

# HPLC 法测定蒙药巴日嘎-13 散中大叶茜草素的含量

高丽梅<sup>1</sup>, 郑健<sup>2</sup> (1. 赤峰市药品检验所, 赤峰 024000; 2. 中国食品药品检定研究院, 北京 100050)

**摘要** 目的: 建立高效液相色谱法测定巴日嘎-13 散中茜草有效成分大叶茜草素的含量。方法: Dikma Dimonsil C18 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-水-四氢呋喃 (527 : 90 : 3), 检测波长为 391nm, 流速为 1 mL·min<sup>-1</sup>。结果: 大叶茜草素在 5.5~55 μg·mL<sup>-1</sup> 范围内呈良好的线性关系 ( $r=0.9999$ ), 平均加样回收率为 102.24 %, RSD 为 1.48 %。结论: 本方法简便可靠、分离度较好、结果稳定, 可用于巴日嘎-13 散的质量检测。

**关键词:** 蒙药; 高效液相色谱法; 巴日嘎-13 散; 大叶茜草素

中图分类号: R927 文献标识码: A 文章编号: 1002-7777(2017)02-0178-04

doi:10.16153/j.1002-7777.2017.02.012

## Determination of Mollugin in Mongolian Medicine Bariga-13 Powder by HPLC

Gao Limei<sup>1</sup>, Zheng Jian<sup>2</sup> (1. Chifeng City Institution for Drug Control, Chifeng 240000, China; 2. National Institutes of Food and Drug Control, Beijing 100050, China)

**Abstract Objective:** To develop a method for determination of mollugin in a prepared Mongolia traditional medicine Bariga-13. **Methods:** HPLC method was built by using Dikma Dimonsil Diamonsil C18 (250 mm×4.6 mm, 5μm) as column and methanol-water-tetrahydrofuran (527 : 90 : 3) as mobile phase. The detection wavelength was set at 391 nm. **Results:** The calibration curve of Mollugin was linear ( $r=0.9999$ ) in the range of 5.5-55 μg·mL<sup>-1</sup>. The average recovery was 102.24%; RSD was 1.48%. **Conclusion:** The method is simple, reproducible and reliable to produce good separation results. It can be applied to the quality test of Bariga-13.

**Keywords:** Mongolian medicine; HPLC; Bariga-13; mollugin

巴日嘎-13散由凤眼草、芒果日-吉木斯(芒果核)、哈黑日各-乌热(海南蒲桃)、卓楞-乌热(大托叶云实)、查干-苏格木勒(豆蔻)、薄仁-芍沙(刀豆)、玛日那(茜草<sup>[1]</sup>)、阿如拉(诃子)、额勒吉根(枇杷叶)、乌日格斯图-阿日查(刺柏叶)、巴嘎-阿拉坦其其格(波棱瓜子)<sup>[2]</sup>等13味药组成, 具有清肾热、消肿的功能, 用于肾损伤性热、血尿、睾丸肿痛等病证的治疗。大托叶云实暖胃、温肾; 芒果核及海南蒲桃具有补肾、祛“巴干达”寒的功能; 刀豆益肾、清肾热;

茜草具有清血热、止泻、止血功能, 用于血热、吐血、衄血、崩漏、子宫出血、侵入性肾及肺热、麻疹、肠刺痛和肠热腹泻。茜草在方中起到主要功效作用, 茜草中含有的抗癌成分<sup>[3]</sup>: β-谷甾醇、二氢大叶茜草素、大叶茜草素、2-甲氧酰基-2,3-环氧基-3-异戊烯基-1,4-萘醌、大黄素甲醚、齐墩果酸等, 其中大叶茜草素为茜草的主要有效成分, 本研究参照文献<sup>[4-16]</sup>以大叶茜草素作为对照品, 建立了巴日嘎-13散蒙成药中大叶茜草素的含量测定方法。通过方法学考察及阴性对照试验, 表明该方法

