

·化学与分析·

高效液相色谱法测定新疆紫草毛状根中乙酰紫草素的含量

贺金华¹, 芦伟华², 王芳^{2*}
(1. 新疆维吾尔自治区药物研究所, 乌鲁木齐 830004;
2. 新疆农业大学农学院, 乌鲁木齐 830052)

[摘要] 目的: 建立高效液相色谱法(HPLC)测定新疆紫草毛状根中乙酰紫草素含量的方法。方法: 采用 YMC ODS-A C₁₈ 色谱柱(4.6 mm ×150 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-水-甲酸(700 300 0.5); 检测波长 275 nm; 流速 1.0 mL · min⁻¹; 柱温 35℃。结果: 乙酰紫草素对照品在 51.55 ~1 031.0 mg · L⁻¹与峰面积线性关系良好, 相关系数 $r=0.999\ 9$, 平均回收率为 99.81%, RSD 2.00% ($n=9$)。结论: 高效液相色谱法操作简单快速, 重复性好, 可用于新疆紫草毛状根中乙酰紫草素含量的测定。
[关键词] 新疆紫草; 毛状根; 紫草色素; 高效液相色谱法
[中图分类号] R283.6 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)10-0039-03

HPLC Determination of Acetylshikonin in Hairy Roots of *Arnebia euchroma*

HE Jin-hua¹, LU Wei-hua², WANG Fang^{2*}
(1. Xinjiang Institute of Materia Medica, Urumqi 830004, China;
2. College of Agronomy, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a method for the determination of acetylshikonin in the Hairy Roots of *Arnebia euchroma* (Royle) Johnst. **Method:** The RP-HPLC system consisting of YMC-Pack ODS-A C₁₈ column (4.6 mm ×150 mm, 5 μm) and a mixture of acetonitrile solution and water solution and formic acid solution(700 300 0.5) as the mobile phase was adopted; the detection wavelength was 275 nm; the flow rate was set at 1.0 mL · min⁻¹ and the column temperature was at 35℃. **Result:** The linear range of acetylshikonin was 51.55-1 031.0 mg · L⁻¹ ($r=0.9\ 999$). The average recovery ($n=9$) was 99.81%. **Conclusion:** The method is quick, simple and reproducible for the determination of acetylshikonin in Hairy roots of *A. euchroma*.
[Key words] *Arnebia euchroma* (Royle) Johnst; hairy roots; shikonin; HPLC

紫草 *Arnebia euchroma* (Royle) Johnst. 是我国民间常用的中草药, 以根入药, 富含萘醌类化合物。此类化合物具有显著的抗菌、抗炎、抗肿瘤等多种药理活性, 在传统的中药处方中用做抗炎药, 退热药和抗菌药^[1-4]。但由于大量采挖使这一天然资源日益贫乏, 加之化学合成工艺繁杂、收率低、成本高, 采用毛

状根培养获得有用的化合物是解决资源匮乏、克服化学合成困难的重要途径。本文报道新疆紫草毛状根化学成分的含量测定, 为紫草的应用提供科学依据。
1 材料
日本岛津 LC 2010C 液相色谱仪和 CLASS-VP V6.14 SP1 数据工作站。新疆紫草干燥根及毛状根株系 Aehr07 由本课题组提供。对照品乙酰紫草素由新疆维吾尔自治区药物研究所自制, 采用 UV, IR, ¹H-NMR, ¹³C-NMR 和 MS 法鉴定结构, 经 HPLC 法检查, 纯度大于 98%。乙腈为色谱纯, 甲酸、甲醇均为分析纯, 水为纯蒸水。

[收稿日期] 2009-12-10
[基金项目] 国家自然科学基金项目(30560059); 自治区自然科学基金项目(200821170)
[通讯作者] * 王芳, Tel: 0991-8762261, E-mail: wangfang1hao@126.com

2 方法与结果

2.1 色谱条件^[5] 色谱柱为 YMC-Pack ODS-A C₁₈ 柱(4.6 mm×150 mm, 5 μm);流动相为乙腈-水-甲酸

(700 300 0.5);检测波长 275 nm;流速 1.0 mL·min⁻¹;柱温 35℃,进样量 10 μL。此色谱条件下,对照品和毛状根样品的色谱图如图 1 所示。

