

RP-HPLC 测定红丝线提取物中紫蓝素的含量

蒋小华, 谢运昌*, 黄永林

(广西壮族自治区广西植物研究所, 广西桂林 541006)
中国科学院

摘要: 建立了红丝线提取物中紫蓝素的测定方法。采用反相高效液相色谱法, 色谱柱为 ZORBAX XDB-C18(4.6 mm×150 mm, 5 μm); 流动相: V(乙腈): V[75 mmol/L 乙酸铵+0.5 mmol/L EGTA(pH7.0)]=8:92; 流速: 1 mL/min; 检测波长 590 nm。紫蓝素的线性范围为 2.5~50 mg/L($r=0.9999$), 回收率 97.9%~101.5%。该法简便、准确, 重复性好, 适用于测定红丝线提取物中紫蓝素的含量。

关键词: 高效液相色谱法; 紫蓝素; 红丝线提取物

中图分类号: Q946 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2007)06-0958-03

Analysis of zilanine in extract of *Peristrophe baphica* by RP-HPLC

JIANG Xiao-Hua, XIE Yun-Chang*, HUANG Yong-Lin

(Guangxi Institute of Botany, Guangxi Zhuangzu Autonomous Region and the Chinese Academy of Sciences, Guilin 541006, China)

Abstract: The paper established a RP-HPLC method for the determination of the content of zilanine in extract of *Peristrophe baphica*. RP-HPLC was conducted on a ZORBAX XDB-C18(4.6 mm×150 mm, 5 μm) with CH₃CN-[CH₃COONH₄(75 mmol/L) + EGTA(0.5 mmol/L, pH=7.0)]=8:92; flow rate 1.0 mL/min, the detection wavelength was set at 590 nm. The linear range of zilanine was 2.5~50 mg/L($r=0.9999$). The recoveries were 97.9%~101.5%. The method is simple and accurate with good reproducibility, it is suitable for the determination of zilanine content in extract of *P. baphica*.

Key words: HPLC; zilanine; extract of *Peristrophe baphica*

红丝线(*Peristrophe baphica*)又名红兰草、野靛青、紫蓝,为爵床科观音草属植物(中国科学院中国植物志编辑委员会,2002),草本,民间用于治疗糖尿病、高血压等症,食品上已用于制作五色米饭,工业生产红兰酒。据报道,红丝线提取物有降血压,降血脂,保护心、肾功能的作用(吕俊华等,2004)。文永新等(2003)对红丝线的加工方法进行了研究。本课题组从红丝线中分离得紫蓝素,并于2003年申请了“紫蓝素化合物、其制备方法及其用途”的专利,于2005年获得国家专利权(谢运昌等,2005)。紫蓝素有较强的抗乙型肝炎病毒、很强的抗氧化、抑制蛋白

酪氨酸酯酶、抗糖尿病作用。为将红丝线提取物开发为新药,本文建立了高效液相色谱法测定红丝线提取物中紫蓝素含量的方法。该方法操作简便、快速、准确,适用于红丝线提取物的质量控制。

1 仪器与材料

Agilent-1100 分析型高效液相色谱仪(配备二极管阵列检测器、四元梯度泵、在线真空脱气机、7725i 手动进样器、HP 化学工作站,Agilent 公司);超纯水仪(Millipore 公司)。超声仪。

收稿日期: 2006-05-12 修回日期: 2007-01-25

基金项目: 国家自然科学基金(30360117); 广西自然科学基金(0342002-2); 国家科技攻关计划“西部开发”重大项目(2005BA901A10); 广西科技计划项目(05112001-3A3)[Supported by the National Natural Science Foundation of China(30360117); Natural Science Foundation of Guangxi(0342002-2); National Key Technologies Research and Development Program of China(2005BA901A10); the Project of Science and Technology of Guangxi(05112001-3A3)]

作者简介: 蒋小华(1977-),女,广西临桂人,研究实习员,从事天然药物研究。

*通讯作者(Author for correspondence, E-mail: yuc018@163.com)

乙腈为色谱纯(美国),水为超纯水(自制),其它试剂均为分析纯。

红丝线(*P. baphica*)栽培于广西植物研究所,经韦发南研究员鉴定。红丝线提取物用新鲜的红丝线样品,采用热水提取、反复上大孔树脂柱、加酸沉淀、溶剂洗涤、干燥的方法制备(谢运昌等,2005)。紫蓝素对照品为本实验室从红丝线中分离得到并经光谱数据分析和理化性质测定鉴定结构。

