

基础研究

DOI: 10.11699/cyxb20130727

高效液相色谱法测定虎杖提取物中白藜芦醇的含量

吴 青¹, 罗先钦², 胡 荣³

(1. 重庆医科大学附属儿童医院药剂科, 重庆 400014; 2. 重庆市中药研究院药理毒理研究所, 重庆 400065;

3. 重庆市中药研究院制剂所, 重庆 400013)

【摘要】目的:建立虎杖提取物中白藜芦醇的含量测定方法。**方法:**采用高效液相色谱法测定虎杖提取物中白藜芦醇的含量。色谱条件:流动相:乙腈-水(30:70);流速:1.0 ml/min;检测波长:306 nm;柱温:室温;进样量:10 μ l。**结果:**白藜芦醇进样量在 0.3~9.6 μ g/ml 范围内,线性关系良好。**结论:**本法简便实用、灵敏度高、重现性好,可用于虎杖提取物中白藜芦醇的含量测定。

【关键词】虎杖提取物;白藜芦醇;高效液相色谱法

【中国图书分类法分类号】R943

【文献标志码】A

【收稿日期】2013-03-13

Determination of erbascoside and resveratrol in root of polygonum cuspidatum by high performance liquid chromatography

WU Qing¹, LUO Xianqin², HU Rong³

(1. Department of Pharmacy, the Children's Hospital, Chongqing Medical University;

2. Institute of Pharmacology and Toxicology, Chongqing Academy of Chinese Materia Medica;

3. Institute of Formulation, Chongqing Academy of Chinese Materia Medica)

【Abstract】Objective: To establish reserved-phase high performance liquid chromatography (HPLC) method for the determination of resveratrol content in root of polygonum cuspidatum. **Methods:** HPLC was carried out to detect resveratrol content in root of polygonum

作者介绍: 吴 青, Email: wuqing1133@126.com,

研究方向: 药物靶向制剂及其研究。

进行,抗癌药物用药时间在口腔鳞状细胞癌细胞增殖水平最高(恶性程度相对较高)的休息相中期可能会获得更好的疗效,而手术时间在口腔鳞状细胞癌细胞增殖水平最低(恶性程度相对较低)和体积最小的活动相中期和晚期进行可能有利于降低肿瘤复发和减小手术创伤。同时,该研究也为进一步对口腔鳞状细胞癌细胞体内生长的昼夜节律改变的分子机理研究提供了正确的方向和基础。昼夜节律和肿瘤生长之间的关系和机理研究的深入,不仅能对恶性肿瘤的发生、发展带来新的认识,而且对设计新的分子治疗靶标、放疗和化疗、疗效的评价以及肿瘤手术边界的确定等诊治手段也将加入时间维度,从而催生肿瘤防治的新模式。

参 考 文 献

[1] Eismann E A, Lush E, Sephton S E. Circadian effects in cancer-relevant psychoneuroendocrine and immune pathways[J]. Psychoneuroendocrinology, 2010, 35(7): 963-976.

[2] Huang X L, Fu C J, Bu R F. Role of circadian clocks in the development and therapeutics of cancer[J]. J Int Med Res, 2011, 39(6): 2061-2066.

[3] Jasser S A, Blask D E, Brainard G C. Light during darkness and cancer: relationships in circadian photoreception and tumor biology[J]. Cancer Causes Control, 2006, 17(4): 515-523.

[4] Fu L, Lee C C. The circadian clock: pacemaker and tumor suppressor[J]. Nat Rev Cancer, 2003, 3(5): 350-361.

[5] Filipinski E, Lévi F. Circadian disruption in experimental cancer processes[J]. Integr Cancer Ther, 2009, 8(4): 298-302.

[6] 童 建. 余弦分析法在生物节律研究中的应用[J]. 中国卫生统计, 1991, 8(1): 23-25.

Tong J. Application of cosinor method to study of biological rhythms[J]. Chinese Journal of Health Statistics, 1991, 8(1): 23-25.

[7] Innominato P F, Lévi F A, Bjarnason G A. Chronotherapy and the molecular clock: clinical implications in oncology[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2010, 62(9-10): 979-1001.

[8] Lévi F, Okyar A, Dulong S, et al. Circadian timing in cancer treatments[J]. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2010, 50: 377-421.

[9] Lévi F. Chronotherapeutics: the relevance of timing in cancer therapy[J]. Cancer Causes Control, 2006, 17(4): 611-621.

(责任编辑: 唐秋姗)

cuspidatum. Chromatographic conditions: mobile phase consisting of acetonitrile–water (30:70) at flow rate of 1.0 ml/min; detection wave length of 306 nm; column temperature at room temperature; sample size of 10 μ l. **Results:** Calibration curves were linear within the range of 0.3~9.6 μ g/ml. **Conclusions:** The method is simple, accurate, reproducible, precise and can be used in the determination of resveratrol content in polygonum cuspidatum extract.

