HPLC法测定茜草饮片中大叶茜草素的含量

薛丽[1,2], 陈世忠[2], 索菲娅[3], 杨波[1*]

(1. 中国科学院武汉植物园, 武汉 430074; 2. 北京大学药学院天然药物学系, 北京 100083;
3. 新疆大学生命科学与技术学院, 乌鲁木齐 830046)

摘要 目的: 建立高效液相色谱法测定茜草饮片中大叶茜草素的含量, 并对 26份茜草饮片中大叶茜草素的含量进行测定。方法: 采用 Gracesmart RP C_{18}柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-水(80∶20), 流速 1.0 mL·min^{-1}, 柱温 40 ℃, 检测波长为 270 nm。结果: 大叶茜草素的线性范围为 0.11~0.98 μg, 相关系数为 0.9995, 平均回收率(n=9)为 97.9%。结论: 本方法简单、快速, 重复性好, 可以作为茜草饮片中大叶茜草素的含量测定方法。本研究为合理制定茜草饮片的质量标准提供数据支持。

关键词: 大叶茜草素; 茜草饮片; 高效液相色谱法; 含量测定

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2009)03-0363-04

HPLC determination of rubimaillin in Chinese herbal pieces of Radix et Rhizoma Rubiae

XUE Li[1,2], CHEN Shi-zhong[2], SUO Fei-ya[3], YANG Bo[1*]

(1. Wuhan Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430074, China;
2. School of Pharmaceutical Sciences, Peking University Health Science Center, Beijing 100083, China;
3. School of Life Sciences and Technology, Xinjiang University, Urumqi 830046, China)

Abstract **Objective** To develop a new HPLC method to determine the content of rubimaillin in Chinese herbal pieces of Radix et Rhizome Rubiae. **Methods** Gracesmart RP C_{18} (4.6 mm×250 mm, 5 μm) column was employed with methanol-water (80∶20) as mobile phase, the flow rate was 1.0 mL·min^{-1}, the column temperature was set at 40 ℃, and detection wavelength was set at 270 nm. **Results** The linear range of rubimaillin was 0.11-0.98 μg, the correlation coefficient was 0.9995 and the average recoveries (n=9) was 97.9%. **Conclusion** The method is simple, rapid and reliable, which can be regarded as a reasonable method for determining the content of rubimaillin in Chinese herbal pieces of Radix et Rhizome Rubiae. The results can be supported as data bases for developing quality specification of Chinese herbal pieces of Radix et Rhizome Rubiae.

Key words rubimaillin; Radix et Rhizome Rubiae; Chinese herbal pieces; HPLC; determination

茜草(*Rubia cordifolia* L.)为茜草科植物茜草的根及根茎, 是常用中药, 始载于《神农本草经》[1]。茜草主要含蒽醌类、萘醌类、环己肽类、三萜类和多糖等成分[2]。具有凉血、止血、祛瘀、通经之功效, 被广泛应用于治疗吐血、衄血、跌打肿痛、经闭瘀阻等症[3]。全国几乎都有茜草分布, 其中河北、山西、山东、陕西和河南等省为茜草的主要产地, 质佳量多, 销往全国[1]。随着中药茜草的研究和应用日益深入, 建立合理有效的质量控制方法对茜草药材及饮片和中成药的质量控制是十分重要的。

大叶茜草素(rubimaillin)是茜草中的主要活性成分之一, 中国药典 2005年版一部中"茜草"药材项下收载了大叶茜草素的含量测定方法[3], 本研究在此基础上进一步优化色谱条件, 建立了新的高效液相色谱含量测定方法, 并对 26份茜草药材饮片进行了含量测定, 为评价国内市售的茜草饮片质量现状提供了科学依据。

* 通讯作者 Tel: (027) 87510687; E-mail: yangbo@rose.whiob.ac.cn

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1　仪器与试药

岛津 LC-10A液相色谱系统: LC-10ADvp泵; CTO-10ASvp柱温箱; SIL-10ADvp自动进样器; 光电二极管阵列检测器; DGU-14A 自动脱气机, LCsolution色谱工作站。超声波振荡清洗仪 (D-78224)为德国 ELMA 公司产品。

大叶茜草素对照品由中国药品生物制品检定所提供, 批号: 110884-200604(含量测定用); 甲醇、乙腈、异丙醇、甲酸、四氢呋喃均为分析纯, 由北京化工厂提供; 水为超纯水。

26份茜草药材饮片均为市售品。饮片炮制法均是将茜草采收后除去杂质, 洗净, 润透, 切厚片或段, 干燥即得。所有药材饮片均由陈世忠副教授鉴定为茜草属植物茜草 (*Rubia cordifolia* L.)的根及根茎。

