

## 妇炎康灌肠剂的 HPLC 指纹图谱

廖广华<sup>1</sup>, 原素<sup>1</sup>, 赖小平<sup>2</sup>, 谢称石<sup>1</sup>, 陈小新<sup>1,2\*</sup>

(1. 广东华南药业集团有限公司, 广东 东莞 523325; 2. 广州中医药大学, 广州 510405)

**[摘要]** 目的: 采用高效液相色谱技术建立妇炎康灌肠剂 HPLC 指纹图谱, 同时分析其化学成分的归属。方法: 采用 Kromasil C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 乙腈-0.04 mol·L<sup>-1</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (含 0.1% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) 为流动相进行梯度洗脱, 检测波长 230 nm, 流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 柱温为 30 °C。结果: 得到分离度较好的妇炎康灌肠剂的指纹图谱, 共标定出 13 个指纹特征峰, 方法稳定、重复性好。同时结合复方药物、阴性样品及单味药的物质信息, 确定了特征峰的来源。结论: 所建立的指纹图谱特征性强、重复性较好, 对妇炎康灌肠剂的质量评价有重要参考价值。

**[关键词]** 妇炎康灌肠剂; 指纹图谱; 化学特征峰

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)20-0079-04

## HPLC Fingerprint Analysis of Fuyankang Enema

LIAO Guang-hua<sup>1</sup>, YUAN Su<sup>1</sup>, LAI Xiao-ping<sup>2</sup>, XIE Cheng-shi<sup>1</sup>, CHEN Xiao-xin<sup>1,2\*</sup>

(1. Guangdong Huanan Pharmaceutical Group Co., Ltd., Dongguan 523325, China;

2. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China)

**[Abstract]** **Objective:** To establish fingerprint of Fuyankang enema by HPLC-DAD, and to analyze its chemical component classification. **Method:** The samples were separated on a reversed phase Kromasil C<sub>18</sub> column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) with gradient elution. The mobile phase consisted of acetonitrile-0.04 mol·L<sup>-1</sup> potassium dihydrogen phosphate solution containing 0.1% phosphoric acid, the detection wavelength was 230 nm, the flow rate was 1.0 mL·min<sup>-1</sup> and column temperature was set at 30 °C. **Result:** Thirteen characteristic peaks were obtained in the fingerprint of Fuyankang enema with good separation. The method was stable with great reproducibility. The sources of characteristic peaks in Fuyankang enema were determined with the information of chemicals of compound, negative samples and single medicine. **Conclusion:** The fingerprint of Fuyankang enema showed a strong characteristic and good reproducibility, and was an important reference for quality evaluation of Fuyankang enema.

**[Key words]** Fuyankang enema; fingerprint; chemical characteristic peak

“妇炎康灌肠剂”是根据传统中医理论和临床经验, 由赤芍、丹参、黄柏、芡实、当归、土茯苓、山药等 13 味中药精制而成的纯中药制剂, 具有活血化瘀, 软坚散结, 清热解毒, 消炎止痛等功效, 临床常用

于慢性盆腔炎等疾病的治疗<sup>[1]</sup>。由于该制剂涉及的药材种类较多、化学成分相对复杂, 各味药材易受产地、药用部位、采收时间、提取工艺等因素的影响, 为有效的控制及评价该制剂的质量带来了一定的困难。中药指纹图谱作为现代中药质量控制和鉴别的新技术, 其优点在于尽可能全面反应中药及其复方中复杂的化学成分和其相对比例<sup>[2-3]</sup>, 顺应中药多组分、多靶点的整体综合作用的特点, 从“全成分”的角度出发的一种现代中药质量控制方法, 现已成为国内外广泛接受的中药质量控制评价模型<sup>[4-7]</sup>。本

**[收稿日期]** 201105269(013)

**[第一作者]** 廖广华, 本科, 从事药品研发与生产, Tel: 0769-86188137, E-mail: 1968922@163.com

**[通讯作者]** \* 陈小新, 博士, 从事药物新剂型与新技术研究, Tel: 0769-81388217, E-mail: chenchenyu2000@yahoo.com.cn

研究采用 RP-HPLC-DAD 法建立妇炎康灌肠剂的 HPLC 指纹图谱,并对芍药苷、丹酚酸 B 和盐酸小檗碱 3 中主要指标成分定性,同时通过对照组方单味、缺味药材的 HPLC 色谱图,分析其 HPLC 特征峰所属化学成分的来源,以便实现从多药物、多成分的系统化角度控制妇炎康灌肠剂的质量。

