

小红蒜总萘醌质量标准的研究

郭朋程, 陈婕妤, 刘思雨, 叶祥睿, 苏 靖, 邱明丰*
(上海交通大学药学院, 上海 200240)

摘要: 目的 建立小红蒜总萘醌的质量标准。方法 TLC、HPLC法分别定性鉴别、定量测定异红葱乙素、红葱乙素、红葱甲素, 2015年版《中国药典》方法检测干燥失重、水分、炽灼残渣、树脂残留物, 紫外分光光度法测定总萘醌含量。结果 TLC斑点清晰, 分离度良好。3批样品干燥失重、水分、炽灼残渣范围分别为2.34%~4.03%、2.06%~3.56%、0.15%~0.19%, 树脂残留物符合相关标准。总萘醌、异红葱乙素、红葱乙素、红葱甲素分别在1~10 μg/mL ($r=0.9994$)、0.005 00~0.200 mg/mL ($r=0.9997$)、0.014 4~0.576 mg/mL ($r=0.9999$)、0.004 96~0.198 mg/mL ($r=0.9999$)范围内线性关系良好, 平均加样回收率分别为100.06% (RSD=1.92%)、101.77% (RSD=1.30%)、103.24% (RSD=1.04%)、98.41% (RSD=1.82%)。结论 该方法合理可行, 可用于小红蒜总萘醌的质量控制。

关键词: 小红蒜; 总萘醌; TLC; 紫外分光光度; HPLC

中图分类号: R284.1

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2020)11-2863-05

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2020.11.008

Quality standard for total naphthoquinones in *Eleutherine plicata*

GUO Peng-cheng, CHEN Jie-yu, LIU Si-yu, YE Xiang-rui, SU Jing, QIU Ming-feng*

(School of Pharmacy, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China)

ABSTRACT: AIM To establish the quality standard for total naphthoquinones in *Eleutherine plicata* Herb. **METHODS** TLC and HPLC were adopted in the qualitative identification and quantitative determination of isoeleutherin, eleutherin and eleutherol, respectively. Chinese Pharmacopoeia (2015 edition) method was used to detect loss on drying, water, ignition residue and resin residue. UV spectrophotometry was applied to determining the content of total naphthoquinones. **RESULTS** The TLC spots were clear with good separation. In three batches of samples, the ranges of loss on drying, water and ignition residue were 2.34%–4.03%, 2.06%–3.56% and 0.15%–0.19%, respectively, and resin residue accorded with relative requirements. Total naphthoquinones, isoeleutherin, eleutherin and eleutherol showed good linear relationships within the ranges of 1–10 μg/mL ($r=0.9994$), 0.005 00–0.200 mg/mL ($r=0.9997$), 0.014 4–0.576 mg/mL ($r=0.9999$) and 0.004 96–0.198 mg/mL ($r=0.9999$), whose average recoveries were 100.06% (RSD=1.92%), 101.77% (RSD=1.30%), 103.24% (RSD=1.04%) and 98.41% (RSD=1.82%), respectively. **CONCLUSION** This reasonable and feasible method can be used for the quality control of total naphthoquinones in *E. plicata*.

KEY WORDS: *Eleutherine plicata* Herb; total naphthoquinones; TLC; UV spectrophotometry; HPLC

收稿日期: 2020-01-14

基金项目: 上海市科委项目 (15401901700)

作者简介: 郭朋程 (1994—), 男, 硕士生, 从事中药与民族药新制剂及新剂型研究。E-mail: gpcedu@sjtu.edu.cn

* 通信作者: 邱明丰 (1970—), 男, 研究员, 从事中药与民族药新制剂及新剂型研究。Tel: (021) 34204052, E-mail: mfqiu@sjtu.edu.cn

