

苗药妇肤康喷雾剂的HPLC指纹图谱研究[△]

廖 秀^{1*}, 许晶晶^{1,2}, 杨 艳¹, 李立即¹, 王 科³, 李齐激^{1,2#}, 杨小生^{1,2} (1. 贵州省中国科学院天然产物化学重点实验室, 贵阳 550014; 2. 遵义医学院药学院, 贵州 遵义 563000; 3. 贵州良济药业有限公司, 贵州 龙里 551206)

中图分类号 R917;R94 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)11-1529-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.11.21

摘 要 目的: 建立苗药妇肤康喷雾剂的高效液相色谱(HPLC)指纹图谱。方法: 色谱柱为 Thermo Hypersil GOLD C₁₈, 流动相为乙腈-0.2%冰醋酸(梯度洗脱), 检测波长为 262 nm, 流速为 0.6 mL/min, 柱温为 25 ℃, 进样量为 10 μL。以 6'-羟基-爵床定 B 为参照, 绘制 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软件(2004 A 版), 对 10 批样品进行相似度评价, 确定 10 批样品的共有峰。采用建立的方法测定 10 批样品中 6'-羟基-爵床定 B 和爵床定 B 的含量。结果: 10 批样品的 HPLC 指纹图谱有 12 个共有峰, 相似度均大于 0.90, 其 HPLC 指纹图谱与对照指纹图谱具有较好的一致性。10 批样品中 6'-羟基-爵床定 B 和爵床定 B 含量分别为 1.64~5.84、0.83~2.78 mg/100 mL。结论: 建立的方法操作简便, 结果准确可靠, 可为妇肤康喷雾剂的质量评价提供参考。

关键词 妇肤康喷雾剂; 高效液相色谱法; 指纹图谱; 6'-羟基-爵床定 B; 爵床定 B

Study on HPLC Fingerprint of Miao Medicine Fufukang Spray

LIAO Xiu¹, XU Jingjing^{1,2}, YANG Yan¹, LI Lilang¹, WANG Ke³, LI Qiji^{1,2}, YANG Xiaosheng^{1,2} (1. Guizhou Province Key Lab of Chemistry for Natural Products, Chinese Academy of Sciences, Guiyang 550014, China; 2. School of Pharmacy, Zunyi Medical College, Guizhou Zunyi 563000, China; 3. Guizhou Liangji Pharmaceutical Co. Ltd., Guizhou Longli 551206, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To establish HPLC fingerprint of Miao medicine Fufukang spray. **METHODS:** The determination was performed on Thermo Hypersil GOLD C₁₈ column with mobile phase consisted of acetonitrile-0.2% glacial acetic acid (gradient elution) at the flow rate of 0.6 mL/min. The detection wavelength was set at 262 nm, and column temperature was 25 ℃. The sample size was 10 μL. Using 6'-hydroxyl-justicidin B as reference control, HPLC chromatograms of 10 batches of samples were drawn. Similarity evaluation system software (2004 A edition) of TCM fingerprint was used to evaluate the similarity and determine common peaks of 10 batches of samples. The established method was used to determine the contents of 6'-hydroxyl-justicidin B and justicidin B in 10 batches of samples. **RESULTS:** There were 12 common peaks in HPLC fingerprints of 10 batches of samples with similarity > 0.90. HPLC fingerprint showed a good consistency with the control fingerprint. The contents of 6'-hydroxyl-justicidin B and justicidin B in 10 batches of samples were 1.64-5.84, 0.83-2.78 mg/100 mL, respectively. **CONCLUSIONS:** The established method is simple, accurate, reliable and suitable for quality evaluation of Fufukang spray.

