

茜草饮片 HPLC 指纹图谱研究

王侃, 孙文君, 单鸣秋, 丁安伟*

(南京中医药大学、江苏省方剂研究重点实验室, 南京 210046)

[摘要] 目的: 利用高效液相色谱法, 建立茜草饮片的指纹图谱。方法: 色谱条件, Hanbon Kromasil C₁₈ 柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相 A 为乙腈, B 为 0.1% 三氟乙酸; 洗脱方法 (0 ~ 30 min, 10% ~ 25% A; 30 ~ 35 min, 25% ~ 50% A; 35 ~ 55 min, 50% ~ 65% A; 55 ~ 70 min, 65% ~ 95% A; 70 ~ 75 min, 95% ~ 10% A)。体积流量 1.0 mL·min⁻¹; 柱温 30 °C; 检测波长 240 nm; 进样量 10 μL。结果: 对 10 批茜草饮片进行测定, 标定出 15 个共有峰, 采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004A 版》软件计算出其相似度范围在 0.824 ~ 0.989, 并得出了茜草饮片的对照指纹图谱。结论: 该法准确, 重复性好, 可作为茜草饮片质量控制方法。

[关键词] 茜草饮片; 指纹图谱; 高效液相色谱

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)10-0113-03

Studies on HPLC Fingerprint of Rubiae Radix Et Rhizoma

WANG Kan, SUN Wen-jun, SHAN Ming-qiu, DING An-wei*

(Nanjing University of Chinese Medicine, Jiangsu Key Laboratory for Traditional Chinese Medicine Formulae Research, Nanjing 210046, China)

[Abstract] **Objective:** To establish an HPLC fingerprint of Rubiae Radix Et Rhizoma. **Method:** The analysis was carried out with Hanbon Kromasil C₁₈ column (4.6 mm × 250 nm, 5 μm). The mobile phase was acetonitrile (A), 0.1%-trifluoroacetic acid (B), elution for 0-30 min. A was 10%-25% for 30-35 min. A was 25%-50% for 35-55 min. A was 50%-65% for 55-70 min. A was 65%-95% for 70-75 min. A was 90%-10%. Flow rate was 1.0 mL·min⁻¹. Wavelength was 240 nm and temperature was maintained at 30 °C. The injection volume was 10 μL. **Result:** The 15 common peaks had been marked and the similarity of 10 batches of Rubiae Radix et Rhizoma was 0.824-0.989 which was analyzed with the Estimating System of Similarity of 2004A Version (the Country's Pharmacopeia Committee) on the Chinese Medicine Fingerprint Chromatography. The fingerprint chromatography of Rubiae Radix et Rhizoma was established. **Conclusion:** The method can be used in quality control of Rubiae Radix et Rhizoma with accuracy and better repeatability.

[Key words] Rubiae Radix et Rhizoma; HPLC; fingerprint

茜草为茜草科植物茜草的干燥根和根茎, 始载于《神农本草经》。其味苦, 性寒, 归肝经。功能凉血、祛瘀、止血、通经, 用于吐血、衄血、崩漏、外伤出血、瘀阻经闭、关节痹痛、跌扑肿痛^[1]。其化学成分

有蒽醌、萘醌、萘氢醌、环己肽、三萜化合物等^[2-4]。茜草全国各地都产, 但以陕西渭南、河南嵩县产量大且品质优。目前茜草临床的用量很大, 2010 年版《中国药典》以大叶茜草素和羟基茜草素的含量作为茜草的质量评价标准^[1], 处理方法较为复杂, 需要经过酸水解及水浴加热, 其操作平行性差。本文采用 HPLC 构建茜草饮片的指纹图谱, 并对 10 批饮片进行了相似度评价, 为建立茜草饮片质量标准提供了实验依据。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 Waters 2695 高效液相色谱仪, Waters

[收稿日期] 20110524(003)

[基金项目] 国家中医药局公益性行业科研专项 (HY11076631)

[第一作者] 王侃, 硕士研究生, Tel: 13770779778, E-mail: wangkan86@hotmail.com

[通讯作者] * 丁安伟, 博士生导师, Tel: 025-85811523, E-mail: awding105@163.com

2996 检测器, Empower 色谱工作站, KQ-500 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司), FA1104N 型电子天平($d = 0.1 \text{ mg}$, 上海精密科学仪器有限公司), EPED-T 型超纯水器(南京易普易达科技有限公司)。

1.2 药品 大叶茜草素对照品(购自中国药品生物制品检定所, 批号 110884-200604), 乙腈(色谱纯, 美国 Fisher 公司), 三氟乙酸(色谱纯), 水为超纯水。

1.3 供试样品 购自全国各地药店, 经南京中医药大学药学院吴启南教授鉴定为茜草科植物茜草 *Rubia cordifolia* L. 的干燥根和根茎。10 批茜草饮片的产地和批号见表 1。

