



论文

紫草中活性成分的非极性溶剂动态微波提取及高效液相色谱法测定

孟祥哲^①, 于永^②, 游景艳^①, 高仕谦^①, 宋大千^①, 张寒琦^①, 于爱民^{①*}^① 吉林大学化学学院, 长春 130012;^② 吉林大学仪器科学与电气工程学院, 长春 130012

*通讯作者, E-mail: mxz1982@email.jlu.edu.cn

收稿日期: 2009-05-28; 接受日期: 2009-07-14

摘要 用非极性溶剂动态微波辅助提取, 高效液相色谱法测定紫草中的紫草素和 β,β' -二甲基丙烯酰紫草素. 考察了微波吸收介质类型、提取溶剂种类、提取溶剂流速、微波功率和样品粒度对提取产率的影响, 优化提取参数. 在优化条件下, 将所建立的方法与超声提取和索氏提取相比, 所得紫草素和 β,β' -二甲基丙烯酰紫草素的产率相差不大, 但本文所建立的方法所需提取时间短(5 min)、溶剂消耗少(10 mL). 与极性溶剂动态微波辅助提取相比, 提取产率大幅度提高. 结果说明, 所建立的方法是一种有效的提取中草药中一些活性成分的方法, 特别是对于一些在非极性溶剂中有更高溶解度的化合物, 此方法更具优势.

关键词非极性溶剂动态微波辅助提取法
紫草素
 β,β' -二甲基丙烯酰紫草素
石墨粉
高效液相色谱

1 引言

紫草分布于我国东北、河北、河南、新疆、内蒙等地^[1], 是一种常用中草药^[2-4]. 紫草中的主要药用成分为萘醌类色素, 主要有乙酰紫草素、紫草素等. 其中紫草素和 β,β' -二甲基丙烯酰紫草素的含量是衡量紫草质量的主要指标^[3, 4], 其结构式如图 1 所示^[5].

微波辅助提取法(MAE)已经发展成为一种从样品中提取有效成分的新型快速提取方法^[6-12]. 与传

统的索氏提取法(SE)和超声提取法(UE)相比, MAE 能够有效地提取被测物, 且具有样品制备时间短、溶剂用量少等优点.

通常情况下, MAE 是静态的, 不能把被测物连续不断地转移出提取器, 而动态微波辅助提取法(DMAE)是将新鲜的溶剂连续泵入提取体系中, 大大提高了提取效率. 此外, DMAE 不仅能缩短提取时间、减少样品和试剂的消耗, 而且便于与其他分析方法联用, 使被测物在线检测成为可行^[13].

若被测物是非极性或极性小的化合物, 在非极性溶剂中, 应当有更高的溶解度, 用非极性溶剂提取自然会得到更高的产率, 但由于非极性溶剂没有偶极, 不吸收微波能, 不能单独用于 MAE. 为了克服这个不足, 可以采用混合溶剂(极性和非极性溶剂), 如正己烷-丙酮(1:1)^[14]. 微波吸收介质(MAM)如活性炭、羟基铁粉和石墨粉等对微波有很强的吸收能力. 我们曾将羟基铁粉与干燥样品混合均匀, 不需要任何前处

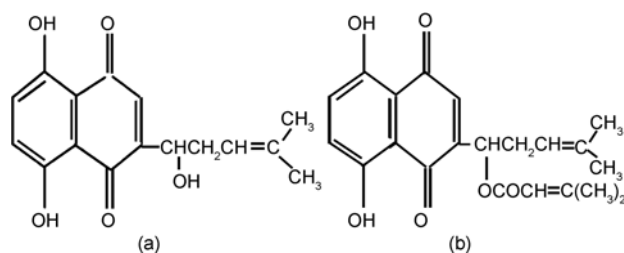


图 1 紫草素(a)和 β,β' -二甲基丙烯酰紫草素(b)的结构式

理过程, 从干燥的中草药样品中提取挥发油^[15], 目前还没有将 MAM 加入到非极性溶剂中, 用动态微波提取法从中草药中提取活性成分的报道.