## 1 材料

**1.1 仪器** Agilent 1200 高效液相色谱仪(G1311A 四元梯度泵, G1329A 自动进样器, G1316A 柱温箱, G1315D 型 DAD 检测器, G1322A 在线脱气机, Agilent ChemStations 数据处理软件,美国安捷伦科技有限公司),超声波清洗器(SB-5200,宁波新芝科器研究所),BP110S 电子天平(德国赛多利斯公司),CP225D 电子天平(德国赛多利斯),实验室专用超纯水机(重庆利迪现代水技术设备有限公司)。

**1.2 药品与试剂** 盐酸小檗碱对照品(批号 110713-200208),丹酚酸 B 对照品(批号 111562-200504),芍药苷对照品(批号 0721-200010)均购自中国药品生物制品检定所;妇炎康灌肠剂(批号 20070812, 20070815, 20070818, 20070822, 20071005, 20071010, 20071018, 20071101, 20071115, 20071201, 广州中医药大学新药开发研究中心提供);赤芍、土茯苓、三棱、川楝子、莪术、延胡索、芫实、当归、苦参、香附、黄柏、丹参、山药均购自广州致信药业有限公司。甲醇、乙腈为色谱纯(Merk 公司),其他试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

### 2.1 对照品溶液及供试品溶液的制备

**2.1.1 供试品溶液** 取本品 0.3 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,加入 70% 乙醇 50 mL,精密称定,超声处理(功率 250 W,频率 250 kHz)30 min,放冷,补足减失质量,摇匀,0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得;称取处方单味药材及阴性样品,按妇炎康灌肠剂生产、制剂工艺制备干浸膏粉,然后再按照前述处方方法制备单味药材和阴性样品溶液。

**2.1.2 对照品溶液** 称取盐酸小檗碱和芍药苷对照品 2.56 mg, 4.84 mg 置 25 mL 量瓶中,丹酚酸 B 对照品 22.79 mg 置 100 mL 量瓶中,加甲醇少许溶解并定容至刻度,制成盐酸小檗碱、芍药苷和丹酚酸 B 浓度分别为 0.102 4, 0.193 6, 0.227 9 g·L<sup>-1</sup> 的对照品溶液。

**2.2 色谱条件** 色谱柱 Kromasil C<sub>18</sub>(4.6 mm × 250

mm, 5 μm),流动相乙腈为流动相 A, 0.04 mol·L<sup>-1</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>(含 0.1% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>)为流动相 B 进行梯度洗脱,见表 1;柱温 30 °C,检测器 DAD,检测波长 230 nm,流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>,进样量 10.0 μL。

表 1 梯度洗脱条件

t/min	流动相 A/%	流动相 B/%
0	14	86
10	15	85
14	18	82
28	23	77
40	33	67
45	33	67

### 2.3 方法学考察

**2.3.1 精密度试验** 取供试品溶液,依据 2.2 项下色谱条件进样分析,重复进样 5 次,测定指纹图谱,经国家药典委员会《中药色谱指纹图谱相似度评价系统 A 版》进行评价,结果表明 230 nm 检测波长下的相似度 > 0.99,各色谱峰相对保留时间和单峰相对峰面积的 RSD 均 < 3%,表明仪器的精密度良好。

**2.3.2 重复性试验** 取同一批次妇炎康灌肠剂 5 份作为供试品,依据 2.2 项下色谱条件进样分析,分别测定其指纹图谱,经《中药色谱指纹图谱相似度评价系统 A 版》进行评价,结果表明 230 nm 检测波长下的相似度 > 0.99,各色谱峰的相对保留时间和单峰相对峰面积的 RSD 均 < 3%,表明方法重复性良好。

**2.3.3 稳定性试验** 取样品在 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 分别进样,依据 2.2 项下色谱条件进样分析,测定指纹图谱,经《中药色谱指纹图谱相似度评价系统 A 版》进行评价,结果表明 230 nm 检测波长下的相似度 > 0.99,各色谱峰的相对保留时间和单峰相对峰面积的 RSD 均 < 3%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

### 2.4 HPLC 指纹图谱的建立及评价

**2.4.1 样品测定** 取 10 批妇炎康灌肠剂样品,分别按 2.1.1 项下供试品溶液的制备方法进行处理,再按 2.2 项下条件进行 HPLC 指纹图谱测定。根据 10 批供试品溶液 HPLC 提供的相关参数,确定共有峰为 13 个。

**2.4.2 指纹图谱相似度计算** 将 10 批样品的色谱图导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2004 A 版),设定匹配模板,进行谱峰自动匹配,生成对照

指纹图谱(图 1),进行相似度评价,结果不同批次样品的相似度 >0.99,见表 2。

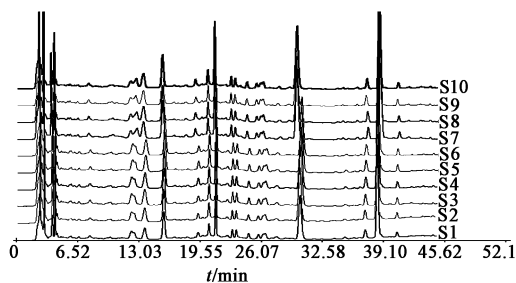


图 1 10 批妇炎康灌肠剂 HPLC 指纹图谱

表 2 10 批样品指纹图谱相似度评价

样品号	相似度	样品号	相似度
S1	0.994	S6	0.991
S2	0.995	S7	0.994
S3	0.996	S8	0.992
S4	0.996	S9	0.996
S5	0.992	S10	0.991

