

RP-HPLC法同时测定新疆紫草中紫草素、乙酰紫草素、 β,β -二甲基丙烯酸酯紫草素的含量^Δ

孙健文^{1*},温宪春^{1,2},蔡德富²,王玥¹,吴永会^{1#}(1.哈尔滨医科大学公共卫生学院劳动卫生教研室,哈尔滨150000;2.齐齐哈尔医学院医药科学研究所,黑龙江齐齐哈尔161000)

中图分类号 R284.1;R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)04-0455-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.04.06

摘要 目的:建立同时测定新疆紫草中紫草素、乙酰紫草素、 β,β -二甲基丙烯酸酯紫草素含量的方法。方法:采用反相高效液相色谱法,色谱柱为Kromasil 100-5 C₁₈,流动相为乙腈-0.1%甲酸溶液(80:20,V/V),流速为1.0 mL/min,检测波长为516 nm,柱温为25 ℃,进样量为10 μ L。结果:紫草素、乙酰紫草素、 β,β -二甲基丙烯酸酯紫草素检测质量浓度线性范围分别为0.404~10.100 μ g/mL($r=0.999\ 8$),5.350~107.000 μ g/mL($r=0.999\ 6$),2.035~40.700 μ g/mL($r=0.999\ 8$);定量限分别为0.40、2.91、1.34 μ g/mL,检测限分别为0.12、0.87、0.40 μ g/mL;精密度、稳定性、重复性试验的RSD<2.0%($n=6$);加样回收率分别为99.12%~104.18%(RSD=1.85%, $n=6$)、96.51%~100.21%(RSD=1.43%, $n=6$)、98.11%~102.51%(RSD=1.42%, $n=6$)。结论:该方法操作简便,精密度、稳定性、重复性好,可用于新疆紫草中紫草素、乙酰紫草素、 β,β -二甲基丙烯酸酯紫草素含量的同时测定。

关键词 紫草;紫草素;乙酰紫草素; β,β -二甲基丙烯酸酯紫草素;反相高效液相色谱法;含量

Simultaneous Determination of Shikonin, Acetylshikonin and β,β -dimethylacrylshikonin in *Arnebia euchroma* by RP-HPLC

SUN Jianwen¹, WEN Xianchun^{1,2}, CAI Defu², WANG Yue¹, WU Yonghui¹ (1. Teaching-research Room of Labor and Hygiene, College of Public Health, Harbin Medical University, Harbin 150000, China; 2. Institute of Medical Science, Qiqihar Medical College, Heilongjiang Qiqihar 161000, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To establish a method for the simultaneous determination of shikonin, acetylshikonin and β,β -dimethylacrylshikonin in *Arnebia euchroma*. **METHODS:** RP-HPLC method was adopted. The determination was performed on Kromasil 100-5 C₁₈ column with mobile phase consisted of acetonitrile-0.1% formic acid solution(80:20, V/V) at the flow rate of 1.0 mL/min. The detection wavelength was set at 516 nm, column temperature was 25 ℃, and sample size was 10 μ L. **RESULTS:** The linear ranges of shikonin, acetylshikonin and β,β -dimethylacrylshikonin were 0.404-10.100 μ g/mL($r=0.999\ 8$), 5.350-107.000 μ g/mL($r=0.999\ 6$), 2.035-40.700 μ g/mL($r=0.999\ 8$), respectively. The limit of quantitation was 0.40, 2.91, 1.34 μ g/mL, and the limit of detection was 0.12, 0.87, 0.40 μ g/mL. RSDs of precision, stability and reproducibility tests were all lower than 2.0% ($n=6$). The recovery rate were 99.12%-104.18% (RSD=1.85%, $n=6$), 96.51%-100.21% (RSD=1.43%, $n=6$), 98.11%-102.51% (RSD=1.42%, $n=6$), respectively. **CONCLUSIONS:** The method is simple, precise, stable and reproducible. It can be used for simultaneous determination of shikonin, acetylshikonin and β,β -dimethylacrylshikonin in *A. euchroma*.

