

# HPLC法同时测定连丹乳膏中蛇床子素和丹皮酚的含量<sup>Δ</sup>

赵 军\*,张婷婷,杨蒙蒙,刘 梅<sup>#</sup>(第四军医大学唐都医院药剂科,西安 710038)

中图分类号 R283.62\*1;R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)35-3300-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.35.12

**摘要** 目的:建立同时测定连丹乳膏中蛇床子素和丹皮酚含量的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为Inertsil ODS-3(250 mm×4.6 mm,5 μm),流动相为甲醇-水(75:25, V/V),流速为1.0 ml/min,检测波长为297 nm,柱温为室温。结果:蛇床子素、丹皮酚质量浓度分别在1.03~103.00、1.142~114.200 μg/ml范围内与各自峰面积积分值呈良好线性关系( $r$ 均为0.999 9);精密性、稳定性、重复性试验的RSD<1%;平均加样回收率分别为99.51%和99.46%,RSD分别为1.84%和1.38%( $n$ 均为9)。结论:该方法简便、快速、专属性强,结果准确、可靠,可用于连丹乳膏的质量控制。

**关键词** 连丹乳膏;蛇床子素;丹皮酚;高效液相色谱法;含量测定

## Simultaneous Determination of Osthole and Paeonol in Liandan Cream by HPLC

ZHAO Jun, ZHANG Ting-ting, YANG Meng-meng, LIU Mei(Dept. of Pharmacy, Tangdu Hospital of Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To establish a method for simultaneous determination of osthole and paeonol in Liandan cream. METHODS: HPLC method was adopted. The separation was performed on a Inertsil ODS-3 (250 mm×4.6 mm, 5 μm) column with mobile phase consisted of methanol-water (25:75, V/V) at the flow rate of 1.0 ml/min. The detection wavelength was 297 nm, and column temperature was room temperature. RESULTS: The calibration curves were linear within the range 1.03-103.00 μg/ml for osthole ( $r=0.999\ 9$ ) and 1.142-114.2 μg/ml for paeonol ( $r=0.999\ 9$ ). RSDs of precision, stability and reproducibility tests were all lower than 1%. The average recoveries were 99.51% (RSD=1.84%,  $n=9$ ) and 99.46% (RSD=1.38%,  $n=9$ ), respectively. CONCLUSIONS: This method is simple, rapid, specific, accurate and reliable, and can be used for the quality control of Liandan cream.

**KEYWORDS** Liandan cream; Osthole; Paeonol; HPLC; Content determination

紫外线可引起皮肤光损伤,导致一系列皮肤疾病。中药中的许多有效成分不但具有防紫外线辐射的能力,而且具有抗炎、抗过敏、抗氧化等作用,可有效对抗紫外线辐射对细胞造成的损伤,且不良反应轻微。连丹乳膏是我院研发的一种主要用于日光性皮肤病治疗的外用制剂,可对抗整个波段的紫外线辐射,对皮肤形成有效保护。方中含有的蛇床子素和丹皮酚是其有效成分,目前对这两种成分主要采用高效液相色谱(HPLC)法分别测定。本试验建立了HPLC法在同一波长下同时测定连丹乳膏中蛇床子素和丹皮酚含量的方法,以用于该制剂的质量控制。

## 1 材料

### 1.1 仪器

1200型HPLC仪,包括四元梯度泵、可变波长检测器、色谱工作站(美国Agilent公司);CP225D型电子分析天平(德国Sartorius公司);BL-620S型电子天平(日本岛津公司);KH5200DV型数控超声波清洗器(昆山禾创超声仪器有限公司)。

### 1.2 药品与试剂

<sup>Δ</sup> 基金项目:陕西省中医管理局中医药科研课题(No.zy40)

\* 药师。研究方向:医院制剂。电话:029-84778232。E-mail: feifly2002@126.com

<sup>#</sup> 通信作者:副主任药师。研究方向:医院制剂。电话:029-84777626。E-mail: liumei@fmmu.edu.cn

连丹乳膏(第四军医大学唐都医院药剂科自制,批号:121115、121202、130117);蛇床子素、丹皮酚对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为110822-200305、110708-200506);灭菌注射用水(山东辰欣药业股份有限公司,批号:1212075205);甲醇为色谱纯。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

色谱柱:Inertsil ODS-3(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:甲醇-水(75:25, V/V);流速:1.0 ml/min;检测波长:297 nm;柱温:室温;进样量:10 μl。