**2.4.3 主要色谱峰的鉴定** 按照 2.2 项下色谱条件,分别测定芍药苷、丹酚酸 B 和盐酸小檗碱对照品,并与样品色谱指纹图谱中相应色谱峰进行比较,发现样品色谱指纹图谱中 2 号峰,10 号峰和 12 号峰的保留时间及紫外光谱分别与芍药苷、丹酚酸 B 和盐酸小檗碱相吻合,故样品色谱指纹图谱中 2 号峰,10 号峰和 12 号峰鉴定为芍药苷、丹酚酸 B 和盐酸小檗碱,结果见图 2。

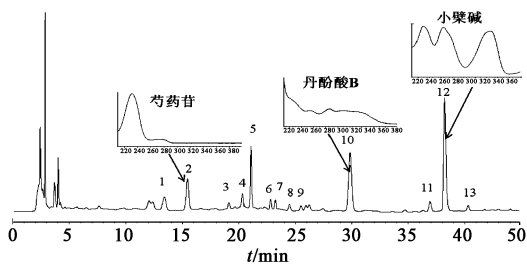


图 2 芍药中主要色谱峰鉴定

**2.4.4 指纹图谱各共有峰归属的初步判断** 依照 2.1.1 项下供试品溶液制备方法,分别制备处方中各药材和阴性供试品溶液,按照 2.2 项下谱条件下分别测定与成品相应量各单味药材的指纹图谱,将获得的成品、药材和相应药材的阴性样品色谱叠加、对比,从而确认成品指纹图谱各特征峰的归属。结果表明,1 号峰、11 号峰、12 号峰归属于黄柏,2 号峰归属于赤芍,4,5,6,7 号峰归属于土茯苓,10 号峰归属于丹参,13 号峰归属于延胡索,3,8,9 号峰属于未

知成分,可能是提取过程中生成的化合物。结果见图 3~7。

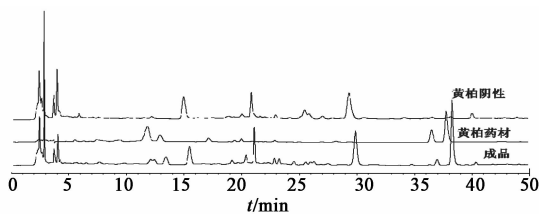


图 3 黄柏阴性、黄柏药材及全方色谱

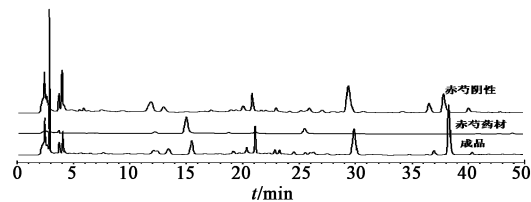


图 4 赤芍阴性、赤芍药材及全方色谱

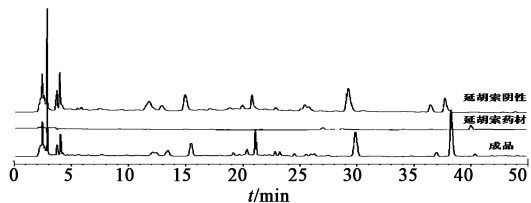


图 5 延胡索阴性、延胡索药材及全方色谱

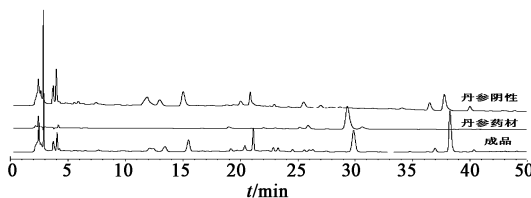


图 6 丹参阴性、丹参药材及全方色谱

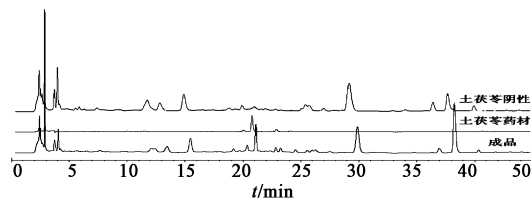


图 7 土茯苓阴性、土茯苓药材及全方色谱

### 3 讨论

芍药苷在 230 nm 处有最大吸收,丹酚酸 B 在 230,286,308,330 nm 处均有最大吸收,盐酸小檗碱在 230,265,345 nm 处均有最大吸收,因此,本试验采用二极管阵列检测器对样品溶液进行全波长(200~400 nm)扫描,重点对 230,265,286,345 nm 的图谱进行考察,根据 3D 图获取不同波长下色谱图,发现在 230 nm 下,各样品的吸收峰较多,分离度及峰型较好,最终确定 230 nm 作最佳检测波长。

