

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2021.17.017

# 不同产地蒙紫草中左旋紫草素和 $\beta,\beta'$ -二甲基丙烯酰阿卡宁含量测定及质量标准研究\*

吕晓洁<sup>1</sup>, 渠弼<sup>1</sup>, 刘德旺<sup>1</sup>, 程丹丹<sup>1</sup>, 那生桑<sup>2△</sup>

(1. 内蒙古医科大学药学院, 内蒙古 呼和浩特 010110; 2. 内蒙古医科大学蒙医学院, 内蒙古 呼和浩特 010110)  
**摘要:**目的 建立测定蒙药蒙紫草中左旋紫草素和 $\beta,\beta'$ -二甲基丙烯酰阿卡宁含量的方法,并制订其质量标准。方法 采用显微鉴别法,对药材样品的横切面和粉末进行鉴别;采用薄层色谱法对药材样品中左旋紫草素和 $\beta,\beta'$ -二甲基丙烯酰阿卡宁进行定性分析;测定药材样品中水分、灰分、浸出物的含量;采用紫外分光光度法测定药材样品中左旋紫草素的含量,检测波长为516 nm;采用高效液相色谱法测定药材样品中 $\beta,\beta'$ -二甲基丙烯酰阿卡宁的含量,色谱柱为Thermo Hypersil C<sub>18</sub>柱(250 mm×4.6 mm,5  $\mu$ m),流动相为乙腈-0.5%甲酸水溶液(70:30,V/V),流速为1.0 mL/min,检测波长为275 nm,柱温为25℃,进样量为10  $\mu$ L。结果 药材样品横切面和粉末显微特征明显;薄层色谱图中可见左旋紫草素和 $\beta,\beta'$ -二甲基丙烯酰阿卡宁的特征斑点,且斑点分离清晰。左旋紫草素质量浓度在5~50  $\mu$ g/mL( $R^2=0.9999$ )范围内与吸光度线性关系良好, $\beta,\beta'$ -二甲基丙烯酰阿卡宁的质量浓度在10~200  $\mu$ g/mL( $R^2=0.9996$ )范围内与峰面积线性关系良好;精密性、稳定性、重复性试验的RSD均小于2.00%;左旋紫草素和 $\beta,\beta'$ -二甲基丙烯酰阿卡宁的平均加样回收率分别为101.23%和100.16%,RSD分别为2.01%和2.88%( $n=9$ )。根据1-7号批次药材拟订蒙紫草的质量标准,羟基蒽醌总色素(以左旋紫草素计)含量不得低于1.00%, $\beta,\beta'$ -二甲基丙烯酰阿卡宁含量不得低于0.15%;蒙紫草中水分含量不得超过12.00%,总灰分含量不得超过8.00%,酸不溶性灰分含量不得超过2.00%,水溶性浸出物含量不得低于30.00%,醇溶性浸出物含量不得低于10.00%。结论 该方法操作简便,结果准确,重复性高,稳定性好,可用于蒙药蒙紫草中左旋紫草素和 $\beta,\beta'$ -二甲基丙烯酰阿卡宁的含量测定和质量控制。

**关键词:**蒙药;蒙紫草;左旋紫草素; $\beta,\beta'$ -二甲基丙烯酰阿卡宁;含量测定

中图分类号:R932;R284.1;R286.0

文献标志码:A

文章编号:1006-4931(2021)17-0065-06

## Content Determination of *L*-Shikonin and $\beta,\beta'$ -Dimethylacrylalkannin in *Arnebiae Szechenyi Radix* from Different Habitats and Study on Its Quality Standard

LYU Xiaojie<sup>1</sup>, QU Bi<sup>1</sup>, LIU Dewang<sup>1</sup>, CHENG Dandan<sup>1</sup>, NA Shengsang<sup>2</sup>

(1. College of Pharmacy, Inner Mongolia Medical University, Hohhot, Inner Mongolia, China 010110; 2. Mongolian Medicine College of Pharmacy, Inner Mongolia Medical University, Hohhot, Inner Mongolia, China 010110)

