

HPLC 测定滇紫草及其两个近缘种中乙酰紫草素的含量

张 超¹, 何宝丰¹, 陈世友¹, 张庆芝^{2△}

(1. 铜梁县中医院, 重庆铜梁 402560; 2. 云南中医学院, 云南昆明 650500)

摘要:目的 建立滇紫草、密花滇紫草和昆明滇紫草中乙酰紫草素的含量测定方法。方法 采用 HPLC 法测定滇紫草、密花滇紫草和昆明滇紫草中乙酰紫草素的含量。结果 乙酰紫草素在 0.0952~1.9030 μg 范围内呈良好的线性关系。精密度、稳定性、重复性和加样回收率均达到要求。结论 该方法简便、准确、重现性好,可用于滇紫草及其两个近缘种中乙酰紫草素含量的测定。

关键词: HPLC; 滇紫草; 乙酰紫草素

中图分类号: R284

文献标志码: A

文章编号: 1000-2723(2014)06-0017-03

滇紫草(*Onosma paniculatum* Bur. et Franch.)始载于《滇南本草》^[1],为紫草科(*Boraginaceae*)滇紫草属(*Onosma*)多年生草本植物,本属植物的根入药,性寒,味甘、咸、微酸,用于清热凉血、解毒透疹。密花滇紫草和昆明滇紫草是滇紫草的 2 个近缘种,对于滇紫草和密花滇紫草的化学成分及含量的研究,已有报道^[2-5],其化学成分主要为萘醌类,滇紫草中还含有黄酮和鞣质^[6]。昆明滇紫草已经进行了生药学和质量标准的初步研究^[7-8],但是迄今为止尚未见对昆明滇紫草化学成分含量研究的报道,我们利用 HPLC 法对紫草科滇紫草属植物滇紫草 *Onosma paniculatum* Bur. et Fr.,密花滇紫草 *O. confertum* W. W. Smith 及昆明滇紫草 *O. cingulatum* W. W. Smith et J. E. Jeffrey 的主要化学成分进行含量测定的比较,从而为扩大滇紫草的药源提供基础数据。

1 实验材料(表 1)

表 1 实验材料来源

学名	药材名	产地	采收时间
<i>Onosma paniculatum</i> Bur. et Fr.	滇紫草	云南昆明	2009.10
<i>Onosma confertum</i> W. W. Smith	密花滇紫草	云南丽江	2008.9
<i>Onosma cingulatum</i> W. W. Smith et J. E. Jeffrey	昆明滇紫草	云南昆明	2008.10

注:实验材料由云南中医学院张庆芝教授鉴定。

2 仪器与试剂

2.1 仪器

色谱仪:岛津 LC-2010AHT 高效液相色谱仪;XS-125A 电子天平(瑞士);BUCHI-R-200 旋转蒸发器(瑞士);SK3300LH 超声波清洗器(上海隆拓仪器设备有限公司)。

2.2 试剂

甲醇;乙腈;0.1%磷酸,均为色谱纯。蒸馏水。乙酰紫草素对照品,自制(已通过结构鉴定,通过 HPLC 检测,纯度为 100%)。

3 实验方法与结果

3.1 色谱分析条件

检测器:UV 检测器;色谱软件:CLASS VP 6.12 工作站;色谱柱:Agilent Eclipse XDB (4.6×250 mm),5 μm ;检测波长:516 nm;流速:1.0 mL/min,柱温为 35℃;流动相:乙腈-0.1%磷酸(75:25),进样量:10 μL 。

3.2 检测波长的确定

《中国药典》(2010 年版),紫草中总萘醌吸收波长为 516 nm 处,同时以 β , β' -二甲基丙烯酰阿卡宁和乙酰紫草素 2 种成分为对照品,故选择 516 nm 为检测波长。

3.3 提取时间的考察

取滇紫草样品粉末(过 40 目筛)1 g,精密称定,加入 25 mL 甲醇超声提取,分别超声 30 min,45

收稿日期:2013-12-26

作者简介:张超(1984-),女,山东齐河人,药师,研究方向:药用植物资源开发与利用。

△通信作者:张庆芝,E-mail:zhangqingzhi99@tom.com

min, 60 min。超声 45 min, 药材中的乙酰紫草素提取效果最好(见表 2)。

表 2 乙酰紫草素提取时间考察

编号	提取时间/min	乙酰紫草素含量/%
1	30	1.476
2	45	1.638
3	60	1.615

3.4 供试品溶液的制备

取 3 种样品粉末(过 40 目筛)各 1 g, 精密称定, 加入 25 mL 甲醇超声提取 45 min, 定容至 25 mL 容量瓶中, 摇匀, 用 0.45 μm 的微孔滤膜滤过, 得到供试品溶液。

