

UPLC-PDA 法同时测定复方五凤草液中 7 种成分

钱佳燕¹, 黄子慧^{2*}, 陈肯¹, 余洋², 朱思洵¹, 高璐珏¹, 高敏行¹

(1. 南京中医药大学, 江苏南京 210046; 2. 南京中医药大学附属南京市中西医结合医院, 江苏南京 210014)

摘要: 目的 建立 UPLC-PDA 法同时测定复方五凤草液(五凤草、白芨、猫爪草)中没食子酸、原儿茶酸、对羟基苯甲酸、咖啡酸、金丝桃苷、槲皮素、柚皮素的含量。方法 该药物 80% 甲醇提取液的分析采用 Waters BEH C₁₈ 色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.7 μm); 流动相乙腈-0.1% 甲酸, 梯度洗脱; 体积流量 0.3 mL/min; 柱温 40 °C; 检测波长 266 nm。结果 7 种成分在各自范围内线性关系良好($r \geq 0.999 5$), 平均加样回收率 96.96%~102.26%, RSD 0.65%~2.10%。结论 该方法稳定准确, 重复性好, 可用于复方五凤草液的质量控制。

关键词: 复方五凤草液; 化学成分; UPLC-PDA

中图分类号: R927.2

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2020)01-0037-04

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2020.01.009

Simultaneous determination of seven constituents in Compound Wufengcao Liquid by UPLC-PDA

QIAN Jia-yan¹, HUANG Zi-hui^{2*}, CHEN Ken¹, YU Yang², ZHU Si-xun¹, GAO Lu-jue¹, GAO Min-xing¹

(1. Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China; 2. Nanjing Municipal Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine Affiliated to Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210014, China)

ABSTRACT: AIM To establish a UPLC-PDA method for the simultaneous content determination of gallic acid, protocatechuic acid, p-hydroxybenzoic acid, caffeic acid, hyperoside, quercetin and naringenin in Compound Wufengcao Liquid [*Euphorbia helioscopia* L., *Bletilla striata* (Thunb.) Reichb. f., *Ranunculus ternatus* Thunb.].

METHODS The analysis of 80% methanol extract of this drug was performed on a 40 °C thermostatic Waters BEH C₁₈ column (2.1 mm×100 mm, 1.7 μm), with the mobile phase comprising of acetonitrile-0.1% formic acid flowing at 0.3 mL/min in a gradient elution manner, and the detection wavelength was set at 266 nm. **RESULTS**

Seven constituents showed good linear relationships within their own ranges ($r \geq 0.999 5$), whose average recoveries were 96.96%–102.26% with the RSDs of 0.65%–2.10%. **CONCLUSION** This stable, accurate and reproducible method can be used for the quality control of Compound Wufengcao Liquid.

KEY WORDS: Compound Wufengcao Liquid; chemical constituents; UPLC-PDA

肺外结核是指发生在肺部以外全身其他脏器的结核病^[1-3], 当结核分支杆菌^[4]经各种传播路径侵犯机体局部组织时, 可引起病灶周围软组织、皮下、皮肤坏死, 最终液化破溃而形成结核性溃疡创

面, 是世界上首要感染性疾病^[3], 约占肺外结核一半以上^[4-5]。有学者临床观察发现^[6], 由于溃疡周围血供破坏, 全身抗痨药物难以使局部组织中药物达到有效杀菌浓度, 导致整体疗效较差, 故急需

收稿日期: 2019-07-16

基金项目: 江苏省中医药局科技项目(YB2017042); 南京市卫健委青年人才项目(QRX17030); 南京市卫计委重点项目(ZKX16067, ZKX18048)

作者简介: 钱佳燕(1993—), 女, 硕士生, 从事中医外科研究。Tel: 15651666530, E-mail: 1027568052@qq.com

* 通信作者: 黄子慧(1973—), 女, 主任中医师, 从事中医外科研究。E-mail: candy73zihui@sina.com

能显著促进结核型创面愈合的外用药物。

南京市中西医结合医院瘰癧科基于结核性溃疡的病机特点,研制了复方五凤草液,方中五凤草^[7]又名泽漆,性味辛、苦、凉,具有行水杀虫、祛腐解毒之功效,其主要活性成分没食子酸、原儿茶酸、金丝桃苷、柚皮素等有抗菌、抗炎、抗氧化作用^[8-10],能抑制结核杆菌的生长;白芨^[11]性味苦、甘、凉,含有大量黏胶质,具有收敛止血、清热湿、消肿生肌之功效,其成分没食子酸、原儿茶酸、肉桂酸等具有抗耐药结核活性^[12-13],对人型结核杆菌有抑制作用,并能提高伤口巨噬细胞数量,对组织愈合有保护作用;猫爪草^[14]性味甘、辛、温,具有清热解毒、消肿散结之功效,其煎剂、生药粉末、醇提液在试管内对强毒人型结核菌(H37RV)均有不同程度的抑制作用,而且强于异烟肼,其所含对羟基苯甲酸、咖啡酸等具有抑制细菌、真菌和酶作用^[12-13],诸药共奏提脓祛腐、活血生肌之效,并取得了满意的疗效^[15-16]。

