

# HPLC法同时测定紫草凡士林中5种萘醌类化合物的含量<sup>Δ</sup>

姜云云<sup>1\*</sup>, 叶光明<sup>2#</sup>, 章杰兵<sup>3</sup>, 陈云红<sup>1</sup>(1. 解放军第101医院, 江苏 无锡 214044; 2. 解放军第98医院, 浙江 湖州 313000; 3. 南京军区联勤部药品仪器检验所, 南京 210002)

中图分类号 R283.62;R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)43-4084-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.43.18

**摘要** 目的:建立同时测定紫草凡士林中紫草素、乙酰紫草素、乙酰氧基异戊酰紫草素、异丁酰紫草素和 $\beta,\beta'$ -二甲基丙烯酰紫草素含量的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为Agilent Eclipse XDB-C<sub>18</sub>(250 mm×4.6 mm, 5  $\mu$ m),流动相为甲醇-乙腈-0.2%甲酸溶液(48:32:20, V/V/V),流速为1.0 ml/min,柱温为24  $^{\circ}$ C,检测波长为516 nm。结果:紫草素、乙酰紫草素、乙酰氧基异戊酰紫草素、异丁酰紫草素和 $\beta,\beta'$ -二甲基丙烯酰紫草素的质量浓度分别在7.12~71.20  $\mu$ g/ml( $r=0.999\ 4$ )、11.92~119.20  $\mu$ g/ml( $r=0.999\ 6$ )、4.07~40.70  $\mu$ g/ml( $r=0.999\ 7$ )、3.65~36.50  $\mu$ g/ml( $r=0.999\ 6$ )、5.11~51.10  $\mu$ g/ml( $r=0.999\ 5$ )范围内与各自峰面积积分值呈良好的线性关系;平均加样回收率分别为100.82%、101.49%、97.99%、100.29%、101.74%,RSD分别为3.03%、1.25%、1.75%、2.25%、2.31%( $n$ 均为6)。结论:该方法简单易行、结果准确、重复性好,适用于紫草凡士林的质量控制。

**关键词** 高效液相色谱法;紫草凡士林;紫草素;乙酰紫草素;乙酰氧基异戊酰紫草素;异丁酰紫草素; $\beta,\beta'$ -二甲基丙烯酰紫草素;含量测定

## Simultaneous Determination of 5 Naphthoquinone Derivatives in Zicao Vaseline by HPLC

JIANG Yun-yun<sup>1</sup>, YE Guang-ming<sup>2</sup>, ZHANG Jie-bing<sup>3</sup>, CHEN Yun-hong<sup>1</sup>(1.No.101 Hospital of PLA, Jiangsu Wuxi 214044, China; 2.No.98 Hospital of PLA, Zhejiang Huzhou 313000, China; 3.Institute of Drug and Instrument Inspection, Joint Service Division, Nanjing Military Command, Nanjing 210002, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To develop a method for simultaneous determination of shikonin, acetylshikonin,  $\beta$ -acetoxyisovalerylshikonin, isobutylshikonin and  $\beta,\beta'$ -dimethylacrylshikonin in Zicao vaseline. METHODS: HPLC method was adopted. The separation was carried out on an Agilent Eclipse XDB-C<sub>18</sub>(250 mm×4.6 mm, 5  $\mu$ m) column with mobile phase consisted of methanol-acetonitrile-0.2% formic acid(48:32:20, V/V/V) at the flow rate of 1.0 ml/min. The detection wavelength was set at 516 nm and the column temperature was 24  $^{\circ}$ C. RESULTS: The linear ranges of shikonin, acetylshikonin,  $\beta$ -acetoxyisovalerylshikonin, isobutylshikonin and  $\beta,\beta'$ -dimethylacrylshikonin were 7.12-71.20  $\mu$ g/ml( $r=0.999\ 4$ ), 11.92-119.20  $\mu$ g/ml( $r=0.999\ 6$ ), 4.07-40.70  $\mu$ g/ml( $r=0.999\ 7$ ), 3.65-36.50  $\mu$ g/ml( $r=0.999\ 6$ ) and 5.11-51.10  $\mu$ g/ml( $r=0.999\ 5$ ), respectively. The average recoveries were 100.82% (RSD=3.03%,  $n=6$ ), 101.49% (RSD=1.25%,  $n=6$ ), 97.99% (RSD=1.75%,  $n=6$ ), 100.29% (RSD=2.25%,  $n=6$ ) and 101.74% (RSD=2.31%,  $n=6$ ). CONCLUSIONS: This method is simple, feasible, accurate and reproducible. It can be used for quality control of Zicao vaseline.