2　方法与结果

2.1　溶液制备

2.1.1　对照品溶液　精密称取大叶茜草素 2.72 mg, 置 50 mL量瓶中, 先用少量甲醇溶解, 再加甲醇定容至刻度, 摇匀, 即得。使用前以 0.45 μm 微孔滤膜过滤。

2.1.2　供试品溶液　首先使用小型粉碎机将茜草药材粉碎成细粉 (符合中国药典 2005年版一部凡例: XII要求), 精密称取茜草药材细粉 0.200 g, 置具塞锥形瓶中, 加入甲醇 25 mL, 称定重量并放置过夜。次日, 超声提取 (功率 80 W, 频率 70 kHz) 30 min, 放冷后补重, 摇匀, 即得。使用前以 0.45 μm 微孔滤膜过滤。

2.2　色谱条件及适用性研究　色谱柱: Gracesmart RP C_{18}柱 (4.6 mm×250 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-水 (80:20), 流速 1.0 mL·min^{-1}, 柱温 40 ℃, 检测波长为 270 nm。在此色谱条件下, 药材中其他色谱峰对大叶茜草素峰无干扰, 理论塔板数大于 10000, 峰形尖锐, 基线平稳。色谱图见图 1-A、B。

2.3　线性关系考察　分别精密吸取对照品溶液 2, 6, 10, 14, 18 μL, 注入液相色谱仪中, 按上述色谱条件测定。求得大叶茜草素的进样量 X (μg)与峰面积 Y的线性。回归方程为:

$$Y = 4.90\times10^{6}X - 7.87\times10^{4} \quad r = 0.9995$$

线性范围为 0.11~0.98 μg。

2.4　精密度试验　精密吸取供试品溶液 10 μL, 连续进样 5次, 按上述色谱条件测定峰面积, 计算大叶茜草素峰面积的 RSD值 (n = 5)为 0.76%。表明仪器精密度良好。

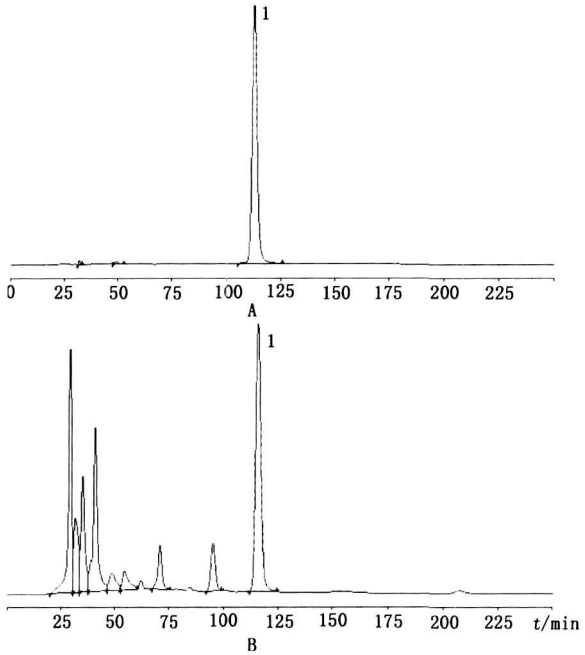

图 1　对照品 (A) 及 1号茜草样品 (B) 色谱图

Fig 1　HPLC chromatograms of reference substances (A) and No. 1 Radix et Rhizoma Rubiae sample (B)

1. 大叶茜草素 (rubiamallin)

2.5　稳定性试验　精密吸取供试品溶液 10 μL, 按上述色谱条件在 8 h内每隔 1 h进样 1次, 测定峰面积, 计算大叶茜草素峰面积的 RSD 值 (n = 9)为 1.4%。表明供试品溶液在 8 h内稳定。

2.6　重复性试验　取茜草粉末 0.200 g, 共 5份, 分别置具塞锥形瓶中。按"2.1.2"项下的方法制备供试品溶液, 每份供试品溶液进样 3次, 依上述色谱条件分别测定其含量。5份样品中大叶茜草素平均含量为 0.518%, RSD值为 1.1%, 说明方法重复性良好。

2.7　加样回收率试验　取"2.6"项下已测知含量的药材粉末约 0.100 g, 共 9份, 精密称定, 分别置具塞锥形瓶中, 平均分成 3组, 每组分别精密加入新配制的大叶茜草素对照品溶液 (0.12 mg·mL^{-1}) 1, 2, 4 mL, 即相当于药材中大叶茜草素含量的 0.5倍、1倍和 2倍量, 混合均匀, 并挥去溶剂。按照"2.1.2"项下的方法制备所需溶液。在上述色谱条件下分别进样 10 μL, 测定含量, 计算加样回收率。大叶茜草素低、中、高 3种加样回收率 (n = 3)分别为 95.8% (RSD = 0.3%), 98.1% (RSD = 1.2%), 99.9% (RSD = 1.4%), 符合规定。

