

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2022.06.018

妇安消疹洗液高效液相色谱指纹图谱研究*

黄良永¹, 刘佳丽², 杜士明^{1△}

(1. 湖北省十堰市太和医院·湖北医药学院附属医院·武当特色中药研究湖北省重点实验室, 湖北 十堰 442000;
2. 湖北医药学院药学院, 湖北 十堰 442000)

摘要:目的 建立妇安消疹洗液的高效液相色谱(HPLC)指纹图谱。方法 采用HPLC法, 色谱柱为OMNIBond HPLC Orca C₁₈柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-0.1%磷酸溶液(含0.1%庚烷磺酸钠), 梯度洗脱, 流速为1.0 mL/min, 检测波长为225 nm或330 nm, 柱温为30℃, 进样量为10 μL。以落新妇苷为参照, 测定10批样品的HPLC图谱, 采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012.130723版)”评价相似度, 确定共有峰及成分。结果 10批样品的HPLC图谱有20个共有峰, 相似度均大于0.90; 确定的5个已知成分为绿原酸、苦参碱、氧化苦参碱、落新妇苷、蒙花苷。结论 所建立的指纹图谱可供妇安消疹洗液的真伪鉴别和质量评价参考。

关键词: 妇安消疹洗液; 高效液相色谱法; 指纹图谱; 质量控制

中图分类号: R932; R284.1; R286.0

文献标志码: A

文章编号: 1006-4931(2022)06-0073-05

Establishment of Fu'an Xiaozhen Lotion HPLC Fingerprint

HUANG Liangyong¹, LIU Jiali², DU Shiming¹

(1. Taihe Hospital · Affiliated Hospital of Hubei University of Medicine · Hubei Key Laboratory of Wudang Local Chinese Medicine Research, Shiyan, Hubei, China 442000; 2. Department of Pharmacy, Hubei University of Medicine, Shiyan, Hubei, China 442000)

Abstract: Objective To establish a high-performance liquid chromatography (HPLC) fingerprint of Fu'an Xiaozhen Lotion. **Methods** The chromatographic column was OMNIBond HPLC Orca C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was acetonitrile-0.1% phosphoric acid solution (contain 0.1% sodium heptanesulfonate), gradient elution. The flow rate was 1.0 mL/min, the wavelength was 225 nm or 330 nm, the column temperature was 30℃ and the injection volume was 10 μL. Astilbin was used as a reference to determine HPLC chromatograms of ten batches of Fu'an Xiaozhen Lotion. The *Similarity Evaluation System of Chromatographic Fingerprints of Traditional Chinese Medicine* (Version 2012.130723) was used for the similarity evaluation to identify common peaks and components. **Results** A total of 20 common peaks of the HPLC fingerprint of ten batches of Fuan Xiaozhen Lotion were determined. The similarity was more than 0.90 of each batch. Chlorogenic acid, matrine, oxymatrine, astilbin and buddleoside were determined. **Conclusion** The established HPLC fingerprint can provide a reference for authenticity identification and quality evaluation of Fu'an Xiaozhen Lotion.

Key words: Fu'an Xiaozhen Lotion; HPLC; fingerprints; quality control

妇安消疹洗液在太和医院临床使用近20年, 疗效确切, 临床主要用于清洁阴道和治疗真菌性阴道炎、滴虫性阴道炎、湿疹丘疹性荨麻疹等症^[1-2]。其现行质量标准中尚无含量测定项, 文献报道采用高效液相色谱(HPLC)法分别测定蒙花苷、落新妇苷、蛇床子素、苦参碱、氧化苦参碱等的含量^[3-7]。为完善该制剂的质量标准和考察其质量的稳定性, 本研究中参考文献^[8-20], 采用HPLC梯度洗脱法-双波长检测法^[21]测定了10批妇安消疹洗液的HPLC图, 分析得到HPLC特征指纹图谱, 确定了5个已知成分, 并初步确认特征峰的原药材归属, 基本反映了原药材的组成及质量^[22-23]。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Ultimate 3000型高效液相色谱仪, 包括LPG-3400泵、WPS-3000SL analyt进样器、TCC-3000型柱温箱、VWD-3400型四波长检测器(美国ThermoFisher公司); KM-36C型超声清洗机(广州市科洁盟实验仪器有限公司); AUW120D型电子分析天平(日本Shimadzu公司, $d=0.01$ mg); GWA-UN Pure Water system型超纯水机(北京普析通用仪器公司)。

