

紫草闪式提取醇提物 HPLC 指纹图谱的研究

王宏, 彭冰, 李萍, 韩旭阳, 曾祖平*

(首都医科大学附属北京中医医院, 北京市中医研究所, 北京 100010)

[摘要] **目的:** 建立紫草闪式提取醇提物的 HPLC 指纹图谱, 全面完整地反映其内在化学信息, 为紫草醇提物的质量控制提供依据。**方法:** 采用高效液相色谱法, 色谱柱为 Kromasil 100-5 C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 以水-甲酸 (300:0.5)-乙腈为流动相进行梯度洗脱, 检测波长 275 nm, 流速 1 mL·min⁻¹, 柱温 25 °C。**结果:** 建立了 10 批紫草闪式提取醇提物的 HPLC 指纹色谱图, 获得了 13 个共有峰, 并指认了其中的 3 个色谱峰, 4, 6, 10 号分别被指认为左旋紫草素、乙酰紫草素和 β, β'-二甲基丙烯酰阿卡宁。**结论:** 该方法简便, 精密度、重复性和稳定性良好, 能有效控制紫草醇提物的质量, 为进一步药效研究、制剂研发提供质量保证。

[关键词] 紫草醇提物; 闪式提取; 高效液相色谱; 指纹图谱

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)02-0074-04

[doi] 10.11653/syjf2014020074

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20131107.1026.002.html>

[网络出版时间] 2013-11-07 10:26

Study on HPLC Fingerprint of Arnebiae Radix Smashing Tissue Extraction with Ethanol

WANG Hong, PENG Bing, LI Ping, HAN Xu-yang, ZENG Zu-ping*

(Beijing Institute of Traditional Chinese Medicine (TCM), Beijing Hospital of TCM Affiliated to Capital Medical University, Beijing 100010, China)

[Abstract] **Objective:** To establish the HPLC fingerprint of Arnebiae Radix smashing tissue extraction with ethanol and reflect the chemical information comprehensively and provide evidence for quality control. **Method:** HPLC was used on a Kromasil 100-5 C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) by gradient elution with solvent system composed of water-formic acid (300:0.5)-acetonitrile, detection wavelength was 275 nm, the flow rate was 1 mL·min⁻¹, the column temperature was set at 25 °C. **Result:** HPLC fingerprint of Arnebiae Radix smashing tissue extraction with ethanol was established, which showed 13 characteristic peaks from 10 batches of crude drug. Among them, the No 4, 6, 10 peaks were respectively identified as shikonin, acetylshikonin, and β, β'-dimethylacryl alkannin. **Conclusion:** The method is simple and has good precision, reproducibility and stability, and can be applied to the quality control the Arnebiae Radix smashing tissue extraction with ethanol, also provide a quality assurance for further pharmacological studies and preparation research.

[Key words] Arnebiae Radix; smashing tissue extraction; HPLC; fingerprints

[收稿日期] 20130427(011)

[基金项目] 北京市中医药科技提升专项 (KJTS2011-07)

[第一作者] 王宏, 中药师, 从事中药化学成分分析研究, Tel: 010-52176919, E-mail: 309566740@qq.com

[通讯作者] * 曾祖平, 硕士, 主任药师, 从事中药制剂及中药成分分析研究, Tel: 010-52176919, E-mail: zzp600@sohu.com

紫草为紫草科植物新疆紫草 *Arnebia euchroma* (Royle) Johnst. 或内蒙紫草 *Arnebia guttata* Bunge 的干燥根, 具有清热凉血、活血解毒、透疹消斑的功效, 用于血热毒盛、斑疹紫黑、麻疹不透、疮疡、湿疹、水火烫伤等症^[1]。紫草萘醌类成分是其主要的有效成分, 具有热不稳定性^[2], 制剂中多采用高浓度乙

醇提取^[3-4]。基于紫草萘醌类成分的理化性质,结合新近发展起来的闪式提取技术的特点^[5-6],笔者采用正交设计法,以 95% 乙醇为提取溶剂,以紫草总萘醌转移率和 β, β' -二甲基丙烯酸酯阿卡宁转移率为评价指标,优化了紫草醇提物的闪式提取工艺^[8];并对其进行了外用制剂配方研究,临床用于治疗银屑病,疗效确切。

本研究采用 HPLC 对紫草闪式提取醇提物进行了指纹图谱的研究,较全面地反映了紫草醇提物的化学信息,为进一步药效研究、制剂研发提供了质量保证。

1 材料

JHBE-50T 型闪式提取器(河南金鼎科技发展有限公司),Aigilent1100 型高效液相色谱仪(安捷伦科技有限公司),METTLER AJ150 型分析电子天平(METTLER),DU-800 型分光光度计(BECKMAN COULTER),Milli-Q 型纯水仪(MILLIPORE)。