目前,对复方五凤草液中各成分含有量测定仍是空白。因此,本实验采用UPLC-PDA法同时测定复方五凤草液中没食子酸、原儿茶酸、对羟基苯甲酸、咖啡酸、金丝桃苷、槲皮素、柚皮素的含有量,可为进一步提高该制剂质量标准提供依据,同时也能促进治疗结核性溃疡外用药物的研发。

1 材料

1.1 仪器 Waters Acquity™ UPLC系统[配置四元泵溶剂系统、在线脱气机、自动进样器、Mass Lynx 4.1 质谱工作站软件,沃特世科技(上海)有限公司]; Milli-Q 超纯水系统[Millipore 实验室设备(上海)有限公司]; MX-S 型旋涡混匀器(美国 Scilogex 公司); 台式高速冷冻离心机(美国 Sigma 公司); BSA2202S 型天平[十万分之一,赛多利斯科学仪器(北京)有限公司]; KH-500D 型超声波清洗器(昆山禾创超声仪器有限公司)。

1.2 试剂与药物 6 批复方五凤草液(院协编号 20181026, R1~R6) 购自南京市中西医结合医院药房,五凤草、猫爪草、白芨按 25:3:5 比例配伍,加水浸没过药面煎煮 3 次,每次 1 h,合并煎液,滤过,滤液浓缩,分装,即得(生药量 1.76 g/mL)。没食子酸(Y19M8C36143)、对羟基苯甲酸(MKBK3 576 V) 对照品购自上海源叶生物科技有限公司;原儿茶酸(MUST-17022102)、咖啡酸(MUST-16060613)、金丝桃苷(MUST-17101605)、槲皮素(MUST-17101104)、柚皮素

(MUST-17030406) 对照品购自成都曼斯特生物科技有限公司。甲醇、乙腈、甲酸均为色谱纯(上海安谱实验科技股份有限公司);水为超纯水(Milli-Q 纯水机制备)。

2 方法及结果

2.1 色谱条件 Waters BEH C₁₈ 色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.7 μm); 流动相乙腈(A)-0.1% 甲酸(B), 梯度洗脱(0~3 min, 6% A; 3~7 min, 6%~25% A; 7~13 min, 25%~50% A); 体积流量 0.3 mL/min; 柱温 40 ℃; 样品盘温度 10 ℃; 二极管阵列检测器, 检测波长 266 nm; 进样量 2 μL。

2.2 对照品溶液制备 精密称取适量没食子酸、原儿茶酸、对羟基苯甲酸、咖啡酸、金丝桃苷、槲皮素、柚皮素对照品于 5 mL 量瓶中, 甲醇分别溶解定容至 8.490、1.082、1.286、0.956、0.988、0.978、1.010 g/L, 吸取适量, 甲醇稀释成每 1 mL 分别含 602.08、60.59、13.18、95.60、167.96、13.69、10.48 μg 上述成分, 即得。

2.3 供试品溶液制备 取 0.5 mL 本品于 10 mL 量瓶中, 80% 甲醇稀释定容, 超声(40 Hz) 提取 30 min, 涡旋 5 min 后 13 000 r/min 离心 10 min, 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 即得。

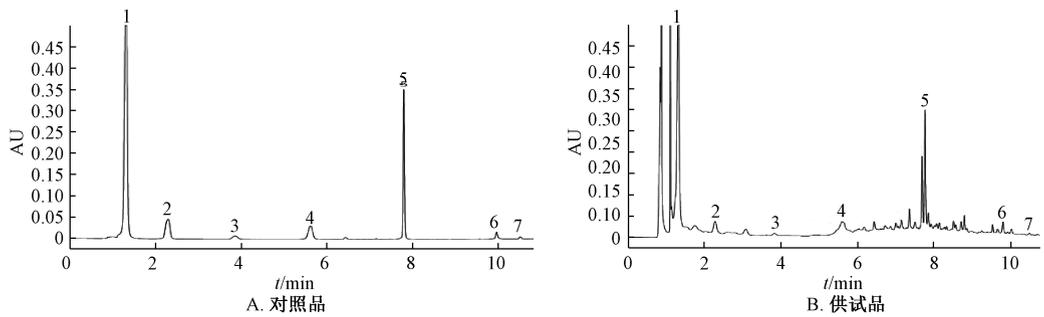
2.4 方法学考察

2.4.1 专属性考察 吸取“2.1”项下对照品、供试品溶液各 2 μL, 在“2.1”项色谱条件下进样测定, 结果见图 1。由此可知, 各成分峰形良好, 无干扰现象, 表明该方法专属性良好。