【Key words】polygonum cuspidatum extract; resveratrol; high performance liquid chromatography

虎杖为蓼科属多年生草本植物的根或根茎,广泛分布于华东、中南、辽陕甘川滇等地。虎杖性味微寒微苦,归肝、胆、肺经,具有活血定痛、清热利湿、止咳化痰作用^[1]。其根茎中所含的白藜芦醇属于非黄酮类的多酚化合物,是植物为了抵御病菌入侵而产生的一种抗毒型物质。研究发现白藜芦醇具有抗癌、抗心脑血管疾病、抗突变、抗菌、抗炎^[2-5]等作用。因而白藜芦醇可广泛地应用于医药、保健品、食品、化妆品等领域。

本研究采用高效液相色谱法测定虎杖提取物中白藜芦醇的含量,并对方法的可行性进行了验证。结果表明含量测定方法简便、灵敏、准确,为客观评价虎杖提取物的质量提供参考依据。

1 对象与方法

1.1 研究对象

白藜芦醇对照品(中国药品生物制品检定所,批号 111535-200802);虎杖提取物(重庆科瑞南海制药有限责任公司,批号 10040)。

1.2 仪器与试剂

Agilent 1200SL RRLC(美国 Agilent 公司);78HW-1 恒温磁力搅拌器(江苏中大仪器厂);BUG25-12 超声波清洗机(220 W, 50 kHz, 必能信超声(上海)有限公司);AEG-45SM 电子天平(十万分之一,日本岛津公司);BP121S 电子天平(万分之一,北京塞多利斯科学仪器有限公司)。

甲醇为色谱纯,水为超纯水,其他试剂均为分析纯。

1.3 实验方法

1.3.1 色谱条件 色谱柱:Welchrom C18(4.6 $\times$ 250 mm, 5 μ m);流动相:乙腈-水(30:70);流速:1.0 ml/min;检测波长:306 nm;柱温:室温;进样量:10 μ l。

1.3.2 溶液的制备

1.3.2.1 对照品溶液的制备 称取白藜芦醇对照品置于容量瓶中,精密称定,加 70%甲醇溶液溶解定容至刻度。即得每 1 ml 含 0.03 mg 的白藜芦醇对照品溶液。

1.3.2.2 供试品溶液的制备 称取虎杖提取物粉末约 0.4 g,置于容量瓶中,精密称定,加 70%甲醇溶液,超声溶解,定容于 50 ml 容量瓶。摇匀,滤过,取续滤液,即得。

1.3.2.3 标准曲线的建立 精密称取白藜芦醇对照品 1.5 mg,

用 70%甲醇溶液溶解定容至 50 ml,作为储备液;分别精密吸取储备液 0.50、1.00、2.00、4.00、8.00、16.00 ml 置于 10 ml 量瓶中,用 70%甲醇溶液定容,摇匀。用 0.45 μ m 微孔滤膜过滤,分别吸取 10 μ l 注入液相色谱仪。以色谱峰面积 A 为纵坐标,白藜芦醇浓度 X 为横坐标绘制标准曲线。

1.3.2.4 精密度实验 配制质量浓度分别为 0.3、4.8、9.6 μ g/ml 白藜芦醇对照品溶液,在 1 d 内各测定 3 次;同时,于第 1、2、3 天每个浓度各测定 1 次。

1.3.2.5 稳定性实验 称取虎杖提取物样品约 0.4 g,精密称定,按 1.3.2.2 项的方法制备样品溶液,于 0、2、4、6、8、10、12 h 进样 1 次,进样量为 10 μ l。

1.3.2.6 重现性实验 分别称取虎杖提取物样品 5 份,每份各约 0.4 g,精密称定,按 1.3.2.2 项的方法制备样品溶液,各精密吸取 10 μ l 进样测定。

1.3.2.7 加样回收率实验 精密称取已知含量的虎杖提取物样品,共 9 份,精密加入白藜芦醇对照品 1.38 mg,按 1.3.2.2 项的方法制备样品溶液进样测定。

1.3.2.8 样品含量测定 按 1.3.2.2 项的方法,制备样品溶液,进样 10 μ l,测定 3 批虎杖提取物中白藜芦醇峰面积,按标准曲线法计算含量。

2 结果

2.1 系统适用性实验

分别取对照品溶液和供试品溶液适量,按上述色谱条件进样测定,对系统适用性参数进行考察,结果见图 1。

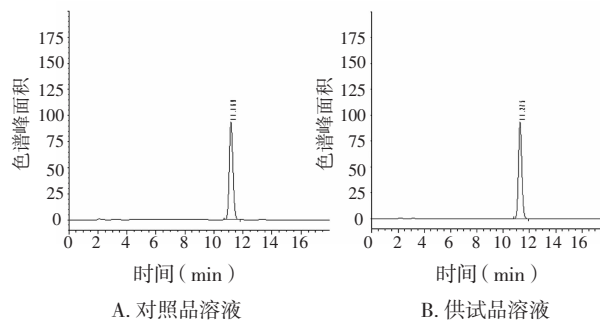


图 1 虎杖提取物色谱图

Fig.1 HPLC chromatogram of Polygonum cuspidatum

2.2 标准曲线的建立

以色谱峰面积 A 为纵坐标,白藜芦醇浓度 X 为横坐标绘制标准曲线,得到回归方程 $A=48.19 X+16.38$, $r=0.999 8$ 。结果表明,白藜芦醇在 0.3~9.6 μ g/ml 内呈良好的线性关系。

