

引用本文:徐斌,梁朝锋,韩晓珂.妇科九味洗剂高效液相色谱法特征指纹图谱及成分定量研究[J].安徽医药, 2023, 27(1): 88-91. DOI: 10.3969/j.issn.1009-6469.2023.01.019.



◇ 药物分析 ◇

妇科九味洗剂高效液相色谱法特征指纹图谱及成分定量研究

徐斌,梁朝锋,韩晓珂

作者单位:芜湖市中医医院制剂室,安徽 芜湖 241000

摘要: **目的** 建立妇科九味洗剂的高效液相色谱法(HPLC)特征指纹图谱及多指标成分测定方法。**方法** 该研究于2020年5—8月在芜湖市中医医院制剂室实验室中进行。采用HPLC法,色谱柱 Agilent Zorbax SB-C₁₈(4.6 mm×150 mm, 5 μm),流动相甲醇-0.4%甲酸不同比例梯度洗脱,波长 334 nm,柱温 30 °C;13批妇科九味洗剂样品的特征图谱运用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2012版)评价其相似度;同时测定咖啡酸、木犀草苷和蒙花苷的含量。**结果** 13批样品共标定16个共有峰,相似度均在0.91以上;通过对照品比对,识别出咖啡酸、木犀草苷和蒙花苷成分。3个成分分别在5.82~58.20 ng($r=0.999\ 5$)、9.44~94.40 ng($r=0.999\ 5$)、20.08~200.80 ng($r=0.999\ 6$)范围内呈现良好的线性关系。**结论** 所建立的方法简单,准确可靠,可用于妇科九味洗剂的质量控制。**关键词:** 主成分分析; 妇科九味洗剂; 指纹图谱; 咖啡酸; 木犀草苷; 蒙花苷; 色谱法,高压液相

The characteristic fingerprint of *Fuke Jiuwei* lotion and quantitative analysis of its components by HPLC

XU Bin, LIANG Chaofeng, HAN Xiaoke

Author Affiliation: Preparation Room, Wuhu Hospital of Traditional Chinese Medicine, Wuhu, Anhui 241000, China

Abstract: **Objective** To establish an HPLC characteristic fingerprint and multi-components determination of *Fuke Jiuwei* lotion. **Methods** The study was conducted in the Preparation Room of Wuhu Hospital of Traditional Chinese Medicine from May 2020 to August 2020. An HPLC method was adopted. The separation was performed on an Agilent ZORBAX SB-C₁₈ (4.6 mm×150 mm, 5 μm) with methanol-0.4% formic acid as the mobile phase with gradient elution. The detection wavelength was 334 nm, and the temperature was 30 °C. The characteristic fingerprints of 13 batches of *Fuke Jiuwei* lotion were determined, and the similarity was evaluated by the "Similarity Evaluation System of TCM Chromatographic Fingerprint" (2012 edition). Meanwhile, caffeic acid, luteolin and linarin were determined. **Results** Totally 16 common peaks were defined of the 13 batches of *Fuke Jiuwei* lotion, and the similarity of each batch was above 0.91. The components of caffeic acid, luteolin and linarin were identified by comparison with reference substances. These three constituents showed good linearity at 5.82~58.2 ng ($r=0.999\ 5$), 9.44~94.4 ng ($r=0.999\ 5$) and 20.08~200.8 ng ($r=0.999\ 6$). **Conclusion** The method was simple, accurate and reliable, which can be used for the quality control of *Fuke Jiuwei* lotion.