**KEY WORDS** HPLC; Zicao vaseline; Shikonin; Acetylshikonin;  $\beta$ -acetoxyisovalerylshikonin; Isobutylshikonin;  $\beta,\beta'$ -dimethylacrylshikonin; Content determination

紫草为紫草科植物新疆紫草 *Arnebia euchroma* (Royle) Johnst. 或内蒙紫草 *A. guttata* Bunge 的干燥根<sup>[1]</sup>, 临床主要用于治疗血热毒盛、麻疹不透、水火烫伤等证<sup>[2-3]</sup>。现代药理学研究表明, 紫草中主要活性成分为萘醌类化合物, 包括紫草素及其衍生物, 这类物质具有抗菌、抗肿瘤、降血糖、保护肝脏、增强免疫等多种作用<sup>[4-5]</sup>。由于紫草萘醌极性较小, 提取物多为油性黏稠状物质, 不易保存, 且使用不便, 故笔者将紫草萘醌提取物溶于凡士林中制得紫草凡士林, 不仅可以直接作为皮肤科及烧伤科用药, 还可以作为药用原辅料与其他药物或基质制得复方乳膏或软膏剂。为确保产品质量, 本试验建立了以

高效液相色谱(HPLC)法同时测定紫草凡士林中5种萘醌类化合物含量的方法, 可为建立紫草凡士林的质量标准提供试验依据。

## 1 材料

### 1.1 仪器

1100型HPLC仪, 包括G1312A型二元泵、G1328A型手动进样器、G1314A型检测器(美国Agilent公司); SK7200H型超声仪(上海科导超声仪器有限公司); HA-202M型电子天平(日本A&D公司)。

### 1.2 中药饮片

紫草购于苏州市天灵中药饮片有限公司(批号: 110622-1), 经解放军第101医院药剂科陈云红主任药师鉴定为真品。

### 1.3 药品与试剂

紫草凡士林(解放军第101医院制剂室自制, 批号:

<sup>Δ</sup> 基金项目: 全军医药卫生科研基金资助课题(No. 11MA012)

\* 主管药师, 博士。研究方向: 药物分析。电话: 0510-85142254。E-mail: jane\_jyy9@hotmail.com

# 通信作者: 副主任药师, 硕士。研究方向: 医院药学。E-mail: shygm8@hotmail.com

20120326、20120411、20120415);白凡士林(药用辅料,南昌白云药业有限公司);紫草素、乙酰紫草素对照品(上海同田生物技术股份有限公司,批号分别为11120331、10949-2001,纯度均>98%); $\beta,\beta'$ -二甲基丙烯酰紫草素对照品(中国食品药品检定研究院,批号:111689-200502);乙酰氧基异戊酰紫草素、异丁酰紫草素对照品[日本化学试剂协会(Tokyo Kasei, Japan),批号分别为A1019、I1327,纯度均>98%];甲醇、乙腈(色谱纯,美国Merk公司);甲酸、石油醚(30~60℃)(分析纯,上海化学试剂有限公司);水为娃哈哈纯净水。

## 2 方法与结果

### 2.1 紫草凡士林的制备

称取紫草200 g,加石油醚(30~60℃)2 000 ml于50℃水浴中回流提取2次,每次1 h,滤过,合并滤液,于30℃减压浓缩至近干,置烘箱中60℃干燥,得紫草提取物。将125 g白凡士林加入该紫草提取物中,60℃熔融混匀,用4层纱布趁热滤过,取滤液,自然冷却后即得紫草凡士林。

### 2.2 溶液的准备

2.2.1 混合对照品溶液的制备 分别取对照品紫草素、乙酰紫草素、乙酰氧基异戊酰紫草素、异丁酰紫草素、 $\beta,\beta'$ -二甲基丙烯酰紫草素各适量,精密称定,用甲醇溶解并制备成每1 ml含上述5种化合物分别为28、48、16、15、20  $\mu\text{g}$ 的混合对照品溶液,即得。