表 1 茜草饮片样品来源

No.	产地	批号
1	安徽	091116
2	湖北	100305
3	陕西	100509
4	河南	091104
5	河北	100402
6	安徽	090806
7	浙江	100507
8	河南	100603
9	江苏	091205
10	四川	100609

1.4 数据处理软件 用中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004A 版(国家药典委员会)将测试数据导入该软件, 经选峰, 设定匹配模板, 将谱峰自动匹配, 然后设定标准模板, 进行谱峰差异性评价和整体相似性评价。

2 实验方法

2.1 色谱条件 色谱柱为 Hanbon Kromasil C_{18} ($4.6 \text{ mm} \times 250 \text{ nm}, 5 \mu\text{m}$), 检测波长 240 nm , 进样量 $10 \mu\text{L}$, 柱温 $30 \text{ }^\circ\text{C}$, 流速 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 流动相乙腈(A)-0.1% 三氟乙酸水溶液, 梯度洗脱 ($0 \sim 30 \text{ min}, 10\% \sim 25\% \text{ A}; 30 \sim 35 \text{ min}, 25\% \sim 50\% \text{ A}; 35 \sim 55 \text{ min}, 50\% \sim 65\% \text{ A}; 55 \sim 70 \text{ min}, 65\% \sim 95\% \text{ A}; 70 \sim 75 \text{ min}, 95\% \sim 10\% \text{ A}$)。

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, 加甲醇分别制成每 1 mL 含大叶茜草素 0.13 mg 的溶液, 即得。

2.3 供试品溶液的制备 取茜草饮片粉末(过 2 号

筛)约 1.0 g , 精密称定, 置于 50 mL 具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 20 mL , 密塞, 称定质量, 超声处理(功率 250 W , 频率 40 kHz) 30 min , 放冷, 称定质量, 用甲醇补足减失的质量, 静置, 上清液过 $0.45 \mu\text{m}$ 微孔滤膜, 取滤液作为供试品溶液。

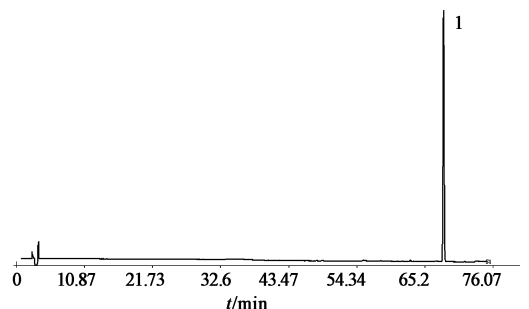
2.4 精密度试验 取 6 号样品(安徽)粉末, 按照 2.3 项下方法制得供试品溶液, 按 2 项下的色谱条件进行测定, 连续进样 6 次, 考察共有色谱峰相对保留时间和峰面积的一致性, 以大叶茜草素的保留时间和峰面积为参照, 结果表明共有峰的相对保留时间和峰面积的比值 $\text{RSD} < 3\%$, 采用《中药色谱指纹图谱相识度评价系统 2004A 版》软件计算得 6 张色谱图相似度在 0.99 以上, 证明仪器精密度良好, 符合指纹图谱研究要求^[5]。

2.5 重复性试验 取 6 号样品(安徽)细粉 6 份, 按照 2.3 项下方法平行制得 6 份供试品溶液, 按 2.1 项下色谱条件进行考察, 考察色谱峰的相对保留时间, 峰面积比值的一致性。结果表明, 其色谱峰的相对保留时间和峰面积的比值基本没有变化 ($\text{RSD} < 3\%$), 6 张色谱图相似度在 0.99 以上, 表明试验重复性良好, 符合指纹图谱研究要求。

2.6 稳定性试验 取 6 号样品(安徽)细粉, 按照 2.3 项下方法制得供试品溶液, 按 2.1 项下色谱条件进行测定, 分别于 0, 2, 4, 6, 8, 12, 24 h 进行测定。结果表明, 其色谱峰的相对保留时间和峰面积的比值基本没有变化 ($\text{RSD} < 3\%$), 6 张色谱图相似度在 0.99 以上, 表明 24 h 内供试品溶液的成分稳定, 符合指纹图谱研究要求。

3 试验结果及相似度评价

图谱中大叶茜草素的色谱峰面积较大, 且没有其他的峰干扰, 故选用大叶茜草素为参比峰, 其液相图谱见图 1。将茜草 10 批饮片所得的色谱数据依次导入《中药色谱指纹图谱相识度评价系统 2004A 版》软件, 叠加图谱见图 2, 以 1 号样品图谱作为参照