**Abstract: Objective** To establish a method for the content determination of *L*-shikonin and  $\beta,\beta'$ -dimethylacrylalkannin in *Arnebiae szechenyi Radix*, and to formulate its quality standard. **Methods** The cross-section and powder of medicinal samples were identified by microscopic identification, the *L*-shikonin and  $\beta,\beta'$ -dimethylacrylalkannin in medicinal samples were qualitatively identified by the thin-layer chromatography(TLC) method, the contents of water, ash and extract were determined, and the content of *L*-shikonin in medicinal samples was determined by ultraviolet spectrophotometry at the detection wavelength of 516 nm. The content of  $\beta,\beta'$ -dimethylacrylalkannin in medicinal material samples was determined by the high-performance liquid chromatography(HPLC) method, the chromatographic column was Thermo Hypersil C<sub>18</sub> column(250 mm×4.6 mm,5  $\mu$ m), the mobile phase was acetonitrile-0.5% formic acid aqueous solution(70:30,V/V), the flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelength was 275 nm, the column temperature was 25℃, and the injection volume was 10  $\mu$ L. **Results** The microscopic characteristics of cross-section and powder of the samples were obvious, and the characteristic spots of *L*-shikonin and  $\beta,\beta'$ -dimethylacrylalkannin could be seen in the TLC chromatogram, and the spots were separated. The concentration of *L*-shikonin showed a good linear relationship with absorbance in the range of 5~50  $\mu$ g/mL( $R^2=0.9999$ ), and the concentration of  $\beta,\beta'$ -dimethylacrylalkannin showed a good linear relationship with the peak area in the range of 10~200  $\mu$ g/mL( $R^2=0.9996$ ). The RSDs of precision, stability and repeatability tests were all less than 2.00%. The average recoveries of *L*-shikonin and  $\beta,\beta'$ -dimethylacrylalkannin were 101.23% and 100.16% with RSDs of 2.01% and 2.88%( $n=9$ ), respectively. The quality standard of *Arnebiae Szechenyi Radix* was formulated according to batches 1-7, which was as follows: the content of hydroxyanthraquinone pigments (calculated by *L*-shikonin) and  $\beta,\beta'$ -dimethylacrylalkannin should not be less than 1.00%, 0.15%, respectively. The content of water, total ash and acid insoluble ash should not exceed 12.00%, 8.00%, 2.00%, respectively. The content of water-soluble extract and alcohol-soluble extract should not be less than 30.00%, 10.00%, respectively. **Conclusion** The method is simple, accurate, reproducible and stable, which can be used for the content determination of *L*-shikonin and  $\beta,\beta'$ -dimethylacrylalkannin in Mongolian medicine *Arnebiae Szechenyi Radix* and control its quality.

**Key words:** Mongolia medicine; *Arnebiae Szechenyi Radix*; *L*-shikonin;  $\beta,\beta'$ -dimethylacrylalkannin; content determination

\*基金项目:内蒙古自治区人民政府蒙医药标准化项目[2018-[008]];内蒙古自治区自然科学基金[2020LH08026]。

第一作者:吕晓洁,女,博士,副教授,研究方向为微粒给药系统及制剂质量标准,(电话)0471-6653159(电子信箱)lxj0471@126.com。

△通信作者:那生桑,男,蒙古族,博士,教授,研究方向为蒙药现代化,(电话)0471-6653163(电子信箱)504085531@qq.com。

蒙紫草为紫草科植物疏花软紫草 *Arnebia szechenyi* Kanitz. 的干燥根, 蒙文植物名塔日漠格-希日-伯日漠格。据《内蒙古植物药志(第二卷)》<sup>[1]</sup>《内蒙古植物志(第四卷)》<sup>[2]</sup>记载和蒙医用药情况考证, 属蒙医自采自用的常用药材。本课题研究的药材为新起草品种, 紫草收载于 2020 年版《中国药典(一部)》<sup>[3]</sup>, 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, 二者来源不同。本品药材蒙名和中文名根据《中国蒙药名词规范(2016 年版)》紫草名前冠“蒙”而成, 植物属名加药用部位自拟拼写了药材品种拉丁名, 根据《内蒙古蒙药炮制规范(2015 年版)》命名方法确定品名, 与药材名一致。疏花软紫草为砾石生旱生植物, 生于石质山坡及山坡沟地, 见于巴彦淖尔市、阿拉善市、贺兰山等地。蒙紫草根入药, 性凉, 味甘、微苦, 有清热、凉血、止血、透疹功效。该药虽入味多种蒙医药传统复方制剂, 但现代研究甚少, 与其他属紫草混用严重。本研究中参考 2020 年版《中国药典(一部)》紫草项下规定, 从药材的性状、显微特征、水分、总灰分、酸不溶性灰分、浸出物、含量测定等方面进行研究, 建立其质量标准, 为蒙紫草的进一步应用提供了科学依据。现报道如下。