Key words: Principal component analysis; *Fuke Jiuwei* lotion; Fingerprint; Caffeic acid; Luteolin; Linarin; Chromatography, high pressure liquid

妇科九味洗剂(批准文号为皖药制字Z20050018)是由芜湖市中医医院妇科专家根据多年临床经验,联合本制剂中心制成的以清热解毒、杀虫灭菌为主要功效的纯中药制剂,其主要提取工艺为加水提取两次,合并浓缩而成,用于治疗细菌性、霉菌性、滴虫性阴道炎及宫颈炎等症,疗效确切,作用显著,在我院妇科应用广泛,作为我院产业化明星产品之一,带来了显著的社会效益和经济效益。药理研究表明,方中白鲜皮、蒲公英、紫花地丁、野菊花均具有清热解毒等功效^[1-4],而苦参、蛇床子、百部、地肤子、土荆皮均具有抗菌杀虫等功效^[5-9]。

目前本制剂的质量标准仅采用薄层色谱法对苦参和蛇床子进行定性鉴别,已无法适用现代中药

对质量控制的需求。而中药指纹图谱着眼于中药的物质基础,能够全面地反映制剂包含的化学信息,有效地控制产品质量^[10-12]。本研究于2020年5—8月,首次建立了妇科九味洗剂的HPLC特征图谱,并对其中咖啡酸、木犀草苷和蒙花苷的含量进行定量研究,通过相似度评价,为全面评价本制剂的质量提供了依据。

1 仪器与材料

仪器: Waters e2695 高效液相色谱仪,包括 2695 四元泵,2489 紫外检测器,美国 Waters 公司;XP205 型电子天平, Mettler Toledo 公司。

材料: 13批妇科九味洗剂样品由本院制剂室生产,批号为 200610(S1)、200606(S2)、200531(S3)、

200112 (S4)、191117 (S5)、191022 (S6)、191008 (S7)、191002 (S8)、190907 (S9)、190905 (S10)、190804 (S11)、190803 (S12)、190612 (S13)。相关饮片信息见表1。木犀草苷(批号 111720-201609), 咖啡酸(批号 110885-200102), 蒙花苷(批号 111528-201308), 以上对照品均购于中国食品药品检定研究院, 纯度均 $\geq 98\%$; 甲醇、乙腈为色谱纯; 其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱安捷伦 Zorbax-SB C₁₈ (150 mm×4.6 mm, 5 μm); 甲醇为流动相 A, 0.4% 甲酸为流动相 B, 波长 334 nm, 进样量 5 μL , 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$ ^[13]。按下表 2 进行梯度洗脱。

表 2 梯度洗脱程序表

时间	流动相 A/%	流动相 B/%	时间	流动相 A/%	流动相 B/%
0 min	12	88	45 min	45	55
15 min	20	80	55 min	70	30
17 min	27	73	60 min	90	10
30 min	35	65			

2.2 供试品溶液的制备 精密量取样品(S1-S13) 2 mL, 置 50 mL 量瓶中, 加入稀乙醇至刻度, 摇匀, 过微孔滤膜(0.45 μm), 取续滤液, 即可。

2.3 指纹图谱研究结果

2.3.1 精密度试验 取样品(S1) 供试液, 按“2.1”项下色谱条件注入液相色谱仪, 连续进样测定 6 次, 以 7 号色谱峰为参照, 计算 16 个共有峰的相对保留时间和相对峰面积, 结果各峰的相对保留时间 RSD 均 $\leq 0.11\%$, 相对峰面积的 RSD 均 $\leq 2.98\%$, 表示精密度良好, 符合 2020 年中国药典四部附录(通则 9101)关于液相色谱测定有关规定。

2.3.2 稳定性试验 取样品(S1) 供试液, 按“2.1”项下色谱条件注入液相色谱仪, 分别在 0、2、4、6、8、10、12 h 时间下进样, 以 7 号色谱峰为参照, 计算其余各色谱峰的相对保留时间和相对峰面积, 结果各峰的相对保留时间 RSD 均 $\leq 0.09\%$, 相对峰面积的

