

茜草提取物中大叶茜草素测定的方法研究

浦益琼, 王冰, 张彤*, 陶建生, 丁越
(上海中医药大学, 上海 201203)

[摘要] 目的: 建立茜草提取物中大叶茜草素的 HPLC 含量测定方法。方法: 采用 Ultimate XB-C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-乙腈-0.2% 磷酸(25: 50: 25), 流速为 1 mL·min⁻¹, 柱温 25 °C, 检测波长 250 nm。结果: 在该条件下, 大叶茜草素在 3.566 ~ 456.4 mg·L⁻¹ 线性关系良好 ($r = 0.9999$); 平均回收率为 98.97% (RSD 2.29%)。结论: 该方法准确、可靠, 操作简便, 可用于茜草提取物的质量控制方法。

[关键词] 茜草; 大叶茜草素; 高效液相色谱法

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)06-0094-03

The Methodology Study on Mollugin Content Determination in Radix Rubiae Extracts

PU Yi-qiong, WANG Bing, ZHANG Tong*, TAO Jian-sheng, DING Yue
(Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a quantitative HPLC method for the determination of mollugin in extract from *Rubia cordifolia* L. **Method:** The determination was carried out on a Ultimate XB-C₁₈ column at 25 °C with methanol-acetonitrile-0.2% phosphoric acid (25: 50: 25) as mobile phase and detection wavelength at 250 nm. The flow rate was 1.0 mL·min⁻¹. **Result:** The good linearity was obtained with the correlation coefficients ranged of 3.566-456.4 mg·L⁻¹ ($r = 0.9999$). The average recovery rate was 98.97% (RSD 2.29%). **Conclusion:** This method is accurate and reliable with easy operation, which can be used in the quality control of extracts from *R. cordifolia*.

[Key words] *Rubia cordifolia* L.; mollugin; HPLC

[收稿日期] 2011-10-14

[基金项目] 教育部新世纪人才计划(NCET-10-0944);上海市曙光计划(10SG40);上海市创新团队及重点学科(J50302)

[第一作者] 浦益琼, 博士, 讲师, 从事中药制药技术与新制剂研究, Tel: 021-51323068, E-mail: puyiq@163.com

[通讯作者] * 张彤, 博士, 教授, 从事中药制药及质量标准研究, Tel: 021-51322315, E-mail: zhangtdmj@hotmail.com

[8] 张祎, 葛丹丹, 薛婧, 等. 火绒草黄酮类成分的分离与结构鉴定[J]. 沈阳药科大学学报, 2011, 28(3): 186.

[9] 潘春暖, 尤海丹, 贺杰. 火绒草正丁醇层化学成分的分离与鉴定[J]. 沈阳药科大学学报, 2010, 27(5): 436.

[10] 张永勇, 罗佳波. 白花蛇舌草化学成分研究[J]. 中药材, 2008, 31(4): 522.

[11] Hirota M. Astragalosides from hairy root cultures of *Astragalus membranaceus* [J]. Phytochemistry, 1994, 36(3): 665.

[12] 张晓燕, 王金辉, 李铤. 白芍的化学成分研究[J]. 沈阳药科大学学报, 2001, 18(1): 30.

[13] 张义平, 陈鸿雁, 程伟贤, 等. 云南丽江丹参化学成分研究[J]. 中草药, 2008, 31(2): 226.

[14] 周长新, 罗厚蔚, 丹羽正武. 丹参水溶性化学成分的研究[J]. 中国药科大学学报, 1999, 30(6): 411.

[15] 潘春暖, 张国刚, 米文珍. 火绒草中的黄酮苷类成分[J]. 沈阳药科大学学报, 2009, 26(11): 886.

[16] 郭宪清, 张丽香, 姜秉荣, 等. 黄芪皂苷类组分的现代药理研究进展[J]. 中国药业, 2006, 15(12): 66.