3.5 对照品溶液的制备

精密称定乙酰紫草素 19.03 mg, 分别加入甲醇定容于 100 mL 容量瓶中。制成含含乙酰紫草素 190.3 $\mu\text{g/mL}$ 的溶液, 作为对照品溶液, 备用。

3.6 乙酰紫草素线性关系的考察

取乙酰紫草素对照品, 精密称定, 分别配置成浓度为 9.52, 19.03, 38.06, 76.12, 114.18, 152.24, 190.30 $\mu\text{g/mL}$ 的溶液, 分别进样 10 μL , 对该标准品溶液进行测定, 记录乙酰紫草素的峰面积(见表 3), 以峰面积为纵坐标, 其进样量为横坐标, 绘制标准曲线, 从标准曲线回归方程为: $Y=6955.1X+4141.3$, $r=0.9999$, 表明对照品乙酰紫草素溶液在 0.0952~1.9030 μg 范围内呈良好的线性关系(见图 1)。

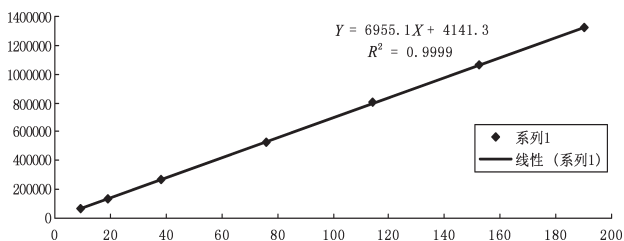


图 1 乙酰紫草素标准曲线

表 3 乙酰紫草素标准曲线测定结果

序号	浓度(X) / μg	峰面积(Y)		
		1	2	平均值
1	0.0952	69991	70440	70215.5
2	0.1903	134080	132926	133503.0
3	0.3806	272832	271876	272354.0
4	0.7612	528763	529497	529130.0
5	1.1418	804770	803121	803945.5
6	1.5224	1066604	1063239	1064921.5
7	1.9030	1323064	1325201	1324132.5

3.7 精密度考察

取已配好的乙酰紫草素的对照品溶液, 平行测定 6 次, 记录乙酰紫草素的峰面积, 计算含量, 其 RSD 值分别为 1.81%, 表明仪器精密度良好(见表 4)。

表 4 乙酰紫草素精密度实验结果

序号	进样量/ μL	峰面积	含量/%	平均含量/%	RSD/%
1	10	450460.0	1.79	1.75	1.81
2	10	457460.0	1.79		
3	10	464116.5	1.75		
4	10	452300.0	1.74		
5	10	434958.5	1.71		
6	10	436114.0	1.74		

3.8 稳定性考察

称取滇紫草粉末, 按供试品溶液的制备方法处理成 6 份, 在 0, 2, 4, 6, 8, 10 h 进样 10 μL 。记录乙酰紫草素的峰面积, 计算其含量, RSD 为 1.30%(见表 5)。显示乙酰紫草素在 10 h 内较稳定。

表 5 乙酰紫草素稳定性实验结果

序号	时间/h	保留时间/min	峰面积	含量/%	平均含量/%	RSD/%
1	0	6.87	483756	1.64	1.62	1.30
2	2	6.88	478594	1.64		
3	4	6.88	473447	1.62		
4	6	6.89	470073	1.61		
5	8	6.90	464545	1.60		
6	10	6.89	461480	1.59		

3.9 重复性考察

取滇紫草粉末, 按供试品溶液的制备方法处理成 6 份, 依次进样每次 10 μL , 平行测定 6 次并计算乙酰紫草素的含量, RSD 为 0.99%(见表 6)。表明该方法重复性很好。

表 6 乙酰紫草素重复性实验结果

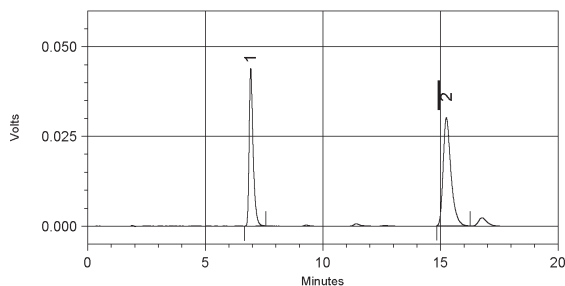
序号	保留时间/min	峰面积	含量/%	平均含量/%	RSD/%
1	7.06	455353	1.56	1.57	0.99
2	7.06	455941	1.56		
3	7.06	453901	1.56		
4	7.05	454333	1.56		
5	7.06	452173	1.55		
6	7.06	453270	1.55		