KEYWORDS *Arnebia euchroma*; Shikonin; Acetylshikonin; β,β -dimethylacrylshikonin; RP-HPLC; Content

紫草(*Arnebia euchroma*)为我国传统常见中药,也是新疆特色药材^[1],其作为药用最初载于《神农本草经》,列为中品,多用于麻疹不透、湿疹、水火烫伤等症^[2],临床上常用于治疗静脉炎、烧烫伤、皮肤病和慢性肾炎等^[3]。现代研究表明,紫草药材中的主要活性成分为羟基萘醌色素类成分,其中的紫草素及其衍生物具有抗癌、抗炎、

降血糖、提高免疫力等多种作用^[4-5]。紫草药材不仅被广泛应用于临床,同时在食品、化妆品、印染工业中也得到广泛应用^[6]。

目前,治疗癌症的主要措施仍为化疗,但化疗的副作用较大,严重影响患者的生存质量。因此,寻找高效、副作用小的治疗方法刻不容缓^[7]。紫草药材由于其具有良好的抗癌作用,且作用机制涉及多个靶点^[8-10],广受关注。2015年版《中国药典》(一部)仅以紫草素、 β,β -二甲基丙烯酸酯紫草素为指标成分进行紫草药材及饮片的质量控制,缺乏质量评价的科学性和全面性^[11-12]。

本试验采用反相高效液相色谱法(RP-HPLC)对紫

^Δ 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81650021);黑龙江省教育厅基本科研课题项目(No.2016-KYYWF-0870)

* 硕士研究生。研究方向:抗肿瘤天然药物。E-mail:404049510@qq.com

通信作者:教授,博士生导师。研究方向:工业毒物及其致病机制。E-mail:wuyonghui777@163.com

中草药材中3种萘醌类成分紫草素、乙酰紫草素、 β,β -二甲基丙烯酰紫草素的含量进行了同时测定,旨在建立一种简单、快速的紫草药材中多种色素成分的定量方法,以期为其质量控制提供快速、有效的检测方法。

1 材料

1.1 仪器

600 Controller 型 HPLC 仪,包括 2487 型紫外检测器、Empower 3 色谱数据软件(美国 Waters 公司);KQ-50DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);AE240 型电子分析天平(瑞士 Mettler Toledo 公司)。

1.2 试剂

紫草素对照品(批号:B21682,纯度: $\geq 98.0\%$)、乙酰紫草素对照品(批号:B21508,纯度: $\geq 98.0\%$)、 β,β -二甲基丙烯酰紫草素对照品(批号:B24012,纯度: $\geq 98.0\%$)均购自上海源叶生物科技有限公司;乙腈为色谱纯,甲酸为分析纯;水为去离子水。

1.3 药材

紫草药材购于新疆当地药店(批号:50100310、20140801、20161001),经齐齐哈尔医学院郭丽娜教授鉴定为真品。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Kromasil 100-5 C_{18} (250 mm \times 4.6 mm,5 μ m);流动相:乙腈-0.1% 甲酸溶液(80:20, V/V);流速:1.0 mL/min;检测波长:516 nm;柱温:25 $^{\circ}$ C;进样量:10 μ L。

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液 精密称取待测成分对照品各适量,分别置于 10 mL 量瓶中,加甲醇溶解并定容,摇匀,得单一对照品贮备液;精密量取上述单一对照品贮备液各适量,加甲醇制成紫草素、乙酰紫草素、 β,β -二甲基丙烯酰紫草素质量浓度分别为 4.04、42.80、32.56 μ g/mL 的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 精密称取药材样品粉末(过 2 号筛) 0.2 g,置于 10 mL 量瓶中,加甲醇定容,超声(功率:150 W,频率:40 kHz)提取 45 min,室温下放置,加甲醇定容,摇匀,经 0.45 μ m 微孔滤膜滤过,取续滤液 1 mL,加甲醇定容至 5 mL,即得。

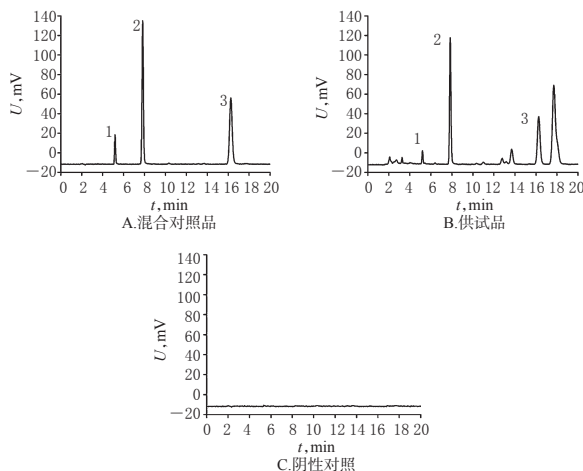
2.2.3 阴性对照溶液 以甲醇作为阴性对照溶液。

2.3 系统适用性试验

取“2.2”项下混合对照品溶液、供试品溶液、阴性对照溶液各适量,按“2.1”项下色谱条件进样测定。结果表明,理论板数以紫草素、乙酰紫草素、 β,β -二甲基丙烯酰紫草素峰计均 $>8\ 000$;分离度 >1.5 ,各成分基线分离良好,详见图 1。