[责任编辑 邹晓翠]

茜草为茜草科植物茜草 *Rubia cardifolia* L. 的干燥根和根茎,具有凉血止血、活血化瘀之功效。茜草的化学成分以蒽醌及其苷类化合物为主,此外还有萘醌类、萜类、己肽类、多糖类等。大叶茜草素为茜草中主要的萘醌类成分,具有神经保护、抗炎、抗肿瘤、抗血小板聚集等作用^[1-3],现已被列入《中国药典》2010年版中茜草项下含量测定的指标成分之一。

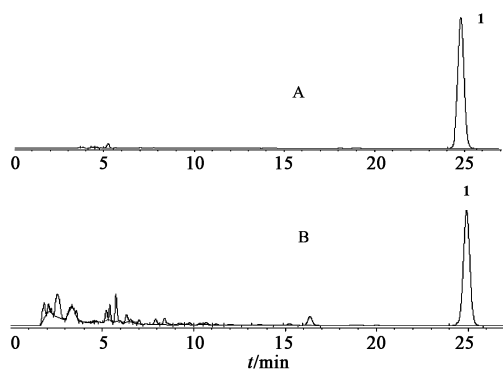
1 仪器与试剂

Agilent 1100 型高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司),FA1004N 型电子天平(上海精宏科学仪器有限公司),SK5200H 型高频超声波清洗器(上海科导超声仪器有限公司)。

大叶茜草素对照品(中国药品生物制品鉴定所,批号 110884-200604,含量测定用),乙腈、甲醇为色谱纯(Merck),磷酸为分析纯(国药集团化学试剂有限公司),水为重蒸馏水。茜草提取物为自制样品。

2 方法与结果

2.1 色谱条件及适用性 Ultimate XB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相甲醇-乙腈-0.2% 磷酸(25:50:25),流速 1 mL·min⁻¹,柱温 25 °C,检测波长 250 nm。色谱图见图 1。



A. 大叶茜草素;B. 供试品;1. 大叶茜草素

图 1 大叶茜草素含量测定 HPLC 图谱

2.2 对照品溶液的制备 精密称取干燥后的大叶茜草素对照品 5.10 mg,置 5 mL 棕色量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,作为对照品储备液;精密吸取该储备液 1 mL,于 10 mL 棕色量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,制得每 1 mL 含大叶茜草素 0.102 mg 的对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备

2.3.1 样品取样量的选择 取茜草提取物粉末(110809),过四号筛,分别取约 0.1,0.05,0.02 g,精密称定,置 50 mL 具塞锥形瓶中,分别精密加入 25

mL 甲醇,密塞,称定质量,超声 30 min,再称定质量,用甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,作为供试品溶液。测定含量。结果表明,该不同取样量下测得的大叶茜草素的含量分别为 8.72%,8.85% 和 9.02%,固体样品取样量约为 0.02 g 左右时,提取效率较优。

2.3.2 溶剂量的选择 取茜草提取物粉末约 0.02 g(110809),精密称定,置 50 mL 具塞锥形瓶中,分别精密加入 10,25,50 mL 甲醇,密塞,称定质量,超声 30 min,放冷,再称定质量,用甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,作为供试品溶液。测定含量。结果表明,该不同溶剂量下测得的大叶茜草素的含量分别为 8.81%,9.05%,8.96%,提取溶剂量为 25 mL 时,提取效率最高。

2.3.3 超声时间的选择 取茜草提取物粉末约 0.02 g(110809),精密称定,置 50 mL 具塞锥形瓶中,分别精密加入 25 mL 甲醇,密塞,称定质量,分别超声 10,20,30 min,放冷,再称定质量,用甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,作为供试品溶液。测定含量。结果表明,该不同超声时间下制备的供试品溶液,测得的大叶茜草素含量分别为 8.77%,9.28%,8.98%,超声时间为 20 min 时,提取效果较优。

2.3.4 供试品溶液的制备方法 取茜草提取物粉末(过四号筛)0.02 g,精密称定,置 50 mL 具塞锥形瓶中,精密加入 25 mL 甲醇,密塞,称定质量,超声 20 min,放冷,再称定质量,用甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,弃去初滤液,续滤液 0.45 μm 滤膜滤过,作为供试品溶液。

