

最佳,故以其为流动相。

3.4 检测波长选择 原儿茶酸、原儿茶醛最大吸收波长为273 nm,而其他成分均为327 nm。因此,本实验采用波长转换法,可使各成分均在其最大吸收波长下进行测定,从而提高了分析灵敏度,减小了测定误差。

3.5 化学计量学研究 聚类分析显示,10批样品大体上被聚为3类,第1类20180301、20180401、20190301、20190302、20190303、20190401,第2类20180304、20180402、20180403,第3类20180101;主成分分析显示,前2个主成分基本可反映各成分全部信息,能以其对样品质量进行控制,其中主成分2主要反映咖啡酸含有量信息,而主成分1主要反映其他8种成分含有量信息,与聚类分析结果一致。

4 结论

本实验建立HPLC法同时测定外感风痧颗粒中原儿茶酸、新绿原酸、原儿茶醛、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、异绿原酸B、异绿原酸A、异绿原酸C的含有量,该方法准确、灵敏、可靠,重复性好,可用于该制剂的质量控制。

参考文献:

[1] 罗宇东,陆施衡,谭安蕾,等.无糖型外感风痧颗粒质量

标准的研究[J].中国当代医药,2017,24(25):125-129.

- [2] 刘娟秀,罗益远,刘训红,等.不同采收期苍耳草中酚酸类及萜醌类成分的动态积累分析[J].中草药,2016,47(7):1204-1209.
- [3] 张琳,王叶飞,徐丽珍.藤苦参化学成分研究[J].中国药理学杂志,2007,42(6):420-422.
- [4] 郭新东,安林坤,徐迪,等.中药山芝麻的化学成分研究(I)[J].中山大学学报(自然科学版),2003,42(2):52-55.
- [5] 杜冰璽,杨鑫瑶,冯晓,等.岗梅的化学成分和药理作用研究进展[J].中国中药杂志,2017,42(1):20-28.
- [6] 刘华钢,黄秋洁,赖茂祥.中药两面针的研究概况[J].时珍国医国药,2007,18(1):222-223.
- [7] 梁侨丽,闵知大.咸虾花化学成分的研究[J].中国中药杂志,2003,28(3):235-237.
- [8] 邱淮,陈新,章慧.咸虾花的化学成分研究[J].安徽农业科学,2018,46(4):181-183.
- [9] 苏丹,高玉桥,梅全喜.山芝麻药材中6个三萜类成分及总三萜的含量测定[J].时珍国医国药,2016,27(5):1038-1040.
- [10] 孙科,陈冉,陆世惠.双波长HPLC法同时测定两面针药材中5种成分的含量[J].中国药房,2017,28(3):393-396.
- [11] 刘娟秀,罗益远,刘训红,等.HPLC法同时测定苍耳类药材中酚酸及萜醌类成分的含量[J].天然产物研究与开发,2016,28(6):880-888.
- [12] 刘雯,郭海蛟,刘进宝,等.HPLC法同时测定外感风痧颗粒中4种成分[J].广西科学,2019,26(5):539-542.

HPLC法同时测定紫白栓中9种成分

吴学辉,肖钦,肖淋,程心玲*,潘艳琳
(福建中医药大学附属人民医院药学部,福建福州350004)

摘要:目的 建立HPLC法同时测定紫白栓(紫草、大黄、白及等)中贝母兰宁、山药素Ⅲ、乙酰紫草素、 β -乙酰氧基异戊酰阿卡宁、异丁酰紫草素、 β , β' -二甲基丙烯酰阿卡宁、异戊酰紫草素、芦荟大黄素、大黄素甲醚的含有量。方法 该药物70%甲醇提取液的分析采用Waters Symmetry C₁₈色谱柱(250 mm×4.6 mm,5 μ m);流动相乙腈-0.1%甲酸,梯度洗脱;体积流量1.0 mL/min;柱温30 $^{\circ}$ C;检测波长254、275 nm。结果 9种成分在各自范围内线性关系良好($r \geq 0.9991$),平均加样回收率96.98%~100.03%,RSD 0.72%~1.64%。结论 该方法简便、准确、可靠,可用于紫白栓的质量控制。

关键词:紫白栓;化学成分;HPLC

中图分类号:R927.2

文献标志码:A

文章编号:1001-1528(2020)08-1991-05

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2020.08.006

收稿日期:2020-02-03

基金项目:福建省科技厅引导性项目(2018Y0043)