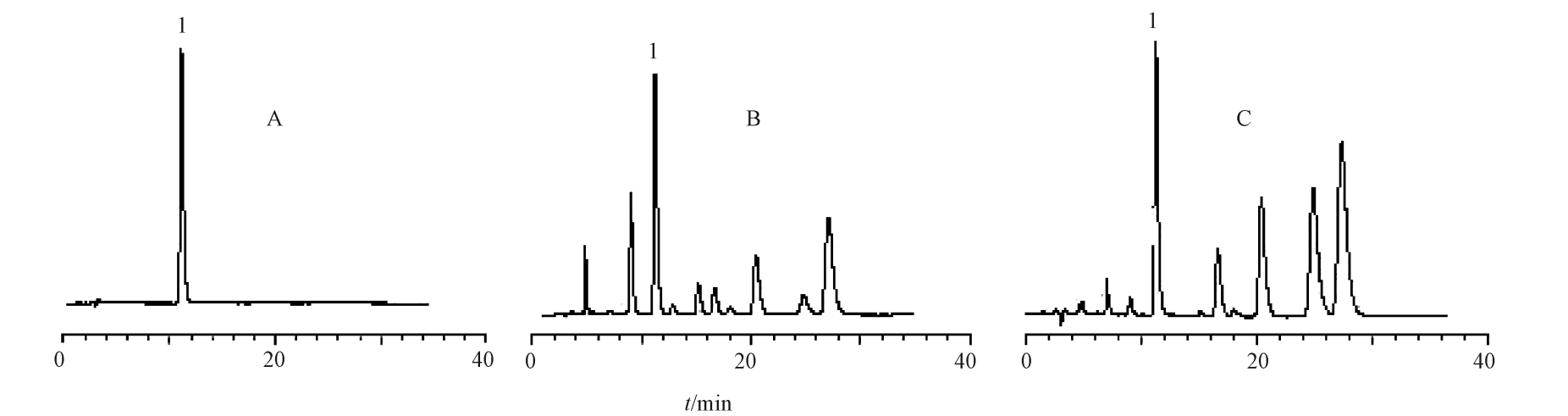


图 1 对照品(A)、毛状根(B)和新疆紫草根(C)色谱图

1. 乙酰紫草素

2.2 紫草素 M9 液体培养基悬浮培养 100 mL 玻璃三角烧瓶中添加 50 mL M9 液体培养基,在超净工作台中添加经过继代培养的新疆紫草毛状根 3 g,培养温度 25℃,转速 120 r·min⁻¹,培养 30 d 后,50℃烘干毛状根待测。

2.3 溶液制备

2.3.1 对照品溶液 称取乙酰紫草素对照品约 25 mg,精密称定,置于 25 mL 量瓶中,加甲醇溶解并定容至刻度,摇匀,即得 1.031 g·L⁻¹的对照品溶液。

2.3.2 供试品溶液 称取新疆紫草原植物干燥根和毛状根各 10 g,精密称定,分别用石油醚回流提取,共提取 2 次,每次溶剂用量为 100 mL,提取液合并,减压浓缩干燥,得原植物根提取物和毛状根提取物。原植物根提取物用甲醇溶解,置 100 mL 量瓶中,并加甲醇定容至刻度,摇匀,精密移取 1.2 mL,置 10 mL 量瓶中,加甲醇定容至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,即得。毛状根提取物用甲醇溶解,置 25 mL 量瓶中,并加甲醇定容至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.4 线性关系考察 精密吸取乙酰紫草素对照品溶液 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 7.5, 10.0 mL 置于 10 mL 棕色量瓶中,用流动相定容,摇匀。精密吸取上述溶液各 10 μL 注入液相色谱仪,测定峰面积。以对照品浓度为横坐标,峰面积为纵坐标进行线性回归。结果表明乙酰紫草素在 51.55~1 031.0 mg·L⁻¹线性关系良好。回归方程为 $Y = 9.77 \times 10^6 X + 1.67 \times 10^4$ ($r = 0.9999$)。

2.5 回收率试验 称取已知含量的毛状根供试品约 5 g,精密称定,分别加入乙酰紫草素对照品

2.835, 3.610, 4.383 mg, 依毛状根供试品溶液的制备方法制备低、中、高 3 个浓度的供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件测定,计算回收率。结果见表 1。

表 1 毛状根中乙酰紫草素加样回收率测定

No.	称样量 /g	样品中 含量/mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均回 收率/%	RSD /%
1	5.160 63	3.612 44	2.835	6.416 0	98.89		
2	5.142 81	3.599 97	2.835	6.359 8	97.35		
3	5.155 64	3.608 95	2.835	6.342 7	96.43		
4	5.180 60	3.626 42	3.610	7.280 8	101.23		
5	5.170 93	3.619 65	3.610	7.196 4	99.08	99.81	2.00
6	5.152 26	3.606 58	3.610	7.234 6	100.50		
7	5.140 59	3.598 41	4.383	8.082 7	102.31		
8	5.193 74	3.635 62	4.383	8.061 6	100.98		
9	5.184 94	3.629 46	4.383	8.080 8	101.56		

