

2.9 加样回收率试验 见表 2。分别精密称取已知含量为 0.813 mg·g⁻¹ 的样品 0.2 g，分别精密加入天麻素对照品溶液(7.51 mg·mL⁻¹)20 mL，即 0.1502 mg，按“2.3”项下方法制备溶液，测定其峰面积，进行计算回收率。结果平均回收率为 99.4 %，RSD=2.52 % (n=6)。

表 2 天麻素加样回收率试验结果(n=6)

Table 2 Results of recovery test for gastrodin						
试验 序号	样品含量 /mg	对照品加 入量 /mg	测定总量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
1	0.1719	0.1502	0.3241	101.3	99.4	2.52
2	0.1611	0.1502	0.3107	99.60		
3	0.1663	0.1502	0.3097	95.47		
4	0.1620	0.1502	0.3156	102.3		
5	0.1759	0.1502	0.3225	97.60		
6	0.1633	0.1502	0.3138	100.2		

2.10 样品测定 见表 3。按拟定的含量测定方法测定 3 批样品中天麻素的含量。

表 3 样品含量测定结果

Table 3 Content determination results of samples		
序号	批号	天麻素 /mg
1	131001	0.174
2	131002	0.171
3	131003	0.165

注：所测结果为每粒天麻定眩胶囊中天麻素的含量。

3 讨论

采用《中华人民共和国药典》(一部)2010 年版中天麻药材含量测定项下流动相进行测定时，天麻素峰与相邻杂质峰分离度小于 1.5，不符合要求；对流

动相中的有机相乙腈的比例进行调整，天麻素峰与相邻杂质峰均不能达到基线分离；故将有机相更改为甲醇，仍然无法将天麻素峰与相邻杂质峰有效分离；再将有机相改为乙腈与甲醇配比，当两者与 0.05 %磷酸溶液比例为 1：2：97 时，天麻素峰与相邻杂质峰的分离度可达 2.0 以上，主峰保留时间适中，色谱峰峰形对称性好，理论板数按天麻素峰计算可达 5000 以上。

采用超声法提取天麻定眩胶囊中所含的天麻素时，由于组方较为复杂，测定干扰较大，天麻素与相邻杂质分离效果不理想^[3-6]。因此将本品过中性氧化铝柱，并以 80 %甲醇为洗脱溶剂，以除去干扰杂质。结果表明本法有效地减少了供试品液中的杂质量，使天麻素的测定不受干扰，方法可行。

方法学研究结果表明，本法操作简便，结果准确，重复性好，能有效控制天麻定眩胶囊的质量。

参考文献：

[1] 李继英. 定眩止晕汤[J]. 江苏中医药, 2011, 43(6): 14.
[2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 (一部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 54.
[3] 周立, 万丽, 叶娉, 等. 加味天麻胶囊中天麻素的含量测定[J]. 湖南中医药大学学报, 2007, 27: 245-246.
[4] 刘平, 智冰冰. 高效液相色谱法测定天麻片中天麻素的含量[J]. 河南中医学院学报, 2008, 11(6): 32-33.
[5] 刘建康, 黄伟, 杨艺. 不同提取方法研究天麻中天麻素的含量[J]. 亚太传统医药, 2009, 5(10): 20-23.
[6] 陈运玖, 赵亮, 周文. HPLC 测定静痛灵胶囊中天麻素的含量[J]. 食品与药品, 2010, 12(3): 112-114.

(编辑：邓响潮)

茜草中大叶茜草素、羟基茜草素含量测定方法优化的实验研究

林文华¹, 朱喜梅¹, 严 萍¹, 詹若挺¹, 潘华峰², 刘翠婷¹, 张 洁¹(1. 广州中医药大学中药资源科学与工程研究中心、岭南中药资源教育部重点实验室, 广东 广州 510006; 2. 广州中医药大学, 广东 广州 510006)

摘要：目的 优化茜草中大叶茜草素、羟基茜草素的 HPLC 含量测定方法。**方法** 采用 LUBEX Ecosil C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm)，流动相为甲醇-乙腈-0.05 %磷酸水(25：50：25)，流速 1.0 mL·min⁻¹，检测波

收稿日期：2013-11-04

作者简介：林文华，女，硕士研究生，研究方向：中药质量评价新技术、新方法。Email: lwh6436@163.com。通讯作者：严萍，副研究员，研究方向：中药质量评价研究。Email: yeyyp22@163.com。潘华峰，研究员，研究方向：中医院特色医疗发展与社区卫生管理。Email: gzphf@gzuem.edu.cn。

