

茜草药材的 HPLC 指纹图谱研究

纪宝玉, 裴莉昕, 陈随清*, 王一芳
(河南中医学院药学院, 郑州 450008)

[摘要] 目的: 建立河南不同产地茜草药材的 HPLC 指纹图谱分析方法, 为茜草药材的质量评价提供参考依据。方法: 采用高效液相色谱法, Phenomenex ODS C₁₈ 柱 (4.60 mm × 250 mm, 4 μm), 甲醇-0.2% 磷酸水梯度洗脱, 检测波长 275 nm, 流速 0.8 mL·min⁻¹, 柱温 25 °C。结果: 以大叶茜草素为参照峰, 确定 11 个共有峰, 测定了 14 批茜草药材 HPLC 指纹图谱与对照图谱的相似度。结论: 所建立的方法可用于茜草药材指纹图谱测定, 并可对其今后规范药用资源及质量评价提供科学依据。

[关键词] 茜草药材; 大叶茜草素; 高效液相色谱; 指纹图谱

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)23-0087-04

[doi] 10.11653/syjf2013230087

Quality Control of Madder Based on HPLC Fingerprint

Ji Bao-yu, Pei Li-xin, Chen Sui-qing*, Wang Yi-fang

(School of Pharmacy, Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China)

[Abstract] **Objective:** To establish the HPLC fingerprint analysis methods for Madder and to provide the reference for quality evaluation of Madder. **Method:** Phenomenex ODS C₁₈ (4.60 mm × 250 mm, 4 μm) column was used and the methanol-0.2% H₃PO₄ water was chosen as the mobile phase in a gradient mode. The column temperature was at 25 °C and the detection wavelength was at 275 nm. The detection time was 80 min and the flow rate was 0.8 mL·min⁻¹. **Result:** Taking mollugin as the reference peak, eleven common peaks were selected as the fingerprint peaks of Madder. **Conclusion:** This method is simple and accurate with a good reproducibility. It provides a reference standard for the quality control of Madder.

[Key words] Madder; mollugin; HPLC; fingerprint

茜草为茜草科植物茜草的干燥根及根茎, 具有凉血、止血、祛瘀、通经之功效, 用于吐血、衄血、崩漏、外伤出血、经闭瘀阻、关节痹痛、跌打肿痛等症^[1]。茜草分布广泛, 主产于陕西、河南、安徽、河北、山东等省, 以陕西、河南出产者量大且质优^[2]。其主要有效成分为蒽醌及其苷类、萘醌及其苷类和

萘酸酯类等^[3,4]。其中萘醌类化合物大叶茜草素 (mollugin) 是茜草中有效成分之一。目前对茜草质量的研究多集中在大叶茜草素含量的高低方面^[5,6], 为完善综合评价茜草质量的标准, 本研究对河南不同产地的茜草药材进行分析, 建立了茜草药材 HPLC 指纹图谱, 为茜草药材的开发应用、品质评价、质量标准制定提供科学依据。

1 材料

岛津 LC-20AT 型高效液相色谱仪、SPD-20A 型紫外检测器、CBM-102 型色谱工作站, KQ-500DV 型数控超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司)、HP-01 型无油真空泵、SHZ-95B 型循环水式多用真空泵 (巩义市予华仪器有限公司)。大叶茜草素对照品 (110884-200604, 中国药品生物制品检定所), 甲醇、乙腈 (天津四友精细化学品有限公司) 均为色

[收稿日期] 20130226(012)

[基金项目] 国家科技基础条件平台项目(2005DKA21000)

[第一作者] 纪宝玉, 硕士, 讲师, 从事中药规范化种植及质量标准研究, Tel: 13607669844, E-mail: jby19820429@yahoo.com.cn

[通讯作者] * 陈随清, 博士, 教授, 从事中药品种整理及质量标准研究, Tel: 0371-65676686, E-mail: suiqingchen@sohu.com

谱醇,磷酸、乙酸乙酯为分析醇,水(双蒸水自制)。不同产地茜草药材样品见表 1,经河南中医学院陈随清教授鉴定为茜草科植物茜草 *Rubia cordifolia* L. 的干燥根及根茎。

表 1 不同产地茜草药材样品信息

No.	产地	采集时间
01	济源市克井镇	2009-07-28
02	鹤壁市淇县桥盟乡	2009-07-15
03	鲁山县木寨乡	2009-07-25
04	信阳市鸡公山	2009-07-20
05	新乡市辉县万仙山	2009-07-15
06	三门峡市	2009-07-30
07	南阳市南召县云阳镇	2009-07-22
08	林州市石板岩乡	2009-07-26
09	南阳市独山	2009-07-22
10	信阳市平桥区	2009-07-20
11	鲁山县石人山	2009-07-25
12	新密市国公岭	2009-07-16
13	洛阳市龙峪湾	2009-07-18
14	巩义市小关镇	2009-07-16