本文通过在提取体系中加入石墨粉, 可使非极性溶剂被迅速加热, 建立了非极性溶剂动态微波提取法(NPSDMAE), 既具有微波提取快的优点, 又具有非极性溶剂对一些被测物溶解度高, 从而可提高提取产率的优点.

2 实验部分

2.1 仪器和试剂

非极性溶剂动态微波提取系统图 2 所示. 主要包含微波发生器(WGY-20, 吉林大学小天鹅仪器公司, 长春, 中国)、蠕动泵(Michem 仪器公司, 北京, 中国)和 TM₀₁₀ 微波谐振腔. 微波发生器的输出功率是 0~200 W, 微波频率为 2450 MHz. 提取管(自制)内径为 4.5 mm, 长度为 110 mm, 样品体积约为 0.32 cm³, 提取管沿谐振腔中心的轴向放置. 高效液相色谱仪(安捷伦仪器公司, 美国)配用光电二极管阵列检测器(DAD). 超声波清洗器(昆山仪器公司, 昆山, 中国).

正己烷、环己烷和乙醇(北京化工试剂厂, 分析纯); 正戊烷(天津复臣试剂厂, 分析纯); 乙腈(美国 Fisher 试剂公司, 色谱纯); 水由 Milli-Q 纯水净化系统(美国 Millipore 公司制取); 羰基铁粉(CIP)(陕西兴化化学试剂公司); 石墨粉(GP)和活性碳粉(ACP)(国药集团化学试剂有限公司); 紫草素和 β,β' -二甲基丙烯酰紫草素标准对照品(中国药品生物制品研究所, 北京, 中国).

五种不同产地的紫草样品为市售中草药, 分别命名为样品 1、2、3、4 和 5, 将样品粉碎至 20 目、40 目、60 目、80 目和 110 目, 得到不同粒度的样品

备用; 用乙腈配制紫草素和 β,β' -二甲基丙烯酰紫草素标准储备液.

2.2 实验步骤

2.2.1 非极性溶剂动态微波辅助提取

精确称取 50 mg 样品和 10 mg 石墨粉, 混合后放入微波谐振腔内的提取管中, 提取管两端用玻璃棉塞好, 用蠕动泵以 2 mL/min 的流速将 10 mL 提取剂连续泵入提取管, 当提取剂流经样品时, 同时开启微波发生器的电源进行提取, 提取液用 15 mL 试管收集, 提取完成后关闭微波电源. 而后取下试管, 将提取液转移到 250 mL 蒸馏瓶内, 再每次用 5 mL 正己烷冲洗试管, 冲洗三次. 将提取液和冲洗液一并转移到 250 mL 蒸馏瓶内, 40 °C 下用旋转蒸发仪蒸干溶剂, 残渣用 5 mL 乙腈溶解后作为样品溶液.

2.2.2 超声提取

精确称取 100 mg 样品置于 50 mL 锥形瓶中, 加入 20 mL 正己烷, 超声提取 30 min 后, 过滤, 将滤液转移到 250 mL 蒸馏瓶内, 在 40 °C 下用旋转蒸发仪蒸干溶剂, 残渣用 5 mL 乙腈溶解后作为样品溶液.

2.2.3 索氏提取

精确称 1000 mg 样品放入索氏提取器中, 在蒸馏瓶中加入 100 mL 提取剂, 水浴加热提取 4 h. 提取液转移到 250 mL 蒸馏瓶内, 在 40 °C 下用旋转蒸发仪蒸干溶剂, 残渣用 5 mL 乙腈溶解后作为样品溶液.

2.2.4 HPLC测定

采用 Agilent 1100 高效液相色谱仪, 在 30 °C 的条件下, DAD 检测器, 检测波长 516 nm. 色谱柱 Eclipse XDB-C8 (4.6 mm×1250 mm, 5 μ m), 进样体积 25 μ L, 柱温 30 °C, 流速 1.0 mL/min; 流动相采用乙腈 70% (A)和水 30% (B)混合溶剂. 紫草素和 β,β' -二甲基丙烯酰紫草素标准混合液和样品溶液的 HPLC 图如图 3 所示.