## 1 仪器与试药

### 1.1 仪器

U3000 型高效液相色谱仪(美国 Thermo 公司), 包括四元泵、在线脱气机、自动进样器、二极管阵列(DAD)检测器、Chromeleon 7 色谱工作站; AL204 型电子天平(瑞士梅特勒-托利多仪器有限公司, 精度为十万分之一); TU-1901 型紫外分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司); SX2-4-10 型马弗炉(天津市中环实验电炉有限公司); SB5-12DTD 型超声波清洗机(宁波新芝生物科技股份有限公司, 功率为 500 W, 频率为 40 kHz)。

### 1.2 试药

左旋紫草素对照品(批号为 110769-200506, 含量为 98%),  $\beta, \beta'$ -二甲基丙烯酰阿卡宁对照品(批号为 111689-201504, 含量为 98%), 均购自中国食品药品检定研究院; GF<sub>254</sub> 薄层板(青岛海洋化工有限公司); 甲醇、乙腈均为色谱纯(美国 Fisher 公司); 其他试剂均为分析纯, 水为超纯水。蒙紫草药材信息见表 1。采摘地点 A, 内蒙古自治区巴彦淖尔市乌拉特前旗; 采摘地点 B, 内蒙古自治区巴彦淖尔市乌拉特后旗; 采摘地点 C, 内蒙古自治区乌海拉僧庙; 采摘地点 D, 内蒙古自治区乌海老石旦洗煤厂; 采摘地点 E, 内蒙古自治区乌海乌巴公路 41 km; 采摘地点 F, 内蒙古自治区阿拉善右旗阿贵庙。经内蒙古医科大学渠弼教授鉴定为紫草科植物疏花软紫草 *Arnebia szechenyi* Kanitz. 的干燥根。

表 1 蒙紫草药材信息

Tab. 1 Information of *Arnebiae Szechenyi Radix*

| 批次 | 批号       | 采摘地点 | 采摘时间       | 批次 | 批号       | 采摘地点 | 采摘时间       |
|----|----------|------|------------|----|----------|------|------------|
| 1  | 181001   | A    | 2018-10-01 | 7  | 191004-2 | B    | 2019-10-04 |
| 2  | 181010   | A    | 2018-10-10 | 8  | 181110   | B    | 2018-11-10 |
| 3  | 181011   | A    | 2018-10-11 | 9  | 181111-1 | C    | 2018-11-11 |
| 4  | 191003-1 | B    | 2019-10-03 | 10 | 181111-2 | D    | 2018-11-11 |
| 5  | 191003-2 | B    | 2019-10-03 | 11 | 191005   | E    | 2019-10-05 |
| 6  | 191004-1 | B    | 2019-10-04 | 12 | 191012   | F    | 2019-10-12 |

## 2 方法与结果

### 2.1 药材性状

本品呈圆锥形或圆柱形, 稍扭曲, 长 6~15 cm, 直径 0.5~3.0 cm。根头部略粗大, 顶端有残茎多个, 被短硬毛; 表面紫红色或灰紫色, 皮部常数层相叠, 易剥离。质硬而脆, 易折断, 断面较整齐, 皮部紫红色, 木部黄白色; 气特异, 味微甘、微涩。