冠心病发病率及危险因素水平逐年上升, 并日趋年轻化, 已经成为“人类健康第一杀手”的心血管疾病。傣药小红蒜又名红葱、红葱头、百步还阳, 其性凉, 味苦, 有活血散瘀、消肿止痛、止血、清热解毒、利尿除湿之功效^[1-3], 是傣医治疗冠心病的主要药物, 分布于我国海南、广西、云南等省^[4-5]。现代研究表明, 小红蒜主要有效成分为萘醌衍生物^[6-9], 其醇提物中的总萘醌能显著增加冠状动脉血流量, 直接舒张血管, 抑制苯肾上腺素和氯化钾对血管环的预收缩作用^[10-12], 以异红葱乙素、红葱乙素、红葱甲素为主。因此, 本实验在前期工艺基础上制备小红蒜总萘醌, 并在性状、检查、定性鉴别、定量测定等方面进行研究, 以期为该药材质量标准的制定和相关制剂的研发奠定基础^[13]。

1 材料

MiniQ 超纯水机 (美国 Millipore 公司); UV-759 紫外可见分光光度计 (上海奥谱勒仪器有限公司); Agilent 1200 高效液相色谱仪 (美国 Agilent 公司); 硅胶 GF₂₅₄ 薄层层析预制板 (青岛海洋化工厂分厂); ZF-20D 暗箱三用紫外分析仪 (上海骥辉科学分析仪器有限公司); KQ-250DB 数控超声波清洗仪 (昆山超声仪器有限公司)。异红葱乙素 (批号 DFZY-17110)、红葱乙素 (批号 DFZY-17111)、红葱甲素 (批号 DFZY-17112) 对照品 (成都瑞芬思生物科技有限公司)。小红蒜对照药材 (批号 20160116, 西双版纳傣族自治州食品药品监督管理局检验所)、原料药 (批号 20150909, 云南金发药业有限公司) 均经上海交通大学药学院王梦月副教授鉴定为鸢尾科植物红葱 *Eleutherine plicata* Herb. 的干燥鳞茎。小红蒜总萘醌 (自制, 批号 20190402、20190412、20190426)。甲醇、乙腈为色谱纯; 其余试剂均为分析纯。

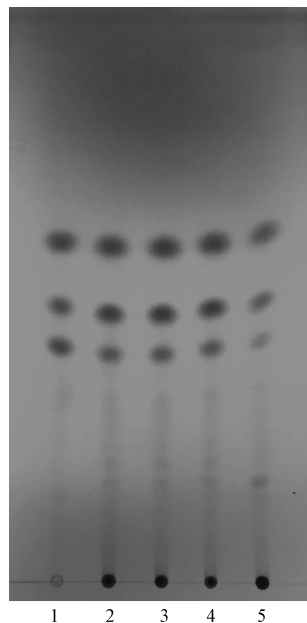
2 方法与结果

2.1 性状 本品为黄褐色粉末, 气微, 味苦。

2.2 TLC 定性鉴别 取3批本品粉末, 每批约0.02 g, 精密称定, 置于10 mL量瓶中, 甲醇定容至刻度, 摇匀, 即得供试品溶液; 取对照药材适量, 粉碎后过60目筛, 取粉末约0.5 g至10 mL量瓶中, 甲醇定容至刻度, 超声30 min, 冷却至室温后甲醇定容至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得对照药材溶液; 取异红葱乙素、红葱乙素、红葱甲素对照品各约10 mg, 精密称定, 置于同一10 mL量瓶中, 甲醇定容至刻度, 摇匀, 即得对照

品溶液。

方法1: 取对照品溶液约5 μL、对照药材及3批供试品溶液各约10 μL, 点于同一硅胶GF₂₅₄薄层板上, 以环己烷-甲苯-乙酸乙酯-甲酸(5:5:3:0.1)为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 置于紫外光灯(254 nm)下检视, 结果见图1, 可知供试品在对照品相应位置有相同斑点。



注: 1 为对照品, 2~4 为供试品 (批号分别为 20190402、20190412、20190426), 5 为对照药材。

图1 小红蒜总萘醌 TLC 色谱图 (I)