左旋紫草素(批号 769-9803,中国药品生物制品检定所), β, β' -二甲基丙烯酸酯阿卡宁(批号 111689-200501,中国药品生物制品检定所),乙酰紫草素(批号 10122923,上海同田生物技术有限公司)。乙腈为色谱纯,购自 Fisher 公司,水为重蒸水,纯水仪自制,其余试剂均为分析纯。

10 批紫草饮片购于北京市的医院药房和药店,经首都医科大学附属北京中医医院李兆福副主任药师鉴定,为 2010 年版《中国药典》一部收载品种,见表 1。

表 1 10 批紫草样品信息

No.	生产厂家	产地	批号
1	北京丰泰金源药业有限公司	新疆	20081125
2	北京市志诚堂药业有限公司	新疆	20090901
3	中国亳州市京皖中药饮片厂	东北	120601
4	中国亳州市京皖中药饮片厂	浙江	120201
5	北京杏林药业有限责任公司	新疆	11031401
6	北京杏林药业有限责任公司	内蒙	09081201
7	北京深港药业有限公司	新疆	120403
8	北京盛世龙药业有限公司	新疆	1207178
9	北京三和药业有限公司	新疆	21270901
10	北京丰泰金源药业有限公司	新疆	12101102

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的制备 精密称取左旋紫草素对照品 8.00 mg、乙酰紫草素对照品 14.00 mg、 β, β' -二甲基丙烯酸酯阿卡宁对照品 8.00 mg,分别置于 50,

10,10 mL 量瓶中,用甲醇定容至刻度,摇匀,即得对照品溶液。精密吸取左旋紫草素对照品溶液 0.5 mL、乙酰紫草素对照品溶液 1.3 mL、 β, β' -二甲基丙烯酸酯阿卡宁对照品溶液 1 mL 于同一 5 mL 量瓶中,用甲醇稀释至刻度,摇匀,制成紫草对照品混合溶液。

2.2 供试品溶液的制备 称取紫草粉末(60 目) 20 g,加入 95% 乙醇 22 倍量,闪式提取 2 次(每次 120 s,140 V),滤过,合并 2 次滤液置 500 mL 量瓶中,定容至刻度,摇匀,即得紫草闪式提取醇提物。0.45 μm 微孔滤膜滤过,作为供试品溶液。

2.3 紫草闪式提取醇提物色谱指纹图谱分析方法的建立

2.3.1 色谱条件 Kromasil 100-5 C_{18} 色谱柱(4.6 mm \times 250 mm,5 μm),流动相 A 水-甲酸(300:0.5),B 乙腈,梯度洗脱,条件见表 2,检测波长 275 nm,光谱采集范围 190 ~ 400 nm,柱温 25 $^{\circ}\text{C}$,流速 1 mL \cdot min⁻¹,进样量 10 μL 。

表 2 梯度洗脱程序

t/min	A/%	B/%	流速/mL \cdot min ⁻¹
0	60	40	1
45	30	70	1
60	30	70	1
80	10	90	1
88	10	90	1
95	0	100	1
125	0	100	1

2.3.2 方法学考察 紫草闪式提取醇提物色谱指纹图谱中共有峰面积相差悬殊,其中峰面积 > 10% 的为第 6,10,11 号峰,峰面积 > 3%, < 10% 的为第 2,4,9 号峰,这 6 个峰的面积之和占共有峰总面积的 95%,因此方法学主要考察这 6 个峰。

精密度考察:取同一供试品溶液,连续进样 5 次,考察被确认为是共有峰的相对保留时间和相对保留峰面积的一致性,结果各色谱峰相对保留时间的 RSD < 0.5%,相对保留峰面积的 RSD < 3%,表明仪器精密度良好。结果见表 3。

重复性考察:取同一批次的紫草饮片,按 2.2 项下供试品溶液的制备方法平行制备 5 份供试品溶液,按 2.3.1 项下色谱条件检测,考察被确认共有峰的相对保留时间和相对保留峰面积的一致性,结果各色谱峰相对保留时间的 RSD 分别为 < 0.5%,相对保留峰面积 RSD < 3%,表明该实验方法基本稳

定。结果见表 3。

表 3 方法学考察

共有峰	相对保留时间 RSD			相对峰面积 RSD		
	精密度	重复性	稳定性	精密度	重复性	稳定性
2	0.11	0.15	0.19	0.54	2.14	1.09
4	0.08	0.09	0.16	0.70	2.34	0.50
6	0.06	0.05	0.06	0.17	1.33	0.22
9	0.02	0.04	0.07	0.32	1.22	0.27
10	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
11	0.02	0.03	0.07	0.17	1.32	0.13