### 2.2 药材鉴别

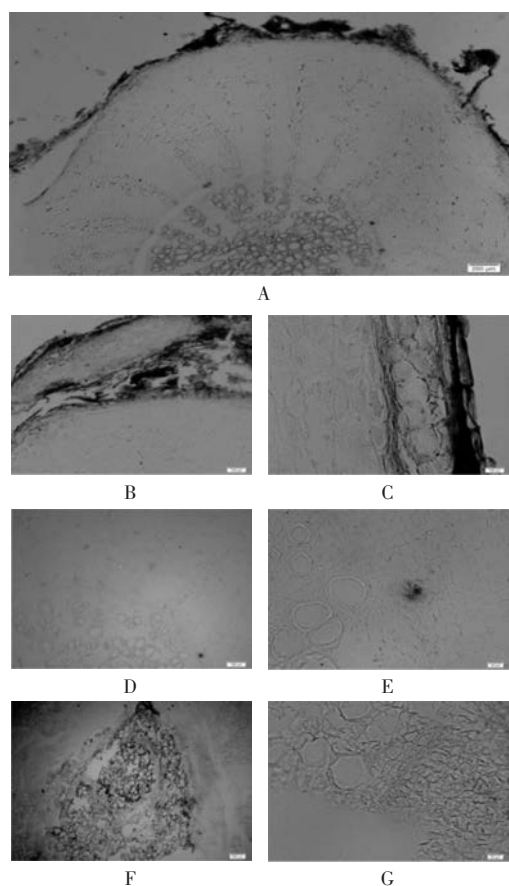
#### 2.2.1 显微鉴别

横切面: 木栓层 1 至多层, 将皮层及韧皮部分隔呈层状, 外侧皮层及韧皮部多颓废呈裂隙状。内侧皮层狭窄, 由 2~3 层薄壁细胞组成, 细胞多切向延长。韧皮部宽广, 射线细胞多列放射状, 韧皮束内侧细胞常木栓化。束间形成层明显, 木质部放射状, 外侧导管多径向排列, 老根中心具木栓层环, 环内组织除导管外多颓废呈裂隙状。木栓细胞和部分薄壁细胞含紫色素。详见图 1。

粉末: 呈深紫红色; 非腺毛单细胞, 直径 13~36  $\mu\text{m}$ , 直立或稍弯曲, 壁光滑或具壁疣, 部分胞腔内含紫棕色色素; 栓化细胞红棕色, 表面观呈多角形或圆多角形, 含紫红色色素; 薄壁细胞较多, 淡棕色或无色, 大多充满紫红色色素; 导管主为网纹导管, 少有具缘纹孔导管, 直径 9~60  $\mu\text{m}$ 。纤维纹孔明显, 直径 7~15  $\mu\text{m}$ 。详见图 2。

#### 2.2.2 薄层鉴别

取本品粉末 0.5 g(过 3 号筛), 精密称定, 加石油醚(60~90  $^{\circ}\text{C}$ ) 20 mL, 超声处理(功率为 500 W, 频率为 40 kHz) 20 min, 滤过, 滤液浓缩至 1 mL, 作为供试品溶液。取左旋紫草素和  $\beta, \beta'$ -二甲基丙烯酰阿卡宁对照品适量, 用乙醇配成质量浓度为 1 mg/mL 的对照品溶液。照 2020 年版《中国药典(四部)》通则 0502 薄层色谱法试验, 吸取上述溶液各 4  $\mu\text{L}$ , 分别点于同一硅胶板上, 以环己烷-甲苯-乙酸乙酯-甲酸(5:5:0.5:0.1, V/V/V/V)为展开剂, 展开, 取出, 晾干。供试品溶液色谱中, 在与对照品溶液色谱相应位置上显相同紫红色斑点, 再喷以 10% 氢氧化钾甲醇溶液, 斑点变为蓝色, 且斑点均分离清晰。详见图 3。



A. 蒙紫草药材横切面特征 B-C. 木栓层及皮层 D-E. 韧皮部、形成层、木质部 F. 老根中心颓废木质部 G. 束间形成层

图 1 蒙紫草药材横切面特征 (×40)

A. Cross sectional characteristics of *Arnebieae Szechenyi Radix*

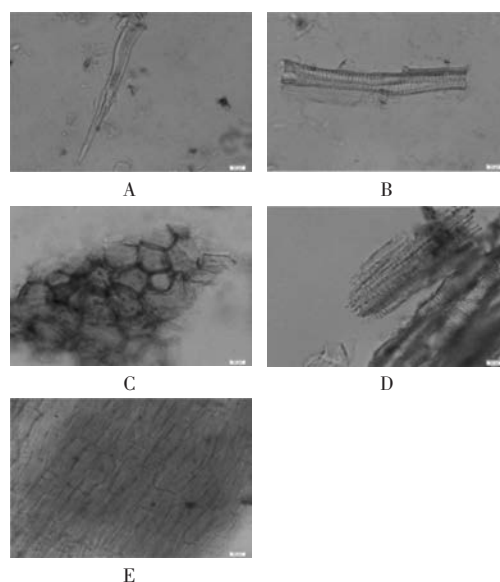
B-C. Cork layer and cortex D-E. Phloem, cambium and xylem

F. Decadent xylem in the center of old root G. Interfascicular cambium

Fig. 1 Cross section characteristics of *Arnebieae Szechenyi Radix* (×40)

### 2.3 水分、灰分、浸出物检查

本品属根类药材,根皮失水后较脆且薄,根据前期研究,有效成分中含有水溶性物质,不适合用水清洗,处理和采集过程中易带入泥土等杂质而影响药材质量,故参考 2020 年版《中国药典(四部)》通则 2302 检查其总灰分和酸不溶性灰分。此外,药材含水量反映其干燥程度,影响有效成分的稳定性和批量加料时的准确性,合适的水分含量可防止储存过程中的虫害与霉变,避免有效成分分解、酶解变质等,故进行水分检查(通则 0832 第二法)。同时,参考通则 2201 水溶性浸出物测定法的冷浸法、醇溶性浸出物测定法,对收集药材的水溶性和醇溶性浸出物进行了含量测定。结果见表 2。考虑试验主要在秋冬干燥季节进行,故规定蒙紫草水分含量不得过 12.00%;其余项目的含量,结合具体情况,初步制订质量标准:总灰分含量不得过 8.00%,酸不溶性灰分含量不得过 2.00%,水溶性浸出物含量不得低于



