

# 茜草中 Lucidin, Lucidin-3-O-primeveroside 及大叶茜草素在小鼠血浆中代谢趋势的初步研究

司南, 王宏洁, 杨健, 李洪梅, 李鹏跃, 李小芹, 边宝林\*, 何希荣  
(中国中医科学院中药研究所, 北京 100700)

**[摘要]** 目的: 研究中药茜草中遗传毒性成分 Lucidin 及其苷 Lucidin-3-O-primeveroside (EUK-4) 在动物体内的代谢, 对茜草的用药安全性进行初步考察。方法: 采用反相高效液相色谱法测定茜草 70% 乙醇提取物以及 ig 该提取物一定时间的动物血浆样品。结果: 茜草提取物中均能够检测到 Lucidin、EUK-4 及大叶茜草素; 茜草 70% 乙醇提取物, 经 ig 给药后, 血浆样品中仅能检测到 Lucidin 及大叶茜草素, 并且给药 15 min, Lucidin 的血药浓度达到最高, 给药后 30 min, 大叶茜草素的血药浓度达到最高。结论: 由于 ig 给药前后血浆中未检测到 EUK-4, 而 Lucidin 成分有增加的趋势, 因此推断中药茜草中 EUK-4 成分可能分解为 Lucidin 的形式参与动物体内代谢。

**[关键词]** 茜草; 遗传毒性; Lucidin; Lucidin-3-O-primeveroside; 大叶茜草素

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2010)02-0113-03

茜草<sup>[1]</sup>为茜草科植物茜草 *Rubia cordifolia* L. 的根和根茎。味苦, 性寒。有凉血, 止血, 祛瘀, 通经等功能, 被广泛应用于中医临床, 在我国大部分地区均有分布。近代研究表明, 茜草根含多种羟基蒽醌衍生物, 如茜草素 (alizarin)、异茜草素 (purpuroxanthin)、羟基茜草素 (purpurin)、伪羟基茜草素 (pseudo-purpurin)、茜草酸 (munjistin)、茜草甙 (rubia, ruberythric acid)、大黄素甲醚等; 而萘醌类成分大叶茜草素 (rubimaillin) 目前被认为是茜草的主要活性成分。

本研究是将国产茜草用 70% 乙醇回流得到的提取物对小鼠进行灌胃, 采取不同时间点的血浆样品, 运用反相高效液相色谱法梯度洗脱, 对样品进行分析, 探讨中药茜草的药物代谢, 初步考察茜草的用药安全性。

## 1 材料

**1.1 药品与试剂** 茜草河南产, 经本所何希荣主管药师鉴定为茜草科植物 *Rubia cordifolia* L. 的根及根茎; Lucidin (批号: T07478)、Lucidin-3-O-primeveroside (EUK-4, 批号 T07468) 均由日本株式会社津村提供; 大叶茜草素 (Rubimaillin, 批号 110884-

200203, 购于中国药品生物制品检定所); 甲醇 (优级纯, 北京化工厂); 乙醇 (分析纯, 北京化工厂); 磷酸 (分析纯, 北京化工厂); 四氢呋喃 (分析纯, 北京化工厂); 乙腈 (Lajota, SPAIN)。

**1.2 实验动物** ICR 小鼠, 体重 (20 ± 1) g, 70 只, 雌雄各半, 饲养在 (20 ~ 22) °C 的室温环境中, 10 只一笼, 自由摄取饲料及水, 北京维通利华实验动物技术有限公司提供, 许可证编号: SCXK (京) 2002-0003。

## 2 仪器与色谱条件

**2.1 仪器** 安捷伦 1100 型高效液相色谱仪; KQ-100 型超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); WH-861 漩涡混合器 (北京科尔德科贸有限公司); LD5-2A 型低速离心机 (北京医用离心机厂); DZ-KW-D 水浴锅 (河北省黄骅航天仪器厂)。