基金项目：教育部 2011 年博士点基金(20114425120010)；广东省教育部科技部产学研结合项目(2011A091000005)。

长为 250 nm。结果 大叶茜草素和羟基茜草素分别在 19.34 ~ 161.20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($r=0.9999$) 和 12.16 ~ 101.30 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($r=0.9999$) 范围内呈良好线性, 平均回收率分别为 97.27 % (RSD=1.91 %) 和 100.00 % (RSD=1.87 %)。结论 该方法操作简单, 重复性好, 可作为茜草中大叶茜草素和羟基茜草素的含量测定方法, 为合理制定茜草的含测方法提供参考。

关键词: 茜草; 大叶茜草素; 羟基茜草素; 含量测定

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 1003-9783(2014)03-0345-04

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2014.03.027

Experiment Research on Optimization of Determination Method for Rubimaillin and Purpurin in Radix Rubiae

LIN Wenhua¹, ZHU Ximei¹, YAN Ping¹, ZHAN Ruoting¹, PAN Huafeng², LIU Cuiting¹, ZHANG Jie¹ (1. Research Center of Chinese Herbal Resource and Engineering, Ministry of Education Key Laboratory of Lingnan Chinese Medicinal Resource, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006 Guangdong, China; 2. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006 Guangdong, China)

Abstract: Objective To optimize the HPLC method for determining the content of rubimaillin and purpurin in Radix Rubiae. **Methods** LUBEX Ecosil C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) was used with methanol-acetonitrile-0.05 % phosphoric acid solution as the mobile phase, the flow rate was 1.0 mL·min⁻¹ and the PDA detective wavelength was set at 250 nm. **Results** The rubimaillin had a good linearity between 19.34~161.20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($r=0.9999$), the purpurin showed a good linearity within the range of 12.16 ~ 101.30 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($r=0.9999$), and the recovery rates of rubimaillin and purpurin were 97.27 % (RSD=1.91%) and 100.00 % (RSD=1.87 %), respectively. **Conclusion** The method is simple, reproducible and stable, which can be used as the content determination method of rubimaillin and purpurin in Radix Rubiae.

Keywords: Radix Rubiae; Rubimaillin; Purpurin; Content determination

茜草为茜草科植物茜草 *Rubia cordifolia* L. 的干燥根和根茎, 主治吐血、衄血、外伤出血、风湿痹痛等。主要含有蒽醌、萘醌及其苷类, 环己肽类、萜类等^[1], 《中华人民共和国药典》2010 年版一部中, 茜草含量测定项下主要以大叶茜草素、羟基茜草素为检测指标, 其中羟基茜草素为 2010 年版新增的检测项目, 需通过提取、蒸干、溶解、水解、碱化等多个步骤, 方法步骤较为繁琐, 检测历时较长, 另外样品蒸干后难以将提取物完全转移^[2-3], 因此本研究主要对茜草的含量测定方法进行优化, 简化样品前处理方法, 建立一种简便、快速、准确的含量测定方法。

1 仪器与材料

1.1 仪器 HPLC- 高效液相色谱仪 (e2695 四元泵自动进样系统、2998 二极管阵列检测器、Empower 化学工作站), 美国 Waters 公司; Milli-Q 超纯水系统,

法国 Millipore 公司; Sartorius BS224S 电子分析天平, 德国赛多利斯公司; XR205SM-DR 电子天平, 瑞士 Precisa 公司; PTHW 型恒温电热套。

1.2 试药 茜草, 共 10 批, 经广州中医药大学詹若挺研究员鉴定为正品茜草 (*Rubia cordifolia* L.); 大叶茜草素对照品 (批号: 110884-200203)、羟基茜草素对照品 (批号: 111898-201101), 中国生物制品检定所; 甲醇、乙腈, 色谱纯, 德国 Merck 公司; 水为超纯水, 自制; 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱为 LUBEX Ecosil C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相为甲醇-乙腈-0.05 % 磷酸水 (25:50:25, V/V/V); 流速为 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长为 250 nm; 进样量为 10 μL 。

2.2 对照品溶液制备 称取大叶茜草素对照品约 8 mg, 精密称定, 置 10 mL 容量瓶中, 加甲醇溶解至刻度,

摇匀, 制得浓度为 $0.806 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的大叶茜草素储备液。另称取羟基茜草素对照品约 10 mg , 精密称定, 置 20 mL 容量瓶中, 加甲醇溶解至刻度, 摇匀, 制得浓度为 $0.5065 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的羟基茜草素储备液。再精密吸取上述储备液适量, 加甲醇制成含大叶茜草素 $0.0967 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、羟基茜草素 $0.0405 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的混合标准溶液。