KEYWORDS Fufukang spray; HPLC; Fingerprint; 6'-hydroxyl-justicidin B; Justicidin B

妇肤康喷雾剂由爵床和千里光两味药材组成, 为贵州省妇科用苗药独家品种, 具有清热解毒、活血止痛、杀虫止痒的功效, 主要用于霉菌性阴道炎、滴虫性阴道炎、细菌性阴道炎、外阴炎、皮肤瘙痒等妇科疾病的治疗^[1-4]。爵床作为君药, 是爵床科植物爵床的干燥全草, 其主要成分为爵床定 A、爵床定 B、Cleistanthin-B、6'-羟基-爵床定 B 等为代表的木脂素类成分, 在抗肿瘤、抗菌、抗炎、诱导细胞凋亡等方面表现出较好的生物活性^[5-11], 与该制剂“清热解毒, 活血止痛”的功效基本吻合。目前, 该制剂及其君药爵床现存标准仅以性状与薄层色谱鉴别

进行质量控制, 无法全面地反映该制剂质量。笔者在前期工作研究基础上^[12], 拟选 6'-羟基-爵床定 B 和爵床定 B 为测定指标, 对 10 批妇肤康喷雾剂进行研究, 建立了妇肤康喷雾剂高效液相色谱(HPLC)指纹图谱, 并测定了其中 6'-羟基-爵床定 B 和爵床定 B 含量, 以期进行全面控制和评价该制剂提供参考。

1 材料

1.1 仪器

U3000 HPLC 仪, 包括二元梯度泵、紫外检测器色谱工作站(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); BS-210S 电子天平[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司]; AG285 电子分析天平(瑞士 Mettler-Toledo 公司)。

1.2 药品与试剂

妇肤康喷雾剂[贵州良济药业有限公司, 批号:

△ 基金项目: 贵州省科技计划课题(No. 黔科合 SY 字[2015]3034)

* 助理研究员, 硕士。研究方向: 中药及民族药质量标准研究。

电话: 0851-83806465。E-mail: lenchante@sina.com

通信作者: 助理研究员, 博士研究生。研究方向: 天然产物化学。电话: 0851-83806465。E-mail: leeqiji@163.com

20150601~201506010 (编号 : S1~S10) , 规格 : 100 mL/瓶];6'-羟基-爵床定B对照品(批号:2015011901,纯度:>98%)、爵床定B对照品(批号:2015011902,纯度:>98%)均由贵州省中国科学院天然产物化学重点实验室自制,经HPLC、质谱、核磁共振进行结构鉴定和纯度检测;乙腈、甲醇为色谱纯,无水乙醇为分析纯,水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Thermo Hypersil GOLD C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相: 乙腈(A)-0.2%冰醋酸(B),梯度洗脱(0~15 min, 4% A; 15~20 min, 4%→15% A; 20~25 min, 15%→20% A; 25~30 min, 20%→25% A; 30~40 min, 25%→35% A; 40~50 min, 35%→60% A; 50~55 min, 60%→80% A; 55~65 min, 80%→90% A);流速: 0.6 mL/min;柱温: 25 ℃;检测波长: 262 nm;进样量: 10 μL。

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液 精密称量6'-羟基-爵床定B、爵床定B对照品适量,加甲醇溶解,制成质量浓度均为1 mg/mL的单一对照品溶液。取6'-羟基-爵床定B单一对照品溶液4 mL、爵床定B单一对照品溶液2 mL,置于同一100 mL量瓶中,加甲醇稀释,定容,得每1 mL分别含6'-羟基-爵床定B 40 μg、爵床定B 20 μg的混合对照品溶液,经0.22 μm微孔滤膜过滤,即得。

2.2.2 供试品溶液 吸取妇科康喷雾剂样品适量,经0.22 μm微孔滤膜过滤,即得。

2.2.3 空白对照溶液 将等量的甲醇和70%乙醇溶剂混合均匀,经0.22 μm微孔滤膜过滤,即得。

2.3 方法学考察

2.3.1 系统适用性试验 精密量取“2.2”项下混合对照品溶液、供试品溶液和空白对照溶液各适量,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱。结果,在该色谱条件下,6'-羟基-爵床定B和爵床定B与各杂质峰间均能达到基线分离,分离度>1.5,理论板数按6'-羟基-爵床定B计>3 000。空白对照的基线平稳,表明溶剂及流动相对爵床药材的HPLC特征图谱检测基本无干扰。色谱图见图1。