RSD 均 $\leq 2.99\%$, 说明样品溶液在 12 h 内保持稳定。符合 2020 年中国药典四部附录(通则 9101)关于液相色谱测定有关规定。

2.3.3 重复性试验 取样品(S1) 6 份供试液, 按“2.1”项下色谱条件注入液相色谱仪, 以 7 号色谱峰为参照, 计算其余各色谱峰的相对保留时间和相对峰面积, 结果各峰的相对保留时间 RSD 均 $\leq 2.88\%$, 相对峰面积的 RSD 均 $\leq 3.10\%$, 重复性良好。符合 2020 年中国药典四部附录(通则 9101)关于液相色谱测定有关规定。

2.3.4 特征指纹图谱结果与分析 取上述 13 批妇科九味洗剂供试液, 按照“2.1”色谱条件进样测定。打开“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2012 版), 将得到的各批样品色谱图数据输入后进行数据匹配, 设置 S1 为参照图谱, 运用中位数法, 时间宽度为 0.1, 经过多点校正、自动匹配后生成对照指纹图谱(R) 和 13 批制剂样品的叠加指纹图谱, 得到 16 个共有峰。采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2012 版) 进行分析, 计算 13 批制剂样品指纹图谱与对照指纹图谱的相似度。

13 批制剂样品号: S1、S2、S3、S4、S5、S6、S7、S8、S9、S10、S11、S12、S13 的相似度分别为 0.967、0.975、0.962、0.945、0.912、0.991、0.981、0.994、0.989、0.992、0.998、0.977、0.945; 均值为 0.971 ± 0.025 。相似度评价结果显示, 13 批制剂与对照图谱相似度均 > 0.91 , 相似度良好^[14-16]。

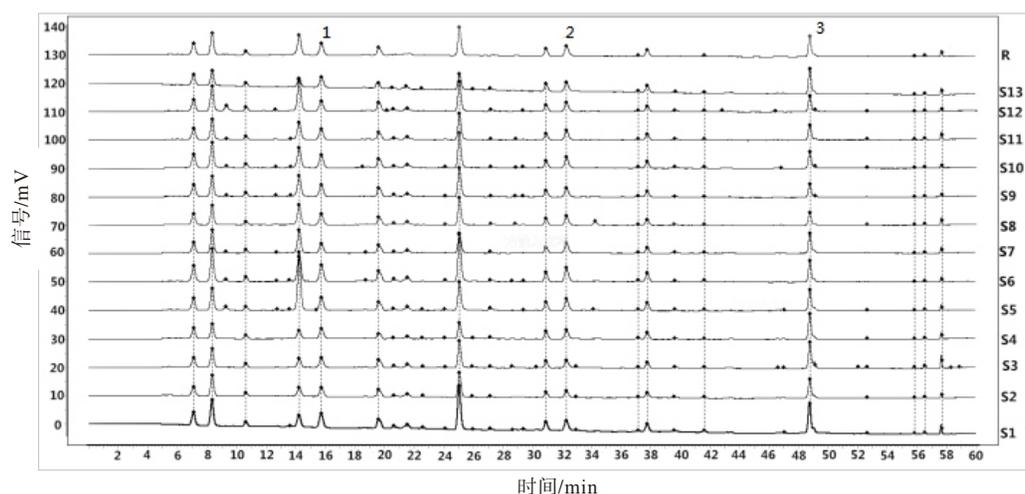
通过与对照品色谱图比对, 指出 3 个成分, 分别为 5 号峰咖啡酸, 9 号峰木犀草苷, 13 号峰蒙花苷。13 批样品特征指纹图谱见图 1。

2.4 3 种成分的含量测定

2.4.1 线性关系考察 精密称取咖啡酸、木犀草苷、蒙花苷对照品各 14.55、11.80、12.55 mg, 加甲醇制成浓度分别为 58.2、47.2、62.75 mg/L 的对照品母液, 分别从各个母液中精密量取 5、10、16 mL 置 50 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 即得各浓度分别为 5.82、