1. 大叶茜草素

图 1 大叶茜草素的色谱图

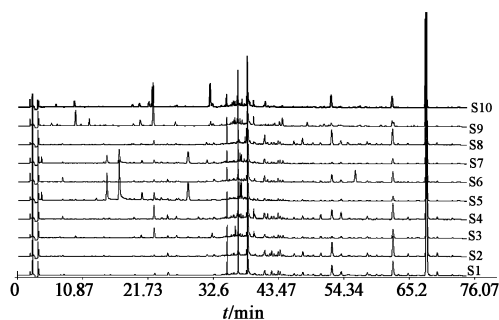


图2 10批茜草饮片的指纹图谱

谱进行指纹匹配,并得到10批样品的共有模式图(图3);14号峰(大叶茜草素)为参比峰计算相对保留时间及相对峰面积,得到10批饮片导入图谱的相似度数据(表3),10批样品的指纹图谱在75 min内有40个共有峰,1~10号样品共有峰所占比例依次为81.42%, 79.93%, 69.71%, 74.07%, 45.72%,

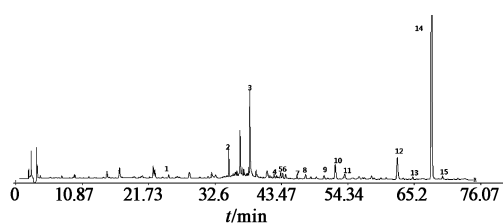


图3 茜草指纹图谱的共有模式

71.35%, 65.72%, 73.8%, 49.04%, 58.21%,确立其中较为显著的15个色谱峰,这15个色谱峰具有较强的特征性和代表性。将各色谱峰保留时间和峰面积与同一图谱中大叶茜草素的保留时间和峰面积比较,其比值为各色谱峰的相对保留时间及相对峰面积,结果15个特征共有峰相对保留时间符合程度较好,而相对峰面积范围波动很大,说明各产地样品在化学成分种类上没有区别,而在含量上却相差很大。

表2 10批茜草饮片相似度计算

样品	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	对照
S1	1.000	0.999	0.975	0.999	0.988	0.809	0.97	0.962	0.833	0.928	0.987
S2	0.999	1.000	0.974	0.987	0.808	0.972	0.962	0.996	0.835	0.931	0.987
S3	0.975	0.974	1.000	0.989	0.822	0.979	0.969	0.977	0.861	0.939	0.989
S4	0.988	0.987	0.989	1.000	0.812	0.972	0.962	0.986	0.837	0.93	0.988
S5	0.809	0.808	0.822	0.812	1.000	0.814	0.907	0.809	0.722	0.781	0.824
S6	0.97	0.972	0.979	0.972	0.814	1.000	0.967	0.976	0.875	0.951	0.987
S7	0.962	0.962	0.969	0.962	0.907	0.967	1.000	0.961	0.85	0.928	0.977
S8	0.996	0.996	0.977	0.986	0.809	0.976	0.961	1.000	0.839	0.937	0.988
S9	0.833	0.835	0.861	0.837	0.722	0.875	0.85	0.839	1.000	0.919	0.863
S10	0.928	0.931	0.939	0.93	0.781	0.951	0.928	0.937	0.919	1.000	0.949
对照	0.987	0.987	0.989	0.988	0.824	0.987	0.977	0.988	0.863	0.949	1.000

4 结果与讨论

4.1 提取方法的考察

采取了6种方法进行优选①甲醇超声提取;②甲醇浸泡过夜后超声提取;③甲醇索氏提取;④75%乙醇加热回流提取;⑤95%乙醇加热回流提取;⑥甲醇浸泡过夜,超声,酸水解提取(药典方法),结果表明以出峰数目、峰形和大小及方法的简易程度为指标来进行优选,以甲醇超声30 min为最佳。

4.2 流动相的选择

筛选了甲醇-水,甲醇-酸水,乙腈-水,乙腈-酸水,并尝试了多种梯度洗脱程序,结果表明乙腈-三氟乙酸水系统的分离度好,保留时间稳定,另外从色谱柱与仪器的安全性考虑,选用了出峰最多且峰形最好的乙腈-0.1%三氟乙酸水系统作为流动相。

4.3 检测波长的考察

通过PDA检测器对样品进行波长210~440 nm扫描,综合比较信号强度,峰形,峰数,基线平整度,选择了240 nm作为检测波长。

4.4 相似度差异评价

经中药色谱指纹图谱相似

度评价系(2004)A版对所测数据进行分析,10批茜草样品中大多数相似度>90%,与指纹图谱的相似范围在0.949~0.989,只有样品5和样品9与对照指纹图谱的差异较大。由于未对这10批药材进行药效学的研究,故无法就其质量的优劣作出确切的定论。因此,应在深入研究茜草指纹图谱与药效的关系上,进一步完善其指纹图谱的研究。

[参考文献]

- [1] 中国药典.一部[S].2010.
- [2] 《中华本草》编委会.中华本草[M].上海:上海科学技术出版社,1999.
- [3] 浦益琼,王冰,张彤,等.茜草提取物中大叶茜草素测定的方法研究[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(6):94.
- [4] 司南,杨健,王宏洁,等.液相色谱方法分析茜草中遗传毒性成分Lucidin及其苷[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(6):88.
- [5] 周玉新.中药指纹图谱研究技术[M].北京:化学工业出版社,2001.

[责任编辑 蔡仲德]