## HPLC 测定双黄连注射液中木犀草苷

樊磊磊<sup>1\*</sup>, 刘乃强<sup>1</sup>, 王雪芹<sup>1</sup>, 李振国<sup>1</sup>, 邢向伟<sup>2</sup>

(1. 河南省食品药品检验所, 郑州 450003; 2. 河南中医学院, 郑州 450003)

**[摘要]** 目的: 建立双黄连注射液中木犀草苷的 RP-HPLC 含量测定方法。方法: 采用聚酰胺柱纯化富集木犀草苷, 通过 Waters C<sub>18</sub> (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱, 以乙腈(A)-0.1% 磷酸(B)为流动相, 梯度洗脱, 流速为 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 检测波长 350 nm, 柱温 35 °C。结果: 木犀草苷进样量在 34.3 ~ 343.0 ng 线性关系良好 ( $r = 0.9997$ ); 方法回收率为 99.2%, RSD 3.3% ( $n = 6$ )。结论: 方法灵敏、简便、准确, 可用于双黄连注射液中木犀草苷的含量测定。

**[关键词]** 双黄连注射液; 木犀草苷; 反向高效液相; 含量测定

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)20-0082-03

## HPLC Determination of Luteoloside in Shuanghuanglian Injection

FAN Lei-lei<sup>1\*</sup>, LIU Nai-qiang<sup>1</sup>, WANG Xue-qin<sup>1</sup>, LI Zhen-guo<sup>1</sup>, XING Xiang-wei<sup>2</sup>

(1. Henan Province Institute for Food and Drug Control, Zhengzhou 450003, China;

2. Henan College of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450003, China)

**[Abstract]** **Objective:** To establish an HPLC method to determine the content of luteoloside in Shuanghuanglian Injection. **Method:** Purification and enrichment of luteoloside were performed through polyamide column. The Waters C<sub>18</sub> (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) column was adopted. The mobile phase consisted of acetonitrile (A)-0.1% phosphoric acid (B) with gradient elution at the flow rate of 1.0 mL·min<sup>-1</sup>. The detection wavelength was at 350 nm, and the column temperature was set at 35 °C. **Result:** The linear range of luteoloside was 34.3-343.0 ng ( $r = 0.9997$ ), and the average recovery was 99.2% with RSD of 3.3% ( $n = 6$ ).

**[收稿日期]** 20110504(010)

**[基金项目]** 河南省科技厅重点科技攻关项目(102102310017)

**[通讯作者]** \* 樊磊磊, 主管药师, 硕士, 从事药品质量标准及化学物质的非法添加检测研究, Tel: 13523446978, E-mail: fan2lei@qq.com

在等度洗脱条件下, 当有机溶剂比例较高时, 流动相洗脱能力强, 色谱图信息多, 但色谱峰分离度较差; 当有机溶剂比例较低时, 洗脱能力弱, 色谱峰分离度得到改善, 但色谱图信息比较少, 洗脱时间延长。因此, 本试验采用梯度洗脱, 在经反复试验后, 比较了乙腈-水, 乙腈-缓冲盐等不同流动相体系, 最终确定了比较理想的色谱条件。

### [参考文献]

- [1] 陈小新, 原素, 蒋东旭, 等. HPLC 法同时测定妇炎康灌肠剂中小檗碱和丹酚酸 B 的含量[J]. 中药新药与临床药理, 2008, 19(5): 393.
- [2] 周玉新. 中药指纹图谱技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2002: 31.

- [3] 周建良, 齐炼文, 李萍. 色谱指纹图谱在中药质量控制中的应用[J]. 色谱, 2008, 26(2): 153.
- [4] 艾立, 罗国安, 王义明. 腰痛宁胶囊 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中成药, 2008, 30(10): 1409.
- [5] 王文燕, 赵强, 张铁军, 等. 牛黄降压丸的高效液相指纹图谱研究[J]. 中草药, 2010, 41(1): 56.
- [6] 马瑛, 刘芳, 柴世伟. 化癥通脉汤的 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中草药, 2010, 41(3): 398.
- [7] 王祥红, 谢培山, 田润涛, 等. 复方中成药保济丸的 HPLC-DAD 指纹图谱研究[J]. 中国中药杂志, 2007, 32(17): 1748.

[责任编辑 蔡仲德]