[2] 杨 柳, 钱 江, 庞卿强, 等. 清肺愈痙丸治疗湿热蕴结型痤疮临床研究[J]. 四川中医, 2005, 2(23): 71-72.

[3] 梁少梅, 陈兴兴, 任 青, 等. 清肺愈痙丸质量标准研究[J]. 按摩与康复医学, 2015, 6(6): 69-71.

[4] 何建雄, 赖小平, 魏 刚, 等. HPLC 测定银翘柴桂汤中绿原酸、芍药苷、黄芩苷[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(6): 48-50.

[5] 张琳琳, 祁 峰, 卞海林. HPLC 法测定通气剂中芍药苷和橙皮苷的含量[J]. 现代中西医结合杂志, 2012, 21(36): 4092-4093.

[6] 李 想, 卢静华. HPLC 法同时测定加味香连丸中芍药苷、柚皮苷、橙皮苷和黄芩苷[J]. 中成药, 2015, 37(9): 1955-1958.

[7] 李中娥. HPLC 法同时测定尿塞通片中 4 个有效成分的含量[J]. 中国药师, 2015, 18(11): 1992-1994.

[8] 雷定超, 鄂秀辉, 张兰兰, 等. HPLC 同时测定糖敏灵丸中 5 种成分的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(13): 70-73.

[9] 张 囡, 钱宇坤, 李维超. 病毒合剂(Ⅱ)中黄芩苷、绿原酸和橙皮苷的含量测定[J]. 天津药学, 2015, 27(3): 13-15.

[10] 张 娴, 徐英宏. 乳腺增生丸中 6 种有效成分含量测定[J]. 医学导报, 2013, 32(11): 1507-1509.