

• 科技简报 •

紫草油膏中左旋紫草素的含量测定

姚水宝, 黄小华, 杨水新 (湖州市中心医院, 浙江 湖州 313000)

[摘要] 目的: 建立紫草油膏中左旋紫草素的含量测定方法。方法: 采用 HPLC 法, 色谱柱为 Shimpack C₁₈ (6 mm × 150 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-水-磷酸(85:15:0.3, v/v), 检测波长为 516 nm。结果: 在 0.16~0.8 μg 间, 左旋紫草素进样量与峰面积呈良好的线性, 线性方程为 $Y = 24\,623.04X + 4\,636.63$, $r = 0.999\,4$; 测得紫草油膏中左旋紫草素的平均含量为 $5.33\text{ mg} \cdot (100\text{ mL})^{-1}$ 。结论: 结果准确, 重复性好。

[关键词] 紫草油膏; 左旋紫草素; 含量测定
[中图分类号] R927.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1001-5213(2006)07-0902-02

紫草油膏为本院制剂室自制的中药油膏剂, 由紫草、虎杖、地榆、黄柏、生地、当归、白芷、四季青叶等药材煎制而成, 具收敛止痛、解毒透疹的作用, 主要用于血热毒盛、麻疹不透、水火烫伤等, 临床疗效显著。紫草油膏中主要的药用成分为紫草, 紫草含有十几种紫草素成分, 其中主要是以左旋紫草素(C₁₆H₁₆O₅)为主的羟基萘醌类色素。中国药典 2005 年版一部采用分光光度法测定左旋紫草素的含量。本实验参考文献^[1-5]采用 HPLC 法对紫草油膏中的左旋紫草素进行含量检测, 经多次实验, 最终选用甲醇-水-磷酸(85:15:0.3, v/v)为流动相, 检测波长为 516 nm; 在此色谱条件下, 左旋紫草素与其他萘醌类成分色谱峰得以完全分离, 方法简单、快速、准确, 建立了紫草油膏的质控标准。

1 材料与与方法

1.1 材料 Waters 高效液相色谱仪(996 二极管阵列检测器, 515 泵, 7725I 进样阀, Millennium32 色谱管理系统); 左旋紫草素对照品(中国药品生物制品检定所, 批号 0769-9602); 紫草油膏由本制剂室自制; 甲醇、磷酸均为色谱纯; 水为自制二次纯化水。

1.2 色谱条件 色谱柱为 Shimpack C₁₈ 柱(150 mm × 6 mm, 5 μm), 加 Alltech C₁₈ 预柱。流动相为甲醇-水-磷酸(85:15:0.3, v/v)。流速: $1\text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 检测波长: 516 nm。典型色谱图如图 1。

1.3 对照品溶液的配制 取左旋紫草素对照品 4.96 mg, 精密称定, 置 25 mL 量瓶中, 加甲醇适量溶解并稀释至刻度, 摇匀, 制成 $198.4\text{ μg} \cdot \text{L}^{-1}$ 对照品溶液。

1.4 样品处理 精密移取紫草油膏 10 mL, 置分液漏斗中, 加 $0.25\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液提取 3 次, 每次 20 mL, 至萃取液呈无色。合并碱液, 加 $0.5\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硫酸溶液调 pH 值至 5.0, 加氯仿提取 4 次(30, 30, 20, 20 mL), 合并氯仿液, 水浴蒸干, 残渣加甲醇溶解并定量转移至 50 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度。

2 结果

2.1 线性关系考察 精密吸取 $198.4\text{ μg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的左旋紫草素

对照品溶液 1, 2, 3, 4, 5 mL 分别置于 25 mL 的量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 配成 $7.936, 15.872, 23.808, 31.744, 39.680\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 标准溶液。分别进样上述溶液 20 μL, 注入液相色谱中, 测定色谱峰面积。以进样量为横坐标, 3 次测定峰面积的均值为纵坐标作图, 得回归方程: $Y = 24\,623.04X + 4\,636.629$, $r = 0.999\,4$ 。进样量在 $0.16 \sim 0.8\text{ μg}$ 间线性关系良好。

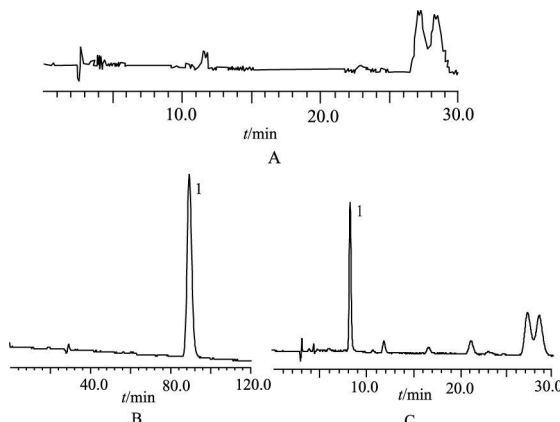


图 1 阴性样品(A)、左旋紫草素对照品(B)和供试品(C)的色谱图

1. 左旋紫草素

Fig1 The HPLC chromatogram of blank sample(A), L-shikonin reference substance(B) and tested sample(C)