稳定性考察:取同一供试品溶液,分别在 0, 2, 4, 8, 12, 18, 24, 32 h 检测,考察被确认共有峰的相对保留时间和相对峰面积,结果各色谱峰相对保留时间 RSD < 0.5%, 相对保留峰面积 RSD < 3%, 说明溶液在 32 h 内基本稳定。结果见表 3。

专属性试验:取不含供试品溶液的空白溶剂,按供试品溶液测定方法测定,结果空白溶剂无干扰,无严重基线漂移现象,专属性良好。

2.4 10 批紫草闪式提取醇提物 HPLC 指纹图谱的建立

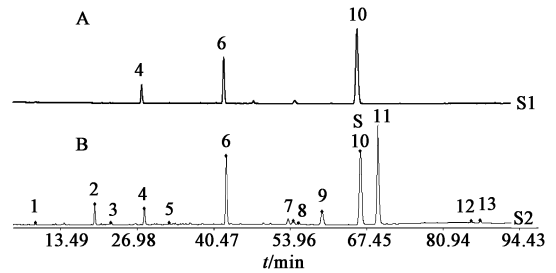
2.4.1 共有峰的选择和特征峰的指认 取紫草对照品混合溶液,按 2.3.1 方法测定,得对照品混合溶液色谱图,见图 1 中的 S1;再按上述 2.2 方法制备

表 4 紫草闪式提取醇提物样品中 13 个共有峰的相对保留时间

供试品	共有峰												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
S1	0.136	0.293	0.336	0.425	0.492	0.643	0.821	0.835	0.898	1.000	1.047	1.297	1.321
S2	0.135	0.293	0.337	0.424	0.491	0.643	0.822	0.836	0.898	1.000	1.047	1.295	1.320
S3	0.135	0.293	0.336	0.425	0.491	0.643	0.821	0.836	0.898	1.000	1.047	1.295	1.319
S4	0.135	0.293	0.336	0.425	0.492	0.643	0.822	0.836	0.898	1.000	1.047	1.295	1.320
S5	0.135	0.294	0.337	0.425	0.492	0.643	0.822	0.836	0.898	1.000	1.047	1.294	1.318
S6	0.135	0.294	0.337	0.425	0.492	0.643	0.822	0.837	0.899	1.000	1.046	1.294	1.319
S7	0.135	0.293	0.336	0.424	0.490	0.642	0.822	0.838	0.899	1.000	1.047	1.292	1.318
S8	0.136	0.295	0.338	0.427	0.493	0.644	0.823	0.839	0.899	1.000	1.046	1.291	1.316
S9	0.136	0.295	0.337	0.426	0.494	0.644	0.822	0.834	0.899	1.000	1.047	1.295	1.319
S10	0.136	0.294	0.336	0.425	0.492	0.643	0.821	0.834	0.898	1.000	1.047	1.293	1.317

2.4.3 指纹图谱相似度计算 将 10 批供试品溶液色谱数据导入国家药典委员会“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004A)”中,得紫草闪式提取醇提物色谱指纹图,见图 2;采用中位数法计算,10 批相似度分别为 0.998, 0.998, 0.997, 0.998, 0.959, 0.951, 0.995, 0.996, 0.981, 0.996。

10 批供试品溶液,同法测定,选择了 10 批药材中共有的 13 个色谱峰作为指纹图谱的共有峰,以阿拉伯数字 1~13 表示,见图 1 中的 S2。两者比对,共指认了供试品溶液中的 3 种萘醌类成分,4 号峰为左旋紫草素,6 号峰为乙酰紫草素,10 号峰为 β , β' -二甲基丙烯酰阿卡宁。



A. 对照品; B. 对照指纹图谱

图 1 紫草对照品色谱图及对照指纹图共有模式

2.4.2 参照峰的选择 根据《中药注射剂指纹图谱研究的技术要求(暂行)》^[7]中参照物的选择原则,将共有峰中峰面积较大,出峰时间适中,且稳定的 10 号色谱峰(阿卡宁)设为参照峰,计算各指纹峰的相对保留时间和相对峰面积,作为紫草闪式提取醇提物指纹图谱的技术参数,见表 4, 5。13 个共有峰的相对保留时间的 RSD < 0.5%, 峰面积之和 > 总峰面积的 90%, 符合要求。