1.2 试剂

妇安消疹洗液10批(医院制剂室提供, 批号分别为20190815, 20190920, 20191106, 20200106, 20200511,

*基金项目: 湖北医药学院校级基金[WDCM2019019]。

第一作者: 黄良永, 男, 大学本科, 主任药师, 副教授, 研究方向为药品检验, (电话)0719-8801103(电子信箱)huangly66@163.com。

△通信作者: 杜士明, 男, 博士, 主任药师, 教授, 研究方向为药剂学教学、中药资源调查及中药新制剂, (电话)0719-8801530(电子信箱)173832121@qq.com。

20200720, 20200927, 20201214, 20210104, 20210301, 编号分别为S1~S10);绿原酸对照品(批号为110753-201817,含量96.8%),苦参碱(批号为110805-200508,含量100%),氧化苦参碱(批号为110780-201007,含量92.3%),蒙花苷对照品(批号为111528-201107,含量86.7%),均购自中国食品药品检定研究院;落新妇苷对照品(上海源叶生物科技有限公司,批号为29838-67-3,含量98%);甲醇、乙腈为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为超纯水。饮片野菊花(批号为170401)、苦参(批号为170201)、漏芦(批号为170301)、土茯苓(批号为170301)、蛇床子(批号为170401),均购自湖北清大中药饮片公司;白矾(湖北神农本草中药饮片公司,批号为170401)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:OMNIBond HPLC Orca C₁₈柱(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:乙腈(A)-0.1%磷酸溶液(B,含0.1%庚烷磺酸钠),梯度洗脱(-5~10 min时10%A,10~30 min时14%A,30~45 min时20%A,45~60 min时30%A);流速:1.0 mL/min;检测波长:330 nm(-5~17 min),225 nm(17~26 min),330 nm(26~70 min);柱温:30℃;进样量:10 μL。

2.2 溶液制备

对照品溶液:分别取5种对照品适量,精密称定,分别置容量瓶中,加甲醇超声(功率250 W,频率40 kHz,下同)处理2 min,用甲醇定容,即得蒙花苷、落新妇苷、苦参碱、氧化苦参碱、绿原酸质量浓度分别为22.0, 590.0, 720.0, 530.0, 980.0 μg/mL的单一对照品溶液。

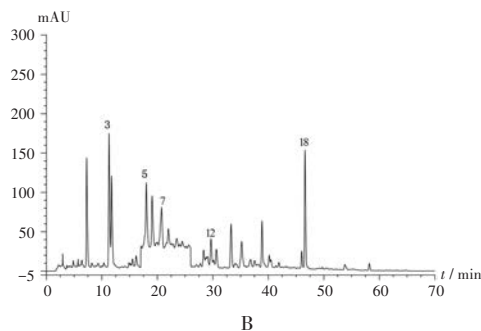
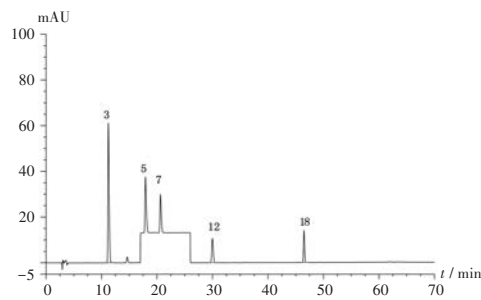
供试品溶液:精密量取样品25 mL,置50 mL容量瓶中,加甲醇定容,超声处理30 min,放冷,用甲醇定容,摇匀,经0.22 μm微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

药材对照溶液:按处方比例分别称取野菊花17.4 g、苦参14.0 g、漏芦14.0 g、土茯苓10.4 g、蛇床子8.0 g,精密称定,分别置三角烧瓶中,按妇安消疹洗液制备工艺,制成100 mL的单一溶液。精密量取25 mL,分别置50 mL容量瓶中,按供试品溶液制备方法制得单一药材对照溶液。取白矾3.4 g,精密称定,置50 mL容量瓶中,用甲醇定容,经0.22 μm微孔滤膜滤过,取续滤液,即得白矾对照药材溶液。

2.3 方法学考察

系统适用性试验:分别精密量取2.2项下溶液各10 μL,按2.1项下色谱条件进样测定,记录色谱图。供试品溶液色谱图中的色谱峰完全分离;对照品溶液色谱图中,在与供试品溶液色谱相应位置上有5种成分的