### 2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液的制备 精密称取蛇床子素对照品5.15 mg、丹皮酚对照品5.71 mg,分别置10 ml量瓶中,加甲醇适量使溶解并稀释至刻度,摇匀,即得对照品贮备液。精密量取上述贮备液各6 ml,置同一100 ml量瓶中,加甲醇定容,即得蛇床子素、丹皮酚质量浓度分别为30.90、34.26 μg/ml的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备 取连丹乳膏约0.6 g,精密称定,置100 ml锥形瓶中,加甲醇40 ml,超声(功率:200 W,频率:40 kHz)处理30 min,放冷,转移至50 ml量瓶中,甲醇稀释至刻度,摇匀,用0.45 μm微孔滤膜滤过,取续滤液1 ml,置3 ml量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,即得。

2.2.3 阴性对照溶液的制备 按处方制备不含蛇床子素和丹

皮酚的阴性样品,按“2.2.2”项下方法操作,即得。

### 2.3 系统适用性试验

取混合对照品、供试品与阴性对照溶液各适量,按上述色谱条件进样测定。结果表明,在此色谱条件下,样品中的各组分达到基线分离,样品中其他成分对蛇床子素和丹皮酚的测定无干扰。色谱见图1。

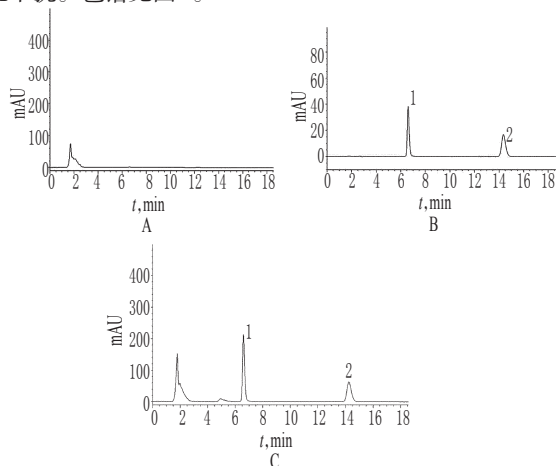


图1 高效液相色谱图

A.阴性对照;B.混合对照品;C.供试品;1.蛇床子素;2.丹皮酚

Fig 1 HPLC chromatograms

A.negative control; B.substance control; C.test sample; 1.osthole; 2. paeonol

### 2.4 线性关系考察

分别精密量取蛇床子素和丹皮酚对照品贮备液适量,置20 ml量瓶中,用甲醇稀释至刻度,摇匀,制成质量浓度分别为1.03、5.15、10.30、30.90、51.50、103.00  $\mu\text{g/ml}$ 的蛇床子素对照品溶液和质量浓度分别为1.142、5.710、11.420、34.260、57.100、114.200  $\mu\text{g/ml}$ 的丹皮酚对照品溶液,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱峰。分别以峰面积积分值( $y$ )为纵坐标,对照品溶液质量浓度( $x, \mu\text{g/ml}$ )为横坐标,进行线性回归,得回归方程。蛇床子素回归方程为 $y=22.775x-6.7222$ ( $r=0.9999, n=6$ ),表明质量浓度在1.03~103.00  $\mu\text{g/ml}$ 范围内与其峰面积各分值呈良好线性关系;丹皮酚回归方程为 $y=22.785x-15.056$ ( $r=0.9999, n=6$ ),表明质量浓度在1.14~114.17  $\mu\text{g/ml}$ 范围内与其峰面积积分值呈良好线性关系。

### 2.5 精密度试验

精密量取混合对照品溶液10  $\mu\text{l}$ ,按“2.1”项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果显示,蛇床子素和丹皮酚的RSD分别为0.30%和0.10%( $n$ 均为6),表明仪器精密度良好。

### 2.6 重复性试验

精密称取同一批样品(批号:121115)6份,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,记录峰面积。结果显示,蛇床子素和丹皮酚的RSD分别为0.78%和0.86%( $n$ 均为6),表明本方法重复性良好。

### 2.7 稳定性试验

将供试品溶液在室温下放置,精密量取同一批号的供试品溶液适量,分别于0、2、4、8、12 h按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果显示,蛇床子素和丹皮酚的RSD分别为0.34%和0.84%( $n$ 均为5),表明供试品溶液在12 h内基本稳定。

### 2.8 加样回收率试验

精密称取已知含量的连丹乳膏(批号:121115)适量,共9

份,分别置5 ml量瓶中,每3份为一组,按低、中、高3种质量浓度分别精密加入混合对照品溶液适量,照“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,照“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积,计算加样回收率,结果见表1。

表1 加样回收率试验结果( $n=9$ )