2.3 精密度实验

计算得日内相对标准偏差 (relative standard deviation, RSD) 分别为 0.59%、1.85%、1.74%; 于第 1、2、3 天测定, 计算得日间 RSD 分别为 1.63%、2.48%、1.04%。

2.4 稳定性实验

记录积分面积, 白藜芦醇峰面积的 RSD 为 2.34%。结果表明, 样品溶液在 12 h 内稳定。

2.5 重现性实验

计算出 RSD 为 2.48%。表明方法重现性良好。

2.6 加样回收率实验

测定峰面积 A, 结果见表 1。

表 1 白藜芦醇的加样回收率试验结果 (n=9)
Tab.1 Results of resveratrol recovery test (n=9)

样品 序号	样品含量 (mg)	加入量 (mg)	测得量 (mg)	回收率 (%)	$\bar{x}$ (%)	RSD (%)
1	0.988	1.38	2.339	97.90	98.33	1.94
2	1.028	1.38	2.359	96.45		
3	0.995	1.38	2.347	97.97		
4	1.003	1.38	2.417	102.46		
5	1.018	1.38	2.381	98.77		
6	0.993	1.38	2.372	99.93		
7	1.006	1.38	2.359	98.04		
8	1.021	1.38	2.362	97.17		
9	1.016	1.38	2.345	96.30		

2.7 样品含量测定

按标准曲线法计算含量, 结果见表 2。

表 2 样品含量测定结果 (n=3)
Tab.2 Results of sample content determination (n=3)

样品	白藜芦醇含量 (%)	平均 (%)
1	98.5	98.0
2	98.1	
3	97.5	

3 讨论

白藜芦醇和虎杖苷是蓼科植物虎杖中的有效成分之一, 均具有保护心血管和保肝等作用。虎杖苷在酶的作用下, 发生水解反应, 脱去一分子葡萄糖转化为白藜芦醇。白藜芦醇是虎杖苷的次生代谢产物。但《中国药典》2010 年版仅以大黄素和虎杖苷

作为虎杖含量测定的指标物, 而未涉及白藜芦醇。因此, 本法可用于虎杖及虎杖提取物中白藜芦醇的含量测定。

由于白藜芦醇是非黄酮类的多酚化合物^[6], 其化学性质不稳定, 对光、热稳定差^[7]。因此, 在测定其含量时, 应注意避光, 并使用棕色进样瓶储存样品

参 考 文 献

- [1] 邹盛勤. 反相高效液相色谱法测定虎杖根中白藜芦醇及其苷的含量[J]. 生命科学仪器, 2011, 9(6): 37-39.
- [2] Zou S Q. Determination of erbascoside and resveratrol in root of polygonum cuspidatum by RP-HPLC[J]. Life Science Instruments, 2011, 9(6): 37-39.
- [3] 熊小春, 安春妹. 白藜芦醇抗肿瘤的研究进展[J]. 黑龙江医药, 2010, 23(1): 59-61.
- [4] Xiong X C, An C M. Research progress of resveratrol on anti-tumor[J]. Heilongjiang Medicine, 2010, 23(1): 59-61.
- [5] 郭雪红. 白藜芦醇的制备及药理作用概述[J]. 天津药学, 2008, 20(3): 71-74.
- [6] Guo X H. The preparation of resveratrol and summary of pharmacological effects[J]. Tianjin Pharmacy, 2008, 20(3): 71-74.
- [7] Mertens-Talcott S U, Percival S S. Ellagic acid and quercetin interact synergistically with resveratrol in the induction of apoptosis and cause transient cell cycle arrest in human leukemia cells[J]. Cancer Lett, 2005, 218(2): 141-151.
- [8] 王新春, 侯世祥, 李文, 等. 白藜芦醇纳米脂质体体外释药和大鼠小肠吸收特性的研究[J]. 中国中药杂志, 2007, 32(11): 1084-1088.
- [9] Wang X H, Hou S X, Li W, et al. Study on drug release in vitro and rat intestinal absorption of resveratrol nanoliposomes[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2007, 32(11): 1084-1088.
- [10] 周福成, 周艳琴, 郭婷婷, 等. 白藜芦醇的研究进展[J]. 中国医药导报, 2009, 6(8): 11-13.
- [11] Zhou F C, Zhou Y Q, Guo T T, et al. Research progress of resveratrol[J]. Journal of Yichun University, 2009, 6(8): 11-13.
- [12] 赵海涛, 陈为涛, 李万忠. 白藜芦醇制备与制剂研究进展[J]. 亚太传统医药, 2009, 5(1): 113-115.
- [13] Zhao H T, Chen W T, Li W Z. Resveratrol preparation and preparation research progress[J]. Asia-Pacific Traditional Medicine, 2009, 5(1): 113-115.

(责任编辑: 冉明会)