作者简介:吴学辉(1973—),男,副主任药师,从事药物质量控制等医院药学相关工作。Tel:(0591)86250178,13799327577

*通信作者:程心玲(1964—),男,主任药师,从事药物质量控制等医院药学相关工作。Tel:(0591)83946560,13705915758,

E-mail:821614848@qq.com

Simultaneous determination of nine constituents in Zibai Suppository by HPLC

WU Xue-hui, XIAO Qin, XIAO Lin, CHENG Xin-ling*, PAN Yan-lin

(Department of Pharmacy, The People's Hospital Affiliated to Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350004, China)

ABSTRACT: AIM To establish an HPLC method for the simultaneous content determination of coelonin, batatasin III, acetylshikonin, β -acetoxisovalerylalkannin, isobutylshikonin, β , β' -dimethylacrylalkannin, isovalerylshikonin, aloe-emodin and physcion in Zibai Suppository (*Arnebiae Radix*, *Rhei Radix et Rhizoma*, *Bletillae Rhizoma*, etc.). **METHODS** The analysis of 70% methanol extract of this drug was performed on a 30 °C thermostatic Waters Symmetry C₁₈ chromatographic column (250 mm×4.6 mm, 5 μ m), with the mobile phase comprising of acetonitrile-0.1% formic acid flowing at 1.0 mL/min in a gradient elution manner, and the detection wavelengths were set at 254, 275 nm. **RESULTS** Nine constituents showed good linear relationships within their own ranges ($r \geq 0.999$), whose average recoveries were 96.98% - 100.03% with the RSDs of 0.72% - 1.64%. **CONCLUSION** This simple, accurate and reliable method can be used for the quality control of Zibai Suppository.

KEY WORDS: Zibai Suppository; chemical constituents; HPLC

紫白栓为福建中医药大学附属人民医院制剂紫白膏(闽药制字 Z06106031)改进而来,由紫草、大黄、白及、煅石膏、冰片 5 味药材组成,主要用于内外痔、肛裂、肛周炎之血热证等病症的治疗,可有效防治混合痔术后便时出血^[1-2],更快减轻肛缘水肿和疼痛症状^[3-5];通过刺激血管内皮生长因子的表达来诱导血管新生,改善局部组织的缺血状态,促进手术创面的愈合^[6-8];有效缓解湿热下注型肛裂术后肛门局部疼痛^[9],具有良好的临床应用价值,但其现行标准仅有药味 TLC 定性鉴别及栓剂通则项检查。因此,本实验采用 HPLC 法同时测定紫白栓中紫草所含乙酰紫草素、 β -乙酰氧基异戊酰阿卡宁、异丁酰紫草素、 β , β' -二甲基丙烯酸酰阿卡宁、异戊酰紫草素,大黄所含芦荟大黄素、大黄素甲醚,白及所含贝母兰宁、山药素 III 的含有量,以期为提高其质量分析水平、完善其质量控制标准、全面评价其内在质量提供参考依据。

1 材料

Waters 2695 型高效液相色谱仪(美国 Waters 公司); MS103DU 型电子分析天平(瑞士 Mettler-Toledo 公司)。 β , β' -二甲基丙烯酸酰阿卡宁(批号 111689-201805, CAS 号 34539-65-6, 纯度 98.0%)、芦荟大黄素(批号 110795-201710, CAS 号 481-72-1, 纯度 98.3%)、大黄素甲醚(批号 110758-201817, CAS 号 521-61-9, 纯度 99.2%)对照品均购于中国食品药品检定研究院;贝母兰宁(批号 CFS201801, CAS 号 82344-82-9, 纯度 98.0%)、

山药素 III(批号 CFS201802, CAS 号 56684-87-8, 纯度 98.0%)对照品均购于武汉天植生物技术有限公司;乙酰紫草素(批号 16030121, CAS 号 24502-78-1, 纯度 99.7%)、 β -乙酰氧基异戊酰阿卡宁(批号 14071422, CAS 号 69091-17-4, 纯度 99.9%)、异戊酰紫草素(批号 18040322, CAS 号 76549-35-4, 纯度 98.0%)对照品均购于上海同田生物技术股份有限公司;异丁酰紫草素(批号 Y-189-170410, CAS 号 52438-12-7, 纯度 98.0%)对照品购于成都瑞芬思生物科技有限公司。紫白栓(每粒重 1.7 g, 批号 190805、190812、190827)来源于福建中医药大学附属人民医院。乙腈为色谱纯;其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 溶液制备