2 方法

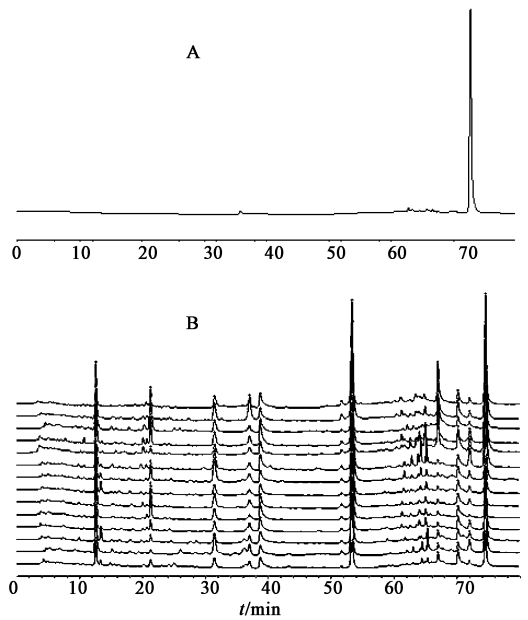
2.1 色谱条件 Phenomenex ODS C₁₈ 色谱分析柱(4.6 mm × 250 mm, 4 μm), 流动相甲醇(A)-0.2% 磷酸溶液(B), 梯度洗脱(0 ~ 4 min, 53% ~ 45% B; 4 ~ 12 min, 45% B; 12 ~ 29 min, 37% B; 29 ~ 42 min, 32% B; 42 ~ 57 min, 32% ~ 10% B; 57 ~ 75 min, 10% B; 75 ~ 80 min, 10% ~ 53% B), 检测波长 275 nm, 柱温 25 °C, 流速 0.8 mL·min⁻¹。

2.2 供试品溶液的制备 取样品粉末 0.5 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中。加入甲醇 100 mL, 精密称定, 超声 30 min, 加入甲醇补足减失的质量, 摇匀, 抽滤, 取续滤液 50 mL, 挥干。再加入甲醇-乙酸乙酯(1:3)混合液 30 mL, 超声 5 min, 使残渣充分溶解, 搅匀, 过滤, 挥干, 加少量甲醇溶解, 置于 25 mL 量瓶中, 用甲醇定容。过 0.45 μm 微孔滤膜, 取续滤液 10 μL 进样, 进行 HPLC 分析。

2.3 对照品溶液的制备 精密称取大叶茜草素对照品适量, 加甲醇制成 0.11 g·L⁻¹ 的溶液, 即得。

2.4 各色谱峰相对保留时间和面积计算 选定色谱图中第 11 号(大叶茜草素)峰为参照峰, 令其保留时间和相对峰面积分别为 1, 其他各峰的保留时间和相对峰面积分别与参照峰保留时间和相对峰面积相比, 比值作为各峰的相对保留时间(RT)和相对

峰面积(RS)。见图 1。



A. 大叶茜草素对照品; B. 供试品叠加

图 1 14 批茜草药材样品 HPLC

2.5 方法学考察

2.5.1 精密度试验 取 1 号茜草药材粉末, 精密称定, 按样品溶液方法制备, 取供试品溶液 10 μL, 连续进样 5 次, 记录各共有色谱峰保留时间和相对峰面积的 RSD 分别在 0 ~ 1.39% 和 0 ~ 2.574%。结果 RSD 均 < 3.0%, 符合色谱指纹图谱要求, 提示精密度良好。

2.5.2 重复性试验 取 1 号茜草药材粉末 5 份, 各称取约 0.5 g, 精密称定, 按样品溶液方法制备, 取供试品溶液进样分析, 结果各共有色谱峰保留时间和相对峰面积的 RSD 分别在 0 ~ 1.167% 和 0 ~ 2.778%; RSD 均 < 3.0%, 符合色谱指纹图谱要求, 提示重复性良好。

2.5.3 稳定性试验 取 1 号茜草药材粉末 0.5 g, 精密称定, 按样品溶液方法制备, 取供试品溶液分别在 0, 2, 4, 6, 12, 24 h 进样分析, 结果各共有色谱峰保留时间和相对峰面积的 RSD 分别在 0 ~ 1.563% 和 0 ~ 2.491%, RSD 均 < 3.0%, 符合色谱指纹图谱要求, 提示 24 h 内供试品溶液内稳定性良好。