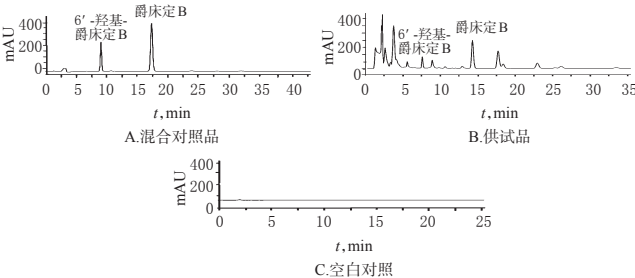


图1 高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms

2.3.2 线性关系考察 精密量取“2.2.1”项下混合对照品溶液2、4、6、8、10、12 mL,精密配制成每1 mL分别含6'-羟基-爵床定B 8、16、24、32、40、48 μg/mL和爵床定

B 4、8、12、16、20、24 μg/mL的混合对照品溶液,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以进样量为横坐标(x)、峰面积为纵坐标(y)进行线性回归。线性关系考察结果见表1。

表1 线性关系考察结果(n=6)

Tab 1 Results of linear relationship investigation (n=6)

待测成分	回归方程	r	线性范围, μg
6'-羟基-爵床定B	y=2.806 6x+0.108 1	0.999 9	0.08~0.48
爵床定B	y=1.541 4x-0.013 1	0.999 9	0.04~0.24

2.3.3 精密度试验 取样品(编号:S1)适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件连续进样测定6次,以6'-羟基-爵床定B的保留时间和峰面积为参照,记录各共有峰相对保留时间和相对峰面积。结果,12个共有峰相对保留时间和相对峰面积的RSD<2.0%(n=6),表明该方法精密度良好。

2.3.4 稳定性试验 取样品(编号:S1)适量,分别于室温下放置0、2、4、6、8、12、24 h时按“2.1”项下色谱条件进样测定,以6'-羟基-爵床定B的保留时间和峰面积为参照,记录各共有峰相对保留时间和相对峰面积。结果,12个共有峰相对保留时间和相对峰面积的RSD<2.0%(n=7),表明供试品溶液室温下放置24 h稳定性良好。

2.3.5 重复性试验 取样品(编号:S1)适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,共6份,按“2.1”项下色谱条件进样测定,以6'-羟基-爵床定B的保留时间和峰面积为参照,记录各共有峰相对保留时间和相对峰面积。结果,12个共有峰相对保留时间和相对峰面积的RSD<2.0%(n=6),表明该方法重复性良好。

2.3.6 加样回收率试验 取样品(编号:S1)适量,共6份,每份约1 g,精密称定,分别精密加入6'-羟基-爵床定B 1.250 0 mg、爵床定B 0.500 0 mg,按“2.2.2”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,记录峰面积并计算加样回收率,结果见表2。

表2 加样回收率试验结果(n=6)

Tab 2 Results of recovery tests (n=6)

待测成分	样品量,mg	加入量,mg	测得量,mg	加样回收率,%	平均加样回收率,%	RSD,%
6'-羟基-爵床定B	1.401 8	1.250 0	2.636 1	98.70	98.88	0.83
	1.401 8	1.250 0	2.638 3	98.92		
	1.410 0	1.250 0	2.635 4	98.03		
	1.408 5	1.250 0	2.636 2	98.22		
	1.381 7	1.250 0	2.636 1	100.35		
	1.425 5	1.250 0	2.643 0	99.00		
爵床定B	0.632 4	0.500 0	1.126 5	98.82	98.65	0.95
	0.631 0	0.500 0	1.126 1	99.02		
	0.639 4	0.500 0	1.123 3	96.78		
	0.626 6	0.500 0	1.123 0	99.28		
	0.628 8	0.500 0	1.123 5	99.16		
	0.588 1	0.500 0	1.095 6	98.82		

表2结果显示,6'-羟基-爵床定B和爵床定B平均加样回收率分别为98.88%、98.65%,RSD分别为0.83%、0.95%,其结果在95%~105%之间,表明加样回收率良好。

2.4 HPLC指纹图谱的生成与相似度、共有峰的相关分析

2.4.1 HPLC 指纹图谱的生成及共有峰相关分析 分别取编号为S1~S10样品,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件进样测定,得到10批次喷雾剂样品的HPLC色谱图。将10批样品指纹图谱数据导入中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004A版),以S1号样品图谱为校正图谱,采用多点校正后进行自动匹配,生成10批样品指纹图谱叠加模式(图2)及对照指纹图谱(图3),确定10批样品的共有峰为12个。根据保留时间指认图谱中10号峰为6'-羟基-爵床定B,12号峰为爵床定B。以10号峰为参照峰,计算其他特征峰相对于10号峰的相对保留时间和相对峰面积,结果见表3、表4。

