

# HPLC测定新疆紫草中紫草素的含量及提取方法的优化

崔晓秋<sup>1\*</sup>, 刘云刚<sup>2</sup>

(1. 济宁医学院药学院, 山东日照 276826; 2. 岚山生化有限公司, 山东日照 276800)

**[摘要]** 目的: 采用超声方法提取新疆紫草中紫草素, 并以左旋紫草素为指标, 建立 HPLC 测定紫草素的含量。方法: 利用超声波协同甲醇提取 40 min; 色谱条件为 Shim-pack CLC-ODS-18 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 10 μm), 检测波长 516 nm, 流动相甲醇-水 (85:15), 流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 柱温室温。结果: 左旋紫草素进样量在 0.127~1.143 μg 具有良好的线性关系, 回归方程为  $Y = 338\ 763X - 198\ 347$  ( $r = 0.999\ 8$ ), 平均回收率 99.3%, RSD 1.18%, 左旋紫草素超声法提取率是回流提取法的 1.29 倍。结论: 经方法学验证, 该实验所采用的实验方法重复性好、稳定、准确、可靠, 可用于中药紫草药材中紫草素的含量测定。

**[关键词]** 左旋紫草素; 高效液相色谱; 超声波辅助提取; 紫草

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)16-0094-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2014160094

## Ultrasonic-assisted Extraction and Content Determination of Shikonin from Arnebiae Radix by HPLC

CUI Xiao-qiu<sup>1\*</sup>, LIU Yun-gang<sup>2</sup>

(1. Jining Medical College, Rizhao 276826, China; 2. Lanshan Biochemistry Co. Ltd, Rizhao 276800, China)

**[Abstract]** **Objective:** To develop a method for ultrasonic-assisted extraction and high performance liquid chromatography (HPLC) determination of shikonin in the roots of Arnebiae Radix. **Method:** Shikonin was extracted by ultrasonic-assisted-methyl alcohol method. The HPLC determination condition consisted of Shim-pack CLC-ODS-18 (4.6 mm × 250 mm, 10 μm) and shikonin was detected at 516 nm wavelength by using methyl alcohol-water (85:15) as the mobile phase, column temperature at room temperature and flow rate 1.0 mL · min<sup>-1</sup>. **Result:** Shikonin had a good linearity relation in the range 0.127-1.143 μg ( $r = 0.999\ 8$ ), regressive equation were  $Y = 338\ 763X - 198\ 347$ . The average recovery was 99.3%, RSD 1.18% ( $n = 6$ ). In contrast with refluxing process, the extraction efficiency of ultrasonic extraction was 1.29 times. **Conclusion:** The methods of ultrasonic extraction and HPLC determination were proved to be accurate, reliable and repeatable. It can be used to determine natural shikonin content of Arnebiae Radix easily.

**[Key words]** shikonin; HPLC; ultrasonic-assisted extract; Arnebiae Radix

新疆紫草主产于我国新疆维吾尔自治区, 是中医临床常用药材, 其主要活性成分是脂溶性的萘醌类天然色素——紫草素及其衍生物, 此外还含有多糖、生物碱、三萜酸、苯醌等多种化学成分<sup>[1]</sup>。紫草的提取方法主要有渗漉法<sup>[2]</sup>、浸渍法<sup>[3]</sup>、回流提取法<sup>[4]</sup>及微波提取法<sup>[5]</sup>等, 不同的提取方法对紫

草素的提取率均有很大的影响。本研究中采用超声波提取法对紫草素进行提取, 并与回流提取法进行比较, 旨在最大限度地提高左旋紫草素的提取率。

左旋紫草素的含量测定方法主要有高效毛细管电泳法<sup>[6]</sup>、高效液相色谱法<sup>[7]</sup>等, 其中以高效液相色谱法更为常见。流动相多数使用酸水系统如乙

**[收稿日期]** 20140311(002)

**[基金项目]** 济宁医学院青年基金项目(JYQ2011KM027)

**[通讯作者]** \* 崔晓秋, 硕士, 讲师, 从事天然产物化学及新药研发工作, Tel:13793406846, E-mail: cuixqiu@163.com

腈-水-甲酸(700:300:0.5)<sup>[8]</sup>、甲醇-水-磷酸(78:22:0.3)<sup>[9]</sup>等。在流动相中加入酸,主要是为了抑制化合物的电离、提高柱效、改善峰形,但酸的加入影响柱子使用寿命。本研究经过反复尝试,确定了不加酸即可进行有效分离紫草素的最佳高效液相色谱条件,为紫草中左旋紫草素的含量测定提供参考。