2.3 供试品溶液制备 取本品粉末约 0.5 g , 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 加入甲醇-25 % 盐酸(4:1)混合溶液 100 mL , 加热回流 30 min , 冷却, 用甲醇-25 % 盐酸(4:1)混合溶液补足减失质量, 滤过, 精密吸取续滤液 20 mL , 加入 4 mL 三乙胺, 摇匀, 转移至 25 mL 容量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.4 系统适应性试验 取适量供试品溶液和对照品溶液, 在上述色谱条件下进行测定, 记录色谱图, 考察系统适应性, 结果见图 1。供试品色谱与对照品色谱在相同时间上有对应的吸收峰, 表明系统适应性良好。

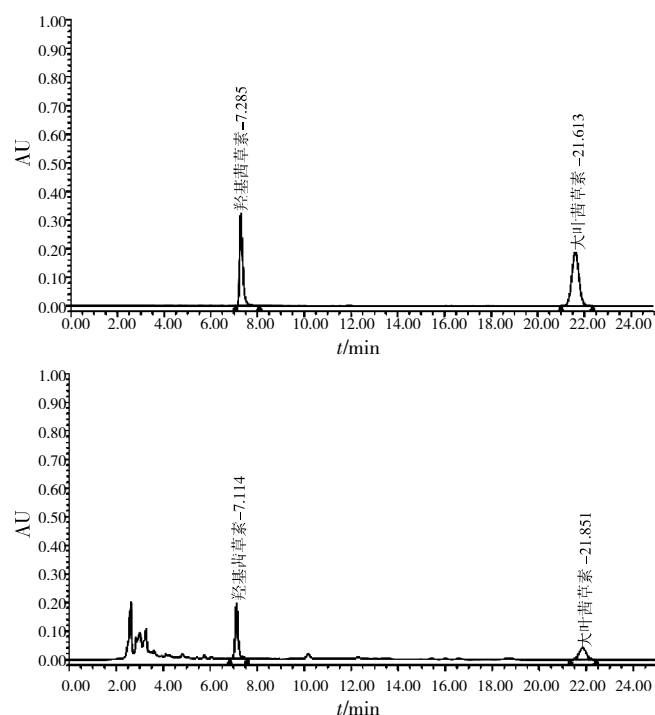


图 1 对照品和供试品溶液 HPLC 图谱

Figure 1 High pressure liquid chromatograms of the reference and sample

2.5 线性关系考察 取已知浓度的混合对照品溶液, 加甲醇分别稀释成不同浓度的溶液: ① $19.34 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的大叶茜草素, $12.16 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的羟基茜草素;

② $25.79 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的大叶茜草素, $16.21 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的羟基茜草素; ③ $38.69 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的大叶茜草素, $24.31 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的羟基茜草素; ④ $51.58 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的大叶茜草素, $32.42 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的羟基茜草素; ⑤ $96.72 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的大叶茜草素, $60.78 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的羟基茜草素; ⑥ $128.96 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的大叶茜草素, $81.04 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的羟基茜草素; ⑦ $161.20 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的大叶茜草素, $101.30 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的羟基茜草素。精密吸取各对照品溶液 $10 \text{ } \mu\text{L}$, 注入液相色谱仪。按 2.1 项下色谱条件测定峰面积, 并以峰面积(Y)为纵坐标, 浓度(X)为横坐标, 绘制标准曲线并进行线性回归计算, 得大叶茜草素回归方程为 $Y=36279X-7037.8(r=0.9999)$; 羟基茜草素的回归方程为 $Y=77310X-223822(r=0.9999)$, 表明大叶茜草素在 $19.34 \sim 161.20 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 羟基茜草素在 $12.16 \sim 101.30 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内呈良好线性。

2.6 重复性试验 取同一批茜草饮片(批号: 20130303-1)6 份, 按 2.3 项下的方法平行制备, 测得大叶茜草素平均含量为 1.07% , $\text{RSD}=1.71 \%$, 羟基茜草素为 0.64% , $\text{RSD}=1.82 \%$, 表明该方法重复性良好。

2.7 精密度试验 精密吸取 2.3 项下的同一份供试品溶液 $10 \text{ } \mu\text{L}$, 按 2.1 项下色谱条件重复连续进样 6 次, 测得大叶茜草素平均峰面积为 1678446 , RSD 为 0.73% ; 羟基茜草素平均峰面积为 1635960 , RSD 为 1.07% 。