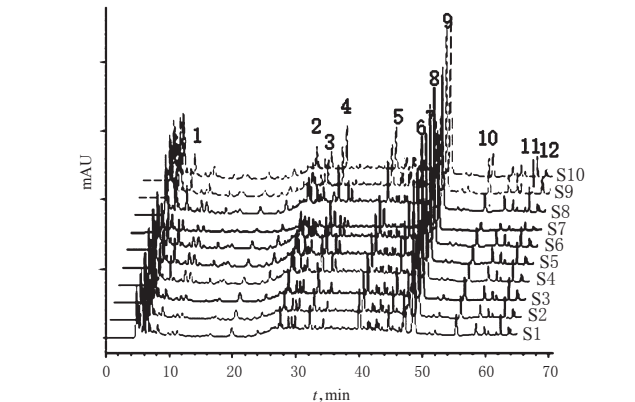


图2 10批样品HPLC叠加指纹图谱
Fig 2 HPLC superposed fingerprints of 10 batches of samples

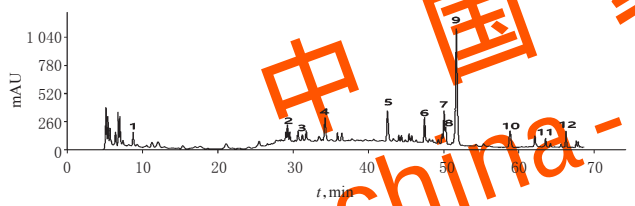


图3 妇肤康喷雾剂样品HPLC对照指纹图谱
Fig 3 HPLC control fingerprints of Fufukang spray

表3 10批样品HPLC指纹图谱共有峰的相对保留时间
Tab 3 Relative retention time of common peaks in HPLC fingerprints of 10 batches of samples

峰号	样品编号									
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
1	0.158	0.150	0.148	0.150	0.149	0.150	0.150	0.149	0.149	0.150
2	0.501	0.498	0.498	0.498	0.498	0.498	0.498	0.498	0.498	0.498
3	0.542	0.540	0.540	0.540	0.540	0.540	0.540	0.540	0.540	0.540
4	0.585	0.582	0.583	0.582	0.583	0.583	0.583	0.583	0.582	0.583
5	0.724	0.723	0.723	0.723	0.723	0.723	0.724	0.723	0.723	0.723
6	0.807	0.807	0.807	0.807	0.807	0.807	0.807	0.807	0.807	0.807
7	0.851	0.851	0.851	0.851	0.851	0.851	0.851	0.851	0.851	0.851
8	0.855	0.855	0.855	0.855	0.855	0.855	0.855	0.855	0.855	0.855
9	0.879	0.879	0.879	0.879	0.879	0.879	0.879	0.879	0.879	0.879
10	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
11	1.055	1.056	1.056	1.056	1.056	1.056	1.056	1.056	1.056	1.056
12	1.125	1.126	1.126	1.126	1.126	1.126	1.126	1.127	1.127	1.126

2.4.2 相似度分析 将共有峰模式的对照指纹图谱及10批喷雾剂样品图谱导入中药色谱指纹图谱相似度评

表4 10批样品HPLC指纹图谱共有峰的相对峰面积
Tab 4 Relative peak areas of common peaks in HPLC fingerprints of 10 batches of samples