2.4.2 线性关系考察 精密吸取“2.2”项下对照品溶液, 按甲醇与混标 1:1 比例梯度稀释 7 次, 每次稀释后均涡旋混匀 3 min, 在“2.1”项色谱条件下进样测定。以溶液质量浓度为横坐标(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。

2.4.3 精密度试验 精密吸取中间质量浓度对照品溶液适量, 在“2.1”项色谱条件下进样测定 6 次, 测得没食子酸、原儿茶酸、对羟基苯甲酸、咖啡酸、金丝桃苷、槲皮素、柚皮素峰面积 RSD 分别为 1.00%、0.77%、0.45%、0.31%、0.49%、0.74%、0.41%, 表明仪器精密度良好。

2.4.4 稳定性试验 取同一供试品溶液适量, 于 0、2、4、8、16、24 h 在“2.1”项色谱条件下进样测定, 测得没食子酸、原儿茶酸、对羟基苯甲酸、咖啡酸、金丝桃苷、槲皮素、柚皮素峰面积 RSD 分别为 0.45%、0.29%、1.10%、3.74%、



1. 没食子酸 2. 原儿茶酸 3. 对羟基苯甲酸 4. 咖啡酸 5. 金丝桃苷 6. 槲皮素 7. 柚皮素
1. gallic acid 2. protocatechuic acid 3. *p*-hydroxybenzoic acid 4. caffeic acid 5. hyperoside 6. quercetin 7. naringenin

图1 各成分UPLC色谱图

Fig. 1 UPLC chromatograms of various constituents

表1 各成分线性关系

Tab. 1 Linear relationships of various constituents

成分	回归方程	<i>r</i>	线性范围/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
没食子酸	$Y=307.93X+1043.2$	0.999 9	9.41~602.08
原儿茶酸	$Y=402.51X+209.37$	0.999 7	0.95~60.59
对羟基苯甲酸	$Y=643.26X+152.15$	0.999 6	0.48~30.86
咖啡酸	$Y=483.33X+136.7$	0.999 6	1.49~95.60
金丝桃苷	$Y=311.56X+675.21$	0.999 5	2.62~167.96
槲皮素	$Y=372.19X+27.279$	0.999 8	0.21~13.69
柚皮素	$Y=378.64X+42.128$	0.999 8	0.52~33.54

0.25%、0.93%、0.59%，表明溶液在24 h内稳定性良好。

2.4.5 重复性试验 取同一批供试品溶液(R3)6份，按“2.3”项下方法制备供试品溶液，在“2.1”项色谱条件下进样测定，测得没食子酸、原儿茶酸、对羟基苯甲酸、咖啡酸、金丝桃苷、槲皮素、柚皮素峰面积RSD分别为0.97%、2.74%、2.80%、4.20%、1.94%、1.53%、0.50%，表明该方法重复性良好。

2.4.6 加样回收率试验 取供试品溶液(R3)6份，每份0.5 mL，加入0.5 mL对照品溶液，按

“2.3”项下方法制备供试品溶液，涡旋3 min 混匀，在“2.1”项色谱条件下进样测定，计算回收率。结果，没食子酸、原儿茶酸、对羟基苯甲酸、咖啡酸、金丝桃苷、槲皮素、柚皮素平均加样回收率分别为99.30%、99.90%、99.78%、99.99%、99.86%、102.27%、96.96%。RSD分别为1.04%、1.13%、0.72%、1.36%、0.65%、2.10%、1.16%。

2.5 样品含有量测定 取本品6份，按“2.3”项下方法制备供试品溶液，在“2.1”项色谱条件下进样测定，计算含有量，结果见表2。

表2 各成分含有量测定结果

Tab. 2 Results of content determination of various constituents

编号	含有量/($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)						
	没食子酸	原儿茶酸	对羟基苯甲酸	咖啡酸	金丝桃苷	槲皮素	柚皮素
R1	1.296 2	0.072 9	0.010 1	0.118 1	0.177 8	0.019 0	0.007 0
R2	1.320 0	0.071 0	0.009 9	0.139 1	0.177 0	0.019 5	0.007 5
R3	1.286 3	0.072 4	0.009 7	0.124 6	0.176 7	0.019 1	0.007 1
R4	1.289 0	0.072 5	0.010 8	0.125 3	0.177 5	0.019 1	0.007 1
R5	1.345 2	0.075 3	0.010 6	0.152 4	0.185 0	0.020 2	0.007 6
R6	1.323 2	0.071 1	0.010 0	0.139 4	0.177 1	0.019 6	0.007 5

