

[质 量]

HPLC法同时测定解毒生肌膏中6种成分

周小刚¹, 李红文^{1*}, 何胜利²

(1. 郑州大学第一附属医院, 河南 郑州 450052; 2. 遂成药业股份有限公司, 河南 新郑 451150)

摘要: 目的 建立 HPLC 法同时测定解毒生肌膏(紫草、白芷、当归等)中 6 种成分的含有量。方法 该药物甲醇提取液的分析采用 Diamonsil C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 乙腈-0.5% 冰醋酸为流动相, 梯度洗脱; 体积流量 0.8 mL/min; 柱温 30 ℃; 检测波长 300 nm (欧前胡素、异欧前胡素)和 516 nm (紫草素、乙酰紫草素、异丁酰紫草素、β, β-二甲基丙烯酸紫草素); 进样量 20 μL。结果 欧前胡素、异欧前胡素、紫草素、乙酰紫草素、异丁酰紫草素、β, β-二甲基丙烯酸紫草素分别在 2.74~54.80 μg/mL ($r=0.999\ 1$)、1.90~38.00 μg/mL ($r=0.999\ 5$)、2.12~42.40 μg/mL ($r=0.999\ 2$)、8.48~169.60 μg/mL ($r=0.999\ 8$)、4.92~98.40 μg/mL ($r=0.999\ 7$)、4.66~93.20 μg/mL ($r=0.999\ 1$) 范围内线性关系良好, 平均加样回收率(RSD)分别为 99.72% (1.15%)、97.39% (1.49%)、98.29% (1.87%)、99.29% (1.94%)、98.51% (1.42%)、97.21% (1.55%)。结论 该方法简便准确, 专属性强, 重复性好, 可用于解毒生肌膏的质量控制。

关键词: 解毒生肌膏; 欧前胡素; 异欧前胡素; 紫草素; 乙酰紫草素; 异丁酰紫草素; β, β-二甲基丙烯酸紫草素; HPLC

中图分类号: R927.2

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2016)10-2168-04

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2016.10.014

Simultaneous determination of six constituents in Jiedu Shengji Ointment by HPLC

ZHOU Xiao-gang¹, LI Hong-wen^{1*}, HE Sheng-li²

(1. The First Hospital Affiliated to Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China; 2. Suicheng Pharmaceutical Co., Ltd., Xinzheng 451150, China)

ABSTRACT: **AIM** To develop an HPLC method for the simultaneous content determination of six constituents in Jiedu Shengji Ointment (an antidotal and myogenic ointment containing *Arnebiae Radix*, *Angelicae Dahuricae Radix*, *Angelicae Sinensis Radix*, etc.). **METHODS** The analysis of methanol extract of this drug was performed on a 30 ℃ thermostatic Diamonsil C₁₈ column (250 mm×4.6 mm, 5 μm), with the mobile phase comprising of acetonitrile-0.5% glacial acetic acid flowing at a rate of 0.8 mL/min in a gradient elution manner, the detection wavelengths were set at 300 nm for imperatorin and isoimperatorin, and 516 nm for shikonin, acetylshikonin, isobutyrlshikonin and β, β-dimethylacrylshikonin, and the injection volume was 20 μL. **RESULTS** Imperatorin, isoimperatorin, shikonin, acetylshikonin, isobutyrlshikonin and β, β-dimethylacrylshikonin showed good linear relationships within the ranges of 2.74–54.80 μg/mL ($r=0.999\ 1$), 1.90–38.00 μg/mL ($r=0.999\ 5$), 2.12–42.40 μg/mL ($r=0.999\ 2$), 8.48–169.60 μg/mL ($r=0.999\ 8$), 4.92–98.40 μg/mL ($r=0.999\ 7$) and 4.66–93.20 μg/mL ($r=0.999\ 1$), whose average recoveries (RSDs) were 99.72% (1.15%), 97.39% (1.49%), 98.29% (1.87%), 99.29% (1.94%), 98.51% (1.42%) and 97.21% (1.55%), respectively. **CONCLUSION** With good specificity and reproducibility, this simple and accurate method can be used for the quality control of Jiedu Shengji Ointment.