Tab 1 Results of recovery tests( $n=9$ )

组分	样品含量, $\mu\text{g}$	加入量, $\mu\text{g}$	测得量, $\mu\text{g}$	回收率, %	$\bar{x}$ , %	RSD, %
蛇床子素	14.21	11.33	25.59	100.44		
	14.21	11.33	25.53	99.91		
	14.21	11.33	25.16	96.65		
	14.21	14.42	28.88	101.73		
	14.21	14.42	28.19	96.95	99.51	1.84
	14.21	14.42	28.56	99.51		
	14.21	17.30	31.33	98.96		
	14.21	17.30	31.84	101.91		
	14.21	17.30	31.43	99.54		
丹皮酚	16.93	13.70	30.72	100.66		
	16.93	13.70	30.48	98.91		
	16.93	13.70	30.29	97.52		
	16.93	16.85	33.93	100.89		
	16.93	16.85	33.41	97.80	99.46	1.38
	16.93	16.85	33.98	101.19		
	16.93	20.54	37.32	99.27		
	16.93	20.54	37.17	98.54		
	16.93	20.54	37.55	100.39		

### 2.9 样品含量测定

取3批样品,分别按“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,记录峰面积,再按外标法,以峰面积计算蛇床子素和丹皮酚在连丹乳膏中的含量,结果见表2。

表2 样品含量测定结果( $\text{mg/g}, n=3$ )

Tab 2 Results of content determination of samples ( $\text{mg/g}, n=3$ )

批号	蛇床子素	丹皮酚
121115	5.83	7.26
121202	5.83	7.22
130117	6.02	7.34

## 3 讨论

连丹乳膏以丹皮酚、蛇床子素为主要药效成分,蛇床子素具有抗氧化<sup>[1]</sup>、抗炎<sup>[2]</sup>、抗菌<sup>[3]</sup>、止痒<sup>[4]</sup>、抗衰老、抗病毒、抗诱变、抗过敏<sup>[5]</sup>等作用;丹皮酚具有抗细胞凋亡<sup>[6]</sup>、免疫调节<sup>[7]</sup>、抑菌<sup>[8]</sup>、解热镇痛<sup>[9]</sup>的作用。

本试验以甲醇配制一定质量浓度的蛇床子素和丹皮酚对照品溶液,在200~400 nm波长范围内扫描,结果在297 nm时有相交的吸收峰。在此检测波长下,两种有效成分的噪声响应小、基线平稳,检测灵敏度好。在该色谱条件下,两种有效成分均能完全分离、阴性样品无干扰。故本试验选用297 nm作为检测波长。在甲醇-水(75:25, V/V)流动相系统下,丹皮酚和蛇床子素峰的分离度达到要求,并与杂质峰能够达到基线分离,且可同时测定多个指标。

本试验采用HPLC法同时测定连丹乳膏中丹皮酚和蛇床子素的含量,方法简便,操作容易,结果准确、可靠,可用于该制剂的质量控制。

### 参考文献

[1] 谭晓红,田嘉铭,赵江磊,等.蛇床子素体外抗氧化性研究

# 不同产地斑蝥超微粉体的HPLC指纹图谱及斑蝥素的含量测定<sup>△</sup>

何杰<sup>1\*</sup>, 张水寒<sup>2</sup>, 李跃辉<sup>2</sup>, 万丹<sup>2</sup>, 黄江波<sup>2#</sup>(1.长沙市宁乡县中医医院, 湖南宁乡 410600; 2.湖南省中医药研究院, 长沙 410013)

中图分类号 R917; R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)35-3302-03  
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.35.13

**摘要** 目的: 结合斑蝥主要成分斑蝥素的含量测定与指纹图谱, 比较不同产地药材化学成分的差异性, 为科学评价不同产地斑蝥药材及其超微粉体的质量提供依据。方法: 建立斑蝥超微粉体指纹图谱检测方法。采用高效液相色谱(HPLC)法对各产地斑蝥超微粉体进行分析, 采用中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件比较指纹图谱的相似度, 采用SPSS 13.0统计软件对10批样品进行聚类分析, 并测定斑蝥素含量。结果: 不同产地斑蝥超微粉体指纹图谱有较大相似性, 但斑蝥素的含量有一定的差异。聚类分析结果表明, 不同产地斑蝥药材存在一定差异, 但差别不大。结论: 所建立的HPLC指纹图谱具有较好的精密性、重复性和稳定性, 结合斑蝥素的含量, 可为斑蝥药材及其超微粉体质量评价提供依据。