2.6 样品测定 取 14 批河南不同产地茜草药材样品, 按样品溶液方法制备供试品溶液, 分别进样, 在上述色谱条件下进行分析。

2.7 指纹图谱的建立与分析

2.7.1 共有峰的确定 取 14 批茜草药材样品分析结果, 茜草药材供试品标出 11 个共有峰。以峰 11

(大叶茜草素)为参照峰,计算河南不同产地茜草药材各共有峰的相对保留时间和相对峰面积,结果见表2,图2。

表2 14批辛夷药材 HPLC 指纹图谱分析($\bar{x} \pm s$)

峰号	保留时间	相对保留面积
1	12.23	1.133 7 ± 0.580 6
2	21.50	0.441 5 ± 0.387 8
3	31.66	0.567 3 ± 0.690 4
4	36.92	0.473 1 ± 0.359 2
5	39.26	0.717 8 ± 0.443 4
6	51.94	0.403 6 ± 1.658 3
7	53.67	3.118 2 ± 0.580 0
8	66.64	0.567 3 ± 0.317 7
9	69.15	0.571 9 ± 0.502 6
10	70.65	0.306 8 ± 0.430 1
11	72.04	2.698 2 ± 1.225 9

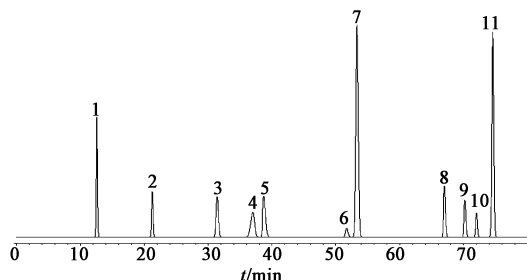


图2 茜草对照指纹图谱

2.7.2 相似度分析 取14批茜草药材样品,按样品溶液方法制备供试品溶液,分别进样,在上述色谱条件下进行分析,记录80 min的色谱图。得到河南不同产地茜草药材高效液相指纹图谱。采用由国家药典委员会中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件(2004A版),计算相似度。以14批茜草药材样品指纹图谱生成的共有模式为对照,分别计算14批茜草药材样品的相似度,其相似度除05,10号样品在0.7左右,其余样品的相似度均>0.93,说明了茜草药材化学成分一致性较好,质量比较稳定。见表3。

表3 茜草药材指纹图谱相似度

样品	相似度	样品	相似度
01	0.930	08	0.955
02	0.982	09	0.981
03	0.954	10	0.747
04	0.944	11	0.980
05	0.735	12	0.981
06	0.958	13	0.976
07	0.959	14	0.972
对照指纹图谱	1.000		

3 讨论

3.1 供试品溶液的制备 茜草药材化学成分较复杂,所以选择合适的提取溶剂和纯化方法尤为重要。茜草药材的主要成分为蒽醌及其苷类,蒽醌苷元极性较小而且多为茜草有效成分^[7],所以在提取和纯化过程中应对其保证高的提取效率。

比较了乙醇、甲醇、丙酮等的提取效果,结果表明,甲醇的提取效果较好,色谱峰的信息量丰富,分离度高;纯化溶剂选择极性略小的丙酮和乙酸乙酯,但只能萃取出少量成分且效率低,改用甲醇与乙酸乙酯的不同比例混合液进行试验,发现甲醇-乙酸乙酯(1:1)萃取后极性较大的小峰仍然很多,而甲醇-乙酸乙酯(1:3)萃取后,小峰明显减少,所以选择甲醇-乙酸乙酯(1:3)混合液进行萃取。

3.2 色谱条件选择 对提取方法(冷浸、超声、回流)进行了考察,结果表明,超声和回流没有明显的差别,冷浸法提取效率明显低。由于超声法较为方便,所以选择超声法。检测波长选定250,275 nm进行考察,在2种检测波长下的HPLC指纹图谱中均有多个色谱峰,在275 nm处各个色谱峰的吸收最强,故选定275 nm。检测流速选定0.8,1.0 mL·min⁻¹进行考察,在2种检测流速下的HPLC指纹图谱中均有多个色谱峰,0.8 mL·min⁻¹分离度较好,检测柱温选定25,30℃的考察,结果在80 min的情况下,柱温25℃分离度较好,故选择25℃作为指纹图谱的柱温。