色谱峰,保留时间完全一致,依次为绿原酸、苦参碱、氧化苦参碱、落新妇苷、蒙花苷的峰(峰号依次为3,5,7,12,18),各成分峰与其相邻峰完全分离,详见图1。5种药材对照溶液色谱图中,在与供试品溶液色谱相应峰可找到各自的归属(白矾属无机矿物质,故其溶液中无色谱峰),详见图2。



3. 绿原酸 5. 苦参碱 7. 氧化苦参碱 12. 落新妇苷 18. 蒙花苷

A. 对照品溶液 B. 供试品溶液

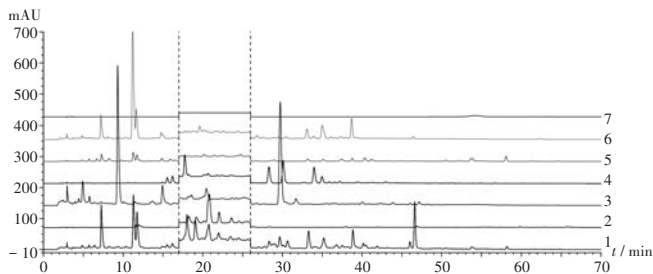
图1 高效液相色谱图

3. Chlorogenic acid 5. Matrine 7. Oxymatrine 12. Astilbin

18. Buddleioside

A. Reference solution B. Test solution

Fig. 1 HPLC chromatograms



1. 供试品溶液 2. 苦参药材对照溶液 3. 漏芦药材对照溶液

4. 土茯苓药材对照溶液 5. 蛇床子药材对照溶液

6. 野菊花药材对照溶液 7. 白矾药材对照溶液

图2 供试品溶液与药材对照溶液的色谱图比较

1. Test solution 2. Reference solution of Sophorae Flavescentis Radix

3. Reference solution of Rhapontici Radix 4. Reference solution of

Smilacis Glabrae Rhizoma 5. Reference solution of Cnidii Fructus

6. Reference solution of Chrysanthemi Indici Flos 7. Reference solution of Alumen

Fig. 2 Comparision of HPLC chromatograms of test solution and reference solution

精密度试验:取2.2项下供试品溶液适量,按2.1项下色谱条件进样测定6次,以落新妇苷峰为参照峰,计算各共有峰的相对保留时间及相对峰面积。结果各共有峰相对保留时间的 RSD 均小于0.39%($n=6$),相对峰面积的 RSD 均小于0.63%($n=6$),表明方法精密度良好。

稳定性试验:取同一供试品溶液适量,分别于室温下放置0,4,8,12,24 h时按2.1项下色谱条件进样测定,以落新妇苷为参照峰,计算共有峰的相对保留时间及相对峰面积。结果各共有峰相对保留时间的 RSD 均小于0.62%($n=5$),相对峰面积的 RSD 均小于1.41%($n=5$),表明供试品溶液在室温放置24 h内基本稳定。

重复性试验:取样品(编号为S5)适量,共6份,按2.2项下方法制备供试品溶液,再按2.1项下色谱条件进样测定。以落新妇苷为参照峰,计算特征峰的相对保留时间及相对峰面积。结果各共有峰相对峰面积的 RSD 均小于0.51%($n=6$),表明方法重复性良好。

2.4 指纹图谱研究

指纹图谱建立与相似度分析:取10批样品,按2.2项下方法制备供试品溶液,按2.1项下色谱条件进样测定,10批样品的指纹图谱见图3。根据结果,采用“中药指纹图谱相似度评价系统(2012.130723版)”,设编号S5样品的色谱图为参照图谱,其他样品色谱峰与参照图谱进行自动匹配,设时间窗宽度为0.2,选用平均值法,采用自动匹配法生成共有特征图谱R,即得妇安消疹洗液共有模式的对照指纹图谱(见图4)。将10批样品的指纹图谱均导入“中药指纹图谱相似度评价系统(2012.130723版)”相似度评价系统软件,计算相似度。结果见表1。

已知成分确认:将共有特征图谱R与对照品溶液色谱图的色谱峰保留时间比较,可知3号、5号、7号、12号、18号峰依次为绿原酸、苦参碱、氧化苦参碱、落新妇苷、蒙花苷。详见图4。