1. L-shikonin

2.2 精密度考察 进样 $7.936, 15.872, 31.744\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 标准溶液各 20 μL, 连续测定 3 次; 连续进样 3 d, 测定峰面积, 按外标法换算成浓度, 分别计算日间差、日内差。结果见表 1。

表 1 精密度测定结果

Tab 1 Results of precision test

加入量/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	日内		日间	
	测得量/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	RSD/%	测得量/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	RSD/%
7.94	8.08	1.5	7.90	2.2
15.87	15.86	1.6	16.02	2.8
31.74	31.39	1.4	32.23	3.3

2.3 回收率的测定 精密移取未加紫草药材的阴性油膏 10 mL 置分液漏斗中, 精密吸取左旋紫草素对照品溶液($7.936, 15.872, 31.744\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 各 10 mL, 按“1.3”项下方法处理, 水浴蒸干氯仿后, 残渣加甲醇溶解并定量转移至 10 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度。连续进样 3 次, 每次 20 μL, 按外标法计算左旋紫草素浓度, 测定方法回收率, 结果见表 2。

表 2 回收率测定结果

Tab 2 Results of recovery test

加入量/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	测得量/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	回收率/%	RSD/%
7.94	7.50	94.56	1.9
15.87	15.29	96.35	2.2
31.74	29.61	93.28	1.3

2.4 紫草油膏中左旋紫草素含量的测定 取 3 批紫草油膏样品, 按“1.3”项下方法处理; 取处理过的样品液 20 μL, 进样高效液相, 测定色谱峰面积; 按照“2.1”项下标准曲线求算其中左旋紫草素含量, 结果见表 3。

3 讨论

3.1 提取方法的选择 根据文献记载, 紫草素主要的药用成分是左旋紫草素, 考虑到左旋紫草素的化学结构为萘醌类

[作者简介] 姚水宝, 男, 学士, 副主任药师, 电话: 0572-2023301-3363, E-mail: hz_adr@126.com

表 3 样品测定结果 (n=3)

Tab 3 Content of shikonin in Zicao oil (n=3)

样品批号	含量/mg·(100mL) ⁻¹	RSD/%	平均/mg·(100mL) ⁻¹
S000001	5.00	3.6	5.33
S000002	5.62	0.7	
S000003	5.37	2.8	

化合物,且醌类分子中具有酚羟基,故有酸性,因此能被碱性溶液提取,并溶于其中。利用此性质,我们可以将左旋紫草素同油性基质初步分离。然后加酸酸化后又可使左旋紫草素析出,利用此性质可以将左旋紫草素提取并纯化。本实验采用 0.25 mol·L⁻¹ 的氢氧化钠进行提取,加碱后溶液分层,下层碱溶液变蓝,可根据颜色深浅变化,判定提取是否完全。加盐酸酸化后,pH 值为 2~3,溶液变红,用氯仿提取,也可通过颜色判断提取是否完全。实验证明,用 0.25 mol·L⁻¹ 的氢氧化钠溶液萃取 4~5 次,可基本提取完全。用氯仿萃取 3~4 次,可提取完全。

3.2 测定方法的选择 紫草中有效成分的测定有两大类的途径:体外测定和体内测定。目前体外测定法主要有 5 种:重量法、分光光度法、柱色谱法、薄层扫描法、HPLC 法。本实验采用高效液相色谱法测定制剂中左旋紫草素的含量,结果准确,重现性好,灵敏度高,可作为紫草油膏质量标准中含量测定项下的测定方法。

3.3 色谱条件的选择 有文献报道,用甲醇 0.025 mol·L⁻¹ 磷酸(85:15, v/v)为流动相,也可控制左旋紫草素在 10 min 左右出峰。本实验采用甲醇-水-磷酸(85:15:0.3, v/v)为流动相,流速为 1 mL·min⁻¹。在实验中发现采用此流动相,左旋紫草素的出峰时间为 8.5 min 左右,且无拖尾,左旋紫草素与其他萘酚类成分色谱峰得以完全分离。

参考文献:

[1] 刘芳,吴伟中,王小平.薄层扫描法测定烧伤软膏中紫草素含量[J].基层中药杂志,2001,15(2):21-22.
 [2] 马瑛,王嗣芬,黄猛.HPLC 测定紫草中紫草素含量[J].中国药学杂志,2000,35(2):98-98.
 [3] 叶碧波,胡明.紫草的研究概况[J].中国中医药科技,1997,4(5):320-32.
 [4] 张善玉,朴美兰,李梅,等.高效液相色谱法测定紫草涂膜剂中紫草素的含量[J].时珍国医国药,2003,14(12):729-730.
 [5] 葛锋,王晓东,王玉春.药用紫草的研究进展[J].中草药杂志,34(9):附 6-7.