Fig. 1 TLC chromatogram of total naphthoquinones in *Eleutherine plicata* (I)

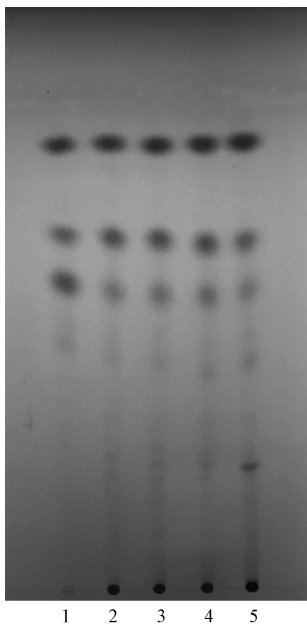
方法2: 取对照品溶液约5 μL、对照药材及3批供试品溶液各约10 μL, 点于同一硅胶GF₂₅₄薄层板上, 以二氯甲烷-乙酸乙酯-甲酸(12:1:0.2)为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 置于紫外光灯(254 nm)下检视, 结果见图2, 可知供试品在对照品相应位置有相同斑点。

综上所述, 2种方法下TLC斑点均较清晰, 分离度良好。

2.3 检查

2.3.1 干燥失重 取3批本品, 按照2015年版《中国药典》四部0831干燥失重测定法^[14]进行测定, 测得干燥失重分别为3.91%、4.03%、2.34%, 均小于5%, 符合相关规定。

2.3.2 水分 取3批本品, 按照2015年版《中国药典》四部0832水分检测法^[14]进行测定, 测得含水量分别为2.15%、3.56%、2.06%, 均小于4%, 符合相关规定。



注：1 为对照品，2~4 为供试品（批号分别为 20190402、20190412、20190426），5 为对照药材。

图 2 小红蒜总萘醌 TLC 色谱图 (II)

Fig. 2 TLC chromatogram of total naphthoquinones in *E. plicata* (II)

2.3.3 炽灼残渣 取 3 批本品，按照 2015 年版《中国药典》四部 0841 炽灼残渣检查法^[14]进行测定，测得炽灼残渣分别为 0.15%、0.16%、0.19%，均小于 0.2%，符合相关规定。

2.3.4 树脂残留物 取 3 批本品，按照 2015 年版《中国药典》四部 0861 残留溶剂测定法^[14]进行测定，测得苯、甲苯、二甲苯、苯乙烯质量分数均小于 0.000 1%，正己烷、二乙烯苯质量分数均小于 0.001%，符合相关规定。

2.4 总萘醌含量测定

2.4.1 对照品溶液制备 精密称取异红葱乙素对照品 10.0 mg，置于 5 mL 量瓶中，甲醇稀释至刻度，摇匀，精密吸取 1 mL 至 25 mL 量瓶中，甲醇稀释至刻度，摇匀，即得 (0.08 mg/mL)。

2.4.2 供试品溶液制备 将本品研细，精密称取 12.5 mg，置于 25 mL 量瓶中，甲醇稀释至刻度，摇匀，即得。

2.4.3 线性关系考察 取适量对照品溶液，甲醇依次稀释至 1、2、4、5、8、10 μg/mL，于 208 nm 波长处测定吸光度。以溶液质量浓度为横坐标 (X)，吸光度为纵坐标 (A) 进行回归，得方程为 $A = 0.101 8X + 0.085 7$ ($r = 0.999 4$)，在 1 ~ 10 μg/mL 范围内线性关系良好。

2.4.4 精密度试验 精密量取 4 μg/mL 对照品溶

液适量，按“2.4.3”项下方法测定吸光度 6 次，测得其 RSD 为 0.31%，表明仪器精密度良好。

2.4.5 稳定性试验 精密量取供试品溶液 1 mL 至 10 mL 量瓶中，甲醇稀释至刻度，摇匀，于 0、2、4、8、12 h 按“2.4.3”项下方法测定吸光度，测得其 RSD 为 0.93%，表明溶液在 12 h 内稳定性良好。