2.8　样品含量测定　取 26份茜草饮片, 按照"2.1.2"项下的方法制备成供试品溶液。在上述色谱条件下测定, 进样量 10 μL, 以外标法计算各批药材饮片中大叶茜草素的含量, 结果见表 1。

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

表 1 样品信息(%, n = 3)

Tab 1 A summary of tested samples

样品编号 (sample No.)	购入地点 [origins (the purchased places)]	产地 (habitats)	大叶茜草素 (rubiaillin) /%
1	江苏无锡市中华药店 (Zhonghua drugstore, Wuxi, Jiangsu province, China)	山西 (Shanxi)	0.542
2	四川成都海上星辰药店 (Haishangxingchen drugstore, Chengdu, Sichuan province, China)	四川 (Sichuan)	0.438
3	武汉武昌刘有余药堂有限责任公司 (Liuyouyu medicine Ltd., Wuhan, Hubei province, China)	不详 (unknown)	0.416
4	河南周口零售药店 (retailed Drugstore, Zhoukou, Henan province, China)	河南 (Henan)	0.488
5	江西省赣州市张家大道 158号 (The great road of Zhangjia, number 158, Ganzhou, Jiangxi province, China)	江西 (jiangxi)	0.325
6	天津宝坻中西药店 (Baodi Chinese and western medicine drugstore, Tianjin, China)	不详 (unknown)	0.058
7	陕西西安惠仁中医药研究所 (Huiren medical institute, Xi'an, Shaanxi province, China)	陕西 (Shaanxi)	0.651
8	北京兴事堂药店 (Xingshitang drugstore, Beijing, China)	河北 (Hebei)	0.114
9	江苏姜堰市健康药店 (Health drugstore, Jiangyan, Jiangsu province, China)	江苏 (Jiangsu)	0.621
10	新疆乌鲁木齐安仁大药房 (Anren drugstore, Urumqi, Xinjiang province, China)	新疆 (Xinjiang)	0.322
11	青海师范大学校医院 (College hospital of Qinghai normal school, Qinghai province, China)	青海 (Qinghai)	0.261
12	河北石家庄健仁堂药店 (Jianrentang drugstore, Shijiazhuang, Hebei province, China)	河北 (Hebei)	0.814
13	上海市徐江区雷允上药店凌云路店 (Leiyunshang drugstore in the Linyun road of Xujiang district, Shanghai, China)	江苏 (Jiangsu)	0.878
14	济南市中圣邦药店 (Zhongshengbang drugstore, Jinan, Shandong province, China)	山东 (Shandong)	0.554
15	陕西汉中药店 (Hanzhong drugstore, Shaanxi province, China)	不详 (unknown)	0.023
16	辽宁沈阳市维康大药店 (Weikang drugstore, Shenyang, Liaoning province, China)	不详 (unknown)	0.252
17	兰州市光明药店 (Guangming drugstore, Lanzhou, Gansu province, China)	河南 (Henan)	0.328
18	湖北黄岗太和春药店 (Taihechun drugstore, Huanggang, Hubei province, China)	不详 (unknown)	0.022
19	陕西礼泉县兴礼药店 (Xingli drugstore, Liquan, Shaanxi province, China)	不详 (unknown)	0.352
20	新疆乌鲁木齐市同心堂药店 (Tongxintang drugstore, Urumqi, Xinjiang province, China)	陕西 (Shaanxi)	0.446
21	新疆克拉玛依市中西药店 (Chinese and western medicine drugstore, Kelamayi, Xinjiang province, China)	新疆 (Xinjiang)	0.413
22	大连泛美药品零售有限公司 (Farmei medicine retailed Ltd., Dalian, China)	河北 (Hebei)	0.466
23	新疆塔城普济堂药店 (Pujitang drugstore, Tacheng, Xinjiang province, China)	新疆 (Xinjiang)	0.284
24	四川成都成华区第二人民医院 (The second hospital of the People, Chengdu, Sichuan province, China)	四川 (Sichuan)	0.461
25	四川杏林医药连锁建设店 (Jianshe medicine catenation drugstore, Xinglin, Sichuan province, China)	四川 (Sichuan)	0.351
26	湖北同济堂药店 (Tongjitang drugstore, Wuhan, Hubei province, China)	湖北 (Hubei)	0.125