收稿日期: 2016-04-22

作者简介: 周小刚(1987—), 男, 硕士, 从事皮肤病用药研究和临床诊疗相关工作。Tel: 18871081593, E-mail: yfzhoxiaogang@163.com

*通信作者: 李红文(1954—), 男, 教授, 主任医师, 硕士生导师, 从事皮肤病用药研究和临床诊疗工作。Tel: 13838262281, E-mail: yfllhw@163.com

KEY WORDS: Jiedu Shengji Ointment; imperatorin; isoimperatorin; shikonin; acetylshikonin; isobutyrylshikonin; β , β -dimethylacrylshikonin; HPLC

解毒生肌膏是由紫草、白芷、当归、甘草、乳香(醋制)、轻粉加工而成的中药复方软膏剂,具有活血散瘀、消肿止痛、解毒拔脓、祛腐生肌等功效,是临床上用于各类创面感染、二度烧伤等症状的首选药物,收载于《卫生部颁药品标准》中药成方制剂第11册,但仅规定了性状和理化鉴别,而无其它检测项目^[1]。方中紫草功效凉血、活血、透疹、解毒,其主要成分是紫草素、乙酰紫草素、异丁酰紫草素和 β , β -二甲基丙烯酰紫草素,为君药;白芷功效解表散寒、祛风止痛、通鼻窍、燥湿止带、消肿排脓,其主要成分是欧前胡素和异欧前胡素,为臣药。因此,本实验采用HPLC法同时测定该制剂中欧前胡素、异欧前胡素、紫草素、乙酰紫草素、异丁酰紫草素、 β , β -二甲基丙烯酰紫草素的含有量。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 HP1100型高效液相色谱仪(美国Waters公司); Agilent1100型紫外检测器(美国安捷伦科技公司); AB104-N型电子天平(南京庚辰科学仪器有限公司); SB25-12DT台式超声波清洗机(宁波新芝公司)。

1.2 试剂 解毒生肌膏购自广西壮族自治区花红药业股份有限公司(30 g/支, 20150202、20150709、20150812)。乙腈为色谱纯;冰醋酸为分析纯;水为重蒸馏水。欧前胡素(110826-201415, 含有量99.7%)、异欧前胡素(110827-201410, 置P₂O₅干燥器中减压干燥12 h后使用, 含有量99.7%)、紫草素(110769-200405, 含有量100%)对照品均购自中国食品药品检定研究院;乙酰紫草素(24502-78-1, 含有量98.0%)、异丁酰紫草素(52438-12-7, 含有量98.0%)、 β , β -二甲基丙烯酰紫草素(24502-79-2, 含有量97.0%, 避光4℃低温密封保存)对照品均购自上海纯优生物科技有限公司。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 供试品溶液 精密称取解毒生肌膏5.0 g, 置于50 mL量瓶中, 精密加入甲醇50 mL, 密塞, 称定质量, 60℃下超声30 min, 放冷, 甲醇补充缺失的质量, 摇匀, 过滤, 取续滤液, 即得。

2.1.2 对照品溶液 精密称取各对照品适量, 置

于6个20 mL量瓶中, 甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得对照品贮备液(欧前胡素0.548 mg/mL、异欧前胡素0.380 mg/mL、紫草素0.424 mg/mL、乙酰紫草素1.696 mg/mL、异丁酰紫草素0.984 mg/mL、 β , β -二甲基丙烯酰紫草素0.932 mg/mL)。分别量取2.5、2.0、2.5、5.0、2.5、5.0 mL, 置于同一100 mL量瓶中, 甲醇稀释至刻度, 摇匀, 即得(欧前胡素0.013 7 mg/mL、异欧前胡素0.007 6 mg/mL、紫草素0.010 6 mg/mL、乙酰紫草素0.084 8 mg/mL、异丁酰紫草素0.024 6 mg/mL、 β , β -二甲基丙烯酰紫草素0.046 6 mg/mL)。