2.1.1 对照品溶液 精密称取各对照品适量,70% 甲醇制成含贝母兰宁 0.152 mg/mL、山药素 III 0.318 mg/mL、乙酰紫草素 0.796 mg/mL、 β -乙酰氧基异戊酰阿卡宁 0.374 mg/mL、异丁酰紫草素 0.292 mg/mL、 β , β' -二甲基丙烯酸酰阿卡宁 0.434 mg/mL、异戊酰紫草素 0.932 mg/mL、芦荟大黄素 0.258 mg/mL、大黄素甲醚 0.112 mg/mL 的贮备液,各精密吸取 2.5 mL,置于 50 mL 量瓶中,70% 甲醇稀释,即得(各成分质量浓度分别为 7.6、15.9、39.8、18.7、14.6、21.7、46.6、12.9、5.6 μ g/mL)。

2.1.2 供试品溶液 取栓剂适量,剪碎,混匀,

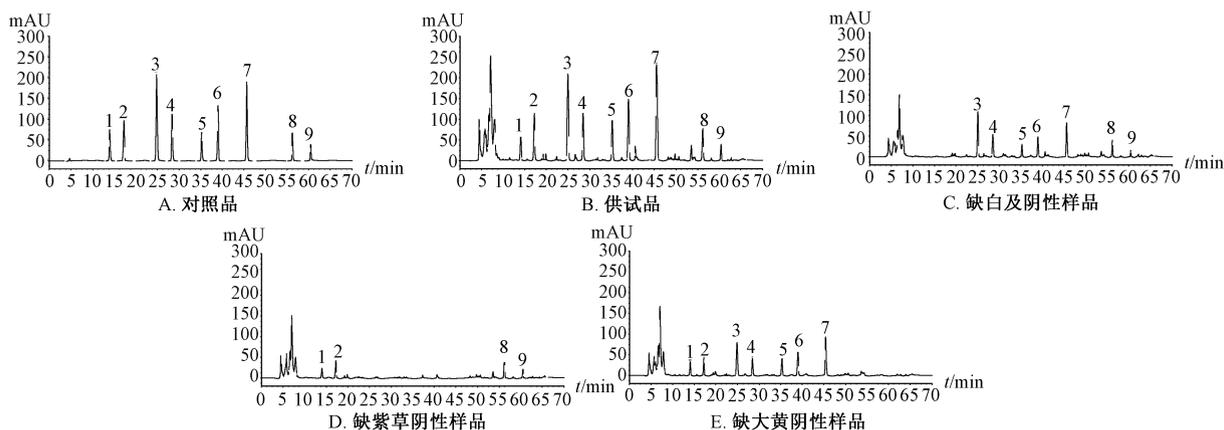
精密称取 2.0 g，置于具塞锥形瓶中，精密加入 25 mL 70% 甲醇^[10-11]，密塞，称定质量，加热回流提取 30 min，取出，放冷，70% 甲醇补足减失的质量，摇匀，滤过，即得。

2.1.3 阴性样品溶液 按栓剂处方工艺，分别制备缺白及、缺紫草、缺大黄的阴性样品，按“2.1.2”项下方法制备，即得。

2.2 色谱条件 Waters Symmetry C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm)；流动相乙腈 (A) - 0.1% 甲酸 (B)，梯度洗脱 (0~11.0 min, 40.0% A；11.0~20.0 min, 40.0%~55.0% A；20.0~48.0 min, 55.0%~76.0% A；48.0~62.0 min, 76.0%~85.0% A；62.0~70.0 min, 85.0%~

40.0% A)；体积流量 1.0 mL/min；柱温 30 ℃；检测波长 275 nm (0~48.0 min, 贝母兰宁、山药素 III、乙酰紫草素、β-乙酰氧基异戊酰阿卡宁、异丁酰紫草素、β, β'-二甲基丙烯酸酯阿卡宁和异戊酰紫草素^[12-17])、254 nm (48.0~70.0 min, 芦荟大黄素、大黄素甲醚^[12,18])；进样量 10 μL。