### 2.2 色谱条件

**2.2.1 全成分分析色谱条件** 色谱柱: YMC-pack ODS-A (4.6 mm × 150 mm, 4 μm); 流速: 1.0 mL · min<sup>-1</sup>; 柱温: 40 °C; 检测波长: 280 nm; 流动相: A: 乙腈, B: 0.05% 磷酸水梯度洗脱——梯度变化: 时间点 0, 20, 60 min; 流动相配比 (A: B) 分别为 (16: 84), (30: 70), (100: 0)。

**2.2.2 大叶茜草素色谱条件** 色谱柱: YMC ODS (4.6 mm × 150 mm, 4 μm); 流动相: 甲醇-水-四氢呋喃 (310: 90: 3); 检测波长: 250 nm; 柱温: 40 °C; 流

**[收稿日期]** 2009-08-13

**[通讯作者]** \* 边宝林, Tel: (010) 64021008; E-mail: bianbaolin9@ yahoo. com. cn

速:1 mL · min<sup>-1</sup>。

### 3 方法与结果

**3.1 茜草提取物的制备**<sup>[2]</sup> 茜草药材(略粉碎),加入 10 倍量 70% 乙醇,回流提取 3 次,每次 1 h,合并 3 次提取液,60 °C 减压回收乙醇,至稠膏,减压干燥至干,粉碎并过 80 目筛,即得茜草提取物。

**3.2 试验设计** 茜草提取物小鼠 ig 给药(16 g 提取物 · kg 体重<sup>-1</sup>)。分别于给药后 0,5,15,30,45,60,120 min 等 7 个时间点采用股动脉取血,加入肝素抗凝(每个时间点 10 只小鼠),并分离得到血浆样品。

**3.3 对照品溶液的制备** 精密称取 Lucidin 对照品 0.133 mg 以 67% 乙腈/水溶解并定容 5 mL,0.45 μm 微孔滤膜滤过,即得 Lucidin 对照品溶液;精密称取 EUK-4 对照品 1.070 mg 以 50% 乙腈/水溶解并定容 25 mL,0.45 μm 微孔滤膜滤过,即得 EUK-4 对照品溶液;精密称取大叶茜草素对照品 0.902 mg 以甲醇溶解并定容 10 mL,0.45 μm 微孔滤膜滤过,即得大叶茜草素对照品溶液。

### 3.4 供试品溶液的制备

**3.4.1** 精密称取茜草 70% 提取物 0.2 g,加入 75% 乙腈/水 80 mL 超声提取 30 min,放凉后定容 100 mL,摇匀,0.45 μm 微孔滤膜滤过,即得茜草提取物供试品溶液。

**3.4.2** 将各个时间点的血浆混合,加入氯仿 3 mL,涡旋振荡 2 min,3500 r · min<sup>-1</sup> 离心 15 min,重复 3 次(第 3 次离心 30 min);合并氯仿层,45 °C 减压浓缩溶剂至干;精密加入 67% 乙腈/水溶液 1 mL,超声溶解,0.45 μm 滤过,即得血浆供试品溶液。

**3.5 测定方法** 分别吸取各个对照品溶液 10 μL,供试品溶液 100 μL 分别注入高效液相色谱仪,按照 3.2.1 所述色谱条件测定;精密吸取上述茜草提取物供试品溶液 3 μL 注入高效液相色谱仪,每个样品进样 3 针,按照 3.2.2 所述色谱条件进行测定,结果见表 1。

表 1 茜草提取物中大叶茜草素的含量

样品	称样量 (mg)	平均峰面积	大叶茜草素含量 (%)	平均含量 (%)
1	216.0	2 259	4.551	
2	209.5	2 193	4.555	4.552
3	207.5	2 170	4.550	