3.10 加样回收率实验

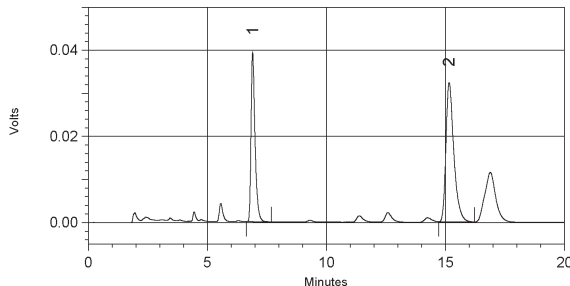
取滇紫草粉末(过40目筛)0.45 g,精密称定,置100 mL三角瓶中,加入25 mL甲醇,超声提取45 min,放冷,再称定重量,用甲醇补足损失的重量,摇匀,加入10 mL,15 mL,20 mL的乙酰紫草素

表7 乙酰紫草素加样回收率

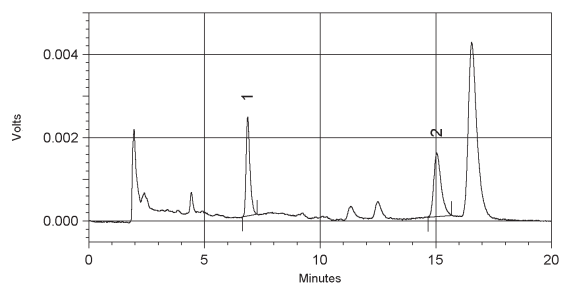
序号	药材量/g	检测量/ μ g	药材含量/ μ g	加入量/ μ g	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
1	0.4708	1464.21	728.10	751.00	98.02		
2	0.4798	1476.60	742.02	751.00	97.81		
3	0.4678	1457.12	723.46	751.00	97.69		
4	0.4412	1761.60	682.32	1126.50	95.81		
5	0.4401	1794.06	680.62	1126.50	98.84	96.95	1.21
6	0.4386	1767.01	678.30	1126.50	96.65		
7	0.4012	2056.13	620.46	1502.00	95.58		
8	0.4023	2069.84	622.16	1502.00	96.38		
9	0.4058	2065.66	627.57	1502.00	95.74		



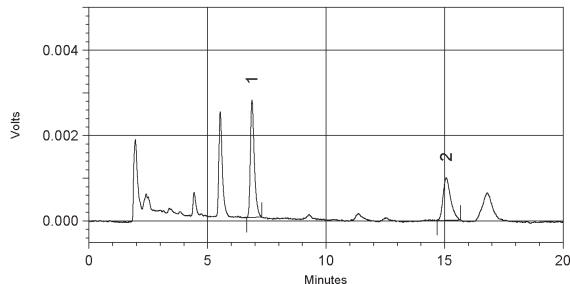
A



B



C



D

A.对照品色谱图;B.滇紫草药材色谱图;C.密花滇紫草药材色谱图;D.昆明滇紫草药材色谱图 1、乙酰紫草素

图2 对照品和不同种滇紫草药材的色谱图

4 讨论

对滇紫草、密花滇紫草和昆明滇紫草中乙酰紫草素的含量测定研究中,高效液相色谱法简便、准确、快速、分离效果好。

对照品溶液,经0.45 μ m微孔滤膜过滤,即得。平行制备3份供试品溶液,各取10 μ L注入液相色谱仪,进行测定。测得乙酰紫草素的平均加样回收率为96.95%,RSD为1.21%(见表7);表明该方法准确可靠。

3.11 样品测定

称取滇紫草、密花滇紫草和昆明滇紫草,按供试品溶液的制备方法各处理成3份,采用上述色谱条件,对滇紫草及其近缘种密花滇紫草和昆明滇紫草的药材进行HPLC分析(见图2),实验结果见表8。实验结果表明,不同品种的滇紫草中乙酰紫草素含量也有差别。