参照峰选择:12号峰处于色谱图的中间位置,与相邻峰能完全分离,峰面积稳定,且为已知成分,故以其为参照峰。将其相对保留时间和峰面积设为1,计算其

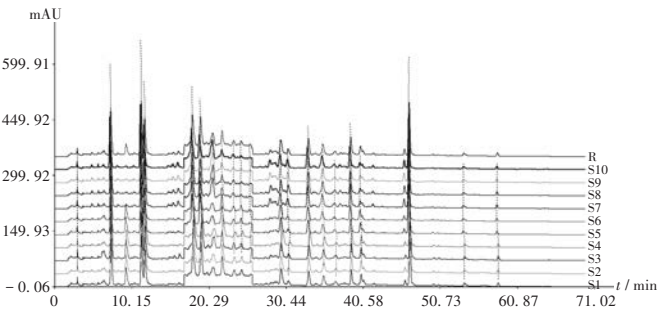


图3 10批样品高效液相色谱叠加指纹图谱
Fig.3 Superimposed HPLC fingerprints of 10 batches of samples

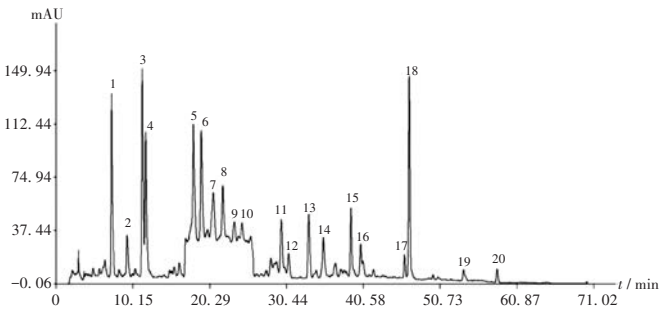


图4 样品的高效液相色谱对照指纹图谱
Fig.4 Reference HPLC fingerprints of 10 batches of samples

表1 10批样品相似度评价结果

Tab.1 Similarity of HPLC fingerprints of 10 batches of samples

编号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	参照图谱
S1	1.000	1.000	0.932	0.984	0.988	0.987	0.909	0.907	0.906	0.905	0.970
S2	1.000	1.000	0.931	0.984	0.988	0.987	0.909	0.906	0.906	0.905	0.970
S3	0.932	0.931	1.000	0.947	0.920	0.921	0.938	0.937	0.938	0.939	0.965
S4	0.984	0.984	0.947	1.000	0.973	0.972	0.916	0.914	0.913	0.910	0.971
S5	0.988	0.988	0.920	0.973	1.000	1.000	0.928	0.925	0.925	0.924	0.977
S6	0.987	0.987	0.921	0.972	1.000	1.000	0.927	0.924	0.924	0.923	0.976
S7	0.909	0.909	0.938	0.916	0.928	0.927	1.000	0.999	0.999	0.999	0.982
S8	0.907	0.906	0.937	0.914	0.925	0.924	0.999	1.000	1.000	0.999	0.981
S9	0.906	0.906	0.938	0.913	0.925	0.924	0.999	1.000	1.000	1.000	0.980
S10	0.905	0.905	0.939	0.910	0.924	0.923	0.999	0.999	1.000	1.000	0.980
参照图谱	0.97	0.97	0.965	0.971	0.977	0.976	0.982	0.981	0.98	0.98	1.000

他各共有峰的相对保留时间和相对峰面积值及 RSD 值。详见表2和表3。可见,各批次供试品各成分峰的相对保留时间较稳定,各成分可被稳定检出;表明不同批次样品中部分成分的含量相差较大,可能是由于不同来源的原药材质量差异较大。

3 讨论

妇安消疹洗液属中药复方制剂,成分复杂,其中含有大量水溶性成分和部分脂溶性成分,为了最大程度地提取两类成分和除去植物蛋白等杂质,预试验中以50%,60%,80%甲醇为溶剂,分别超声20,30,40,60 min。结果显示,50%甲醇提取效果较好,超声处理30 min和60 min的提取效果一致,故以50%甲醇超声处理30 min为提取方法。2020年版《中国药典(一部)》中蒙花苷、苦参碱、氧化苦参碱、落新妇苷的检测波长分别为334,225,291 nm;预试验中在334,225,291,277,254 nm等单波长处分别对供试品进行检测。结果显示,330 nm波长处测得的色谱图中峰的信息量较多,且峰面积相对较大,但妇安消疹洗液中的主要成分苦参碱及氧化苦参碱峰未检出;将17~26 min时间段的检测波长改为225 nm,结果显示,在此检测波长下,对照品及供试品中能检测出苦参碱和氧化苦参碱成分,故将检测波长