2.2.2 供试品溶液的制备 取紫草凡士林约2.5 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,加入甲醇20 ml,超声(功率:180 W,频率:35 kHz)提取30 min,置冰浴中放置2 h,滤过,滤液置25 ml量瓶中,加入2.5 ml水,用甲醇定容,经0.45  $\mu\text{m}$ 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.2.3 阴性对照溶液的制备 取不含紫草提取物的白凡士林,按“2.2.2”项下方法操作,即得。

### 2.3 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱:Agilent Eclipse XDB-C<sub>18</sub>(250 mm×4.6 mm,5  $\mu\text{m}$ );流动相:甲醇-乙腈-0.2%甲酸溶液(48:32:20,V/V/V);流速:1.0 ml/min;柱温:24℃;检测波长:516 nm;进样量:20  $\mu\text{l}$ 。取供试品溶液、混合对照品溶液与阴性对照溶液各适量,按上述色谱条件注入HPLC仪测定。结果发现,各目标色谱峰的理论板数均不低于4 500,拖尾因子在0.995~1.110之间;阴性对照溶液在目标色谱峰位置无吸收。色谱见图1。

### 2.4 标准曲线、检测限和定量限的制定

吸取对照品紫草素、乙酰紫草素、乙酰氧基异戊酰紫草素、异丁酰紫草素、 $\beta,\beta'$ -二甲基丙烯酰紫草素各适量,精密称定,用甲醇溶解并制备成每1 ml含上述5种化合物分别为712、1 192、407、365、511  $\mu\text{g}$ 的混合对照品贮备液。精密吸取该贮备液0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 ml,分别置10 ml量瓶中,用甲醇稀释至刻度,摇匀,即得系列质量浓度的混合对照品溶液,按上述色谱条件依次进样,记录峰面积。以对照品质量浓度( $x$ ,  $\mu\text{g/ml}$ )对峰面积积分值( $y$ )进行线性回归,得到各化合物的回归方程和线性范围。另外,逐步稀释混合对照品溶液,按信噪比为3和10分别测定各化合物的检测限(LOD)和定量限(LOQ)。5种萘醌类化合物的线性回归方程、检测限和定量限见表1。

### 2.5 精密度试验

取同一供试品溶液(批号:20120326)适量,按上述色谱条

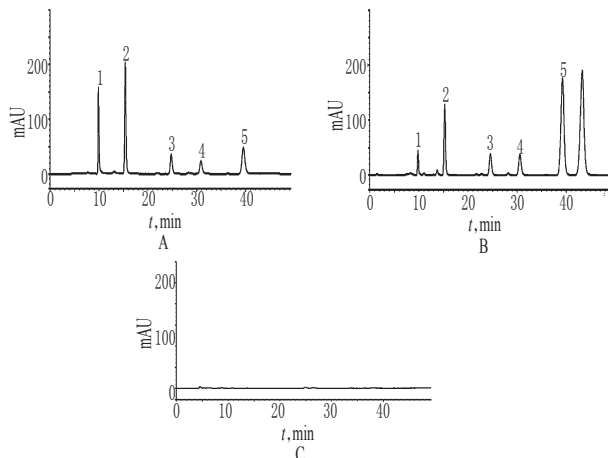


图1 高效液相色谱图

A. 混合对照品; B. 紫草凡士林; C. 阴性对照; 1. 紫草素; 2. 乙酰紫草素; 3. 乙酰氧基异戊酰紫草素; 4. 异丁酰紫草素; 5.  $\beta,\beta'$ -二甲基丙烯酰紫草素

Fig 1 HPLC chromatograms

A. mixture control; B. Zicao vaseline; C. negative control; 1. shikonin; 2. acetylshikonin; 3.  $\beta$ -acetoxyisovalerylshikonin; 4. isobutylshikonin; 5.  $\beta,\beta'$ -dimethylacrylshikonin

表1 5种萘醌类化合物的线性回归方程、检测限和定量限( $n=6$ )

Tab 1 Regression equation, LODs and LOQs of 5 naphthoquinone derivatives ( $n=6$ )