峰号	样品编号									
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
1	0.364	0.440	0.878	0.883	0.856	0.827	0.906	0.548	0.407	0.834
2	0.647	0.501	0.824	0.837	0.861	0.807	0.880	0.637	0.464	0.805
3	0.347	0.332	0.477	0.493	0.468	0.489	0.472	0.377	0.296	0.502
4	0.878	0.783	1.627	1.574	1.460	1.478	1.577	1.366	0.835	1.421
5	1.662	1.528	1.946	1.962	1.943	1.918	2.018	1.435	0.982	1.526
6	0.780	0.733	1.067	1.067	1.051	1.017	1.067	0.905	0.747	0.846
7	1.304	1.250	1.319	1.308	1.290	1.253	1.332	1.159	0.974	1.254
8	0.592	0.552	0.716	0.724	0.707	0.705	0.713	0.612	0.518	0.522
9	7.204	6.578	7.791	8.274	8.123	10.901	7.592	6.239	4.780	7.785
10	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
11	0.422	0.452	0.659	0.656	0.655	0.634	0.654	0.369	0.389	0.425
12	0.457	0.469	0.550	0.544	0.526	0.527	0.548	0.424	0.489	0.551

价系统(2004A版),采用相关系数法对样品的相似度进行评价。结果,S1~S10相似度分别为0.947、0.987、0.989、0.988、0.909、0.913、0.925、0.901、0.927、0.929,均>0.90,说明10批样品HPLC图谱与对照指纹图谱具有较好的一致性^[13]。

2.5 6'-羟基-爵床定B、爵床定B的含量测定

分别取S1~S10样品,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件进样测定。结果,10批样品中6'-羟基-爵床定B含量依次为3.34、3.54、3.64、2.92、2.98、2.95、2.44、1.64、4.02、5.84 mg/100 mL;爵床定B含量依次为1.46、1.63、1.96、1.39、1.50、1.50、1.34、0.83、1.62、2.78 mg/100 mL。

3 讨论

笔者前期试验通过对检测波长、流动相、流速、柱温等色谱条件进行优化,对妇肤康喷雾剂样品进行紫外(200~400 nm)全波长扫描,在262 nm波长处出峰较多,且检测成分6'-羟基-爵床定B和爵床定B在此波长下吸光值最大,故选262 nm为检测波长。随后分别对乙腈-水、甲醇-水、不同浓度的冰醋酸/甲酸-乙腈等流动相进行了前期的预试验,结果显示在相同的条件下,乙腈-水作为流动相分离效果好,但基线不平稳;乙腈-0.2%冰醋酸为流动相,分离效果更好,基线更平稳,峰形更好,最终确定乙腈-0.2%冰醋酸为流动相,在此条件下又分别对流速、柱温等色谱条件进行考察,最终确定色谱条件为262 nm为检测波长、体积流量0.6 mL/min、柱温25℃、乙腈-0.2%冰醋酸为流动相进行梯度洗脱。

通过对10批样品指纹图谱分析,得到不同样品之间的相似度均在0.90以上,并标定了12个共有峰,各个色谱峰的保留时间匹配较好,说明不同批次样品中的化学成分类型一致^[14-15]。通过测定样品中6'-羟基-爵床定B和爵床定B的含量发现,10批样品中6'-羟基-爵床定B含量为1.64~5.84 mg/100 mL,爵床定B含量为0.83~2.78 mg/100 mL,不同批号间两种检测指标的含量存在较大差异,这可能是由于生产原料不稳定引起的。前期研究发现,不同产地爵床药材中成分差异较大,且6'-羟

炮制方法及提取溶剂对何首乌中主要成分含量的影响^Δ

朱 敏*,姚 毅#,居文政,刘志辉,方祝元(南京中医药大学附属医院/江苏省中医院,南京 210036)

中图分类号 R284.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)11-1532-05
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.11.22

摘 要 目的:研究不同炮制方法及不同提取溶剂对何首乌中主要成分含量的影响。方法:采用黑豆汁蒸法和清蒸法对生何首乌进行炮制,分别用水、50%乙醇、70%乙醇、90%乙醇对生何首乌、黑豆汁制何首乌、清蒸制何首乌和市售制何首乌4种饮片进行提取,采用高效液相色谱法同时测定各样品中4种主要成分没食子酸、二苯乙烯苷、大黄素、大黄素甲醚的含量。结果:3种何首乌炮制品的4种提取液中4种主要成分的含量均较生品中更高;没食子酸以水提时含量最高,二苯乙烯苷以90%乙醇提取时含量最低,大黄素和大黄素甲醚以50%和70%乙醇提取时含量较高。结论:不同炮制方法和提取溶剂能明显影响何首乌中主要成分的含量;各炮制品中各成分的含量变化未呈现一定的规律性。
关键词 何首乌;炮制方法;提取溶剂;没食子酸;二苯乙烯苷;大黄素;大黄素甲醚;含量