## 1 材料

紫草药材购于日照市中医院,经山东中医药大学中药学院郭庆梅教授鉴定为新疆紫草 *Arnebia euchroma* (Royle) Johnst. 干燥根。

KQ-500DB 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司),BSA224S 型电子分析天平(北京赛多利斯),LC-6AD 高效液相色谱仪系列(包括SIL-10AF 泵,SPD-20A 紫外检测器,CTO-20AC column oven and class-vp 色谱工作站,日本岛津)。

左旋紫草素对照品由中国食品药品检定研究院提供(批号110769-200405),甲醇为色谱纯(天津永大化学试剂有限公司),其余试剂均为分析纯,水为娃哈哈纯净水。

## 2 方法与结果

**2.1 色谱条件** Shim-pack CLC- ODS-18 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 10 μm),流动相甲醇-水(85:15)。流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>,检测波长 516 nm,柱温为室温。

### 2.2 方法学考察

**2.2.1 对照品溶液制备** 精密称取左旋紫草素对照品 1.900 mg,甲醇溶解,制成 1.270 g·L<sup>-1</sup> 的贮备液。精密移取 1 mL 贮备液,加甲醇稀释并定容至 10 mL 量瓶中,即得含有左旋紫草素 0.127 g·L<sup>-1</sup> 的对照品溶液。

**2.2.2 供试品溶液制备** 准确称取相同批次的新疆紫草药材粉末 2.003 5 g,置于 250 mL 锥形瓶中。准确加入 100 mL 甲醇,100 MHz 超声提取 40 min,严格确保超声前后重量一致,过滤。滤渣再以同法提取 1 次,将两次甲醇提取液合并,采用旋转蒸发仪将其浓缩至干,再以液相甲醇溶解并定容至 10 mL 量瓶中,即得供试品溶液,备用。

**2.2.3 线性关系考察** 分别精密吸取对照品(0.127 g·L<sup>-1</sup>)溶液 1,3,5,7,9 μL,经 0.45 μm 微孔滤膜过滤后,注入高效液相色谱仪,每个进样量平行测定 3 次,记录测得的峰面积数据,取平均值。利用 Excel 表格绘制标准曲线,得回归方程为  $Y = 338\ 763X - 198\ 347$ ,其中纵坐标( $Y$ )为峰面积,横坐标( $X$ )为进样量,检测下限为 0.012 7 μg

( $r = 0.999\ 8$ )。结果表明进样量在 0.127 ~ 1.143 μg 峰面积与进样量呈良好线性关系。

**2.2.4 精密度试验** 分别精密吸取对照品溶液(0.127 g·L<sup>-1</sup>),每次 5 μL,按照确定的色谱条件连续重复进样 6 次,测定左旋紫草素的峰面积,并计算 RSD 0.09%,由此可知仪器的精密度良好。

**2.2.5 稳定性试验** 取同一批号紫草样品粉末,按 2.2.2 项下样品制备方法,制备供试品溶液,分别在 0,2,4,6,8,10,24 h 进行测定,记录峰面积,结果左旋紫草素相 RSD 0.87%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

**2.2.5 加样回收试验** 准确称取已知含量的同一批次紫草样品粉末共 6 份,每份约 0.5 g,分别精密加入左旋紫草素对照品(0.127 g·L<sup>-1</sup>) 2 mL,按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液,以设定的色谱条件进行测定,左旋紫草素的平均回收率为 99.3%,RSD 1.18%,说明该方法准确可靠。结果见表 1。

表 1 紫草甲醇提取物加样回收率

No.	称样量 /g	样品中量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均 值/%	RSD /%
1	0.503 5	0.204 7	0.253 3	99.7	99.3	1.18
2	0.502 5	0.203 2	0.254 3	100.1		
3	0.504 0	0.208 8	0.247 6	97.5		
4	0.503 6	0.209 2	0.249 1	98.1		
5	0.503 5	0.203 6	0.254 2	100.1		
6	0.503 2	0.203 0	0.254 7	100.2		

注:加入量均为 0.254 mg。

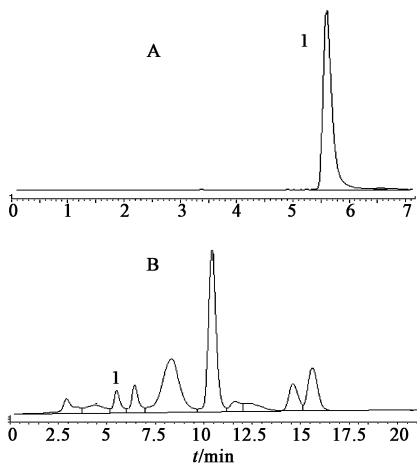
### 2.3 紫草提取方法的优化

**2.3.1 最佳提取溶剂选择** 称取同一批次干燥紫草药材粉末 4 份,置锥形瓶中,分别用石油醚、甲醇、乙醚、95%乙醇 4 种溶剂浸泡 24 h,浸泡过程中将瓶口封住,以防溶剂挥发。4 份紫草粉末均以 100 MHz 超声提取 2 次,每次 30 min,两次滤液合并,旋转蒸发仪浓缩至干,再以甲醇溶解定容于 10 mL 量瓶中,摇匀,采用 2.1 项下色谱条件进行含量测定。4 种溶剂提取所得左旋紫草素的提取率分别为 0.670 3,0.673 8,0.537 6,0.629 7 mg·g<sup>-1</sup>,因此本实验选择甲醇进行超声提取。