**3.6 大叶茜草素方法学考察** 线性关系考察:分别

取大叶茜草素对照品溶液 1,2,4,8,10,20 μL,注入高效液相色谱仪中,进样次数各 3 次,按上述色谱条件测定峰面积值,以峰面积作图,绘制标准曲线,得到回归方程:Y=38.929 8X-0.001 31,r=0.999 99。

精密度试验:取上述对照品溶液,重复进样 5 次,计算得到 RSD% ≤0.077%。

重复性试验:平行精密称取茜草提取物 0.2 g × 5 份,RSD% ≤0.492%。

回收率试验:精密称取茜草提取物 0.2 g × 3 份,分别加入 1 mg 大叶茜草素对照品,按照供试品溶液的制备方法进行制备,得到供试品溶液,分别吸取 2 μL 注入高效液相色谱仪,进行测定,每个样品进样 3 针,结果见表 2。

表 2 大叶茜草素加样回收结果

样品	称样量 (mg)	大叶茜草素加入量 (mg)	计算回收率 (%)	平均回收率 (%)
1	240.4	0.960	105.4	
2	206.2	0.905	98.5	105.1
3	207.0	0.848	111.5	

**3.7 结果** 运用全成分分析色谱方法 3.2.1,根据外标法粗测,茜草提取物中 Lucidin,EKU-4,大叶茜草素含量分别为:0.103%,0.12%,3.75%;运用大叶茜草素色谱分析方法测定大叶茜草素的含量为 4.552%;茜草 70% 乙醇提取物,经口服灌胃给药后 15 min,Lucidin 的血药浓度达到最高(0.666 μg · mL<sup>-1</sup>),给药后 30 min,大叶茜草素的血药浓度达到最高(0.833 μg · mL<sup>-1</sup>),结果见表 3。

表 3 血浆中 Lucidin 及大叶茜草素药时变化

给药时间 (min)	Lucidin (μg · mL <sup>-1</sup> )	大叶茜草素 (μg · mL <sup>-1</sup> )
0	0	0
5	0.571 2	0.209 8
15	0.666	0.322 3
30	0.621 4	0.833 2
45	0.407 6	0.711 2
60	0.156	0.395 1
120	0.059 3	0.133 5

## 4 讨论

通过对茜草 70% 乙醇提取物的全成分分析初步检测,发现其中 Lucidin 及其苷 EKU-4 的含量基本相同;经口服灌胃给药后,血浆中没有检测到 EUK-4,而 Lucidin 含量有增长的趋势,表明 EUK-4 可能分解为 Lucidin 的形式参与动物体内代谢。