2.3 专属性试验 取对照品、供试品、阴性样品溶液适量，在“2.2”项色谱条件下进样测定，结果见图 1。由此可知，色谱图基线平稳，各成分与其他杂质峰均能达到有效分离 (分离度均>1.5)，理论塔板数均不低于 4 500，阴性无干扰，表明该方法专属性良好。



1. 贝母兰宁 2. 山药素 III 3. 乙酰紫草素 4. β-乙酰氧基异戊酰阿卡宁 5. 异丁酰紫草素 6. β, β'-二甲基丙烯酸酯阿卡宁
7. 异戊酰紫草素 8. 芦荟大黄素 9. 大黄素甲醚

1. coelonin 2. batatasin III 3. acetylshikonin 4. β-acetoxyisovalerylalkannin 5. isobutylshikonin 6. β, β-dimethylacrylalkannin
7. isovalerylshikonin 8. aloe-emodin 9. physcion

图 1 各成分 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of various constituents

2.4 线性关系考察 精密量取“2.1.1”项下贮备液 0.1、0.2、0.5、1.0、1.5、2.0 mL，置于 20 mL 量瓶中，70% 甲醇稀释，在“2.2”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。

表 1 各成分线性关系

Tab. 1 Linear relationships of various constituents

成分	回归方程	r	线性范围/(μg·mL ⁻¹)
贝母兰宁	$Y=7.3549 \times 10^5 X+285.5$	0.999 4	0.76~15.20
山药素 III	$Y=1.3861 \times 10^6 X-400.7$	0.999 7	1.59~31.80
乙酰紫草素	$Y=1.5772 \times 10^6 X+1021.3$	0.999 1	3.98~79.60
β-乙酰氧基异戊酰阿卡宁	$Y=1.4956 \times 10^6 X+765.9$	0.999 6	1.87~37.40
异丁酰紫草素	$Y=1.1204 \times 10^6 X+436.1$	0.999 9	1.46~29.20
β, β'-二甲基丙烯酸酯阿卡宁	$Y=1.7839 \times 10^6 X-1074.8$	0.999 6	2.17~43.40
异戊酰紫草素	$Y=1.5946 \times 10^6 X+1006.4$	0.999 5	4.66~93.20
芦荟大黄素	$Y=9.2215 \times 10^5 X-566.0$	0.999 5	1.29~25.80
大黄素甲醚	$Y=7.1672 \times 10^5 X+690.2$	0.999 2	0.56~11.20

2.5 精密度试验

2.5.1 日内精密度 精密吸取“2.3”项下对照品溶液，同一天内在“2.2”项色谱条件下进样测定，测得贝母兰宁、山药素Ⅲ、乙酰紫草素、β-乙酰氧基异戊酰阿卡宁、异丁酰紫草素、β，β'-二甲基丙烯酰阿卡宁、异戊酰紫草素、芦荟大黄素、大黄素甲醚峰面积 RSD 分别为 1.15%、0.97%、0.83%、1.02%、1.21%、0.58%、0.43%、1.19%、0.92%，表明该方法日内精密度良好。

2.5.2 日间精密度 精密吸取“2.3”项下对照品溶液，在“2.2”项色谱条件下进样测定 3 d，测得贝母兰宁、山药素Ⅲ、乙酰紫草素、β-乙酰氧基异戊酰阿卡宁、异丁酰紫草素、β，β'-二甲基丙烯酰阿卡宁、异戊酰紫草素、芦荟大黄素、大黄素甲醚峰面积 RSD 分别为 1.46%、1.15%、0.98%、1.24%、1.59%、0.71%、0.55%、1.47%、1.06%，表明该方法日间精密度良好。

2.6 重复性试验 取同一批栓剂（批号 190805）适量，按“2.1.2”项下方法平行制备 6 份供试品溶液，在“2.2”项色谱条件下进样测定，测得贝母兰宁、山药素Ⅲ、乙酰紫草素、β-乙酰氧基异戊酰阿卡宁、异丁酰紫草素、β，β'-二甲基丙烯酰阿卡宁、异戊酰紫草素、芦荟大黄素、大黄素甲醚含有量 RSD 分别为 1.83%、0.65%、1.43%、1.62%、0.68%、0.55%、1.09%、1.74%、0.89%，表明该方法重复性良好。