化合物名称	回归方程	线性范围, $\mu\text{g/ml}$	检测限, $\mu\text{g/ml}$	定量限, $\mu\text{g/ml}$	$r$
紫草素	$y=12.781x-5.372$	7.12~71.20	0.14	0.71	0.999 4
乙酰紫草素	$y=8.835x-15.403$	11.92~119.20	0.40	1.19	0.999 6
乙酰氧基异戊酰紫草素	$y=7.472x+7.354$	4.07~40.70	0.68	2.04	0.999 7
异丁酰紫草素	$y=10.296x-6.859$	3.65~36.50	0.61	1.83	0.999 6
$\beta,\beta'$ -二甲基丙烯酰紫草素	$y=14.613x-10.509$	5.11~51.10	0.51	2.56	0.999 5

件连续进样测定5次,记录峰面积。结果显示,紫草素、乙酰紫草素、乙酰氧基异戊酰紫草素、异丁酰紫草素、 $\beta,\beta'$ -二甲基丙烯酰紫草素的RSD分别为0.73%、0.55%、1.18%、0.96%、0.84%( $n$ 均为5),表明本方法精密度良好。

另取混合对照品溶液适量,按上述色谱条件连续进样测定5次,记录峰面积。结果显示,上述5种化合物对应的RSD分别为0.59%、0.26%、0.88%、0.41%、0.35%( $n$ 均为5),表明仪器精密度良好。

### 2.6 稳定性试验

取新鲜配制的同一供试品溶液(批号:20120326)适量,按上述色谱条件于0、1、2、4、8、12 h分别进样测定,记录峰面积。结果显示,紫草素、乙酰紫草素、乙酰氧基异戊酰紫草素、异丁酰紫草素、 $\beta,\beta'$ -二甲基丙烯酰紫草素的RSD分别为2.84%、2.12%、3.42%、2.90%、2.53%( $n$ 均为6),表明供试品溶液在12 h内稳定。

### 2.7 重复性试验

取同一批(批号:20120326)紫草凡士林适量,按“2.2.2”项下方法平行制备6份供试品溶液,在上述色谱条件下分别进样测定。结果显示,样品中紫草素、乙酰紫草素、乙酰氧基异戊酰紫草素、异丁酰紫草素、 $\beta,\beta'$ -二甲基丙烯酰紫草素的平均质量分数分别为0.013%、0.036%、0.018%、0.026%、0.076%,

RSD 分别为 2.37%、2.09%、3.35%、3.72%、1.97% ( $n$  均为 6), 表明本方法重复性良好。

## 2.8 加样回收率试验

取同一批(批号:20120326)紫草凡士林约 1.25 g, 共 6 份, 精密称定, 分别置具塞锥形瓶中, 各精密加入 5 种萘醌对照品适量, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 再按上述色谱条件进样测定, 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 ( $n=6$ )

化合物名称	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, %
紫草素	157.03	162.00	323.17	102.55	100.82	3.03
	158.80	162.00	318.06	98.31		
	156.98	162.00	326.79	104.82		
	157.59	162.00	324.48	103.02		
	157.92	162.00	315.33	97.17		
	159.28	162.00	319.73	99.05		
乙酰紫草素	442.44	447.00	903.26	103.09	101.49	1.25
	447.41	447.00	900.75	101.42		
	442.29	447.00	896.25	101.56		
	444.00	447.00	887.60	99.24		
	444.92	447.00	898.57	101.49		
	448.76	447.00	905.37	102.15		
乙酰氧基异戊酰紫草素	226.83	242.00	459.04	95.96	97.99	1.75
	229.37	242.00	464.88	97.32		
	226.75	242.00	460.42	96.56		
	227.63	242.00	465.33	98.22		
	228.10	242.00	469.08	99.58		
	230.07	242.00	472.85	100.32		
异丁酰紫草素	329.02	328.00	656.89	99.96	100.29	2.25
	332.72	328.00	663.39	100.81		
	328.92	328.00	671.04	104.31		
	330.18	328.00	659.08	100.27		
	330.87	328.00	653.48	98.36		
	333.72	328.00	655.21	98.01		
$\beta, \beta'$ -二甲基丙烯酰紫草素	944.70	986.00	1968.62	103.85	101.74	2.31
	955.31	986.00	1977.36	103.66		
	944.39	986.00	1964.75	103.48		
	948.03	986.00	1948.49	101.47		
	950.00	986.00	1934.84	99.88		
	958.19	986.00	1925.76	98.13		