表 1 相关饮片信息

饮片名称	产地	批号	厂家
苦参	吉林	191101、190401	芜湖振龙齐欣药业有限公司
百部	湖北	047190101	杭州民泰(亳州)中药饮片有限公司
地肤子	河北	154190701、154171201	杭州民泰(亳州)中药饮片有限公司
野菊花	安徽	21912197、1803197	杭州民泰(亳州)中药饮片有限公司
土荆皮	安徽	190802、190303	安徽致良中药饮片有限公司
紫花地丁	河南	190801、190303	安徽致良中药饮片有限公司
蒲公英	安徽	190910、190303	亳州市善安堂中药饮片有限公司
白鲜皮	未知	190912、180806	亳州市善安堂中药饮片有限公司
蛇床子	安徽	1807001	安徽亳源药业饮片有限公司



注:1—咖啡酸;2—木犀草苷;3—蒙花苷。

图1 妇科九味洗剂13批样品HPLC特征指纹图谱

9.44、20.08 mg/L的混合对照品溶液。在“2.1”色谱条件下分别进样1、2、4、6、8、10 μL ,以进样量和峰面积作为横坐标(X)和纵坐标(Y),进行线性回归,见表3。

表3 妇科九味洗剂各成分定量的线性关系试验结果

成分	回归方程	r 值	线性范围/ng
咖啡酸	$Y=2\ 401.4X+1\ 676.2$	0.999 5	5.82 ~ 58.20
木犀草苷	$Y=2\ 219.1X-2\ 685.5$	0.999 5	9.44 ~ 94.40
蒙花苷	$Y=1\ 908.4X+2\ 850.3$	0.999 6	20.08 ~ 200.8

2.4.2 精密度试验 取样品(S1)供试品溶液,注入液相色谱仪,进样量5 μL ,连续测定6次,得到咖啡酸峰面积(RSD=0.90%)、木犀草苷峰面积(RSD=2.06%)、蒙花苷峰面积(RSD=0.98%),表示精密度良好。

2.4.3 稳定性试验 取样品(S1)供试品溶液,注入液相色谱仪,进样量5 μL ,分别在0、2、4、6、12、24 h时间下进样分析,测得咖啡酸峰面积(RSD=1.41%)、木犀草苷峰面积(RSD=0.80%)、蒙花苷峰面积(RSD=0.70%),符合2020年中国药典四部附录(通则9101)关于液相色谱测定有关规定。提示在24 h内,供试品溶液稳定。

2.4.4 重复性试验 取上述样品供试品6份,注入液相色谱仪,进样量5 μL ,测得咖啡酸、木犀草苷、蒙花苷的平均含量和RSD分别为0.164 6 g/L(RSD=1.79%)、0.132 3 g/L(RSD=2.07%)、0.340 5 g/L(RSD=1.59%),表明重复性良好。符合2020年中国药典四部附录(通则9101)关于液相色谱测定有关规定。

2.4.5 加样回收率试验 精密量取S1供试品溶液1 mL,共6份,置50 mL量瓶中,分别精密加入咖啡酸(58.2 mg/L)3.3 mL、木犀草苷(47.2 mg/L)2.8 mL、蒙花苷(62.75 mg/L)5.5 mL,加入稀乙醇至刻度,摇匀,过微孔滤膜(0.45 μm),取续滤液,即可。将得到

的供试液注入液相色谱仪,进样量5 μL 。结果各个成分平均加样回收率分别为100.8%、98.1%、100.4%,RSD分别为1.16%、1.81%、1.06%。符合2020年中国药典四部附录(通则9101)关于液相色谱测定有关规定。

2.4.6 含量测定 取13批妇科九味洗剂(S1-S13)各2 mL,按照“2.2”方法进行处理后,依据“2.1”色谱条件进行测定,混合对照品及样品色谱图见图2,表4。