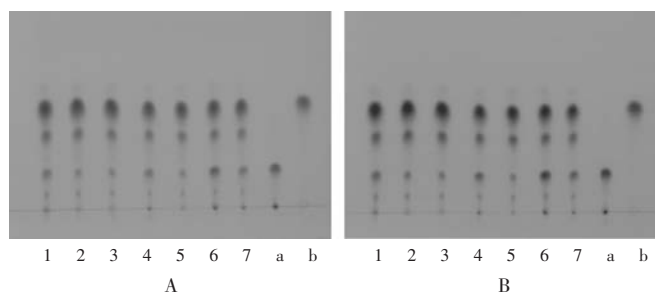
A. 非腺毛 B. 导管 C. 木栓细胞 D. 纤维 E. 薄壁细胞

图 2 蒙紫草药材粉末特征 (×400)

A. Non-glandular hair B. Vessels C. Cork cells D. Fiber

E. Parenchyma cells

Fig. 2 Powder characteristics of *Arnebieae Szechenyi Radix* (×400)



A. 显色前 B. 显色后

1-7. 1-7 号批次样品 a. 左旋紫草素对照品 b.  $\beta, \beta'$ -二甲基丙烯酰阿卡宁对照品

图 3 蒙紫草薄层色谱图

A. before color development B. after color development

1-7. Samples of batches 1-7

a. *L*-shikonin reference substance b.  $\beta, \beta'$ -dimethylacrylalkannin reference substance

Fig. 3 TLC chromatograms of *Arnebieae Szechenyi Radix*

30.00%, 醇溶性浸出物含量不得低于 10.00%。

### 2.4 左旋紫草素含量测定

#### 2.4.1 测定波长选择

参照 2020 年版《中国药典(四部)》通则 0401 紫外分光光度法,将对照品溶液进行全波长扫描,在 516 nm 波长处有最大吸收,供试品在相应波长也有最大吸收,阴性对照无干扰,故选择 516 nm 为紫外测定波长。

#### 2.4.2 提取方法考察

取粉碎后过 3 号筛的蒙紫草药材 0.5 g,精密称定,共 3 份,分别加入石油醚(60~90℃)和乙醇 100 mL,分别浸泡 4, 5, 6 h,不时振摇,滤过。精密量取续滤液

表2 样品水分、总灰分、酸不溶性灰分、水溶性浸出物及醇溶性浸出物平均含量测定结果(%,  $n=3$ )

Tab. 2 Results of content determination of water, total ash, acid insoluble ash, water-soluble extract and alcohol soluble extract in the sample(%,  $n=3$ )

| 批次        | 水分   | 总灰分  | 酸不溶性灰分 | 水溶性浸出物 | 醇溶性浸出物 |
|-----------|------|------|--------|--------|--------|
| 1         | 7.92 | 6.21 | 1.52   | 49.12  | 15.67  |
| 2         | 6.45 | 4.63 | 0.69   | 32.65  | 12.17  |
| 3         | 7.45 | 4.61 | 0.74   | 33.79  | 11.16  |
| 4         | 6.72 | 6.29 | 1.03   | 32.55  | 14.19  |
| 5         | 7.16 | 6.34 | 1.20   | 38.82  | 16.66  |
| 6         | 7.69 | 6.07 | 1.41   | 41.18  | 19.61  |
| 7         | 7.80 | 5.86 | 1.13   | 38.30  | 17.57  |
| $\bar{X}$ | 7.31 | 5.72 | 1.10   | 38.06  | 15.29  |

5 mL, 转移至 25 mL 容量瓶中, 加溶液至刻度, 摇匀, 于 516 nm 波长处测量吸光度, 每份重复测定 3 次。结果同种提取溶剂提取时间越长, 提取量越大, 乙醇作提取溶剂时, 含量增加更快。综合考虑石油醚和乙醇的提取效果, 并考虑时间、提取溶剂的毒性及溶剂的成本问题, 参考同属药材紫草 2020 年版《中国药典(一部)》中的提取方法, 结合药物稳定性综合考虑, 选择提取溶剂为乙醇, 提取时间为 5 h。