3 结果与讨论

3.1 NPSDMAE实验参数优化

3.1.1 微波吸收介质的选择

微波吸收介质是影响 NPSDMAE 提取产率的重

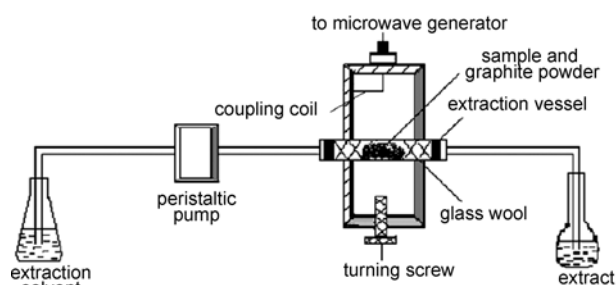


图 2 NPSDMAE 系统

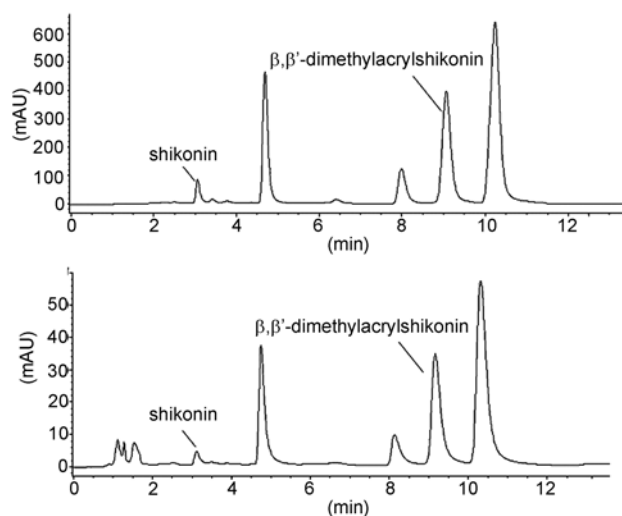


图3 HPLC图. (a)紫草素和 β,β' -二甲基丙烯酰紫草素标准混合溶液; (b)由NPSDMAE得到的样品提取液

要因素,分别以10 mg CIP、GP和ACP作为MAM,在微波功率30 W,提取溶剂为正己烷,流速为1 mL/min的提取条件下,提取50 mg样品1(40目)中紫草素和 β,β' -二甲基丙烯酰紫草素,从实验结果(图4)可知,ACP作为MAM时,紫草素和 β,β' -二甲基丙烯酰紫草素的提取产率最低,可能是由于ACP本身的吸附作用降低了被测物的产率.当选用GP作为MAM时,紫草素和 β,β' -二甲基丙烯酰紫草素的提取产率均最高.因而选取GP为MAM进行实验.

在相同条件下,GP对提取产率的影响如图5所示,当GP用量为10 mg时,提取产率最高,因而选取GP用量10 mg进行实验.

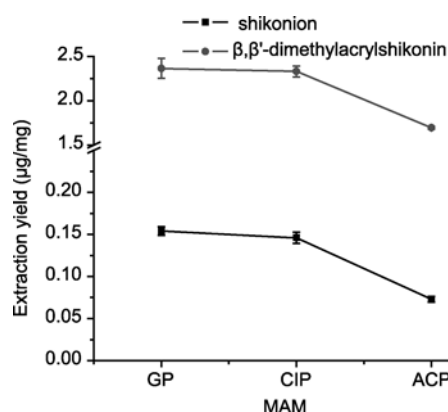


图4 微波吸收介质对提取产率的影响. MAM质量, 10 mg; 微波功率, 30 W; 正己烷体积, 10 mL; 流速, 1.0 mL/min; 40目样品1质量, 50 mg

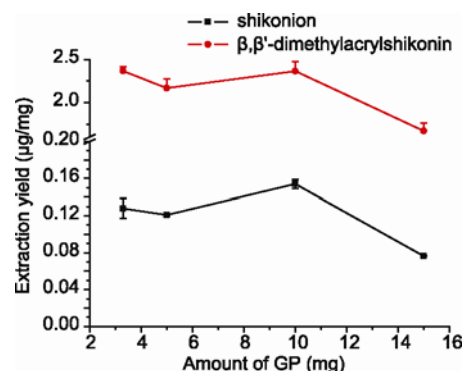


图5 石墨粉的质量对提取产率的影响. MAM, GP; 功率, 30 W; 正己烷, 10 mL; 流速, 1.0 mL/min; 40目样品1质量, 50 mg