2.4 线性关系考察

分别精密量取“2.2.1”项下单一对照品贮备液各适量,分别置于 10 mL 量瓶中,加流动相定容,制成紫草素质量浓度为 0.404、0.808、1.616、3.232、10.100 μ g/mL,



注:1. 紫草素;2. 乙酰紫草素;3. β,β -二甲基丙烯酰紫草素

Note: 1. shikonin; 2. acetylshikonin; 3. β,β -dimethylacrylshikonin

图 1 高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms

乙酰紫草素质量浓度为 5.350、10.700、17.120、21.400、107.000 μ g/mL, β,β -二甲基丙烯酰紫草素质量浓度为 2.035、4.070、8.140、16.280、40.700 μ g/mL 的系列单一对照品溶液。精密量取上述系列单一对照品溶液各 10 μ L,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以紫草素、乙酰紫草素、 β,β -二甲基丙烯酰紫草素质量浓度(x, μ g/mL)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归。回归方程与线性范围见表 1。

表 1 回归方程与线性范围

Tab 1 Regression equations and linear ranges

待测成分	回归方程	r	线性范围, μ g/mL
紫草素	$y=41\ 106.436\ 9x+5\ 964.596$	0.999 8	0.404~10.100
乙酰紫草素	$y=30\ 616.284\ 3x+47\ 321.570$	0.999 6	5.350~107.000
β,β -二甲基丙烯酰紫草素	$y=46\ 393.800\ 5x-21\ 285.704$	0.999 8	2.035~40.700

2.5 定量限与检测限考察

取“2.2.1”项下单一对照品贮备液各适量,倍比稀释,按“2.1”项下色谱条件连续进样测定 6 次,记录峰面积。当信噪比为 10:1 时,得定量限;当信噪比为 3:1 时,得检测限。结果,紫草素、乙酰紫草素、 β,β -二甲基丙烯酰紫草素的定量限分别为 0.40、2.91、1.34 μ g/mL,检测限分别为 0.12、0.87、0.40 μ g/mL。

2.6 精密度试验

取“2.2.1”项下单一对照品贮备液各适量,按“2.1”项下色谱条件连续进样测定 6 次,记录峰面积。结果,紫草素、乙酰紫草素、 β,β -二甲基丙烯酰紫草素峰面积的 RSD 分别为 0.96%、1.31%、0.64% ($n=6$),表明仪器精密度良好。

2.7 稳定性试验

取“2.2.2”项下供试品溶液(批号:50100310)适量,分别于室温下放置 0、4、8、12、24、48 h 时按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,紫草素、乙酰紫草素、 β,β -二甲基丙烯酰紫草素峰面积的 RSD 分别为 0.59%、0.81%、0.72% ($n=6$),表明供试品溶液室温放置

48 h内基本稳定。

2.8 重复性试验

精密称取药材样品(批号:50100310)适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,共6份,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算药材样品含量。结果,紫草素、乙酰紫草素、 β,β -二甲基丙烯酰紫草素含量平均值分别为0.456、8.587、5.175 mg/g, RSD分别为1.42%、0.38%、0.74% ($n=6$),表明本方法重复性良好。

2.9 加样回收率试验

取已知含量药材样品(批号:50100310)6份,每份0.1 g,分别加入一定量的待测成分对照品溶液,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算加样回收率,结果见表2。

表2 加样回收率试验结果($n=6$)

Tab 2 Results of recovery tests($n=6$)