#### 2.4.3 溶液制备方法

取粉碎后过 3 号筛的蒙紫草药材 0.5 g, 精密称定, 加乙醇 100 mL, 浸泡 5 h, 不时振摇, 滤过, 精密量取续滤液 5 mL, 转移至 25 mL 容量瓶中, 加溶液至刻度, 摇匀, 即得供试品溶液。取左旋紫草素对照品, 精密称定, 加乙醇制成质量浓度为 200  $\mu\text{g/mL}$  的对照品溶液。

#### 2.4.4 方法学考察

线性关系考察: 将对照品溶液逐级稀释, 于 516 nm 波长处进样测定 2 次, 测量吸光度, 取平均值, 以左旋紫草素质量浓度( $X$ ,  $\mu\text{g/mL}$ )为横坐标、吸光度( $Y$ )为纵坐标进行线性回归, 得线性回归方程  $Y=0.0246X+0.0103$ ,  $R^2=0.9999$  ( $n=2$ )。结果表明, 左旋紫草素质量浓度在 5~50  $\mu\text{g/mL}$  范围内与吸光度线性关系良好。

精密度试验: 依法制备供试品溶液, 于 516 nm 波长下连续进样测定 6 次。结果左旋紫草素吸光度的  $RSD$  为 0.16% ( $n=6$ ), 表明仪器精密度良好。

稳定性试验: 取同一批(批号为 181011)样品, 依法制备供试品溶液, 于室温下放置 0, 1, 2, 4, 6, 8 h 时测量吸光度。结果左旋紫草素吸光度的  $RSD$  为 0.58% ( $n=6$ ), 表明供试品溶液在室温下放置 8 h 稳定。

重复性试验: 取同一批(批号为 181011)蒙紫草粉末, 精密称定, 依法制备供试品溶液, 于 516 nm 波长下进样测定 6 次, 记录吸光度值, 并计算含量。结果左旋紫草素的平均含量为 2.60%,  $RSD$  为 1.72% ( $n=6$ ), 表

明方法重复性良好。

加样回收试验: 取同一批(批号为 181011)已知含量的蒙紫草粉末 0.1 g, 精密称定, 共 9 份, 依法制备供试品溶液, 按 50%, 100%, 150% 低、中、高水平加入对照品, 测定含量, 并计算回收率。结果见表 3。

表3 加样回收试验结果( $n=9$ )

Tab. 3 Results of the recovery test( $n=9$ )

| 样品含量(mg) |      | 加入量(mg) |      | 测得量(mg) |      | 回收率(%) |        | $\bar{X}$ (%) |        | $RSD$ (%) |      |
|----------|------|---------|------|---------|------|--------|--------|---------------|--------|-----------|------|
| A        | B    | A       | B    | A       | B    | A      | B      | A             | B      | A         | B    |
| 1.67     | 0.87 | 0.80    | 0.50 | 2.45    | 1.35 | 97.50  | 96.00  |               |        |           |      |
| 1.67     | 0.87 | 0.80    | 0.50 | 2.47    | 1.36 | 100.00 | 98.00  |               |        |           |      |
| 1.67     | 0.87 | 0.80    | 0.50 | 2.47    | 1.35 | 100.00 | 96.00  |               |        |           |      |
| 1.68     | 0.87 | 1.60    | 0.90 | 3.30    | 1.77 | 101.25 | 100.00 |               |        |           |      |
| 1.68     | 0.87 | 1.60    | 0.90 | 3.30    | 1.77 | 101.25 | 100.00 | 101.23        | 100.16 | 2.01      | 2.88 |
| 1.68     | 0.87 | 1.60    | 0.90 | 3.29    | 1.77 | 100.62 | 100.00 |               |        |           |      |
| 1.67     | 0.87 | 2.40    | 1.40 | 4.15    | 2.33 | 103.33 | 104.29 |               |        |           |      |
| 1.67     | 0.87 | 2.40    | 1.40 | 4.17    | 2.32 | 104.17 | 103.57 |               |        |           |      |
| 1.67     | 0.87 | 2.40    | 1.40 | 4.14    | 2.32 | 102.92 | 103.57 |               |        |           |      |

注: A 为左旋紫草素, B 为  $\beta, \beta'$ -二甲基丙烯酰阿卡宁。

Note: A is *L*-shikonin, B is  $\beta, \beta'$ -dimethylacrylalkannin.