3.1.2 提取溶剂的选择

在GP用量为10 mg,微波功率30 W,流速为1 mL/min的提取条件下,分别用正己烷、正戊烷、环己烷和石油醚四种溶剂对40目的50 mg样品1进行提取.实验结果如图6所示,四种溶剂对紫草素和 β,β' -二甲基丙烯酰紫草素的提取产率相近,其中正己烷的提取产率略高,因而选取正己烷为提取溶剂.

考察了提取溶剂体积对提取产率的影响如图7所示,紫草素和 β,β' -二甲基丙烯酰紫草素的产率随着溶剂体积的增大先增大,后减小.用10 mL正己烷时紫草素和 β,β' -二甲基丙烯酰紫草素的提取产率最高.溶剂体积越大,提取的时间越长,可能导致紫草素和 β,β' -二甲基丙烯酰紫草素分解.为此选择10 mL正己烷进行实验.

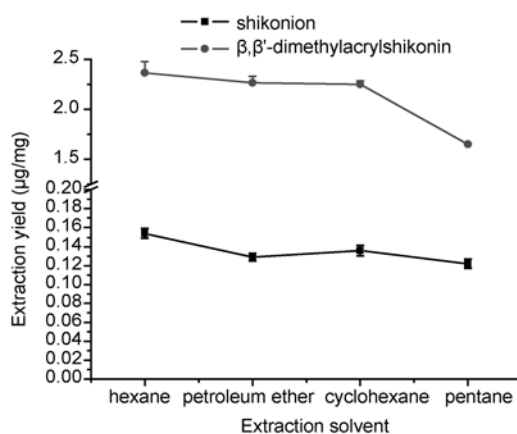


图6 提取溶剂对提取产率的影响. GP质量, 10 mg; 微波功率, 30 W; 提取溶剂体积, 10 mL; 流速, 1.0 mL/min; 40目样品1质量, 50 mg

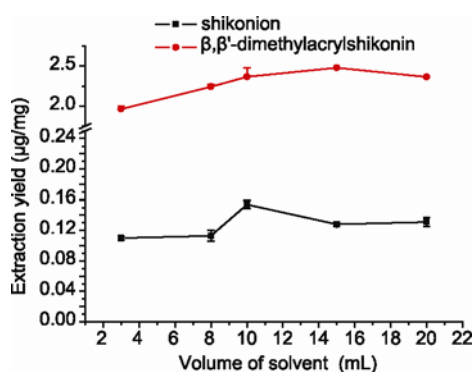


图 7 正己烷体积对提取产率的影响. GP 质量, 10 mg; 微波功率, 30 W; 提取溶剂, 正己烷; 流速, 1.0 mL/min; 40 目样品 1 质量, 50 mg

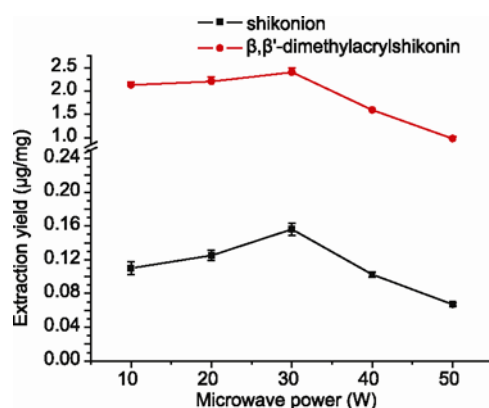


图 9 微波功率对提取产率的影响. GP 质量, 10 mg; 正己烷体积, 10 mL; 流速, 2.0 mL/min; 40 目样品 1 质量, 50 mg

3.1.3 溶剂流速对提取产率的影响

提取溶剂流速对提取产率的影响如图 8, 过高和过低的流速都会使提取产率降低, 这是因为流速过高时, 样品经微波照射的时间过短, 提取不完全; 流速过低时, 样品经微波照射时间过长而可能导致被测物分解. 因此选择 2.0 mL/min 为提取溶剂的流速.