3.3 流动相及洗脱梯度的确定 首先采用2010年版《中国药典》茜草药材含量测定方法进行试验,采用乙腈-甲醇-磷酸溶液流动相系统,此系统洗脱能力较强,峰形较好,但由于系统较复杂,梯度洗脱基线不稳定,影响图谱效果;后采用甲醇-0.2%磷酸溶液流动相系统,洗脱能力相对较弱,峰形稍有拖尾,但增大有机相比例后仍能满足要求,且梯度洗脱基线较稳定,所以选择该系统。

3.4 指纹图谱评价 对河南不同产地茜草HPLC指纹图谱进行相似度分析,结果表明,除了新乡市辉县万仙山和信阳市平桥区外,其他各批之间的相似度均较高,说明各产区茜草药材质量具有一定的稳定性,但是各批共有峰相对峰面积比值表明,河南不同产地茜草成分的含量差异较大,这可能是受环境因素的影响^[8],有必要对茜草的生长环境进行考察,建立茜草的GAP基地,从源头上保证茜草药材的质量。本实验对河南不同产地的茜草进行分析,为综合评价其质量、规范化种植药材和可持续利用药材提供科学依据。

离子色谱法测定栀子中 Cl^- , Br^- , NO_3^- , SO_4^{2-} , PO_4^{3-} 5种阴离子的含量

郭俊国, 毕宏生*

(1. 山东中医药大学眼科研究所, 济南 250002;
2. 山东省中西医结合眼病防治重点实验室, 济南 250002)

[摘要] 目的: 建立一种同时测定中药栀子药材中 Cl^- , Br^- , NO_3^- , SO_4^{2-} , PO_4^{3-} 阴离子的含量测定方法。方法: 采用离子色谱法, IonPac AS11-HC 阴离子色谱柱, 氢氧化钾梯度淋洗, 电导检测栀子中 5 种无机阴离子。结果: Cl^- , Br^- , NO_3^- , SO_4^{2-} , PO_4^{3-} 的线性范围良好, 加样回收率介于 97% ~ 102%, 栀子中 Cl^- , Br^- , NO_3^- , SO_4^{2-} , PO_4^{3-} 重复性良好, 含量分别为 0.084%, 0.063%, 0.070%, 0.30%, 0.12%。结论: 离子色谱法可以同时检测栀子中 5 种阴离子, 灵敏度高, 结果准确可行, 为栀子的质量控制提供了一种简便快速的方法。

[关键词] 离子色谱法, 栀子, 无机阴离子, 含量测定, 超声波提取法

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)23-0090-04

[doi] 10.11653/syfj2013230090

Determination the Content of Cl^- , Br^- , NO_3^- , SO_4^{2-} , PO_4^{3-} in Chinese Herbal of Gardenia by Ion Chromatography

GUO Jun-guo, BI Hong-sheng*

(1. Eye Institute of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Ji'nan 250002, China;
2. Key Laboratory of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine for Prevention and Therapy of Ocular Diseases of Shandong, Ji'nan 250002, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a simultaneous determination of Cl^- , Br^- , NO_3^- , SO_4^{2-} , PO_4^{3-}

[收稿日期] 20130528(017)

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81072961)

[第一作者] 郭俊国, 硕士, 讲师, 从事中西医结合眼科学药研究, Tel:0531-58859696, E-mail: guojunguo111@163.com

[通讯作者] * 毕宏生, 教授、博士生导师, 从事中西医结合眼科研究, Tel:0531-58859696, E-mail: hongshengbi@126.com

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 219.
- [2] 李景丽, 胡本祥, 张琳. 茜草炭炮制前后显微鉴别研究[J]. 中药材, 2006, 29(8): 780.
- [3] 肖培根. 新编中药志[M]. 北京: 化学工业出版社, 2002: 629.
- [4] 中国科学院北京植物研究所. 中国高等植物图鉴. 第4册[M]. 北京: 科学出版社, 1975: 276.
- [5] 薛丽, 杨波, 索菲娅, 等. HPLC法测定茜草饮片中中大叶茜草素含量[J]. 药物分析杂志, 2009, 29(3): 363.
- [6] 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.
- [7] 苏静慧, 吕强三, 李红霞. 超声波法提取茜草中蒽醌成分[J]. 河北理工大学学报: 自然科学版, 2011, 33(4): 101.
- [8] 张金鸽, 代丽萍, 陈随清. 河南不同产地茜草的质量评价[J]. 中医学报, 2010, 25(2): 253.

[责任编辑 顾雪竹]