2.4 线性关系考察 精密称取减压干燥后的大叶茜草素对照品 11.41 mg,置 5 mL 棕色量瓶中,用甲醇溶解并定容至刻度,得质量浓度为 2.282 g·L⁻¹ 的对照品储备液。分别精密吸取该储备液适量,依次稀释,分别得到 3.566 ~ 456.4 mg·L⁻¹ 的一系列质量浓度梯度的对照品溶液。分别吸取上述的对照品溶液各 20 μL,按 2.1 项下条件进行测定。以峰面积积分为纵坐标(Y),大叶茜草素对照品的质量为横坐标(X),绘制标准曲线,得回归方程 $Y = 91326X + 92.808$ ($r = 0.9999$)。结果表明,大叶茜草素在 3.566 ~ 456.4 mg·L⁻¹ 与峰面积呈良好线性关系。

2.5 精密度试验 取 2.4 项下制备的浓度为 0.1141 g·L⁻¹ 对照品溶液,精密吸取该对照品溶液 20 μL,注入液相色谱仪中,连续测定 6 次,按上述色谱条件测定峰面积,计算 RSD ($n = 6$) 为 0.55%,表

明仪器精密度良好。

2.6 重复性试验 取同批茜草提取物样品 (No. 110804) 6 份, 照 2.3.4 项下操作, 制备供试品样品溶液, 按上述色谱条件测定大叶茜草素, 平均质量分数为 10.39%, RSD 2.10%。

2.7 稳定性试验 照 2.3.4 项下制备样品溶液, 分别于 0, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24 h 不同时间点, 精密吸取 20 μ L 注入液相色谱仪, 记录峰面积, 峰面积 RSD 为 1.26%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.8 加样回收率试验 称取茜草提取物 ((110804) 约 0.01 g, 平行 6 份, 精密称定, 精密加入大叶茜草素对照品, 照 2.3.4 项下方法制备供试品溶液, 测定大叶茜草素的含量, 计算回收率。结果见表 1。

表 1 大叶茜草素加样回收率

取样量 /g	供试品 中量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均 回收率 /%	RSD /%
0.010 2	1.056	0.763	1.802	97.80		
0.009 2	0.956	0.763	1.694	96.65		
0.009 1	0.945	0.763	1.689	97.48		
0.009 5	0.987	0.978	1.964	99.96		
0.009 7	1.008	0.978	1.956	96.99	98.97	2.29
0.009 8	1.018	0.978	1.974	97.78		
0.010 6	1.101	1.222	2.318	99.54		
0.010 5	1.091	1.222	2.323	100.82		
0.010 3	1.070	1.222	2.337	103.67		

3 讨论

本实验通过方法学研究, 建立了茜草提取物中大叶茜草素的 HPLC 测定方法, 该方法操作简便, 准确可靠、重复性好, 可作为一种高效、可行的评价茜草提取物等中间产品的有效手段。

有文献报道^[4], 光照条件下甲醇溶液中的大叶茜草素的含量降低明显。本实验中所用到的供试品溶液均保存于棕色瓶中, 在研究“样品溶液稳定性”的过程中发现, 在将样品经 0.45 μ m 微孔滤膜过滤后存于白色塑料 PE 管后, 从该管中吸取同一滤液注入 HPLC 仪后, 所得的峰面积在 10 h 内确实下降较大。后经将供试品溶液保存于棕色瓶中, 所得峰面积的稳定性良好, 提示在对大叶茜草素甲醇溶液进行含量测定时, 需尽量避光操作, 降低测定偏差。

[参考文献]

- [1] 中国药典. 一部[S]. 2010:218.
- [2] Jeong G S, Lee D S, Kim D C, et al. Neuroprotective and anti-inflammatory effects of mollugin via up-regulation of heme oxygenase-1 in mouse hippocampal and microglial cells [J]. Eur J Pharmacol, 2011, 654(3):226.
- [3] Kim S M, Park H S, Jun D Y, et al. Mollugin induces apoptosis in human Jurkat T cells through endoplasmic reticulum stress-mediated activation of JNK and caspase-12 and subsequent activation of mitochondria-dependent caspase cascade regulated by Bcl-xL [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2009, 241(2):210.
- [4] 刘广, 齐娜, 徐本明. 大叶茜草素在甲醇溶液中的稳定性研究[J]. 华西药理学杂志, 2010, 25(3):318.

[责任编辑 蔡仲德]