#### 2.4.5 样品含量测定

取 1~7 号批次样品, 依法制备供试品溶液, 分别于 516 nm 波长处进样测定 3 次, 并计算含量。结果样品中左旋紫草素(以干燥品计)的含量介于 1.40%~4.09%, 平均含量为 2.49%。考虑到不同地点、不同时间采集的药材含量差异较大, 故拟订本品羟基蒽醌总色素(以左旋紫草素计)不得少于 1.00%。

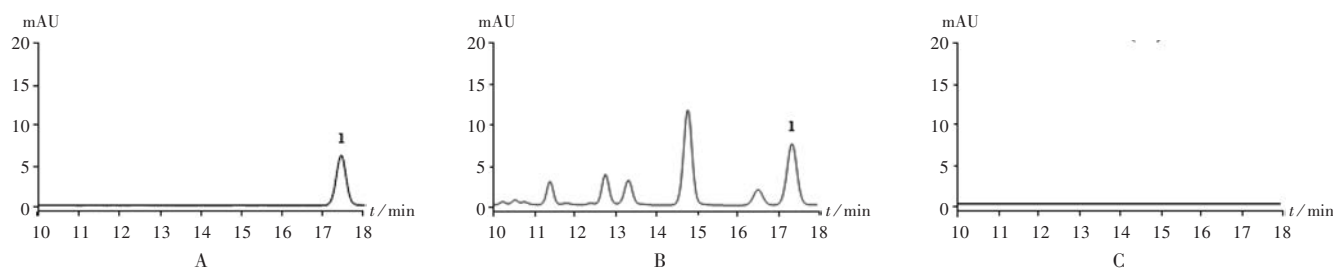
#### 2.5 $\beta, \beta'$ -二甲基丙烯酰阿卡宁含量测定

##### 2.5.1 提取方法考察

取蒙紫草药材粉末 0.5 g(过 4 号筛), 精密称定, 共 4 份, 分别加入石油醚(60~90  $^{\circ}\text{C}$ )和乙醇 25 mL, 分别超声(功率为 250 W, 频率为 33 kHz)处理 30 min 和 45 min, 放冷, 称定质量, 加相应溶剂补足减失的质量, 摇匀, 滤过。精密量取续滤液 5 mL, 蒸干, 残渣加流动相溶解, 转移至 5 mL 容量瓶中, 加流动相至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 分别进样测定 3 次, 记录峰面积, 并计算含量。结果石油醚超声 30 min 提取时含量最高。

##### 2.5.2 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱: Thermo Hypersil C<sub>18</sub> 柱(250 mm  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ); 流动相: 乙腈-0.05% 甲酸水溶液(70:30,  $V/V$ ); 流速: 1.0 mL/min; 检测波长: 275 nm; 柱温: 25  $^{\circ}\text{C}$ ; 进样量: 10  $\mu\text{L}$ 。理论板数按  $\beta, \beta'$ -二甲基丙烯酰阿卡宁峰计应不低于 5 000。在此色谱条件下, 供试品溶液色谱中, 在与对照品溶液色谱相应位置处有色谱峰出现, 且分离度良好, 阴性对照无干扰, 表明专属性良好。详见图 4。



1.  $\beta, \beta'$ -二甲基丙烯酰阿卡宁  
A.  $\beta, \beta'$ -二甲基丙烯酰阿卡宁对照品溶液 B. 蒙紫草供试品溶液 C. 阴性对照品溶液

图4  $\beta, \beta'$ -二甲基丙烯酰阿卡宁高效液相色谱图

1.  $\beta, \beta'$ -dimethylacrylalkannin

A.  $\beta, \beta'$ -dimethylacrylalkannin reference solution B. *Arnebie Szechenyi Radix* test solution C. Negative reference solution

Fig. 4 HPLC chromatograms of  $\beta, \beta'$ -dimethylacrylalkannin

### 2.5.3 溶液制备

取过4号筛的各批次药材0.5 g,精密称定,加入石油醚(60~90℃)25 mL,称定质量,超声30 min,放冷,补足减失的质量,摇匀,滤过,精密量取续滤液10 mL,蒸干,残渣加流动相溶解,转移至10 mL容量瓶中,加流动相至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,即得供试品溶液。取 $\beta, \beta'$ -二甲基丙烯酰阿卡宁对照品,精密称定,加无水乙醇配制成质量浓度为100  $\mu\text{g/mL}$ 的对照品溶液。