待测成分	样品含量, mg	加入量, mg	测得量, mg	加样回收率, %	平均加样回收率, %	RSD, %
紫草素	0.045 5	0.045 5	0.090 6	99.12	101.83	1.85
	0.045 5	0.045 5	0.091 4	100.88		
	0.045 6	0.045 5	0.091 9	101.76		
	0.045 6	0.045 5	0.091 7	101.32		
	0.045 7	0.045 5	0.092 9	103.74		
	0.045 8	0.045 5	0.093 2	104.18		
乙酰紫草素	0.858 5	0.858 5	1.687 0	96.51	97.90	1.43
	0.858 5	0.858 5	1.688 2	96.65		
	0.861 1	0.858 5	1.702 4	98.00		
	0.859 4	0.858 5	1.695 1	97.34		
	0.862 8	0.858 5	1.709 8	98.66		
	0.863 7	0.858 5	1.724 0	100.21		
β,β -二甲基丙烯酰紫草素	0.517 2	0.517 5	1.024 9	98.11	100.31	1.42
	0.517 2	0.517 5	1.034 3	99.92		
	0.518 8	0.517 5	1.038 2	100.37		
	0.517 7	0.517 5	1.035 9	100.14		
	0.519 8	0.517 5	1.041 5	100.81		
	0.520 3	0.517 5	1.050 8	102.51		

2.10 药材样品含量测定

取3批药材样品各适量,分别按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液各3份,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算样品含量,结果见表3。

表3 药材样品含量测定结果($n=3$, mg/g)

Tab 3 Results of content determination of medicinal material samples ($n=3$, mg/g)

样品批号	紫草素	乙酰紫草素	β,β -二甲基丙烯酰紫草素
50100310	0.455	8.585	5.172
20140801	0.114	0.802	0.222
20161001	0.075	0.896	0.308

3 讨论

目前,新疆紫草还不能有效地进行人工种植,但国内乃至国际市场需求量却在日益增加,野生新疆紫草遭到掠夺性采摘,因此有效合理地利用紫草药材中的有效成分非常重要;同时,研究紫草药材中有效成分的相关

作用也成为热点课题^[2]。

预试验考察流动相时,笔者曾尝试乙腈-水(75:25, V/V),结果发现待测成分峰峰形不好,后改用乙腈-0.1%甲酸溶液(80:20, V/V),结果待测成分峰峰形良好,且保留时间稳定。因此,最终将流动相确定为后者。根据2015年版《中国药典》(一部),紫草药材中总萘醌吸收波长为516 nm^[12],故本研究以此作检测波长。

由含量测定结果可知,3批药材样品中乙酰紫草素、 β,β -二甲基丙烯酰紫草素含量变化较大,其原因可能为紫草药材尚不能人工种植,而野生品种的生长区域、采收时间不同导致其成分含量变化大^[3]。各批次紫草药材中乙酰紫草素含量均为最高,说明紫草萘醌色素类化合物中乙酰紫草素为主要成分,该论据为本课题组进一步研究乙酰紫草素抗肿瘤作用提供了帮助。

综上所述,本方法操作简便,精密度、稳定性、重复性好,可用于新疆紫草中紫草素、乙酰紫草素、 β,β -二甲基丙烯酰紫草素含量的同时测定。

参考文献

- [1] 毛艳,张瑞萍,贺金华,等.紫草中萘醌类化学成分的快速高效液相色谱-飞行时间质谱联用技术分析[J].中国药房,2014,25(43):4090-4092.
- [2] 袁慧勤,胡迪.紫草的药理作用及单味药临床外用概述[J].医学综述,2015,21(3):504-506.
- [3] 董薇薇,张建民.紫草的临床应用研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(24):368-371.
- [4] 詹志来,胡峻,刘谈,等.紫草化学成分与药理活性研究进展[J].中国中药杂志,2015,40(21):4127-4135.
- [5] 杨海红,杨雪梅,杨春霞,等.紫草萘醌类成分的提取及其复合物的抗炎活性研究[J].中国民族民间医药,2012,21(17):54-56.
- [6] 马莹.药用紫草的研究进展[J].黑龙江医药,2013,26(1):131-132.
- [7] 崔晓秋.中药紫草化学成分及药理作用最新研究进展[J].济宁医学院学报,2015,38(5):356-358,362.
- [8] CHEN C, SHANMUGASUNDARAM K, RIGBY AC, et al. Shikonin, a natural product from the root of *Lithospermum erythrorhizon*, is a cytotoxic DNA-binding agent[J]. *Eur J Pharm Sci*, 2013, 49(1):18-26.
- [9] 李亮,陈钰沁,张超,等.紫草素的研究进展[J].云南中医学院学报,2011,34(5):62-66.
- [10] 朱梦媛,王汝冰,周文,等.紫草素及其衍生物抗肿瘤作用研究进展[J].药学学报,2012,47(5):588-593.
- [11] 郝鹤,李鹏跃,叶和春,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.
- [12] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:340-341.

(收稿日期:2017-04-20 修回日期:2017-06-06)

(编辑:张 静)