Effects of Processing Methods and Extraction Solvents on the Contents of Major Components in *Polygonum multiflorum*
ZHU Min, YAO Yi, JU Wenzheng, LIU Zhihui, FANG Zhuyuan (Dept. of Pharmacy, the Affiliated Hospital of Nanjing University of TCM/Jiangsu Province Hospital of TCM, Nanjing 210036, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the effects of different processing methods and extraction solvents on the contents of major components in *Polygonum multiflorum*. METHODS: Decoction of black soybean and water were used to steam the raw *P.*

基-爵床定B和爵床定B含量具有较大差异^[12],建议生产该制剂时,尽量选择同一产地的药材。但是也有可能是由于生产前对样品提取不当或生产线上其他原因引起的,需进一步验证。

综上,本研究所建立的方法操作简便,结果准确可靠,可为妇科康喷雾剂的质量评价提供参考。

参考文献

[1] 金建荣.治疗妇女阴道炎症病的中药制剂及其制备方法:中国,200410021839.X[P]. 2006-03-22.
[2] 杨星.妇科康凝胶剂及其制备方法:中国,201010574174.0[P]. 2013-03-20.
[3] 王奔,肖冰冰,那日苏,等.妇科康喷雾剂对阴道常见微生物增殖影响的体外研究[J].中国微生态学杂志,2014,26(3):342-344.
[4] 喻蓉.用妇科康喷雾剂治疗老年性阴道炎43例的疗效观察[J].求医问药,2013,11(10):318-319.
[5] CHEN CC, HSIN WC, HUANG YL, et al. Six new diarylbutane lignans from *Justicia procumbens*[J]. *J Nat Prod*,1998,61(2):227-229.
[6] 刘国瑞,吴军,杨美华,等.药用植物爵床的研究进展[J].西北药学杂志,2008,23(1):55-56.
[7] LUO JY, HU YC, KONG WJ, et al. Evaluation and structure-activity relationship analysis of a new series of

arylnaphthalene lignans as potential anti-tumor agents[J]. *PLoS One*,2014,9(3):e93516.
[8] MOMEKOV G, KONSTANTINOV S, DINEVA I, et al. Effect of justicidin B: a potent cytotoxic and pro-apoptotic aryl naphthalene lignan on human breast cancer-derived cell lines[J]. *Neoplasma*,2011,58(4):320-325.
[9] RAO YK, FANG SH, TZENG YM. Anti-inflammatory activities of constituents isolated from *Phyllanthus pollyanthus*[J]. *J Ethnopharmacol*,2006,103(2):181-186.
[10] PRIYADHARSINI RP, PARASURAMAN S, RAVEENDRAN R. Evaluation of the antihypertensive activity and alpha adrenergic receptor interaction of cleistanthins A and B [J]. *Journal of Basic and Clinical Pharmacy*,2014,5(4):109-114.
[11] VIJAYAKUMAR B, PARASURAMAN S, RAVEENDRAN R, et al. Identification of natural inhibitors against angiotensin I converting enzyme for cardiac safety using induced fit docking and MM-GBSA studies [J]. *Pharmacogn Mag*,2014,10(3):639-644.
[12] 许晶晶,李齐激,杨艳,等.不同产地爵床药材HPLC成分差异性研究[J].中药材,2017,40(8):1888-1891.
[13] 牛小花,陈洪源.清喉利咽颗粒的UPLC指纹图谱建立及主成分分析[J].中国药房,2017,28(6):826-830.
[14] 吴和珍,张雅奇,张炳武,等.爵床化学成分研究[J].湖北中医杂志,2013,35(5):68-69.
[15] 吴威巍,缪刘萍,王鑫杰.爵床化学成分研究[J].中成药,2013,35(5):985-988.

Δ 基金项目:江苏省中医药局科技项目(No.YB2015029)
* 副主任中药师,博士。研究方向:中药药效物质基础。电话:025-86529291。E-mail:zhumin0902@126.com
通信作者:主任中药师。研究方向:中药学、药事管理。电话:025-86619821。E-mail:yaoyi@medmail.com.cn