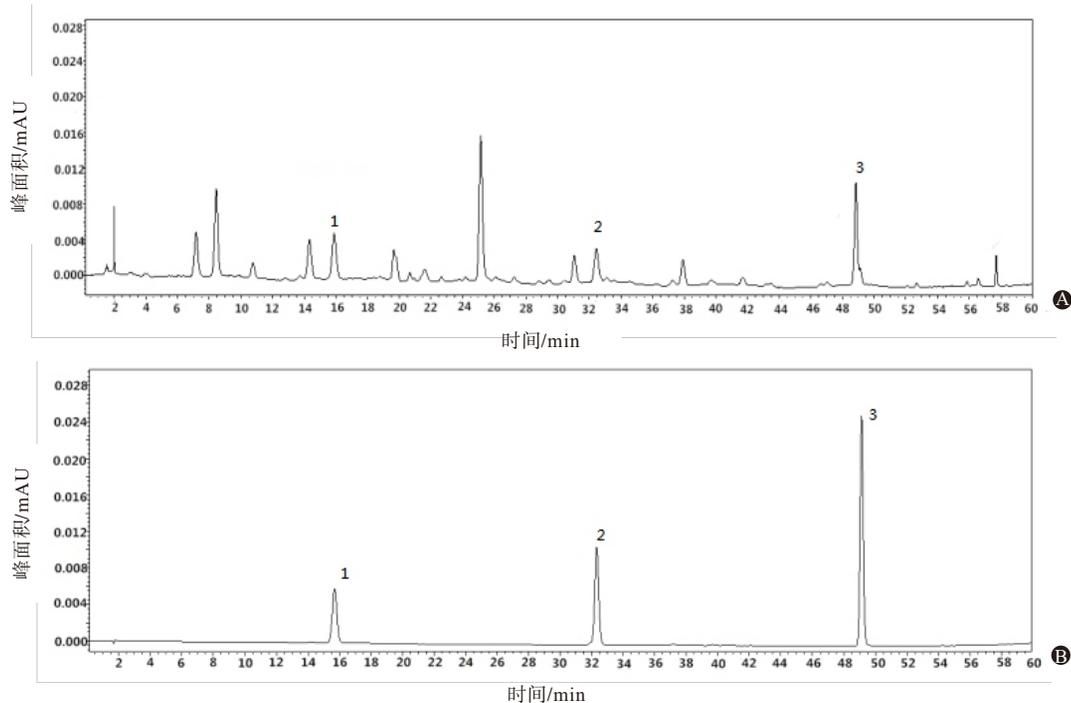
表4 妇科九味洗剂13批样品中3种成分含量测定结果/(g/L)

样品	咖啡酸	木犀草苷	蒙花苷	样品	咖啡酸	木犀草苷	蒙花苷
S1	0.16	0.14	0.33	S8	0.11	0.11	0.31
S2	0.10	0.09	0.23	S9	0.13	0.12	0.17
S3	0.11	0.10	0.30	S10	0.14	0.12	0.17
S4	0.11	0.12	0.31	S11	0.15	0.15	0.21
S5	0.15	0.16	0.25	S12	0.12	0.13	0.19
S6	0.19	0.20	0.27	S13	0.11	0.12	0.20
S7	0.10	0.13	0.24				

3 讨论

3.1 流动相及波长的确定 研究考察了甲醇-0.1%磷酸、甲醇-0.2%甲酸、甲醇-0.4%甲酸、乙腈-0.2%甲酸系统对特征图谱的分离情况,通过分析各个系统对整个色谱峰的分离效果及特征峰信息量,最终确定甲醇-0.4%甲酸作为流动相。通过全波长扫描,重点对波长230、250、270、300、334、350 nm下的特征指纹图谱进行了考察,发现在334 nm下,特征图谱的信息量较大,特征峰的响应值较高,基线平稳度较好。

3.2 共有峰的确认及来源 妇科九味洗剂HPLC特征指纹图谱共标定出共有峰16个,通过对照品比对,识别出咖啡酸、木犀草苷和蒙花苷成分,查阅相关文献可知,蒙花苷为野菊花特有成分,咖啡酸和木犀草苷在野菊花和蒲公英中均存在^[17-19]。