**2.3.2 最佳提取时间的选择** 称取 4 份同批次干燥至恒重的紫草,以粉碎机适当粉碎,并用甲醇超声提取,时间分别为 10,30,40,50 min。在不同提取时间下,左旋紫草素的提取率分别为 0.369 4,0.652 9,0.688 6,0.554 2 mg·g<sup>-1</sup>。因此,最佳提取

时间定为 40 min。

**2.4 样品含量测定** 取供试品溶液,经 0.45  $\mu\text{m}$  微孔滤膜过滤后,连续 3 次,精密吸取 10  $\mu\text{L}$  注入高效液相色谱仪,根据标准曲线所得回归方程,利用峰面积平均值,计算每克紫草中左旋紫草素含量为 0.964 5 mg。对照品和供试品的高效液相色谱图见图 1。



A. 对照品; B. 样品; 1. 左旋紫草素

图 1 紫草 HPLC

**2.5 超声波提取法与回流提取法比较** 为了验证超声波提取法的确具有提取率高、时间短、速度快的优点,我们选取了 10 批次新疆紫草样品,分别进行超声提取与回流提取,比较左旋紫草素提取率。称取紫草药材粉末,每份约 2 g 左右,超声提取法按 2.3.2 操作。回流提取时将样品粉末置于圆底烧瓶中,各加入甲醇 100 mL,水浴温度 40  $^{\circ}\text{C}$ ,每份样品均回流提取 40 min,旋转蒸发仪回收溶剂至干。所得提取物均采用甲醇溶解,置 10 mL 量瓶中,以甲醇定容至刻度,作为供试品溶液。经微孔滤膜过滤后,每次进样 10  $\mu\text{L}$ ,注入高效液相色谱仪,每份平行进样 3 次,记录峰面积,取平均值计算提取率。两种提取方法结果比较如表 2。

### 3 讨论

由于紫草中主要成分为萘醌类色素混合物,基本母核相同,有相同吸收。我们通过外标法依据对照品保留时间,确定提取物中左旋紫草素吸收峰。考虑在 516 nm 下左旋紫草素与附近各峰能实现基线分离,且杂峰少,因此,将 516 nm 选为本实验的最佳检测波长。

超声提取过程中,由于超声波的物化作用,促使超声温度不断升高,因此,为保证恒温提取,试验时将超声波清洗器接上循环水,以确保温度变化幅度

表 2 两种不同提取方法左旋紫草素提取率比较

提取方法	批次	样品量 /g	左旋紫草素提取率/%	提取率平均值/%
超声提取	1	2.002 5	1.929 0	1.918 7
	2	2.002 6	1.910 4	
	3	2.002 9	1.917 0	
	4	2.003 4	1.929 0	
	5	2.003 2	1.905 0	
	6	2.003 5	1.917 0	
	7	2.002 7	1.929 0	
	8	2.003 5	1.919 7	
	9	2.002 8	1.927 0	
	10	2.002 5	1.903 7	
回流提取	1	2.002 3	1.482 0	1.485 0
	2	2.002 5	1.481 6	
	3	2.002 3	1.481 0	
	4	2.002 3	1.480 7	
	5	2.002 4	1.482 0	
	6	2.002 8	1.481 6	
	7	2.002 6	1.490 6	
	8	2.003 0	1.493 7	
	9	2.002 8	1.489 3	
	10	2.002 3	1.487 6	

注:提取时间均为 40 min,提取温度均为 40  $^{\circ}\text{C}$ 。

不超过 2  $^{\circ}\text{C}$ 。

曾尝试采用手动进样方式,但操作误差较大,因此,最终使用了自动进样器进样,避免了手动误差;也参照文献尝试过各种不同的流动相及色谱柱,结果发现,加酸水作为流动相时进样前后均需要长时间冲洗,实验效率低。因此,经过不断改进,确定了不加酸水即可进行有效分离的色谱条件。

通过本项实验研究,利用超声波协同甲醇提取法,对新疆紫草中的紫草素进行了提取。比较了超声波提取法与回流提取法,结果表明,同样的时间,同样的温度下,超声波提取法收率更高。确定了紫草素的 HPLC 测定方法,且严格经过方法学考察,该方法准确、操作简便,适合于对紫草药材粉末中紫草素的质量控制。

### [参考文献]

[1] 宋艳华,孙晖,张爱华,等. 紫草的研究进展[J]. 中医药学报,2013,41(4):123.  
[2] 喻录容,韩宪忠. 紫草的提取工艺[J]. 光谱实验室,2011,28(4):2055.