### 2.5.4 方法学考察

线性关系考察:依法制备对照品溶液,逐级稀释,按拟定色谱条件进样测定2次,取平均值,以峰面积( $Y$ )为纵坐标、质量浓度( $X, \mu\text{g/mL}$ )为横坐标进行线性回归,得回归方程 $Y=0.2089X+0.1184$ ,  $R^2=0.9996$  ( $n=2$ )。结果表明, $\beta, \beta'$ -二甲基丙烯酰阿卡宁质量浓度在10~200  $\mu\text{g/mL}$ 范围内与峰面积线性关系良好。

精密度试验:取同一批(批号为181011)样品,依法制备的供试品溶液,按拟定色谱条件连续进样10  $\mu\text{L}$ ,测定6次。结果峰面积的RSD为0.21% ( $n=6$ ),表明仪器精密度良好。

稳定性试验:取同一批(批号为181011)样品,依法制备供试品溶液,分别于室温下放置0,1,2,4,6,8,10 h时按拟定色谱条件进样测定。结果峰面积的RSD为0.51% ( $n=7$ ),表明供试品溶液室温下放置10 h内稳定。

重复性试验:取过4号筛的药材粉末6份,依法制备供试品溶液,按拟定色谱条件进样测定,并计算含量。结果含量的RSD为1.31% ( $n=6$ ),表明方法重复性良好。

加样回收试验:取已知含量的同一批(批号为20181011)蒙紫草粉末(过4号筛)0.5 g,精密称定,共9份,依法制备供试品溶液,按50%,100%,150%低、中、高水平加入对照品,按拟定色谱条件进样测定,计算加样回收率。结果见表3。

### 2.5.5 样品含量测定

取1~7号批次样品,依法制备供试品溶液,按拟定

色谱条件进样测定,并计算含量。结果样品中 $\beta, \beta'$ -二甲基丙烯酰阿卡宁(按干燥品计)含量介于0.20%~0.33%,平均含量为0.26%。考虑到不同地点药材含量的差异及阿卡宁的稳定性,拟订本品含 $\beta, \beta'$ -二甲基丙烯酰阿卡宁不得少于0.15%。

### 2.6 蒙紫草质量标准拟订

综合考虑成分特征、对照品来源、测量便利,参考同科植物的药典收载情况<sup>[3]</sup>、文献<sup>[4-7]</sup>报道及预试验结果,最终采用紫外分光光度法测定羟基蒽醌总色素(以左旋紫草素计)的含量,采用高效液相色谱法测定 $\beta, \beta'$ -二甲基丙烯酰阿卡宁的含量。虽然该药材在内蒙古地区多有分布,但成分含量差异很大,入药效果也有差异。表4列出了8~12号批次药材的含量测定及检查各项数据。综合分析12批次药材中左旋紫草素和 $\beta, \beta'$ -二甲基丙烯酰阿卡宁的含量,发现1~7号批次药材中这2种成分的含量较高。参考文献<sup>[1,5-8]</sup>,认为紫草中萘醌类成分为其主要药效成分,参考2020年版《中国药典(一部)》中同属植物紫草项下的含量测定项,根据1~7号批次药材的产地和采收时间初步拟订了蒙紫草的质量标准。

表4 8~12号批次样品中含量测定及检查项测定结果(%,  $n=3$ )

Tab. 4 Source of *Arnebie Szechenyi Radix* samples of batches 8~12, the results of content determination of *L*-shikonin and  $\beta, \beta'$ -dimethylacrylalkannin in the samples, and the results of inspection items(%,  $n=3$ )

| 批次 | 左旋紫<br>草素 | $\beta, \beta'$ -二甲基丙<br>烯酰阿卡宁 | 水分    | 总灰分  | 酸不溶<br>性灰分 | 水溶性<br>浸出物 | 醇溶性<br>浸出物 |
|----|-----------|--------------------------------|-------|------|------------|------------|------------|
| 8  | 2.45      | 0.08                           | 5.82  | 4.57 | 0.69       | 4.06       | 10.65      |
| 9  | 0.03      | 0.00                           | 7.04  | 6.61 | 0.28       | 30.65      | 5.83       |
| 10 | 0.16      | 0.01                           | 6.21  | 4.81 | 0.22       | 35.19      | 7.24       |
| 11 | 0.30      | 0.03                           | 8.84  | 8.60 | 2.58       | 20.84      | 9.93       |
| 12 | 0.08      | 0.01                           | 12.85 | 6.51 | 0.82       | 20.31      | 6.53       |

### 3 讨论

同科的紫草类植物中,萘醌类是其有效成分<sup>[41]</sup>,主要含紫草素和阿卡宁类<sup>[9]</sup>,用于治疗炎症、烧伤、麻疹