操作简单、重复性好、专属性强，方中其它组分对大叶茜草素的测定无干扰。

## 1 仪器与试药

### 1.1 仪器

Dikma Dimonsil C18色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm) CBM-20A系统控制器, LC-20AT溶剂输送泵, SIL-20AC自动进样器, SPD-20AV紫外检测器, CTO-20A柱温箱, LCsolution色谱工作站。普析通用TU-1901型紫外-可见分光光度仪。HR-200型万分之一天平。Presia型十万分之一天平。

### 1.2 试剂与试药

大叶茜草素对照品(C<sub>17</sub>H<sub>15</sub>O<sub>4</sub>) (中国食品药品检定研究院提供, 批号: 110884-200604, 供含量测定用); 甲醇为色谱纯; 四氢呋喃为色谱纯; 水为超纯水; 其他试剂均为分析纯。巴日嘎-13散(锡盟蒙医研究所提供, 批号: 070123、080225、090427)。

## 2 方法和结果

### 2.1 色谱条件

色谱柱: Dikma Dimonsil C18色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm)。流动相: 甲醇-四氢呋喃-水(527:90:3), 流速: 1.0 mL · min<sup>-1</sup>, 柱温: 室温, 检测波长: 391 nm, 进样量: 20 μL。理论

板数按大叶茜草素峰计算应不低于5000。分离度为2.58。

### 2.2 对照品溶液的制备

取大叶茜草素对照品适量, 精密称定, 加甲醇制成浓度为20 μg · mL<sup>-1</sup>的溶液。

### 2.3 供试品溶液的制备

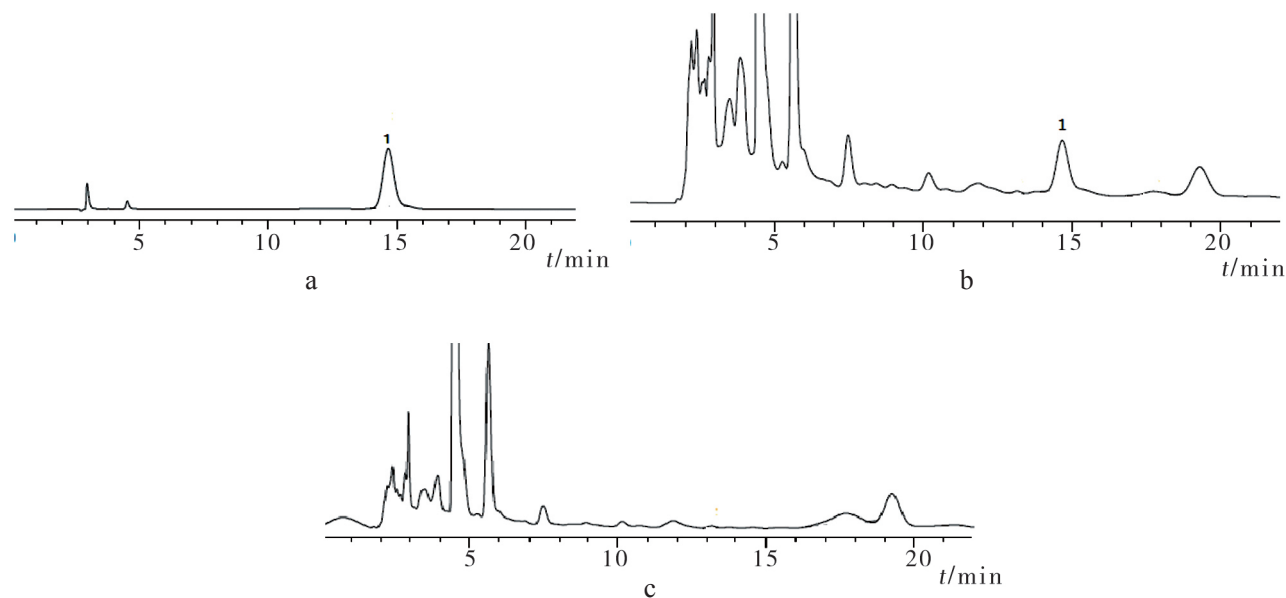
取本品1.5 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇25 mL, 称定重量, 浸泡过夜, 超声处理(功率: 250 W, 频率: 33 kHz) 30 min, 放冷, 再称定重量, 用甲醇补足减失的重量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 用微孔滤膜(0.45 μm)滤过, 即得(注意避光操作<sup>[5]</sup>)。