# 丹栀逍遥散 6 种有效成分的 HPLC 测定

杨永红\*

(贵州省骨科医院检验科, 贵阳 550007)

**[摘要]** **目的:**建立丹栀逍遥散制剂中有效成分栀子苷、中京尼平苷、芍药内酯苷、甘草甜素、芍药苷以及牡丹酚 6 种成分的测定分析方法。**方法:**采用 HPLC, Cosmosil 5C<sub>18</sub> 色谱柱, (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈-0.5% 磷酸水(15:85) 梯度洗脱, 流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 波长 230 nm。**结果:**根据上述方法可在 90 min 内成功地分离丹栀逍遥散中栀子苷、京尼平苷、芍药内酯苷、甘草甜素、芍药苷以及牡丹酚 6 个指标成分, 在丹栀逍遥散中各成分质量分数为栀子苷 1.203 mg·g<sup>-1</sup>, 京尼平苷 1.960 mg·g<sup>-1</sup>, 芍药内酯苷 6.720 mg·g<sup>-1</sup>, 甘草甜素 0.157 mg·g<sup>-1</sup>, 芍药苷 0.012 mg·g<sup>-1</sup>, 牡丹酚 0.127 mg·g<sup>-1</sup>。**结论:**该方法可用于丹栀逍遥散中栀子苷、京尼平苷、芍药内酯苷、甘草甜素、芍药苷以及牡丹酚的测定, 操作简单、结果准确、回收率高、重复性好, 可用于丹栀逍遥散及其相关制剂的质量控制。

**[关键词]** 丹栀逍遥散; 栀子苷; 京尼平苷; 芍药内酯苷; 甘草甜素; 芍药苷; 牡丹酚

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)16-0097-03

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2014160097

## Simultaneous Determination of Six Constituents in Danzhi Xiaoyaosan by HPLC

YANG Yong-hong\*

(Guizhou Province Osteological Hospital, Guiyang 550077, China)

**[Abstract]** **Objective:** To establish a method for simultaneous determination of gardenin, geniposide, albiflorin, paeoniflorin, liquiritigenin, paeonol in Danzhi Xiaoyaosan by HPLC. **Method:** The Cosmosil 5 C<sub>18</sub> column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) was used with a mobile phase of acetonitrile (A) - 0.5% phosphoric acid solution (B) gradient elution, the flow rate was 1 mL·min<sup>-1</sup>, and the detection wave-lengths were set at 230 nm. **Result:** The linear ranges were 0.009 46-0.946 mg·L<sup>-1</sup> for gardenin, 0.009 58-0.958 mg·L<sup>-1</sup> for geniposide, 0.008 68-0.868 mg·L<sup>-1</sup> for albiflorin, 0.004 88-0.488 mg·L<sup>-1</sup> for paeoniflorin, 25.0-500 mg·L<sup>-1</sup> for liquiritigenin, 25.0-500 mg·L<sup>-1</sup> for paeonol respectively. The average recoveries of three constituents were 96.1%, 104.3%, 100.5%, 94.7%, 97.4%, 95.4% with the RSD of 1.32%, 2.55%, 0.67%, 1.29%, 1.36%, 2.38%. The contents of six compounds, gardenin, geniposide, albiflorin, paeoniflorin, liquiritigenin,

**[收稿日期]** 20140430(018)

**[通讯作者]** \* 杨永红, 硕士, 副主任技师, 从事生化免疫学研究, Tel:13511905061, E-mail:2301444608@qq.com

- [3] 钱亚琴. 紫草醇提工艺优化研究[J]. 现代中药研究与实践, 2011, 25(5): 56.
- [4] 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.
- [5] 徐萍, 张凤清, 周洪亮, 等. 微波辅助醇提法提取紫草总色素的工艺研究[J]. 长春工业大学学报: 自然科学版, 2009, 30(5): 484.
- [6] 白研, 毋福海, 罗碧莲等. 高效毛细管电泳法测定新疆紫草中左旋紫草素的含量[J]. 中国药房, 2010, 21(19): 1790.
- [7] 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.
- [8] 贺金华, 芦苇华, 王芳. 高效液相色谱法测定新疆紫草毛状根中乙酰紫草素含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(10): 39.
- [9] 林雄, 潘旭东, 黄燕, 等. HPLC 法测定紫草油中左旋紫草素含量[J]. 海峡药学, 2011, 23(7): 83.

[责任编辑 顾雪竹]