3.1.4 微波功率对提取产率的影响

微波功率对提取产率影响如图 9, 从图可知, 微波功率为 30 W 时, 被测物的提取产率最高, 更高的微波功率不仅不会提高提取产率, 反而使提取产率降低, 可能使被测物发生分解. 因而选择微波功率为 30 W 进行实验.

3.1.5 样品颗粒度对提取产率的影响

比较了样品 1 在不同颗粒度时的提取产率, 结果

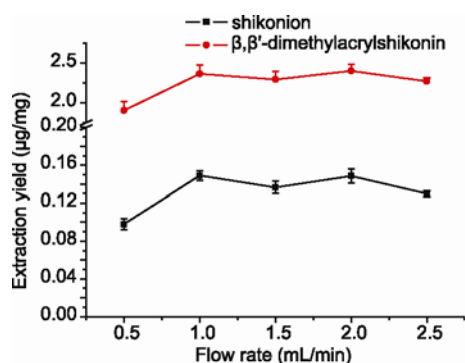


图 8 提取溶剂流速对提取产率的影响. GP 质量, 10 mg; 微波功率, 30 W; 正己烷体积, 10 mL; 40 目样品 1 质量, 50 mg

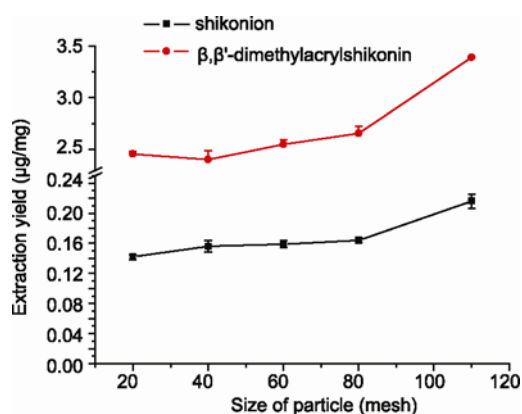


图 10 样品粒度对提取产率的影响. GP 质量: 10 mg; 微波功率: 30 W; 正己烷体积: 10 mL; 流速: 2.0 mL/min; 40 目样品 1 质量: 50 mg

如图 10 所示, 紫草素和 β,β' -二甲基丙烯酰紫草素的提取产率随着样品粒度的减小而提高, 说明样品的颗粒越小, 与提取溶剂接触的面积就越大, 更有利于被测物的提取, 因而选择 110 目进行实验.

3.2 标准曲线和检测限

用 HPLC 测定紫草素和 β,β' -二甲基丙烯酰紫草素标准曲线的回归方程、相关系数和检出限列于表 1.

3.3 实际样品分析

表 2 列出了用 NPSDMAE- HPLC 分析 5 种样品所得结果. 从表 2 可以看出, 不同产地的紫草样品中紫草素和 β,β' -二甲基丙烯酰紫草素的含量有着很大的差异, 其中样品 2 中的紫草素含量最低, 但是样品 2 中所含 β,β' -二甲基丙烯酰紫草素的含量最高, 可能

表 1 HPLC 测定紫草素和 β,β' -二甲基丙烯酰紫草素标准曲线的回归方程、相关系数和检出限

Analyte	Regression equation	Linear range ($\mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$)	Correlation coefficient	Detection limit ($\mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$)
shikonin	$A=21.29c-6.50$	0.5~40.0	0.99993	0.20
β,β' -dimethylacrylshikonin	$A=18.31c-60.99$	13.1~78.6	0.99984	2.62

表 2 样品分析结果^{a)}

Sample	Shikonin		β,β' -Dimethylacrylshikonin	
	within-day ($\mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$)	between-day ($\mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$)	within-day ($\mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$)	between-day ($\mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$)
1	0.22 (4.31)	0.20 (6.46)	3.33 (3.29)	3.30 (2.53)
2	0.15 (4.62)	0.16 (10.21)	10.21 (2.40)	9.98 (3.43)
3	0.38 (0.66)	0.37 (3.86)	6.75 (3.51)	6.73 (3.11)
4	0.26 (2.59)	0.25 (5.39)	3.79 (1.79)	3.74 (3.94)
5	0.24 (4.44)	0.24 (4.45)	5.09 (5.22)	5.07 (3.87)

a) 括号中的值为 RSD (% , n=4)

是由于不同产地地理环境差异引起的. 从所得含量的相对标准偏差值(RSD)可以看出, 方法具有较好的精密度.