### 2.4 阴性供试品溶液的制备

按巴日嘎-13散处方比例配制缺茜草的样品作为阴性供试品, 取1.5 g, 精密称定, 按“2.3”节下供试品溶液的制备方法制成阴性供试品溶液。

### 2.5 专属性试验

分别精密吸取对照品、供试品、阴性供试品溶液20 μL进样, 按上述色谱条件测定, 结果阴性供试品的色谱图中, 未出现与对照品(大叶茜草素)色谱峰保留时间相同的色谱峰, 表明方中其他组分对大叶茜草素的测定无干扰, 该方法专属性强。见图1。



a. 对照品; b. 供试品; c. 阴性对照; 1. 大叶茜草素峰。

图1 HPLC 色谱图

## 2.6 线性关系考察

精密称取大叶茜草素对照品 11.00 mg, 置 100 mL 棕色量瓶中, 加甲醇使溶解并稀释至刻度, 摇匀, 精密吸取 0.5、1.0、1.5、2.0、3.0、4.0、5.0 mL, 分别置 10 mL 棕色量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 各取 20  $\mu$ L 进样, 按上述色谱条件测定, 峰面积为纵坐标, 对照品的进样量为横坐标绘制标准曲线。回归方程:

$$Y=1.345781 \times 10^6 x + 1.0021 \times 10^4 \quad r=0.9999$$

结果表明, 大叶茜草素在 5.5~55  $\mu$ g  $\cdot$  mL<sup>-1</sup> 范围内呈良好的线性关系。

## 2.7 精密度试验

精密吸取同一大叶茜草素对照品溶液 20  $\mu$ L, 连续进样 6 次, 测定峰面积积分值, 计算峰面积平均值为 594777, RSD 为 0.32%。

## 2.8 稳定性试验

取同一供试品溶液, 精密吸取 20  $\mu$ L, 分别于配置后 0、2、4、8、12 h 测定大叶茜草素峰面积, 计算峰面积平均值为 580460, RSD 为 0.27%。

## 2.9 重复性试验

精密称取样品 (批号: 090427) 6 份, 同法制成供试品溶液并测定。结果大叶茜草素平均含量为 0.3753 mg  $\cdot$  g<sup>-1</sup>, RSD 为 1.28%。

## 2.10 回收率试验

精密称取已知含量的同一批号 (批号: 090427, 含量: 0.3753 mg  $\cdot$  g<sup>-1</sup>) 的样品 0.77 g, 分别精密加入大叶茜草素对照品溶液一定量, 按供试品溶液的制备方法制备及上述色谱条件测定, 计算回收率为 102.24%, RSD 为 1.48%。结果见表 1。

表 1 回收率测定结果

序号	样品称样量 /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	0.7789	0.2923	0.1375	0.4298	99.98		
2	0.7725	0.2899	0.1375	0.4277	100.19		
3	0.7738	0.2904	0.1375	0.4291	100.84		
4	0.7816	0.2933	0.2750	0.5751	102.45		
5	0.7834	0.2940	0.2750	0.5768	102.82	102.24	1.48
6	0.7819	0.2934	0.2750	0.5777	103.35		
7	0.7836	0.2941	0.4125	0.7220	103.74		
8	0.7835	0.2940	0.4125	0.7187	102.94		
9	0.7896	0.2963	0.4125	0.7250	103.92		

## 2.11 含量测定

取大叶茜草素对照品溶液与供试品溶液各

20  $\mu$ L 进样测定, 采用外标法计算, 测定结果见表 2。

表 2 样品测定结果

批号	大叶茜草素 / (mg $\cdot$ g <sup>-1</sup> )	RSD /%
070123	0.3614	1.37
090424	0.3753	1.28
080225	0.3235	1.15

### 3 讨论

#### 3.1 提取溶剂的选择

大叶茜草素易溶于三氯甲烷、苯、乙酸乙酯,能溶于乙醚、甲醇、丙酮,稍溶于乙醇,不溶于水<sup>[17]</sup>。由于三氯甲烷、苯、乙酸乙酯溶解的非极性的杂质较多,且三氯甲烷、苯的毒性较大,结合文献<sup>[1,4-5]</sup>选择用甲醇浸泡过夜超声提取。