**关键词** 斑蝥; 超微粉体; 高效液相色谱法; 指纹图谱; 斑蝥素

## Study on the HPLC Fingerprints of *Spanish fly* Ultra-fine Powder from Different Producing Areas and Content Determination of Cantharidin

HE Jie<sup>1</sup>, ZHANG Shui-han<sup>2</sup>, LI Yue-hui<sup>2</sup>, WAN Dan<sup>2</sup>, HUANG Jiang-bo<sup>2</sup>(1.Changsha City Ningxiang County Hospital of TCM, Hunan Ningxiang 410600, China; 2.Hunan Academy of Chinese Medicine, Changsha 410013, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To compare the difference of chemical components in *Spanish fly* from different producing areas on the basis of content determination and fingerprints of cantharidin, and to provide reference for quality control of *S. fly* from different producing areas and its ultra-fine powder. METHODS: Established the fingerprint method of *S. fly* ultra-fine powder. *S. fly* ultra-fine powder were determined by HPLC. Chromatographic Fingerprint Similarity Evaluation software was used to analyze the similarity of HPLC fingerprint. Cluster analysis was conducted in 10 batches of sample by using SPSS 13.0 software, and the content of cantharidin was determined. RESULTS: The fingerprints of *S. fly* ultra-fine powder from different producing areas were similar to each other. The content of cantharidin had little difference. Cluster analysis showed that there was little difference in *S. fly* from different producing areas. CONCLUSIONS: Established HPLC fingerprint is precise, reproducible and stable, and combined with content determination of cantharidin to provide reference for quality evaluation of *S. fly* and its ultra-fine powder.

**KEYWORDS** *Spanish fly*; Ultra-fine powder; HPLC; Fingerprint; Cantharidin

斑蝥为芫青科昆虫南方大斑蝥 *Mylabris phalerata* Pallas 或黄黑小斑蝥 *M. cichorii* Linnaeus 的干燥体。其性辛、热, 有大毒, 归肝、胃、肾、大肠和小肠经, 具有攻毒蚀疮、逐瘀散结的功效<sup>[1]</sup>, 主治癰疽、经闭、顽癣、瘰疬、赘疣、痈疽不溃、恶疮死肌

等症。主产于辽宁、河南、广西、安徽、江苏、湖南、贵州等地区, 是我国首先发现的一种具有抗肿瘤作用的昆虫类药物<sup>[2]</sup>。入药始载于《神农本草经》, 其体内含有的斑蝥素具有较强的抗肿瘤活性, 为斑蝥药材的主要有效成分与质量评价指标。

- [1] 中成藥, 2013, 35(5): 1 070.
- [2] 于鹏霞, 喻婉莹, 阚伟娟, 等. 蛇床子素的抗炎作用及其机制[J]. 时珍国医国药, 2012, 23(4): 866.
- [3] 王勤, 李华文, 彭新生. 蛇床子素微乳的制备及其透皮能力的研究[J]. 中国药房, 2010, 21(27): 2 529.
- [4] 汪文来, 于智敏, 鞠大宏, 等. 蛇床子化学及药理研究进展[J]. 中国中医基础医学杂志, 2011, 17(6): 704.
- [5] 张春梅, 冯霞, 钟艺. 蛇床子的药理研究进展[J]. 实用药物

- 与临床, 2006, 9(1): 55.
- [6] 周军, 周丽, 侯德仁, 等. 丹皮酚对 $\text{A}\beta$ 诱导的AD模型大鼠脑细胞凋亡因子的影响及作用机理[J]. 中药材, 2011, 5(5): 758.
- [7] 黄茂芳, 刘玉梅, 朱慧兰, 等. 丹皮酚软膏对老年性皮肤瘙痒症免疫偏移的影响[J]. 中国老年学杂志, 2012, 7(32): 2 928.
- [8] 宋丹. 丹皮酚体外抑菌作用研究[J]. 医药导报, 2012, 9(31): 1 135.
- [9] 开伟华, 桂双英. O/W型丹皮酚微乳处方设计及质量评价[J]. 中成藥, 2012, 34(12): 2 313.

(收稿日期: 2013-09-02 修回日期: 2013-12-25)

<sup>△</sup> 基金项目: 湖南省自然科学基金资助项目(No.C190710)  
\* 药师, 硕士研究生。研究方向: 中药新制剂与新技术。电话: 0731-87899212。E-mail: 469948971@qq.com  
# 通信作者: 主任医师, 硕士研究生导师。研究方向: 中医内科。电话: 0731-84135156。E-mail: 1915954707@qq.com