2.1.3 阴性对照溶液 按处方比例称取除白芷、紫草外的其他5味药材各1份, 按解毒生肌膏制备工艺和“2.1.1”项下方法制得缺白芷、紫草阴性对照溶液。

2.2 色谱条件 Diamonsil C₁₈色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μ m); 体积流量0.8 mL/min; 柱温30℃; 进样量20 μ L; 流动相乙腈(A)-0.5%冰醋酸(B), 梯度洗脱^[2-7](0~18 min, 32% A; 18~32 min, 32%→47% A; 32~40 min, 47%→65% A; 40~65 min, 65%→85% A; 65~75 min, 85%→32% A); 0~32 min在300 nm^[8-9]波长下检测欧前胡素和异欧前胡素, 32~75 min在516 nm^[10-11]波长下检测紫草素、乙酰紫草素、异丁酰紫草素、 β , β -二甲基丙烯酰紫草素。

2.3 方法学考察

2.3.1 线性关系 精密吸取上述对照品贮备液0.1、0.2、0.5、1.0、2.0 mL, 置于20 mL量瓶中, 甲醇稀释至刻度, 摇匀, 即得到系列质量浓度的对照品溶液。以质量浓度作为横坐标(X), 峰面积作为纵坐标(Y)绘制标准曲线, 结果见表1, 表明各成分均呈良好的线性关系。

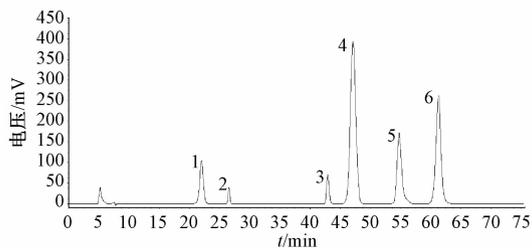
2.3.2 专属性试验 取供试品、对照品、阴性对照溶液适量, 在“2.2”项色谱条件下进样测定, 结果见图1。由图可知, 6种成分色谱峰在对应位置均无干扰, 表明该方法专属性良好。

2.3.3 重复性试验 取解毒生肌膏(批号20150202)6份, 按“2.1.1”项下方法制备供试品溶液, 在“2.2”项色谱条件下测定, 测得欧前胡素、异欧前胡素、紫草素、乙酰紫草素、异丁酰

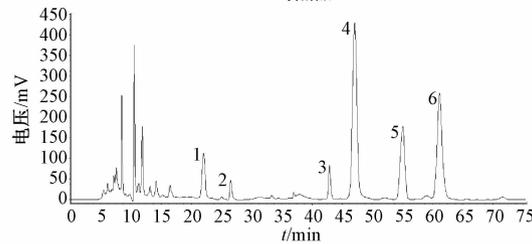
表1 6种成分的线性关系

Tab. 1 Linear relationships of six constituents

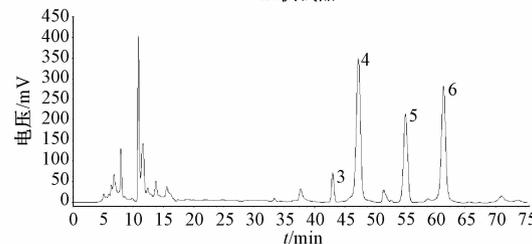
成分	回归方程	线性范围/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	r
欧前胡素	$Y = 1.1595 \times 10^6 X - 169.3$	2.74 ~ 54.80	0.999 1
异欧前胡素	$Y = 8.2574 \times 10^5 X + 207.8$	1.90 ~ 38.00	0.999 5
紫草素	$Y = 8.9716 \times 10^5 X + 172.9$	2.12 ~ 42.40	0.999 2
乙酰紫草素	$Y = 1.7513 \times 10^6 X - 437.7$	8.48 ~ 169.60	0.999 8
异丁酰紫草素	$Y = 1.4982 \times 10^6 X + 117.0$	4.92 ~ 98.40	0.999 7
β, β -二甲基丙 烯酰紫草素	$Y = 1.5971 \times 10^6 X + 386.4$	4.66 ~ 93.20	0.999 1