[收稿日期] 2005-04-11

高效液相色谱法测定咽喉炎糖浆剂中葛根素的含量

邢俊家,周晖,冯婉玉 (中国医科大学附属第一医院,辽宁沈阳 110001)

[摘要] 目的:建立咽喉炎糖浆剂中葛根素的含量测定方法。方法:高效液相色谱法,采用 YWG-C₁₈ 柱,以甲醇-水(30:70, v/v)为流动相,流速为 1.0 mL·min⁻¹ 检测波长为 248 nm。结果:葛根素在 0.2~200 mg·L⁻¹ 范围内线性关系良好, r=0.999, 平均回收率为 100.4%, RSD 为 1.71% (n=

[作者简介] 邢俊家,男,学士,副主任药师,电话:024-23256666-6157

6)。结论:本实验方法专属性强,灵敏度高,重复性好,可用于该制剂的质量控制。

[关键词] 葛根素;咽喉炎糖浆剂;高效液相色谱法
 [中图分类号] R927 [文献标识码] A [文章编号] 1001-5213 (2006)07-0903-02

咽喉炎糖浆剂为我院协定处方,由葛根、知母、麦冬、山豆根等 6 味中药组成,主要用于咽喉肿痛患者的治疗,效果良好。方中葛根为主药,具有解表、生津的功能。葛根素是葛根的主要有效成分,与其疗效有密切的关系。有关葛根素的含量测定方法有薄层色谱法^[1]、高效液相色谱法^[2]等,本实验建立了分离效果好,专属性强的 HPLC 法,作为本品质量控制定量指标。操作简便、测定准确、重复性好。

1 仪器与试剂

美国惠普 HP1100 高效液相色谱仪;UV6000P 二极管阵列检测器;葛根素对照品(中国药品生物制品检定所,批号 030814);咽喉炎糖浆(本院制剂室自制,批号 040216,040305,040320);甲醇为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件的选择 色谱柱:YWG-C₁₈ (4.6 mm×250 mm, 5 μm);流动相:甲醇-水(30:70, v/v);流速:1.0 mL·min⁻¹;柱温:室温;检测波长:248 nm;进样量:20 μL。在此条件下葛根素与其他成分达到基线分离。对照品和样品色谱图见图 1。

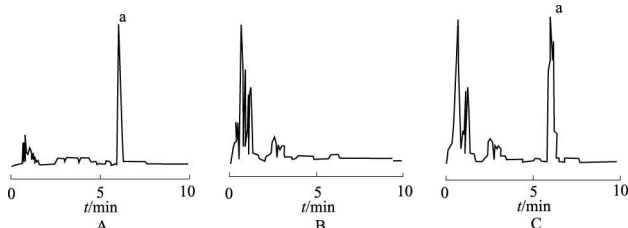


图 1 HPLC 色谱图
 A. 对照品; B. 空白; C. 样品; a. 葛根素
 Fig 1 HPLC chromatograms
 A. chemical reference substance; B. blank; C. sample; a. puerarin

2.2 溶液的制备 对照品溶液制备:精密称取干燥至恒重的葛根素对照品适量,用 30% 甲醇超声溶解,制成浓度为 0.2 g·L⁻¹ 的对照品溶液。

供试品溶液的制备:取咽喉炎糖浆 2 mL,置 100 mL 量瓶中,加 30% 甲醇至刻度摇匀、过滤。取续滤液,经 0.5 μm 滤膜过滤,即得。

2.3 空白对照试验 照处方比例制备缺少葛根素的空白样品,依法制备空白供试品溶液,进样分析,结果表明,其他成分对葛根素测定无干扰。

2.4 线性关系考察 精密量取对照品溶液适量,用 30% 甲醇稀释成浓度分别为 0.2, 1.0, 2.0, 20, 100, 200 mg·L⁻¹ 标准溶液,依法测定,以葛根素峰面积值(Y)对进样浓度(X)进行回归,得回归方程: Y=1.03×10⁻⁷X+4.28×10⁻⁴, r=0.999。线性范围为 0.2~200 mg·L⁻¹。

2.5 精密度试验 精密量取同一批号的样品,照供试品溶液的制备方法操作,分别在日内每隔 2 h 进样,连续 5 次进样。日间(1, 2, 3, 4, 5 d)进样,记录峰面积。得日内精密度,