表8 滇紫草及其近缘种中乙酰紫草素含量测定结果

样品	乙酰紫草素含量/%			平均含量/%	RSD/%
	1	2	3		
滇紫草	1.636	1.647	1.622	1.635	0.77
密花滇紫草	0.122	0.121	0.117	0.120	2.21
昆明滇紫草	0.114	0.113	0.113	0.113	0.63

通过本实验建立了高效液相色谱法测定滇紫草及其近缘种中乙酰紫草素含量的方法。实验研究发现密花滇紫草和昆明滇紫草中乙酰紫草素的含量明显比滇紫草低,能否作为滇紫草(下转第22页)

- [3] 袁义,王娟. 慢性阻塞性肺疾病患者合并抑郁障碍的研究[J]. 临床肺科杂志,2014,19(1):87-88.
- [4] Kunik ME, Roundy K, Veazey C, et al. Surprisingly high prevalence of anxiety and depression in chronic breathing disorders[J]. Chest, 2005, 127(4): 1205-1211.
- [5] 张伟,谷明明. 浅析“肺朝百脉”与肺胀[J]. 云南中医学院学报,2013,36(1):19-21.
- [6] Khaled A, Umme K, Rachel D, et al. Biomarkers of systemic inflammation and depression and fatigue in moderately stable COPD[J]. Respir Res, 2011, 12(1):3.
- [7] 江恋,侯昕珩. 帕罗西汀辅助治疗慢性阻塞性肺疾病合并抑郁症的疗效[J]. 广东医学,2012,33(20):3163-3164.
- [8] 陈秋帆,洪文扬. 抑郁症的治疗需调肺[J]. 辽宁中医药大学学报,2008,10(9):12-13.
- [9] 叶陈毅,汪俊祥. 慢性阻塞性肺疾病相关合并症临床研究进展[J]. 临床肺科杂志,2013,18(7):1305-1306.
- [10] 朱迎霞,李海峰. 抗抑郁治疗对慢性阻塞性肺疾病患者生活质量及预后的影响[J]. 临床肺科杂志,2013,18(3):472-474.
- (编辑:杨阳)

(上接第 19 页)药材资源开发利用仍需要进一步深入研究。

参考文献:

- [1] 于乃义,于兰馥整理. 明·兰茂著. 滇南本草[M]. 昆明:云南科技出版社,2004:520.
- [2] 徐国钧. 常用中药材品种整理和质量研究(第一册)[M]. 福州:福建科学技术出版社,1994:184.
- [3] 艾克蕙,李凤英,李勇,等. 密花滇紫草萘醌成分研究及紫草素含量测定[J]. 植物学报(英文版),1989(7):549-553.
- [4] 罗淑荣,李彤. 紫草中萘醌的测定[J]. 药学学报,1992,17(9):553-554.
- [5] 汪长钢,李常营,邱芳萍. 不同紫草中左旋紫草素含量比较及提取条件优化[J]. 长春工业大学学报(自然科学版)2010,31(3):251-254.
- [6] 胡军,普琼惠. 滇紫草化学成分的研究[J]. 云南中医中药杂志,2008(3):29.
- [7] 张超,何宝丰,张庆芝. 昆明滇紫草生药学的研究[J]. 湖南中医药大学学报,2011,31(7):32-34.
- [8] 陈钰沁,张超,赵明智,等. 昆明滇紫草质量标准初步研究[J]. 云南中医学院学报,2011,34(2):7-10.
- (编辑:杨阳)

Content Determination of Acetylshikonin in *Onosma paniculatum* and Its Two Closely Related Species by HPLC

ZHANG Chao¹, HE Bao-feng¹, CHEN Shi-you¹, ZHANG Qing-zhi²

(1. TCM Hospital of Tongliang, Tongliang, Chongqing 402560, China;

2. Yunnan University of TCM, Kunming 650200, China)

ABSTRACT: **Objective** To establish the determination method of acetylshikonin in three species, *Onosma paniculatum* Bur. et Fr., *O. cingulatum* W. W. Smith et J. E. Jeffrey and *O. confertum* W. W. Smith. **Methods** Using HPLC as quantitative analysis means and acetylshikonin as the detection of targets, the quality standards of above three species were studied. **Results** The acetylshikonin had good linear relationship in the range of 0.0952~1.9030 μ g. Precision, stability, repeatability and recovery are achieved. **Conclusion** The method is simple, accurate, reproducible and suitable for determining the acetylshikonin in *Onosma paniculatum* and its two closely related species.

KEY WORDS: HPLC; *Onosma paniculatum* Bur. et Fr.; acetylshikonin