#### 3.2 测定波长的选择

实验中曾参照文献<sup>[1,4]</sup>选用250 nm作为检测波长进行高效液相色谱法含量测定的条件探测,但因阴性干扰大,样品分离效果差,保留时间长,故未采用250 nm作为检测波长,而采用另一个最大吸收波长391 nm作为检测波长,结果阴性无干扰,样品分离效果好,保留时间适宜,故选择391 nm作为检测波长。

#### 3.3 浸泡时间的选择

分别考察了浸泡60、90、120 min以及浸泡过夜,在不同浸泡时间对提取效率的影响,结果表明浸泡过夜再用同样超声条件可以提取完全。

#### 3.4 定量成分的选择

因芒果核、海南蒲桃、大托叶云实、诃子、波棱瓜子等多种药味均含有没食子酸,专属性差,故未选择没食子酸作为指标成分进行含量测定的研究;又因枇杷叶、刺柏叶等药味均含有槲皮素,专属性差,故未选择槲皮素作为指标成分进行含量测定的研究。

#### 参考文献:

- [1] 中国药典:一部[S]. 2010: 218-219.
- [2] 内蒙古自治区卫生厅编著. 内蒙古蒙药材标准[M]. 内蒙:内蒙古科学技术出版社出版, 1986: 353, 356, 402, 432, 437, 444, 450, 469.
- [3] 姜哲, 韩东哲. 茜草化学成分和抗癌活性研究[J]. 中国医院药学杂志, 2012, 32(14): 1126-1128.
- [4] 唐宇伟, 孙彬贤, 黄德杰. 参茜固经颗粒中大叶茜草素含量测定[J]. 中成药, 2005, 27(1): 28-31.
- [5] 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]. 华西药学杂志, 2010, 25(3): 318-320.
- [6] 薛丽, 杨波, 索菲亚, 等. HPLC法测定茜草素、大叶茜草素、羟基茜草素的含量[C]//第九届全国中药和天然药物学术研讨会大会报告及论文集. 南昌, 2007: 342-348.
- [7] 索菲娅, 王弘, 陈世忠. 不同采收期茜草中大叶茜草素含量的动态研究[J]. 中成药, 2006, 28(10): 1499-1501.
- [8] 彭亮, 杨冰月, 王志华, 等. 陕西产茜草大叶茜草素的最佳提取工艺研究[J]. 现代中医药 2010, 30(2): 63-64.
- [9] 乔亚芳, 王素贤, 吴立军, 等. 茜草中抗菌活性成分的研究[J]. 药学学报, 1990, 25(11): 834-839.
- [10] 张林, 彭亮, 胡本祥. 茜草的化学成分研究进展[J]. 现代中医药, 2008, 28(2): 52-54.
- [11] 方晓艳, 孙艳红, 杨林莎. 茜草的研究进展[J]. 河南中医学刊, 2002, 17(5): 78-80.
- [12] 杨宇婷, 康文艺. HPLC法测定茜草及不同炮制品中大叶茜草素[J]. 中成药, 2011, 33(12): 2125-2127.
- [13] 林文华, 朱喜梅, 严萍. 茜草中大叶茜草素、羟基茜草素含量测定方法优化的实验研究[J]. 中药新药与临床药理, 2014, 25(3): 345-348.
- [14] 杨连荣, 周庆华, 张哲锋. 茜草的生物学及化学成分与生物活性研究进展[J]. 中草药, 2013, 44(14): 2009-2014.
- [15] 王晓建, 黄胜阳. 茜草属植物化学成分及其药理作用研究进展[J]. 中国中医药信息杂志, 2012, 19(2): 109-112.
- [16] 郭桂明, 蔡乐, 梁晓雨等. HPLC法测定茜草饮片中 大叶茜草素和羟基茜草素的含量[J]. 北京中医药, 2011, 37(10): 541-543.
- [17] 孙文基, 谢世昌. 天然药物成分定量分析[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2002: 391.

(收稿日期 2015年3月29日 编辑 范玉明)