3.4 回收率

在五种样品中加入标准对照品, 测得的加标回收率列于表 3, 从实验结果可以看出, 该方法具有良好的回收率.

3.5 NPSDMAE, SE和UE的比较

将 NPSDMAE 与其他提取方法进行比较, 结果

列于表 4, 从表中可看出, 不管用那种提取方法, 用非极性溶剂(正己烷)时紫草素和 β,β' -二甲基丙烯酰紫草素的提取产率明显高于用极性溶剂(乙醇)时的产率. 虽然应用非极性溶剂 SE 时产率最高, 但 SE 耗时最长 (240 min), 且需要大量的样品, 而 NPSDMAE 的提取产率较高, 提取时间仅需 5 min. 与极性溶剂 DMAE 相比, 由非极性溶剂获得的提取产率明显要高. 这些都表明, NPSDMAE 应当不仅适合于提取紫草中一些活性成分, 且应当是提取中草药中在非极性溶剂中有更高溶解度化合物的有效方法.

表 3 紫草素和 β,β' -二甲基丙烯酰紫草素的回收率

Sample	Shikonin				β,β' -Dimethylacrylshikonin			
	content ($\mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$)	added ($\mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$)	found ($\mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$)	recovery (%)	content ($\mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$)	added ($\mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$)	found ($\mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$)	recovery (%)
1	0.22	0.21	0.43	100.00	3.33	3.30	6.74	103.33
2	0.15	0.15	0.29	93.33	10.21	10.30	19.58	90.97
3	0.38	0.38	0.73	92.11	6.75	7.42	14.40	103.10
4	0.26	0.25	0.48	88.00	3.79	4.12	7.84	98.30
5	0.24	0.25	0.49	100.00	5.09	4.12	9.10	97.32

表 4 UE、SE 和 DMAE 提取紫草素和 β,β' -二甲基丙烯酰紫草素的比较

	UE		SE		DMAE	
	hexane	ethanol	hexane	ethanol	hexane	ethanol
Extraction yields of shikonin ($\mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$)	0.22	0.16	0.27	—	0.22	0.13
RSD (%)	2.81	2.82	5.60	—	4.31	5.98
Extraction yields of β,β' -dimethylacrylshikonin ($\mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$)	3.54	3.39	3.72	1.07	3.33	1.68
RSD (%)	2.45	4.59	4.89	3.95	3.29	4.47
Extraction time (min)		60		240		5
Amount of sample (mg)		100		1000		50

4 结论

在非极性溶剂中加入微波吸收介质作为提取溶剂, 用 DMAE 提取了中药紫草中活性成分紫草素和 β,β' -二甲基丙烯酰紫草素, 并用 HPLC 分离测定了这二种化合物, 建立了 NPSDMAE-HPLC 法. 通过与传

统的 SE 和 UE 进行比较, 证明 NPSDMAE 具有提取产率高、提取时间短、样品耗量少等优点. 而与用极性溶剂的 DMAE 相比, 有提取产率高的优点. 表明所建立的方法特别适用于那些在非极性溶剂中有较高溶解度化合物的提取和测定, 扩展了微波提取的应用范围.