注:1—咖啡酸;2—木犀草苷;3—蒙花苷。

图2 妇科九味洗剂样品及混合对照品 HPLC 色谱图:A为样品;B为混合对照品

3.3 批间差异性分析 13批样品生产中部分饮片来自于不同批次,故3个成分的含量存在一定的差异,但13批样品相似度均>0.91,说明批间差异性较小,各个批次相似度较好,表明该生产工艺具有较好的稳定性和较高的成分保留率。

本研究首次建立了妇科九味洗剂 HPLC 特征指纹图谱及咖啡酸、木犀草苷和蒙花苷三种成分含量测定,方法简便快捷,实用性强,为有效地控制本制剂的质量提供了科学的方法。后续研究将建立更多的成分测定,以期能更全方位控制制剂的质量。

参考文献

- [1] 周晓鹰,陈洁,金柳,等.白鲜皮的药理作用及抗炎活性成分研究进展[J].常州大学学报(自然科学版),2018,30(1):82-86.
- [2] 姜醒,赵敏,高晓波,等.蒲公英中桉叶烷型倍半萜类化学成分研究[J].中南药学,2016,14(12):1293-1297.
- [3] 李永生,何希瑞,杨燕,等.紫花地丁化学成分与药理活性研究新进展[J].环球中医药,2013,6(4):313-318.
- [4] 宋颜君,许利嘉,缪剑华,等.野菊花的研究进展[J].中国现代中药,2020,22(10):1752-1756,1762.
- [5] 王悦,姜雪,丁菲,等.中药苦参药理作用及应用研究进展[J].山东化工,2017,46(15):66-67,69.
- [6] 田斌,瞿孝兰,林义平,等.蛇床子化学成分及药理作用研究进展[J].中药与临床,2020,11(1):70-73,80.
- [7] 樊兰兰,陆丽妃,王孝勋,等.百部药理作用与临床应用研究进

展[J].中国民族民间医药,2017,26(8):55-59.

- [8] 张艳华,汪荣斌,王存琴,等.中药地肤的研究进展[J].现代中药研究与实践,2016,30(1):84-86.
- [9] 李晓翠,苗爱东,张洪峰,等.土荆皮的研究进展[J].现代中西医结合杂志,2014,23(29):3301-3304.
- [10] 赵娟,谢世静,赵兴华,等.中药指纹图谱质控方法研究进展[J].云南中医中药杂志,2020,41(1):82-86.
- [11] 万佳丽,明凯利,向阳,等.小儿金青颗粒 HPLC 指纹图谱研究[J].中国药师,2020,23(8):1525-1530.
- [12] 任莹,王虎,韩双.金英消食口服液的 HPLC 指纹图谱与含量测定研究[J].中国民族民间医药,2020,29(10):51-56.
- [13] 梁梓敏,覃洁萍,郭海姣.二丁颗粒 HPLC 指纹图谱建立及5种成分测定[J].中成药,2019,41(11):2591-2596.
- [14] 覃鸿恩,漆立军,徐元翠,等.银杏活脑胶囊高效液相色谱指纹图谱研究[J].医药导报,2020,39(8):1129-1133.
- [15] 宋新华,陈旭娇,邓冯沂,等.肾衰宁颗粒指纹图谱研究及3种有效成分含量测定[J].药学实践杂志,2020,38(3):259-263.
- [16] 赵荣,肖会敏,何悦,等.调经益母片的高效液相色谱指纹图谱及成分定量研究[J].安徽医药,2018,22(7):1263-1267.
- [17] 李盛建,王慧,吕磊,等.HPLC-DAD法同时测定蒲公英配方颗粒中6种成分的含量[J].中南药学,2019,17(10):1714-1717.
- [18] 武秀丽.RP-HPLC法同时测定野菊花中绿原酸、木犀草苷和蒙花苷的含量[J].临床研究,2019,27(5):1-4.
- [19] 张璐,戴群芳.野菊花中活性成分的含量测定[J].广东化工,2019,46(19):195-196,184.

(收稿日期:2021-01-05,修回日期:2021-03-26)