2.4.6 加样回收率试验 取总萘醌含有量已知的本品 6 份，每份约 6.0 mg，精密称定，置于 25 mL 量瓶中，精密加入含等量总萘醌的对照品溶液，甲醇稀释至刻度，摇匀，精密移取 0.1 mL 至 10 mL 量瓶中，按“2.4.3”项下方法测定吸光度，计算回收率，结果见表 1。

表 1 总萘醌加样回收率试验结果 (n=6)

Tab. 1 Results of recovery tests for total naphthoquinones (n=6)

取样量/ mg	原有量/ mg	加入量/ mg	测得量/ mg	回收率/ %	平均回收 率/%	RSD/ %
6.170 0	4.605 9	4.480 0	9.114 6	100.64		
5.880 0	4.389 4	4.480 0	8.772 7	97.84		
5.880 0	4.389 4	4.480 0	9.014 6	103.24	100.06	1.92
5.970 0	4.456 6	4.480 0	9.002 0	101.46		
5.740 0	4.284 9	4.480 0	8.720 1	99.00		
6.120 0	4.568 6	4.480 0	8.966 6	98.17		

2.4.7 分析结果 精密称取 3 批本品，按“2.4.2”项下方法制备供试品溶液，每批平行 3 份，分别精密量取 1 mL 至 10 mL 量瓶中，按“2.4.3”项下方法测定吸光度，计算含有量，结果见表 2。

表 2 总萘醌含有量测定结果 (n=3)

Tab. 2 Results of content determination of total naphthoquinones (n=3)

批号	称样量/g	吸光度	总萘醌/%
20190402	0.012 50	0.472	75.89
20190412	0.012 40	0.480	78.10
20190426	0.012 40	0.478	77.69

2.5 异红葱乙素、红葱乙素、红葱甲素含有量测定

2.5.1 色谱条件与专属性考察 Agilent TC-C₁₈₍₂₎ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相乙腈 (A) -0.1% 磷酸 (B)，梯度洗脱 (0 ~ 25 min, 40% A; 25 ~ 30 min, 40% ~ 80% A; 30 ~ 35 min, 80% A); 体积流量 1 mL/min; 柱温 40 °C; 检测波长 254 nm; 进样量 10 μL，色谱图见图 3。由此可知，各成分色谱峰与相邻峰的分度均大于 1.5，理论塔板数按各成分计均大于 3 000，表明该方法专属性良好。

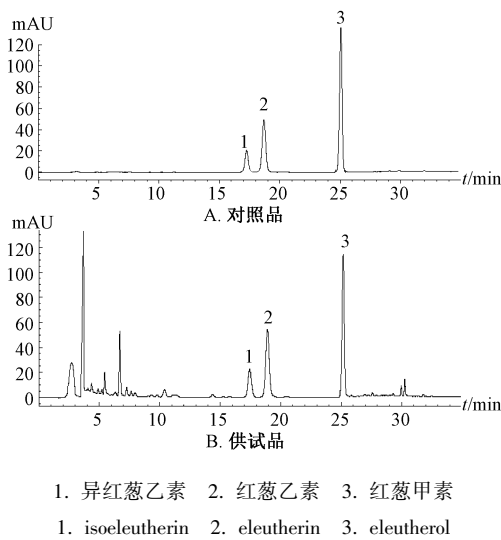


图3 各成分HPLC色谱图

Fig. 3 HPLC chromatograms of various constituents

2.5.2 对照品溶液制备 分别精密称取异红葱乙素、红葱乙素、红葱甲素对照品 10.00、9.60、4.96 mg，置于 5 mL 量瓶中，甲醇稀释至刻度，振荡溶解，摇匀，分别精密吸取 1、3、2 mL 至 10 mL 量瓶中，甲醇稀释至刻度，摇匀，即得 (0.200 0、0.576 0、0.198 4 mg/mL)