参考文献

- 1 杨秀芳. 紫草提取工艺的优化. 陕西科技大学学报, 2004, 22(4): 35—37
- 2 《全国中草药汇编》编写组. 全国中草药汇编. 北京, 人民卫生出版社, 1975, 841
- 3 《中国药典》2000 年版(一部). 北京, 化学工业出版社. 2000, 283
- 4 《中国药典》2005 年版(第一部). 北京, 北京工业出版社. 2005, 238
- 5 葛锋, 王晓东, 王玉春. 药用紫草的研究进展. 中草药, 2003, 34(9): 11—13
- 6 Singh SB, Foster GD, Khan SU. Determination of thiophanate methyl and carbendazim residues in vegetable samples using microwave-assisted extraction. *J Chromatogr A*, 2007, 1148(2): 152—157
- 7 Gao M, Huang W, RoyChowdhury M, Liu CZ. Microwave-assisted extraction of scutellarin from *Erigeron breviscapus* Hand-Mazz and its determination by high-performance liquid chromatography. *Anal Chim Acta*, 2007, 591(2): 161—166
- 8 You JY, Zhang HR, Zhang HQ, Yu AM, Xiao TT, Wang YT, Song DQ. Determination of triazines in infant nutrient cereal-based foods by pressurized microwave-assisted extraction coupled with high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B*, 2007, 856(1-2): 278—284
- 9 Chen YI, Su YS, Jen JF. Determination of dichlorvos by on-line microwave-assisted extraction coupled to headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-electron-capture detection. *J Chromatogr A*, 2002, 976(1-2): 349—355
- 10 Yang Y, Chen L, Zhang XX, Guo ZK. Microwave assisted extraction of major active ingredients in *panax quinquefolium* L. *J Liq Chromatogr Rel Technol*, 2005, 27(20): 3203—3211
- 11 张丽平, 余晓琴. 微波萃取技术在提取黄酮类化合物上的应用. 成都纺织高等专科学校学报, 2006, 23(3): 13—16
- 12 颜流水, 黄智敏, 胡臻恺, 万益群, 陈燕清. 藜蒿中黄酮类化合物的微波辅助萃取研究. 分析试验室, 2006, 25: 66—69
- 13 Chen LG, Ding L, Yu AM, Yang RL, Wang XP, Li JT, Jin HY, Zhang HQ. Continuous determination of total flavonoids in *Platycladus orientalis* (L.) Franco by dynamic microwave-assisted extraction coupled with on-line derivatization and ultraviolet-visible detection. *Anal Chim Acta*, 2007, 596(1): 164—170
- 14 Liu Y, Wen B, Shan XQ. Determination of pentachlorophenol in wastewater irrigated soils and incubated earthworms. *Talanta*, 2006, 69(5): 1254—1259
- 15 Wang ZM, Ding L, Li TC, Zhou X, Wang L, Zhang HQ, Liu L, Li Y, Liu ZH, Wang HJ, Zeng H, He H. Improved solvent-free microwave extraction of essential oil from dried *Cuminum cyminum* L and *Zanthoxylum bungeanum* Maxim. *J Chromatogr A*, 2006, 1102(1-2): 11—17

Determination of the active components in *Arnebia eucroma* (Royle) *Johnst* by non-polar solvent dynamic microwave-assisted extraction coupled with HPLC

MENG XiangZhe¹, YU Yong², YOU JingYan¹, GAO ShiQian¹, SONG DaQian¹, ZHANG HanQi¹ & YU AiMin¹

¹ College of Chemistry, Jilin University, Changchun 130012, China;

² College of Instrument Science and Electronic Engineering, Jilin University, Changchun 130012, China

Abstract: Non-polar solvent dynamic microwave-assisted extraction (DMAE) was applied to the extraction of shikonin and β,β' -dimethylacrylshikonin in *Arnebia eucroma* (Royle) *Johnst*. The experimental parameters of non-polar solvent DMAE, including types of microwave absorption media, types of extraction solvents, the flow rate of extraction solvents, microwave irradiation power and size of sample particles were examined and optimized separately. The extraction yields of target compounds obtained by non-polar solvent DMAE (NPSDMAE) were comparable with those obtained by ultrasonic extraction (UE) and soxhlet extraction (SE). However, when NPSDMAE was applied, short extraction time (5 min) and a small amount of solvent (10 mL) were required. Compared with polar solvent DMAE, the proposed method was demonstrated to obtain higher extraction yield. The experimental results indicate that the proposed method is especially suitable for the compounds, the solubility of which in non-polar solvents is higher than that in polar solvents.

Keywords: non-polar solvent dynamic microwave assisted extraction, shikonin, β,β' -dimethylacrylshikonin, graphite powder, HPLC