2.7 稳定性试验 取同一份供试品溶液，于 0、2、4、6、12、24 h 在“2.2”项色谱条件下进样测定，测得贝母兰宁、山药素Ⅲ、乙酰紫草素、β-乙酰氧基异戊酰阿卡宁、异丁酰紫草素、β，β'-二甲基丙烯酰阿卡宁、异戊酰紫草素、芦荟大黄素、大黄素甲醚峰面积 RSD 分别为 1.23%、0.91%、0.75%、0.83%、1.05%、0.68%、0.59%、1.13%、1.29%，表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.8 加样回收率试验 取各成分含有量已知的同一批栓剂（批号 190805）适量，剪碎，混匀，精密称取 9 份，每份 1.0 g，置于具塞锥形瓶中，精密加入含贝母兰宁 0.084 mg/mL、山药素Ⅲ 0.216 mg/mL、乙酰紫草素 0.482 mg/mL、β-乙酰氧基异戊酰阿卡宁 0.246 mg/mL、异丁酰紫草素 0.198 mg/mL、β，β'-二甲基丙烯酰阿卡宁 0.284 mg/mL、异戊酰紫草素 0.652 mg/mL、芦荟大黄素 0.176 mg/mL、大黄素甲醚 0.062 mg/mL 的对照品溶液 0.5、1.0、1.5 mL 各 3 份，使各成分

对照品加入量分别约为样品原有量的 50%、100%、150%，按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液，在“2.2”项色谱条件下进样测定，计算回收率。结果，贝母兰宁、山药素Ⅲ、乙酰紫草素、β-乙酰氧基异戊酰阿卡宁、异丁酰紫草素、β，β'-二甲基丙烯酰阿卡宁、异戊酰紫草素、芦荟大黄素、大黄素甲醚平均加样回收率分别为 98.91%、99.16%、100.03%、98.49%、97.91%、97.80%、99.91%、96.98%、98.65%，RSD 分别为 0.98%、1.08%、0.83%、1.64%、1.13%、1.22%、0.72%、1.11%、0.81%。

2.9 样品含有量测定 取 3 批栓剂，按“2.1.2”项下方法制备 3 份供试品溶液，在“2.2”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 (mg/g)

Tab. 2 Results of content determination of various constituents (mg/g)

成分	批号		
	190805	190812	190827
贝母兰宁	0.086	0.075	0.091
山药素Ⅲ	0.217	0.199	0.226
乙酰紫草素	0.483	0.518	0.437
β-乙酰氧基异戊酰阿卡宁	0.249	0.270	0.226
异丁酰紫草素	0.195	0.178	0.211
β,β'-二甲基丙烯酰阿卡宁	0.281	0.302	0.256
异戊酰紫草素	0.647	0.591	0.704
芦荟大黄素	0.174	0.159	0.197
大黄素甲醚	0.062	0.055	0.068

3 讨论

3.1 指标成分筛选 在紫白栓组成药材中，乙酰紫草素、β-乙酰氧基异戊酰阿卡宁、异丁酰紫草素、β，β'-二甲基丙烯酰阿卡宁、异戊酰紫草素为紫草代表性成分，芦荟大黄素、大黄素甲醚为大黄代表性成分，贝母兰宁、山药素Ⅲ为白及代表性成分。本实验选取上述 9 种成分作为指标，可更全面地评价紫白栓整体质量。

3.2 流动相筛选 本实验考察了甲醇-0.1% 磷酸^[12,18]、乙腈-0.1% 磷酸^[11,14]、乙腈-0.1% 甲酸^[10,13,15-17]，发现以乙腈-0.1% 甲酸洗脱时各成分色谱峰形良好，分离度符合要求，基线平稳，进而对该流动相比比例不断进行摸索，最终确定为“2.2”项下梯度洗脱程序。

3.3 供试品溶液制备方法筛选 本实验考察了提取溶剂（95% 乙醇^[13]、甲醇^[14-15,18]、70% 甲醇^[10-11]）、提取方式（加热回流提取、超声提取^[10-11,14-18]）、提取时间（15、30、60 min），发现以 70% 甲醇为提取溶剂时各成分综合提取效果最

佳;加热回流提取效果优于超声提取;提取30 min时各成分即可提取完全,杂质干扰程度明显小于提取60 min时,同时对提取溶剂用量不断进行摸索。最终确定,供试品溶液制备方法为25 mL 70%甲醇加热回流提取30 min。