2.5.3 供试品溶液制备 精密称取小红蒜总萜醌对照品 12.5 mg，置于 25 mL 量瓶中，甲醇定容至刻度，摇匀，滤过，即得。

2.5.4 线性关系考察 取对照品溶液 5、2.5、1.25、0.5、0.25 mL 至 10 mL 量瓶中，甲醇依次稀释至不同质量浓度，在“2.5.1”项色谱条件下进样测定。以溶液质量浓度为横坐标 (X)，峰面

积为纵坐标 (Y) 进行回归，结果见表 3，可知各成分在各自范围内线性关系良好。

表3 各成分线性关系

Tab. 3 Linear relationships of various constituents

成分	回归方程	r	线性范围/ (mg·mL ⁻¹)
异红葱乙素	Y=17 952X+38.063	0.999 7	0.005 00~0.200
红葱乙素	Y=16 708X-80.433	0.999 9	0.014 4~0.576
红葱甲素	Y=52 556X-101.91	0.999 9	0.004 96~0.198

2.5.5 精密度试验 取含 0.050 0 mg/mL 异红葱乙素、0.144 mg/mL 红葱乙素、0.049 6 mg/mL 红葱甲素的对照品溶液，在“2.5.1”项色谱条件下进样测定，测得三者峰面积 RSD 分别为 0.73%、0.97%、0.68%，表明仪器精密度良好。

2.5.6 稳定性试验 取同一份供试品溶液，分别于 0、2、4、8、12、24 h，在“2.5.1”项色谱条件下进样测定，测得异红葱乙素、红葱乙素、红葱甲素峰面积 RSD 分别为 1.96%、1.63%、1.73%，表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.5.7 重复性试验 取同一批本品，按“2.5.3”项下方法平行制备 6 份供试品溶液，在“2.5.1”项色谱条件下进样测定，测得异红葱乙素、红葱乙素、红葱甲素含有量 RSD 分别为 1.96%、1.63%、1.73%，表明该方法重复性良好。

2.5.8 加样回收率试验 精密称取小红蒜总萜醌对照品 6.0 mg，置于 25 mL 量瓶中，精密加入含等量异红葱乙素、红葱乙素、红葱甲素的对照品溶液，甲醇稀释至刻度，平行 6 份，在“2.5.1”项色谱条件下进样测定，计算回收率，结果见表 4。

表4 异红葱乙素、红葱乙素、红葱甲素加样回收率试验结果 (n=6)

Tab. 4 Results of recovery tests for isoeleutherin, eleutherin and eleutherol (n=6)

成分	取样量/mg	原有量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
异红葱乙素	6.100 0	0.832 0	0.830 0	1.668 1	100.73	101.77	1.30
	6.180 0	0.843 0	0.830 0	1.710 8	104.56		
	6.120 0	0.834 8	0.830 0	1.678 5	101.65		
	6.100 0	0.832 0	0.830 0	1.667 2	100.62		
	6.130 0	0.836 1	0.830 0	1.681 5	101.85		
	6.110 0	0.833 4	0.830 0	1.673 4	101.20		
红葱乙素	6.100 0	2.319 8	2.300 0	4.683 3	102.76	103.24	1.04
	6.180 0	2.350 3	2.300 0	4.778 4	105.57		
	6.120 0	2.327 4	2.300 0	4.704 0	103.33		
	6.100 0	2.319 8	2.300 0	4.677 1	102.49		
	6.130 0	2.331 2	2.300 0	4.691 0	102.60		
	6.110 0	2.323 6	2.300 0	4.685 3	102.68		
红葱甲素	6.100 0	0.979 7	0.980 0	1.938 7	97.86	98.41	1.82
	6.180 0	0.992 5	0.980 0	1.935 3	96.20		
	6.120 0	0.982 9	0.980 0	1.958 0	99.50		
	6.100 0	0.979 7	0.980 0	1.935 1	97.49		
	6.130 0	0.984 5	0.980 0	1.941 2	97.62		
	6.110 0	0.981 3	0.980 0	1.978 8	101.79		