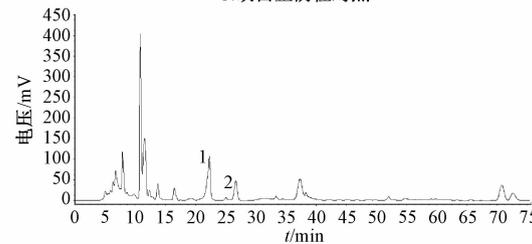
A. 对照品



B. 供试品



C. 空白阴性对照



D. 紫草素阴性对照

1. 欧前胡素 2. 异欧前胡素 3. 紫草素 4. 乙酰紫草素 5. 异丁酰紫草素 6. β, β -二甲基丙烯酰紫草素

1. imperatorin 2. isoimperatorin 3. shikonin 4. acetylshikonin
5. isobutylshikonin 6. β, β -dimethylacrylshikonin

图1 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms

紫草素、 β, β -二甲基丙烯酰紫草素含有量 RSD 分别为 1.63%、1.04%、1.77%、1.08%、1.59%、

1.47%，表明该方法重复性良好。

2.3.4 精密度试验 取“2.1.2”项下对照品溶液适量，在“2.2”项色谱条件下进样6次，测得欧前胡素、异欧前胡素、紫草素、乙酰紫草素、异丁酰紫草素、 β, β -二甲基丙烯酰紫草素峰面积 RSD 分别为 1.33%、1.12%、1.28%、1.02%、1.16%、1.09%，表明仪器精密度良好。

2.3.5 加样回收率试验 精密称取含有量已知的解毒生肌膏（批号 20150202）6份，每份 2.5 g，置于 50 mL 量瓶中，精密加入对照品溶液（欧前胡素 0.013 7 mg/mL、异欧前胡素 0.007 6 mg/mL、紫草素 0.010 6 mg/mL、乙酰紫草素 0.084 8 mg/mL、异丁酰紫草素 0.024 6 mg/mL、 β, β -二甲基丙烯酰紫草素 0.046 6 mg/mL）和甲醇各 25 mL，60 $^{\circ}\text{C}$ 下超声 30 min，放冷，甲醇补充减失的质量，摇匀，过滤，取续滤液，在“2.2”项色谱条件下计算回收率，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)

成分	称样量/	原有量/	加入量/	测得量/	回收率/	平均回	RSD/
	g	mg	mg	mg	%	收率/%	%
欧前胡素	2.498 3	0.354 8	0.342 5	0.695 2	99.39	99.72	1.15
	2.501 6	0.355 2	0.342 5	0.689 7	97.66		
	2.500 3	0.355 0	0.342 5	0.699 1	100.47		
	2.499 0	0.354 9	0.342 5	0.696 8	99.82		
	2.502 2	0.355 3	0.342 5	0.697 7	99.97		
	2.499 8	0.355 0	0.342 5	0.700 9	100.99		
异欧前胡素	2.498 3	0.177 4	0.190 0	0.363 6	98.00	97.39	1.49
	2.501 6	0.177 6	0.190 0	0.367 5	99.95		
	2.500 3	0.177 5	0.190 0	0.360 2	96.16		
	2.499 0	0.177 4	0.190 0	0.362 3	97.32		
	2.502 2	0.177 7	0.190 0	0.361 8	96.89		
	2.499 8	0.177 5	0.190 0	0.360 0	96.05		
紫草素	2.498 3	0.259 8	0.265 0	0.516 3	96.79	98.29	1.87
	2.501 6	0.260 2	0.265 0	0.527 1	100.72		
	2.500 3	0.260 0	0.265 0	0.515 5	96.42		
	2.499 0	0.259 9	0.265 0	0.519 8	98.08		
	2.502 2	0.260 2	0.265 0	0.526 2	100.38		
	2.499 8	0.260 0	0.265 0	0.518 0	97.36		
乙酰紫草素	2.498 3	2.066 1	2.120 0	4.190 6	100.21	99.29	1.94
	2.501 6	2.068 8	2.120 0	4.113 3	96.44		
	2.500 3	2.067 7	2.120 0	4.200 6	100.61		
	2.499 0	2.066 7	2.120 0	4.128 1	97.24		
	2.502 2	2.069 3	2.120 0	4.199 9	100.50		
	2.499 8	2.067 3	2.120 0	4.203 7	100.77		
异丁酰紫 草素	2.498 3	0.647 1	0.615 0	1.239 3	96.29	98.51	1.42
	2.501 6	0.647 9	0.615 0	1.260 2	99.56		
	2.500 3	0.647 6	0.615 0	1.263 8	100.20		
	2.499 0	0.647 2	0.615 0	1.254 9	98.81		
	2.502 2	0.648 1	0.615 0	1.248 5	97.63		
	2.499 8	0.647 4	0.615 0	1.253 5	98.55		
β, β -二甲 基丙烯酰 紫草素	2.498 3	1.086 8	1.165 0	2.250 5	99.99	97.21	1.55
	2.501 6	1.088 2	1.165 0	2.216 6	96.86		
	2.500 3	1.087 6	1.165 0	2.210 9	96.42		
	2.499 0	1.087 1	1.165 0	2.206 3	96.07		
	2.502 2	1.088 5	1.165 0	2.207 0	96.01		
	2.499 8	1.087 4	1.165 0	2.229 1	98.00		