2 实验方法

2.1 色谱条件

色谱柱:ZORBAX XDB-C18 柱(4.6 mm×150 mm,5 μm);柱温:32 ℃;流动相:V(乙腈):V[75 mmol/L 乙酸铵+0.5 mmol/L EGTA(pH7.0)]=8:92;流速:1 mL/min;三维光谱扫描确定检测波长 590 nm;进样量:20 μL。定量方法:外标法。在上述条件下对红丝线提取物中紫蓝素进行色谱分析,紫蓝素色谱峰与其它组分达到了良好分离(Snyder 等,1997)。

2.2 供试品的制备

精密称取经磨细成粉末状的红丝线提取物样品 50.0 mg,以 0.01 mol/L 碳酸氢铵水溶液超声溶解,过滤,滤液置于 500 mL 容量瓶中,用水稀释至刻度再精密量取 10.0 mL,置 100 mL 容量瓶中,加水稀释至刻度,取样过微孔滤膜。

2.3 线性关系考察

精密称取经磨细成粉末状的紫蓝素对照品 50.0 mg,置于 500 mL 容量瓶中,用 0.01 mol/L 碳酸氢铵水溶液超声溶解并用水稀释至刻度。此溶液 A 质量浓度为 100 mg/L 溶液。以此溶液作为母液,配制浓度为 50,40,30,20,10,5,2.5 mg/L 对照品溶液。微孔滤膜过滤,取滤液按上述色谱条件进行测定。以峰面积 Y 对进样质量浓度 X(mg/L)绘制标准曲线。计算得回归方程为:Y=165.46X+4.838,相关系数:r=0.999 9,结果表明:紫蓝素在 2.5~50 mg/L 范围内具有良好的线性关系。

2.4 精密度试验

精密称取红丝线提取物 50.0 mg 于 500 mL 容量瓶中,用 0.01 mol/L 碳酸氢铵水溶液超声溶解,并用水稀释至刻度。精密量取此溶液 10.0 mL 于 100 mL 容量瓶中,加水稀释至刻度,取样过微孔滤膜。按上述色谱条件进行测定。连续进样 6 次,测

定峰面积积分值,代入回归方程,计算紫蓝素含量,考察仪器精密度。结果表明仪器精密度良好。其 RSD 为:2.5%(n=6)。

2.5 重复性试验

精密称取 5 份红丝线提取物 50.0 mg,按“2.2”项方法制备后,在上述色谱条件下进行分析,计算紫蓝素含量,考察方法重复性,结果表明方法重复性良好,其 RSD 值为:1.6%(n=5)。

2.6 加样回收实验

在已知紫蓝素含量的红丝线提取物溶液中定量加入标准品溶液,按前述供试品处理方法制备样品溶液,测定 5 份,测定结果见表 1。

表 1 回收率的测定

Table 1 Recovery of the HPLC determination (n=3)

编号 No.	样品浓度 Concentration (mg/L)	加入量 Added (mg/L)	实测量 Found (mg/L)	回收率 Recovery (%)	平均值 Average (%)	RSD (%)
1	4.74	5.26	9.91	98.3		
2	4.81	5.26	9.96	97.9		
3	4.88	5.26	10.22	101.5	99.1	1.5
4	4.74	5.26	9.97	99.4		
5	4.61	5.26	9.78	98.3		

2.7 稳定性试验

精密吸取紫蓝素对照品溶液,每隔 2 h 进样测定,进样量 20 μL,结果表明对照品溶液在 24 h 内稳定。RSD 为 1.8%。

2.8 最低检测限及最低定量限

在选定色谱条件下,取上述对照品贮备液,逐步稀释,进样,直至信噪比 S/N≥3 时,此时进样量即为最低检测限,S/N=10 时即为最低定量限。紫蓝素最低检测限为 0.01 mg/L,最低定量限为 0.05 mg/L。