2.5.9 分析结果 精密称取3批本品,按“2.5.3”项下方法制备供试品溶液,每批平行3份,在“2.5.1”项色谱条件下进样测定,计算含有量,结果见表5。

表5 异红葱乙素、红葱乙素、红葱甲素含有量测定结果 (n=3)

Tab.5 Results of content determination of isoeleutherin, eleutherin and eleutherol (n=3)

批号	异红葱乙素/%	红葱乙素/%	红葱甲素/%	总量/%
20190402	11.75	32.97	16.02	60.74
20190412	13.57	39.89	15.62	69.08
20190426	11.85	36.62	15.70	64.16

3 讨论

本实验根据紫外扫描情况,确定检测波长为254 nm;考察了流动相甲醇-0.1%磷酸、乙腈-0.1%磷酸的分离效果,发现后者优于前者,并对其梯度洗脱比例进行优化。最终,确定为“2.5.1”项下色谱条件。

小红蒜总萘醌是治疗冠心病傣药小红蒜的有效部位,主要含有异红葱乙素、红葱乙素、红葱甲素,具有巨大开发潜力。根据本实验结果,初步建议小红蒜总萘醌干燥失重不得超过5%,含水量不得超过4.0%,炽灼残渣不得超过0.2%,树脂残留物(苯、甲苯、二甲苯、苯乙烯)质量分数均不得超过0.0001%,正己烷、二乙烯苯质量分数均不得超过0.001%,萘醌类成分质量分数不得低于70%,异红葱乙素、红葱乙素、红葱甲素总质量分数不得低于60%。

参考文献:

[1] 云南省食品药品监督管理局. 云南省中药材标准(2005年版第三册 傣族药)[S]. 昆明: 云南出版集团公司, 云南科技出版社, 2005: 11-12.

[2] 丁建弥, 黄慧珠. 红葱素片剂的试制[J]. 中草药, 1982, 13(11): 19-21.

[3] 胥筱云, 杨梅, 杨宏, 等. 傣医治疗“拢梅兰申”病用药特点分析[J]. 中国民间疗法, 2005, 13(4): 4-5.

[4] 王晓艺, 王庆华, 何云, 等. 红葱植物成分及生物活性研究现状[J]. 亚太传统医药, 2015, 11(5): 39-42.

[5] 陈亚梅. 傣医常用药物简介[J]. 云南中医中药杂志, 1998, 19(3): 42-43.

[6] 陈政雄, 黄慧珠, 王成瑞, 等. 红葱有效成分的研究[J]. 中草药, 1981, 12(11): 4; 3.

[7] 徐巧林, 何春梅, 曾雷, 等. 红葱化学成分与药理活性研究进展[J]. 广东林业科技, 2014, 30(2): 82-89.

[8] 吴佳妮, 陈德力, 刘洋洋, 等. 红葱的化学成分和生物活性研究[J]. 中草药, 2018, 49(13): 2967-2971.

[9] 徐金钟, 邱峰, 曲戈霞, 等. 红葱抗稻瘟霉活性成分研究[J]. 中国药物化学杂志, 2005, 15(3): 157-161.

[10] Xu J Z, Qiu F, Duan W J, et al. New bioactive constituents from *Eleutherine americana*[J]. *Front Chem China*, 2006, 1(3): 320-323.

[11] 刘西京, 汪程远, 王乃利, 等. 红葱萃取物对离体大鼠主动脉血管环的影响研究[J]. 中国药房, 2009, 20(18): 1376-1378.

[13] 曹云芸, 王玲, 张滔, 等. 傣药小红蒜体外抗菌活性的研究[J]. 云南中医学院学报, 2006, 29(S1): 53-55; 64.

[13] 唐雪澜, 李心蕊, 马欣, 等. 小红蒜总萘醌的提取工艺研究[J]. 中华中医药杂志, 2018, 33(12): 5637-5640.

[14] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2015年版四部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 103-109.