2.4 含有量测定 取3批解毒生肌膏(20150202、20150709、20150812),按“2.1.1”项下方法制备供试品溶液,在“2.2”项色谱条件下测定,结果见表3。

表3 含有量测定结果(mg/g)

Tab.3 Results of content determination (mg/g)

批号	欧前胡素	异欧前胡素	紫草素	乙酰紫草素	异丁酰紫草素	β, β -二甲基丙烯酰紫草素
20150202	0.142	0.071	0.104	0.827	0.259	0.435
20150709	0.138	0.075	0.109	0.813	0.262	0.446
20150812	0.151	0.066	0.112	0.836	0.255	0.439
平均值	0.144	0.071	0.108	0.825	0.259	0.440

3 讨论

3.1 供试品溶液制备方法的优化 本实验考察了提取溶剂(乙醇、甲醇、流动相)、提取时间(20、30、40 min)、提取温度(40、60、90 °C),最终确定为“2.1.1”项下方法,即甲醇在60 °C下超声30 min。

3.2 检测波长的选择 将对照品贮备液进行全波长扫描,发现欧前胡素和异欧前胡素在254 nm和300 nm波长处均有较大吸收,结合《中国药典》2015年版白芷项下的检测波长300 nm,最终确定为300 nm;紫草素、乙酰紫草素、异丁酰紫草素、 β, β -二甲基丙烯酰紫草素在275 nm和516 nm波长处均有较大吸收,结合文献资料,最终确定为516 nm。

参考文献:

[1] 卫生部药典委员会. 卫生部颁药品标准(中药成方制剂): 第11册[S]. 北京: 人民卫生出版社, 1996: 198.

[2] 赵友谊, 王鸣, 冯煦, 等. HPLC法同时测定江苏引种白芷中5个香豆素的含量[J]. 中国野生植物资源, 2013, 32(1): 56-58, 67.

[3] 王鸣, 冯煦, 顾红梅, 等. RP-HPLC测定杭白芷不同部位5种香豆素的含量[J]. 中国野生植物资源, 2013, 32(4): 31-33.

[4] 张慧, 海广范, 尹志奎, 等. 高效液相色谱法测定不同产地白芷中欧前胡素和异欧前胡素含量[J]. 新乡医学院学报, 2009, 26(2): 138-140.

[5] 曾祖平, 韩旭阳, 彭冰, 等. HPLC法测定紫草中萘醌类成分[J]. 解放军药学学报, 2013, 29(5): 453-455.

[6] 赵路, 关琴笑, 路丽, 等. UHPLC法同时测定不同产地紫草中5种活性成分的含量[J]. 中药材, 2015, 38(3): 473-475.

[7] 郝鹤, 池剑亭, 王红, 等. 新疆紫草7种萘醌类成分的同时测定[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(18): 108-112.

[8] 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: 105-106.

[9] 万焱, 马国柱, 冯素香. 白芷中欧前胡素和异欧前胡素的含量测定[J]. 中医学报, 2013, 28(8): 1178-1179.

[10] 刘玉梅. 高效液相色谱法同时测定紫草素及其衍生物[J]. 中国酿造, 2011(1): 173-176.

[11] 韩洁, 朱利民, 毕开顺, 等. RP-HPLC法同时测定紫草中紫草素, 异丁酰紫草素和 β, β -二甲基丙烯酰紫草素的含量[J]. 药物分析杂志, 2008, 28(1): 6-8.