3 讨论

3.1 提取溶剂筛选 本实验考察了溶剂水、50%甲醇、80%甲醇、甲醇的提取效果,发现水、甲醇提取时供试品溶解度相对较低,各成分出峰效果不理想,而50%、80%甲醇均能提取出各成分。综合考虑各成分峰面积,最终确定80%甲醇作为提取溶剂。

3.2 色谱条件筛选 本实验采用二极管阵列检测器对检测波长进行考察,发现对羟基苯甲酸吸收光谱较窄,仅有1个最大吸收波长254 nm;咖啡酸最大吸收波长在324 nm处,在统一波长下观察时其峰形较差,故各成分峰面积均为其最大吸收波长下的数值。然后,考察了流动相乙腈-水、甲醇-水、乙腈-0.1%甲酸对色谱峰的影响,发现乙腈-0.1%甲酸洗脱时各成分分离度、峰形在短时间内最佳,响应值最高,故选择其作为流动相。

4 结论

2015年版《中国药典》仅记载了复方五凤草液中白及、猫爪草的TLC定性鉴别方法,未涉及泽漆和成分定量检测^[17]。本实验首次建立快速方便的UPLC-PDA法同时测定复方五凤草液中没食子酸、原儿茶酸、对羟基苯甲酸、咖啡酸、金丝桃苷、槲皮素、柚皮素的含量,为该制剂质量控制提供了依据,也为后期研究促进结核性溃疡创面愈合有效成分的作用机制及开发相关新药奠定了基础。

参考文献:

[1] Dye C, Scheele S, Dolin P, *et al.* Consensus statement. Global burden of tuberculosis: estimated incidence, prevalence, and mortality by country. WHO Global Surveillance and Monitoring Project[J]. *J Am Med Assoc*, 1999, 282(7): 677-686.

[2] Fry D E. Extra-pulmonary tuberculosis and its surgical treatment [J]. *Surg Infect (Larchmt)*, 2016, 17(4): 394-401.

[3] Churchyard G J, Fielding K L, Lewis J J, *et al.* A trial of mass

isoniazid preventive therapy for tuberculosis control [J]. *New Engl J Med*, 2014, 370(4): 301-310.

[4] 贾赤宇. 结核性创面——一个被忽视且值得重视的临床问题[J]. *中华损伤与修复杂志 (电子版)*, 2014, 9(4): 355-359.

[5] Sharawat I K, Dawman L. Scrofula [J]. *J Pediatr*, 2017, 189: 236.

[6] 吕晓武, 张亚洁, 贾赤宇, 等. 胸壁结核性创面不同治疗方法的认识和评析[J]. *医学与哲学 (B)*, 2015, 36(5): 67-69; 97.

[7] 赵杰, 吴繁荣, 韩续, 等. 泽漆化学成分研究[J]. *安徽医科大学学报*, 2016, 51(3): 383-388.

[8] Shen S, Wang J B, Chen X, *et al.* Evaluation of cellular antioxidant components of honeys using UPLC-MS/MS and HPLC-FLD based on the quantitative composition-activity relationship [J]. *Food Chem*, 2019, 293: 169-177.

[9] 周孟, 李芮, 邓连力, 等. 多波长HPLC法同时测定黔产泽漆中3个有效成分的含量[J]. *中国药房*, 2018, 29(21): 2958-2961.

[10] Liu F, Zhao Y H, Lu J M, *et al.* Hyperoside inhibits proinflammatory cytokines in human lung epithelial cells infected with *Mycoplasma pneumoniae*[J]. *Mol Cell Biochem*, 2018, 453(1-2): 179-186.

[11] 万大群, 赵仁全, 刘海, 等. 白及的成分、药理作用和临床应用研究进展[J]. *中国药业*, 2017, 26(2): 93-96.

[12] Maresca A, Vullo D, Scozzafava A, *et al.* Inhibition of the β -class carbonic anhydrases from *Mycobacterium tuberculosis* with carboxylic acids[J]. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 2013, 28(2): 392-396.

[13] 唐天弼, 王建萍, 武栋, 等. 咖啡酸治疗抗结核药物所致白细胞和血小板下降临床观察[J]. *宁夏医科大学学报*, 2017, 39(1): 78-80.

[14] 熊英, 陈虹, 邓敏芝, 等. 猫爪草化学成分及抗耐药结核活性研究[J]. *中药材*, 2016, 39(4): 775-777.

[15] 黄子慧, 洪练青, 张国英, 等. 复方五凤草液对结核性溃疡的临床研究[J]. *陕西中医*, 2018, 39(9): 1257-1259.

[16] 黄子慧. 五凤草液外用治结核性窦道83例[J]. *江西中医药*, 2008, 39(5): 38-39.

[17] 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.