表2 10批样品高效液相色谱指纹图谱共有峰的相对保留时间
Tab.2 Relative retention time of common peaks in HPLC fingerprints of 10 batches of samples

峰号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	RSD(%)
1	0.096	0.096	0.096	0.096	0.096	0.096	0.096	0.096	0.096	0.096	0.27
2	0.240	0.241	0.239	0.239	0.239	0.239	0.240	0.238	0.238	0.237	0.52
3	0.371	0.371	0.372	0.372	0.370	0.371	0.371	0.370	0.370	0.368	0.29
4	0.386	0.386	0.387	0.387	0.385	0.385	0.386	0.384	0.385	0.383	0.28
5	0.592	0.593	0.595	0.592	0.589	0.589	0.589	0.588	0.589	0.588	0.40
6	0.625	0.626	0.629	0.626	0.622	0.623	0.623	0.622	0.623	0.622	0.35
7	0.717	0.717	0.716	0.717	0.716	0.717	0.717	0.716	0.717	0.717	0.10
8	0.768	0.768	0.766	0.767	0.766	0.768	0.767	0.765	0.767	0.767	0.11
9	0.800	0.800	0.798	0.799	0.798	0.799	0.799	0.799	0.799	0.799	0.09
10	0.840	0.839	0.836	0.837	0.836	0.837	0.837	0.837	0.837	0.837	0.11
11	0.969	0.969	0.968	0.969	0.969	0.969	0.968	0.968	0.968	0.968	0.05
12	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.00
13	1.087	1.086	1.087	1.085	1.086	1.086	1.087	1.086	1.088	1.086	0.08
14	1.151	1.150	1.150	1.147	1.148	1.149	1.149	1.148	1.151	1.148	0.11
15	1.203	1.203	1.203	1.198	1.201	1.201	1.202	1.200	1.203	1.201	0.14
16	1.270	1.269	1.269	1.263	1.269	1.268	1.270	1.266	1.270	1.268	0.17
17	1.311	1.310	1.311	1.303	1.310	1.310	1.312	1.308	1.312	1.310	0.20
18	1.520	1.518	1.520	1.509	1.517	1.519	1.520	1.517	1.519	1.521	0.24
19	1.754	1.752	1.753	1.741	1.751	1.753	1.754	1.750	1.755	1.755	0.24
20	1.898	1.897	1.898	1.885	1.895	1.898	1.899	1.894	1.899	1.899	0.23

表3 10批样品高效液相色谱指纹图谱共有峰的相对峰面积
Tab.3 Relative peak area of common peaks in HPLC fingerprints of 10 batches of samples

峰号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	RSD(%)
1	0.846	0.879	0.671	0.804	0.787	0.768	0.413	0.396	0.399	0.392	33.01
2	9.061	9.178	6.230	8.632	8.542	8.688	5.193	5.051	5.068	4.971	26.85
3	10.292	10.337	6.968	9.827	9.664	9.819	6.973	6.713	6.755	6.617	20.16
4	7.780	7.832	5.290	7.243	7.224	7.413	5.412	4.881	4.904	4.818	20.89
5	1.684	1.684	3.499	1.645	1.651	1.660	5.862	5.826	5.839	5.972	59.23
6	8.114	8.144	6.395	7.732	7.647	7.802	3.853	3.837	3.810	3.776	33.22
7	4.398	4.413	2.793	4.270	4.191	4.285	1.352	0.852	0.844	0.841	59.02
8	1.670	1.679	1.112	1.589	1.571	1.603	0.673	0.643	0.645	0.635	41.07
9	1.255	1.253	1.333	1.186	1.164	1.186	0.369	0.381	0.375	0.377	49.97
10	4.203	4.144	3.274	3.504	4.651	4.871	2.079	1.865	2.079	2.068	35.88
11	4.608	4.611	3.386	4.460	4.428	4.497	1.442	1.398	1.414	1.399	48.90
12	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.00
13	3.790	3.746	2.500	3.625	3.596	3.671	2.771	2.682	2.692	2.645	17.29
14	2.917	2.907	1.987	2.765	2.736	2.783	2.089	2.019	2.028	1.994	17.55
15	1.030	1.038	0.696	0.988	0.973	0.995	0.581	0.567	0.572	0.565	27.39
16	3.605	3.624	2.469	3.404	3.397	3.450	2.723	2.613	2.625	2.578	15.77
17	1.565	1.597	1.058	2.189	1.353	1.400	0.345	0.357	0.344	0.344	63.58
18	9.973	10.038	6.762	9.483	10.565	10.763	5.879	5.705	5.726	5.626	28.24
19	0.950	0.955	0.604	0.901	0.907	0.921	0.422	0.410	0.415	0.406	37.36
20	0.786	0.793	0.570	0.749	0.740	0.757	0.397	0.384	0.385	0.378	31.88