3.4 检测波长筛选 采用二极管阵列检测器,在190~400 nm范围内对各成分对照品溶液进行全波长扫描,发现贝母兰宁、山药素Ⅲ分别在274.5、270.0 nm处有较大吸收,乙酰紫草素、 β -乙酰氧基异戊酰阿卡宁、异丁酰紫草素、 β , β' -二甲基丙烯酸酰阿卡宁、异戊酰紫草素均在275 nm附近有较大吸收,芦荟大黄素、大黄素甲醚均在254 nm处有较大吸收。同时,参考2015年版《中国药典》紫草、大黄药材项^[12]及文献[13-18]报道,分别选取275、254 nm进行研究,发现单一波长难以同时对各成分进行检测,通过不断摸索,最终确定为“2.2”项下检测波长。

4 结论

本实验首次采用HPLC法同时测定紫白栓中贝母兰宁、山药素Ⅲ、乙酰紫草素、 β -乙酰氧基异戊酰阿卡宁、异丁酰紫草素、 β , β' -二甲基丙烯酸酰阿卡宁、异戊酰紫草素、芦荟大黄素、大黄素甲醚的含有量,建立了该制剂多指标成分质量分析模式,而且该方法操作便捷,结果准确,重复性好,可用于其质量控制。

参考文献:

[1] 蔡而玮,吴燕燕,许圳鹏.紫白膏对混合痔术后出血的临床和实验研究[J].中医临床研究,2014,6(30):104-106.
[2] 蔡而玮,吴燕燕,胡士强,等.紫白膏治疗痔病100例临床观察[J].福建中医药,2011,42(1):26-27.
[3] 蔡而玮,吴燕燕.紫白膏治疗混合痔术后水肿的临床研究[J].中华中医药杂志,2013,28(9):2785-2787.
[4] 郑文彬,刘燕,吴燕燕,等.紫白膏加硫酸镁溶液合微波治疗混合痔术后水肿的临床观察60例[J].福建中医药

大学学报,2013,23(5):63-64.
[5] 陈美,胡少红,林丰兰.紫白膏换药对混合痔术后病人肛缘水肿的效果观察[J].护理研究,2015,29(12):1489-1490.
[6] 吴燕燕,蔡而玮,赵诚.紫白膏促进创面血管内皮生长因子表达的研究[J].内蒙古中医药,2015,34(12):90-91.
[7] 蔡而玮,赵诚,吴燕燕.基于NF- κ B因子研究紫白膏促进混合痔术后创面修复的作用机制[J].时珍国医国药,2014,25(3):589-591.
[8] 石荣,王菁.紫白膏促进湿热下注型混合痔术后创面愈合临床观察[J].中国中医急症,2009,18(12):1971;2013.
[9] 王菁,石荣.紫白膏治疗湿热下注型肛裂术后疼痛70例[J].福建中医药,2014,45(5):23-25.
[10] 蒋福升,沈徐婷,姚玥,等.不同来源白及中3个主要化学成分的含量比较[J].中国中药杂志,2019,44(13):2762-2767.
[11] 刘月红,黄政海,董玲,等.高效液相色谱法同时测定大黄中14种成分的含量[J].中国中药杂志,2017,42(23):4514-4519.
[12] 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,2015:23-24;340-341.
[13] 蒋福升,李美芽,盛振华,等.白及提取物对炎症因子抑制活性的谱效关系分析[J].中药材,2018,41(11):2655-2661.
[14] 刘刚,丁志山,刘育辰,等.白及药材的HPLC指纹图谱建立及聚类分析[J].中国药房,2018,29(22):3050-3053.
[15] 赵文文,吴智敏,吴霞,等.一测多评法测定新疆紫草中主要萘醌类成分的含量[J].中国中药杂志,2016,41(20):3792-3797.
[16] 管珂,郑凤雅,刘杰,等.HPLC测定新疆紫草不同部位中8种羟基萘醌的含量[J].中国中药杂志,2017,42(13):2532-2537.
[17] 丁文欢,燕雪花,葛亮,等.HPLC法测定新疆软紫草属4种植物根中萘醌类成分[J].中成药,2019,41(4):936-939.
[18] 龚小红,赵梦杰,党珏,等.基于主成分分析不同产地大黄13个成分量的比较研究[J].中草药,2017,48(23):4994-4999.