3 讨论

3.1 色谱条件的选择 对 3 种流动相体系(水-甲醇、水-乙腈、甲酸水-甲醇、甲酸水-乙腈)及 3 种不同型号色谱柱进行了比较,结果以本实验所选的流动相及色谱柱对供试品溶液分离度好,色谱峰数目多。

表 5 紫草闪式提取醇提物样品中 13 个共有峰的相对峰面积

供试品	共有峰												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
S1	0.005	0.096	0.037	0.114	0.014	0.568	0.027	0.016	0.194	1.000	1.388	0.014	0.017
S2	0.010	0.125	0.038	0.145	0.016	0.456	0.031	0.012	0.173	1.000	1.233	0.020	0.020
S3	0.009	0.093	0.013	0.097	0.008	0.519	0.035	0.011	0.161	1.000	1.419	0.011	0.027
S4	0.011	0.129	0.011	0.118	0.011	0.500	0.032	0.011	0.161	1.000	1.369	0.014	0.018
S5	0.013	0.205	0.029	0.174	0.021	0.895	0.084	0.051	0.444	1.000	1.698	0.018	0.021
S6	0.017	0.117	0.029	0.308	0.021	0.454	0.032	0.069	0.211	1.000	1.073	0.017	0.030
S7	0.010	0.110	0.030	0.099	0.009	0.652	0.046	0.008	0.176	1.000	1.524	0.015	0.027
S8	0.010	0.102	0.014	0.137	0.010	0.418	0.024	0.030	0.163	1.000	1.345	0.017	0.019
S9	0.015	0.166	0.017	0.144	0.019	0.573	0.039	0.047	0.239	1.000	1.429	0.016	0.031
S10	0.012	0.163	0.017	0.099	0.009	0.675	0.058	0.016	0.158	1.000	1.247	0.016	0.025

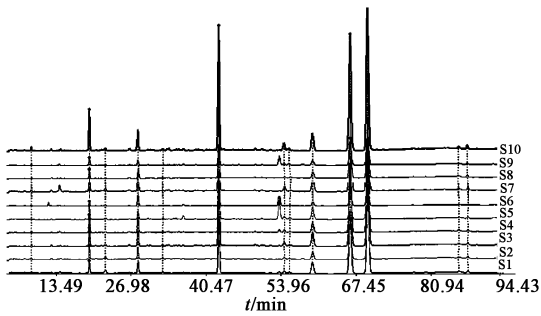


图 2 10 批紫草闪式提取醇提物 HPLC 指纹图

3.2 检测波长的选择 对供试品溶液进行 200 ~ 800 nm 全波长扫描,并参考药典及文献^[8],考察了 275,516 nm 下供试品的色谱行为。结果表明 275 nm 下色谱信息最为丰富,出峰数目多,且分离度良好,因此选择该波长作为检测波长。

3.3 特征峰的指认和参照峰的选择 在现有的实验条件下指认了供试品中的 3 种萘醌类成分,4 号峰为左旋紫草素,6 号峰为乙酰紫草素,10 号峰为 β,β' -二甲基丙烯酰阿卡宁。生成的对照指纹图谱中,相对保留时间为 1.047 的 11 号色谱峰,峰面积占总峰面积的 38.92%,是各指纹峰中面积最大的峰。由于无对照品比对,暂不能确认其化学组成,因此也未将其作为参照峰进行计算,目前正在对其进行进一步的制备分离、结构鉴定。

本实验在确定了紫草闪式提取工艺以后,对醇

提物建立了指纹图谱。获得的 13 个共有峰面积占总峰面积的 95% 以上,较全面的揭示了该醇提物的化学物质基础。并指认出了其中 3 个萘醌类成分,为控制其质量提供了一定的依据。

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:320.
- [2] 谢秀琼,邱明丰. 对制剂中紫草成分和提取工艺的探讨[J]. 中国药房,1997, 8(2):60.
- [3] 吴学渊,刘萍. 正交试验设计优选紫草的醇提工艺[J]. 中国医院用药评价与分析,2008, 8(10):750.
- [4] 潘晓鹃,沈立,杨志峰,等. 正交设计法优选紫草萘醌成分的提取工艺[J]. 中国医院药学杂志,2010, 30(18):1515.
- [5] 刘延泽. 植物组织破碎提取法及闪式提取器的创制与实践[J]. 中国天然药物,2007, 5(6):401.
- [6] 李精云,刘延泽. 组织破碎提取法在中药研究中的应用进展[J]. 中草药,2011, 42(10):2145.
- [7] 国家药品监督管理局. 关于印发《中药注射剂指纹图谱研究的技术要求(暂行)》的通知[J]. 中成药,2000,22(10):671.
- [8] 韩洁,朱利民,钟新楚,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.

[责任编辑 顾雪竹]