改为时间程序控制下的双波长检测。预试验中以乙腈-0.1%磷酸溶液进行梯度洗脱,但部分色谱峰有拖尾现象,将0.1%磷酸溶液中加入0.1%庚烷磺酸钠,采用同样的梯度洗脱程序,色谱图中各色谱峰对称,完全分离,峰信息量多。

本研究所得妇安消疹洗液的指纹图谱共标识出20个共有峰,10批供试品溶液的色谱图与共有特征图谱的相似度均大于0.9,表明所建立的HPLC指纹图谱可靠。20个特征峰的相对保留时间的RSD为0.08%~0.52%,均小于2.0%,说明不同批次的妇安消疹洗液有效成分的保留时间稳定,所含成分基本一致,但相对峰面积的RSD在15.77%~63.58%之间波动,说明不同批次的供试品中各有效成分含量差异大,与生产中原药材的来源差异有关,为了保证妇安消疹洗液临床使用的稳定性和有效性,必须保证原药材的质量与来源统一。HPLC指纹图谱技术可用于全面控制该制剂的质量。本研究中所建立的妇安消疹洗液的HPLC指纹图谱明确的5个共有峰成分分别为绿原酸、苦参碱、氧化苦参碱、落新妇苷、蒙花苷,可为制剂质量标准的提高和同时测定5种指标性成分提供参考。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 19, 211, 328, 387.
- [2] 张钟媛. 苦参的化学成分和药理作用研究进展[J]. 云南中医中药杂志, 2015, 36(6): 104-106.
- [3] 胡丽, 彭芬芬, 余刚. 妇安消疹洗液中落新妇苷的含量测定[J]. 中国药师, 2013, 16(9): 1434-1435.
- [4] 胡丽, 彭芬芬, 余刚. 妇安消疹洗液中蛇床子素的含量测定[J]. 实用药物与临床, 2013, 16(8): 718-720.
- [5] 樊秦娥, 吴立兵, 常明泉, 等. 妇安消疹洗液中蒙花苷的含量测定[J]. 实用药物与临床, 2013, 16(7): 604-606.
- [6] 陈黎, 王永惠, 黄良永. HPLC法测定妇安消疹洗液中苦参碱与氧化苦参碱的含量[J]. 中国药师, 2012, 15(2): 217-219.
- [7] 雷震, 常明泉, 彭芬芬. 妇安消疹洗液中 β -脱皮甾酮的含量测定[J]. 儿科药学杂志, 2013, 19(7): 48-51.
- [8] 张永贵, 赵力, 杨小英. 土茯苓药材HPLC指纹图谱研究及主成分的含量测定[J]. 中国药房, 2016, 27(36): 5143-5146.
- [9] 吴修红, 孙泽, 杨恩龙. 酒女贞子HPLC指纹图谱的建立及多成分含量的测定[J]. 药物分析杂志, 2016, 36(2): 273-277.
- [10] 郑继标, 杨红梅, 黄春华, 等. 野菊花不同部位蒙花苷含量测定及HPLC指纹图谱研究[J]. 亚太传统医药, 2019, 15(6): 39-41.
- [11] 薛嘉盛, 曲健源, 王婧芸, 等. 高效液相色谱法测定痛风定胶囊中落新妇苷的含量[J]. 沈阳医学院学报, 2018, 20(5): 467-469.
- [12] 于本涛, 彭博, 鄢长余. 高效液相色谱法测定银屑胶囊中落新妇苷的含量[J]. 世界最新医学信息文摘, 2017, 17(73): 168-169.
- [13] 肖卫红, 杨全伟, 徐宏峰, 等. 高效液相色谱法同时测定洁阴灵洗剂中苦参碱和蛇床子素的含量[J]. 医药导报,