3 讨论

3.1 本文采用中国药典 2005年版一部"茜草"药材项下的方法处理茜草饮片,并对液相色谱条件进行了相应的优化,分别考察了甲醇 - 0.2% 甲酸 (80:20)、甲醇 - 乙腈 - 0.2% 甲酸 (35:35:30)、乙腈 - 水 (65:35)、甲醇 - 异丙醇 - 水 (2:1:1)、甲醇 - 水 - 四氢呋喃 (310:90:3)、甲醇 - 水 (80:20)等流动相,结果表明:甲醇 - 水 (80:20)具有流动相组成简单、分离度大(大于 5)、色谱峰对称 (拖尾因子小于 1.05)、理论塔板数大(大于 10000)等优点。

3.2 本研究比较了 3种品牌的色谱柱:即迪马 Diamonsil™ C_{18}柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm)、Unimet-

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

rics UMX C_{18}柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm)和 Gracesmart RP C_{18}柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm)。结果使用迪马 Diamonsil™ C_{18}柱和 Unimetrics UMX C_{18}柱时,大叶茜草素的保留时间较长(大于 30 min),如果降低流动相的极性,则容易产生杂质峰干扰;采用 Gracesmart RP C_{18}柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm)具有分析时间短[(11.5±1) min]、重复性好、柱效高、无杂质峰干扰等优点,故本研究选用 Gracesmart RP C_{18}色谱柱。

3.3 国内文献报道均采用 250 nm[3~8]左右的检测波长测定大叶茜草素,通过对大叶茜草素紫外吸收波长的测定表明:大叶茜草素在 270 nm 附近有最大吸收,在此波长下,供试品中大叶茜草素峰形尖锐,且无其他色谱峰干扰,基线平稳,适合作为含量测定的检测波长。

3.4 本文建立了新的 HPLC法,并测定了从全国各地药店收集的 26份商品茜草饮片中大叶茜草素的含量。结果表明:商品茜草饮片中大叶茜草素含量最低低于 0.05%,最高高于 0.85%。最低含量与最高含量相差 17倍之多,显示市售茜草饮片质量参差不齐,应引起我们的高度重视。

参考文献

1 CHEN Si-bao (陈四保), FENG Rui-zhi (冯瑞芝), CHEN Bi-zhu (陈碧珠), *et al*. A study on the medicinal plants of genus Rubia. I. Botanical origins and resource of Chinese traditional drug "Qian Cao" (Madder) (茜草属药用植物的研究. I 中药茜草的原植物与国内资源). *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 1991, 3(4): 8

2 YANG Nian-yun (杨念云), TIAN Li-juan (田丽娟). Study on chemical composition of Rubia cordifolia L. and its pharmacologic action (茜草属植物的化学成分和药理作用). *World Phytomed* (国外医药植物药分册), 2005, 20(2): 53

3 ChP (中国药典). 2005. Vol I (一部): 162

4 LI Jing-wei (李敬伟), LI Hui-chao (李慧超), LI Jing-zhi (李敬芝), *et al*. Determination of mollugin in Bateriiqiwei pills by RP-HPLC (高效液相色谱法测定巴特日七味丸中大叶茜草素含量). *Chin Pharm Aff* (中国药事), 2005, 19(4): 222

5 QI Xiao-peng (齐校鹏), LI Chang-xin (李长新). Determination of rubimaillin content in nasosiusitis pill by HPLC (高效液相色谱法测定鼻渊丸中大叶茜草素的含量). *Heilongjiang Med J* (黑龙江医药), 2005, 18(5): 328

6 WANG Ke-ying (王克英), HU Qi-zhi (胡奇志). Determination of mollugin in compound Xueteng Shangtong liquid by HPLC (HPLC法测定复方血藤伤痛液中大叶茜草素的含量). *Chin Pharm Aff* (中国药事), 2004, 18(11): 676

7 SUO Fei-ya (索菲娅), WANG Hong (王弘), CHEN Shi-zhong (陈世忠). Determination of rubimaillin in *Rubia cordifolia* L. from different collecting time (不同采收期茜草中大叶茜草素含量的动态研究). *Chin Traitl Pat Med* (中成药), 2001, 28(10): 1499

8 MO Rigengao-wa (莫日根高娃), TU Ya (图雅), HA Sigao-wa (哈斯高娃). Determination of mollugin in Mingmu twenty-five ingredients pill by HPLC (HPLC法测定明目二十五味丸中大叶茜草素的含量). *Drug Stand China* (中国药品标准), 2003, 4(6): 22

(本文于 2008年 9月 5日修改回)

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net