3 结果

取 8 批红丝线提取物供试品按上述色谱条件进行分析,记录色谱图(图 1),计算紫蓝素的含量。含量测定结果见表 2。

4 讨论

4.1 流动相的选择

在实验过程中曾先后选用了水-甲醇、(乙酸铵+EDTA)-甲醇、(乙酸铵+EGTA)-甲醇、水-乙腈、乙酸水-乙腈、(乙酸铵+EDTA)-乙腈等溶

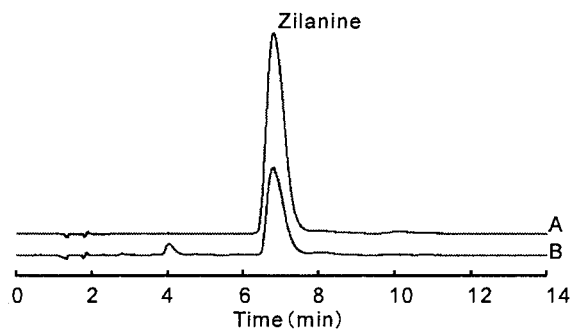


图1 红丝线提取物中紫蓝素的 HPLC 分析
Fig. 1 HPLC analysis of zilanine in extract of *Peristrophe baphica*

A. 紫蓝素; B. 红丝线提取物。
A. Zilanine; B. Extract of *P. baphica*.

表2 红丝线提取物中紫蓝素的含量测定结果
Table 2 Content of zilanine in extract of *Peristrophe baphica* (n=3)

批号 No.	紫蓝素含量 Content of zilanine (%)	RSD (%)
050601	86.8	0.42
050602	89.6	0.23
050701	97.9	0.78
050702	93.4	0.33
050801	93.6	0.56
050802	99.4	0.98
050901	88.5	0.67
050902	96.6	0.29

剂系统作为流动相对样品进行分析,结果最佳的流动相为(75 mmol/L 乙酸铵+0.5 mmol/L EGTA)一乙腈(92:8),样品峰与杂质峰分离度好,专属性强,保留时间合适,峰形尖锐,对称性好。

4.2 检测波长的选择

本试验用二极管阵列检测器对紫蓝素色谱峰在200~600 nm 范围内进行光谱扫描,在波长250 nm 及590 nm 处有最大吸收,但波长590 nm 处响应值比波长250 nm 处的响应值大,在590 nm 处杂质峰少,故选择590 nm 作为检测波长。

参考文献:

- 中国科学院中国植物志编辑委员会. 2002. 中国植物志(第70卷)[M]. 北京:科学出版社:241
- 谢运昌,蒋小华,文永新,等. 2005. 紫蓝素化合物、其制备方法及其用途[P]. 中国专利 CN03117188.5,北京:知识产权出版社
- Lü JH(吕俊华), Yu CR(玉从容), Yang WZ(杨文忠), et al. 2004. Influence of extract of *Peristrophe roxburghiana* on blood pressure and blood rheology in renal hypertensive rats (RHR)(红丝线草提取物对肾性高血压大鼠血压和血液流变学的影响)[J]. *Shanxi Med J*(陕西医学杂志), 33(345): 209-212
- Snyder LR, Kirkland JJ, Glajch JL. 1997. Practical HPLC Method Development[M]. 2nd Ed. New York: John Wiley & Sons, Inc
- Wen YX(文永新), Xie YC(谢运昌), Jiang XH(蒋小华), et al. 2003. The comparison of four methods for processing *Peristrophe baphica*(四种山蓝加工方法的比较)[J]. *Guizhou J. Bot.*(广西植物), 23(5): 453-456

(上接第943页 Continue from page 943)

无毒的。(2)肝损伤实验研究结果表明,黄根醇提物对实验性小鼠肝损伤有显著的保护作用。在各肝损伤实验中有低剂量组较好的趋势,分析其原有二:①黄根含有一定量的蒽醌类化合物,而蒽醌类化合物有致泻的作用,在实验中高剂量组含有的蒽醌类化合物要高于低剂量组,因此致泻的作用也就要强于低剂量组,结果导致高剂量组药物吸收减少。而低剂量组因含有较少的蒽醌类化合物,致泻的作用就明显减轻,反而低剂量组吸收程度要比高剂量组好,因此出现了高剂量组药效低于低剂量组的情况。②同时在以前的一些实验中也曾经报道过黄根具有轻

微的毒性,这对药效也有一定的影响(甘荔等,1986)。

参考文献:

- 广西壮族自治区卫生局. 1974. 广西本草选编[M]. 南宁:广西人民出版社:1790-1791
- 合山矿务局疗养院. 1977. 黄根合剂治疗矽肺57例疗效观察[J]. *广西医学*, 8(4): 27
- 徐淑云,卞如廉,陈修,等. 2002. 药理实验方法学[M]. 第3版. 人民卫生出版社:1346-1347
- 甘荔,韦玉忠,刘敬东,等. 1986. 黄根抑制肝纤维化的病理形态学观察[J]. *中草药*, 17(11): 24