## 2.9 样品含量测定

取 3 个批号的样品, 分别按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 再按上述色谱条件进样测定, 记录峰面积, 计算样品中 5 种萘醌类化合物的质量分数, 结果见表 3。

表 3 3 批紫草凡士林中 5 种萘醌类化合物的质量分数 (% ,  $n=3$ )

Tab 3 Mass fraction of 5 naphthoquinone derivatives in 3 batches of Zicao vaseline (% ,  $n=3$ )

批号	紫草素	乙酰紫草素	乙酰氧基异戊酰紫草素	异丁酰紫草素	$\beta, \beta'$ -二甲基丙烯酰紫草素
20120326	0.013	0.036	0.018	0.026	0.076
20120411	0.015	0.041	0.019	0.025	0.083
20120415	0.016	0.039	0.016	0.028	0.074

## 3 讨论

### 3.1 供试品溶液制备方法的选择

紫草凡士林中的基质白凡士林极易污染色谱柱, 在供试品溶液的制备过程中, 加甲醇超声提取可将萘醌类化合物提取完全, 而后置冰浴中冷却, 可使白凡士林充分析出; 为使白凡士林去除完全, 在定容时还加入了 10% 的水, 该法操作简便、提取效率高。另外, 由于萘醌类化合物对热不稳定, 超声时间过长会导致溶液温度升高而破坏被测组分<sup>[6]</sup>。经考察, 超声 30 min 可将萘醌类成分提取完全且溶液温度不会过高, 故选择超声提取 30 min。

### 3.2 流动相的选择

文献中对于紫草萘醌类化合物的 HPLC 法分析大多采用梯度洗脱法<sup>[7-8]</sup>, 操作烦琐, 且对仪器设备有一定要求。为了使 2-甲基- $n$ -丁酰紫草素与异戊酰紫草素两个同分异构体达到基线分离, Hu Y 等<sup>[7]</sup>在流动相中使用了四氢呋喃, 虽然可以提高分离效果, 但四氢呋喃价格昂贵, 且会缩短色谱柱使用寿命。笔者经反复试验, 最终确定以甲醇-乙腈-0.2% 甲酸溶液 (48:32:20,  $V/V/V$ ) 为流动相进行等度洗脱, 操作简便, 分离效果令人满意。在此色谱条件下, 2-甲基- $n$ -丁酰紫草素与异戊酰紫草素两个色谱峰重叠, 保留时间约为 43 min。

### 3.3 检测波长的选择

经紫外分光光度计扫描, 紫草萘醌类化合物在 215、275 和 516 nm 波长处均有最强紫外吸收, 但在 215 nm 波长处基线不够平稳, 275 nm 波长处有一些小的干扰峰存在, 516 nm 波长处的图谱比较干净, 基线也相对平稳, 所以选择 516 nm 为检测波长。

## 参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部[S]. 2010 年版. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 320.
- [2] 黄志纾, 张敏, 马林, 等. 紫草的化学成分及其药理活性研究概况[J]. 天然产物研究与开发, 2000, 12(1): 73.
- [3] 孔令冰. 紫草的临床应用概况[J]. 中国现代药物应用, 2008, 2(12): 117.
- [4] 曾燕, 熊丰, 吴崇荣, 等. 紫草抑制青春期雌性大鼠性腺轴功能的研究[J]. 中国药房, 2008, 19(3): 169.
- [5] 金呈之. 紫草色素的生物活性及其应用研究进展[J]. 食品工程, 2007(1): 33.
- [6] 韦英杰, 王莱, 袁慕荣, 等. 紫草效应成分动态变化与稳定性研究[J]. 中药材, 2011, 34(4): 611.
- [7] Hu Y, Jiang Z, Leung KS, et al. Simultaneous determination of naphthoquinone derivatives in Boraginaceous herbs by high-performance liquid chromatography[J]. *Anal Chim Acta*, 2006, 577(1): 26.
- [8] 韩洁, 朱利民, 翁新楚, 等. RP-HPLC 法同时测定紫草中紫草素、异丁酰紫草素和  $\beta, \beta'$ -二甲基丙烯酰紫草素的含量[J]. 药物分析杂志, 2008, 28(1): 6.

(收稿日期: 2012-12-07 修回日期: 2013-04-28)