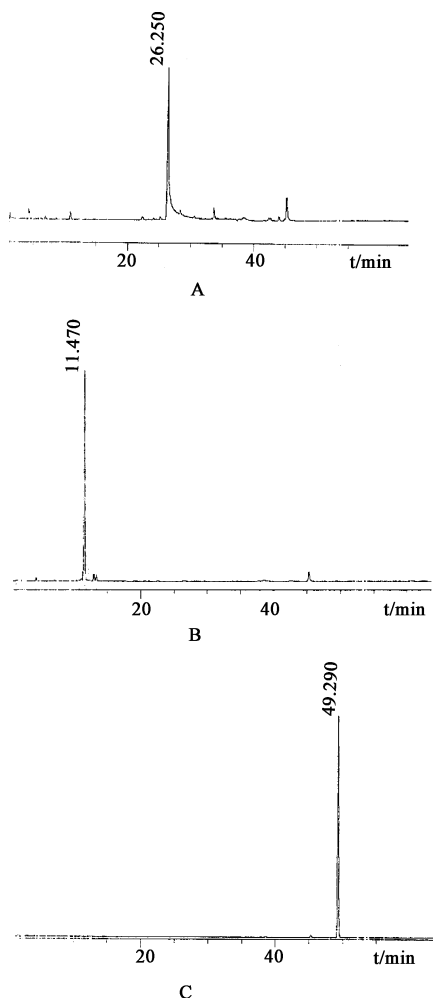


图 1 标准品梯度洗脱条件色谱图  
A. Lucidin; B. Eku-4; C. 大叶茜草素

茜草在中医中药中应用十分广泛,卫生部 2002 年公布的《关于进一步规范保健食品原料管理的通知》中,将茜草列为可用于保健食品的物品之一(共 114 味)。经过我们对国内已上市药品、保健品以及已申请专利的统计:自 1985 年以来,处方中含有茜草的专利共有 348 项,其中外用 44 项;此外还有含有茜草的香烟、药枕等 7 项。目前市场上流通的处方中含有茜草的药品及院中使用的医院制剂多达上百种。各地区中医院中医大夫开出的处方中含有茜草的更是不计其数。

据有关文献报道,蒽醌类色素 Lucidin 是具有遗传毒性的一种化合物,它具有较强的致基因突变、细胞转化<sup>[3]</sup>及 DNA 结合作用<sup>[4]</sup>,该化合物存在于西茜草(又名欧茜草 *Rubia tinctorum*)中。2002 年,国际癌研究机构(IARC)报告欧茜草中的 lucidin 及 lucidin-3-O-primeveroside 具有致癌性。之后,日本对其

进行安全评价确认此二种成分具有遗传毒性和致癌性(肾癌)<sup>[5~6]</sup>;2004 年,日本汉方制剂协会和日本汉方生药制剂协会特制定“关于含有茜草根的生药制剂中 lucidin 及 lucidin-3-O-primeveroside 的行业标准”——禁止含有茜草的生药制剂中检出上述 2 种成分。因此美国 FDA 已明确将其列为禁用药物。

国内现有对中药茜草(*R. cordifolia*)的研究报道中尚未发现含有此遗传毒性成分<sup>[7~8]</sup>,但是我们通过对不同产地的茜草药材进行了 LC-MS 等色谱分析,发现茜草药材中均含有 Lucidin 苷,部分茜草中还含有 Lucidin。本试验仅对 Lucidin 及其苷在动物体内的代谢进行了初步试验研究,对中药茜草的用药安全性提出了质疑。但是茜草作为常用中药,长期以来广泛运用于中医处方中,并未发现上述不良反应,由于中医中药成分复杂,各种成分之间相互作用相互制约,因此中国产茜草的用药安全性是否真的存在隐患,还有待考量。

### [参考文献]

- [1] 肖培根. 新编中药志[M]. 北京:化学工业出版社, 2002:629.
- [2] 谭朝阳,尤昭玲. 茜草提取工艺的研究[J]. 中草药, 2004,35(4):399.
- [3] Johannes Westendorf, Hildegard Marquardt, Barbara Poginsky, et al. Genotoxicity of naturally occurring hydroxyanthraquinones [J]. Mutation Research, 1990, 240:1.
- [4] Barbara Pogindky, Johannes Westendorf, loemeke Bruhilde, et al. Evaluation DNA-binding Activity of Hydroxyanthraquinones Occuring in *Rubia tinctorum* L [J]. CA, 1991, 115(9):84974Z.
- [5] Frantisek M, Ivana K, Alexandr J. Mutagenicity of Natural Anthraquinones from *Rubia tinctorum* in the *Drosophila* Wing Spot Test [J]. Planta Med, 2001, 67:127.
- [6] Blomeke B, Poginsky B, Schmutte C, et al. Formation of genotoxic metabolites from anthraquinone glycosides, present in *Rubia tinctorum* L [J]. Mutat Res, 1992, 265(2):263.
- [7] 王钢力,田金改,陈德昌. 茜草与欧茜草的化学成分研究 II. 反相高效液相色谱法测定茜草素和芦西定的含量 [J]. 药物分析杂志, 1997, 17(4):219.
- [8] 储秋萍,胡浩彬. 茜草与欧茜草薄层色谱法鉴别 [J]. 中草药, 2000, 31(5):352.