2.6 精密度试验 称取新疆紫草毛状根约 10 g,精密称定,依供试品溶液制备方法制备,同一供试品溶液,重复进样 6 次,每次 10 μL,注入液相色谱仪,记录乙酰紫草素色谱峰面积, RSD 为 0.59%。

2.7 重复性试验 取同一批的新疆紫草毛状根供试品 6 份,每份约 10 g,精密称定,依供试品溶液制备方法制备 6 份供试品溶液,进样 10 μL,注入液相色谱仪,记录乙酰紫草素色谱峰面积,计算含量, RSD 为 0.41%。

2.8 供试液稳定性试验 同一批供试品,按照 2.3.2 项下制备,室温放置,分别于 0, 2, 4, 8, 10, 12, 24 h 进样,进样量 10 μL,记录乙酰紫草素色谱峰面积,24 h 内样品含量稳定, RSD 为 0.85%。

(下转第 43 页)

紫萸贯众中多糖的含量测定

厉博文, 张东, 杨岚*, 傅梅红, 方婧
(中国中医科学院中药研究所, 北京 100700)

[摘要] 目的: 建立紫萸贯众中总多糖的含量测定方法, 比较不同产地和采收期紫萸贯众多糖含量。方法: 采用硫酸-苯酚法显色, 分光光度法在 490 nm 处测定。结果: 12 个不同产地紫萸贯众多糖含量为 1.22% ~1.85%, 同产地不同采收期紫萸贯众多糖含量为 0.91% ~1.37%。结论: 紫萸贯众多糖含量因产地和采收期变化而不同。

[关键词] 紫萸贯众; 总多糖; 硫酸-苯酚法

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010) 10-0041-03

Determination of Polysaccharides from Rhizoma of *Osmunda japonica*

LI Bo-wen, ZHANG Dong, YANG Lan*, FU Mei-hong, FANG Jing
(Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To establish the method for determination of polysaccharide from Rhizoma of *Osmunda japonica* and the content of polysaccharide from Rhizoma of *O. japonica* in different locations and different harvest times was compared. **Method:** Sulfuric acid-phenol method was used and the sugar content was determined by the spectrophotometer at 490 nm. **Result:** The content of polysaccharide from Rhizoma of *O. japonica* in different locations was 1.22%-1.85% and in different harvest times was 0.91% -1.37%. **Conclusion:** The different locations and different harvest times would affect the content of polysaccharide from Rhizoma of *O. japonica*.

[Key words] *Osmunda japonica*; polysaccharide; sulfuric acid-phenol method

紫萸贯众为为紫萸科植物紫萸 *Osmunda japonica* Thunb. 的根茎及叶柄残基。具有清热解毒, 止血的功效。用于防治感冒、鼻衄头晕、痢疾、崩漏。为传统中药贯众的主要商品流通品种之一, 收载于 1977 年版和 2010 年版《中国药典》一部^[1]。据文献报道紫萸多糖具有抗菌消炎、促进损伤细胞修复等生物活性^[2-3]。本文建立了紫萸贯众中多糖的含量测定方法, 并测定了不同产地和采收期紫萸贯众多糖含量。为全面评价紫萸贯众药材质量提供依据。

1 材料

1.1 仪器 UV-T6 型新世纪紫外-可见分光光度计(中国北京普析通用); 电子天平(Sartorius Bs-210 s 1/100 00); 离心机(北京雷勃尔离心机有限公司); 电热恒温水浴锅(天津市泰斯特仪器有限公司)。

1.2 试药 葡萄糖对照品(批号 0833-9504, 购于中国药品生物制品检定所); 浓硫酸、苯酚、95% 乙醇、无水乙醇等试剂均为分析纯, 水为蒸馏水; 紫萸贯众药材均经中国中医科学院中药研究所冯雪峰副研究员鉴定为紫萸科植物紫萸 *O. japonica* T. 的干燥带叶柄残基的根茎。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 5% 苯酚液的制备 称取苯酚 100 g, 加铝条 0.1 g, 碳酸氢钠 0.2 g, 用套式电热器加热蒸馏, 收集 182 馏份, 称定 5 g, 置于棕色量瓶中, 加少量水溶解后, 加水定容至 100 mL, 充分混匀, 冷藏, 备用。

[收稿日期] 2009-12-27

[基金项目] 《中国药典》2010 版标准研究(YZ - 241)

[第一作者] 厉博文, 硕士研究生, Tel: 010-64014347

[通讯作者] * 杨岚, 研究员, Tel: 010-64014347, Email: ylan_66@ yahoo. com. cn, 研究方向中药有效成分和质量标准研究