2.8 稳定性试验 取 2.3 项下同一份供试品溶液分别于 0, 4, 8, 12, 16, 20, 24 h 进样 $10 \text{ } \mu\text{L}$, 测得大叶茜草素平均峰面积为 1673471 , RSD 为 0.44% ; 羟基茜草素平均峰面积为 1666130 , RSD 为 1.24% , 表明供试品溶液在 24 h 内基本稳定。

2.9 加样回收率试验 取上述已知含量的茜草(批号: 20130303-1)6 份, 取约 0.25 g (已知含大叶茜草素约 2.68 mg , 羟基茜草素约 1.59 mg), 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 分别精密加入大叶茜草素对照品约 2.68 mg , 羟基茜草素约 1.57 mg , 按 2.3 项下方法平行制备, 按 2.1 项下色谱条件测定, 计算回收率, 结果见表 1、表 2, 平均回收率分别为 97.27% ($\text{RSD}=1.9 \%$) 和 100.00% ($\text{RSD}=1.87 \%$) 表明该方法准确度良好。

2.10 样品含量测定 按照 2.1 项下方法制备供试品溶液, 对 10 批样品进行测定, 与按照《中华人民共和国药典》方法测定的结果进行比较, 结果表明本法提取率高于《中华人民共和国药典》方法, 见表 3。

表 1 茜草中大叶茜草素加样回收测定结果(n=6)

Table 1 Recovery of rubimaillin from <i>Rubia cordifolia</i> L.							
序号	称样量/g	样品含量/mg	对照品加入量/mg	实测量/mg	回收率%	平均	RSD/%
1	0.2503	2.6846	2.6763	5.2637	96.37	97.27	1.91
2	0.2507	2.6888	2.6763	5.2723	96.53		
3	0.2507	2.6888	2.6763	5.2448	95.51		
4	0.2503	2.6846	2.6763	5.2512	95.90		
5	0.2503	2.6846	2.6763	5.3303	98.86		
6	0.2500	2.6813	2.6763	5.3692	100.43		

表 2 茜草中羟基茜草素加样回收测定结果(n=6)

Table 2 Recovery of purpurin from <i>Rubia cordifolia</i> L.							
序号	称样量/g	样品含量/mg	对照品加入量/mg	实测量/mg	回收率%	平均	RSD%
1	0.2503	1.5907	1.5650	3.2060	103.21	100.00	1.87
2	0.2507	1.5933	1.5650	3.1809	101.45		
3	0.2507	1.5933	1.5650	3.1381	98.71		
4	0.2503	1.5907	1.5650	3.1400	98.99		
5	0.2503	1.5907	1.5650	3.1468	99.43		
6	0.2500	1.5888	1.5650	3.1256	98.20		

表 3 茜草含量测定结果

Table 3 Content of rubimaillin and purpurin from different batches of <i>Rubia cordifolia</i> L.								
编号	批号	产地	大叶茜草素%		羟基茜草素%		总量%	
			本法	药典法	本法	药典法	本法	药典法
1	120816	陕西	0.61	0.50	0.67	0.20	1.28	0.70
2	120903	安徽	0.78	0.61	0.86	0.26	1.64	0.87
3	120627	陕西	0.75	0.55	0.86	0.26	1.61	0.81
4	13011702	湖北	0.60	0.52	0.68	0.23	1.28	0.75
5	13041496	云南	0.57	0.50	0.73	0.25	1.30	0.75
6	20130303-1	河北	1.07	0.63	0.64	0.39	1.71	1.02
7	20130502	陕西	1.33	0.69	0.71	0.38	2.04	1.07
8	20130220-1	山东	1.03	0.61	0.86	0.47	1.89	1.08
9	20130303-2	安徽	1.61	1.17	0.73	0.36	2.34	1.53
10	20130220-2	河南	1.19	0.87	0.85	0.29	2.04	1.16

3 讨论

本研究通过实验改进了大叶茜草素及羟基茜草素的提取方法，采用甲醇-25 % HCl 直接加热回流，简化了操作步骤，减少了操作误差；实验结果表明（表 3），本实验方法提取率明显高于《中华人民共和国药典》方法。

提取溶剂考察了甲醇、乙醇、水、酸性溶剂的提取率^[4-5]，发现前三者提取所得的供试品中只有大叶茜草素，无羟基茜草素。羟基茜草素为羟基蒽醌类成分，一般羟基蒽醌类衍生物及其相应的苷类在植物体内多通过酚羟基或羧基结合成镁、钾、钠、钙盐形式存在，为充分提取出蒽醌类衍生物，必须

预先加酸酸化使之全部游离后再行提取，故选用酸性溶剂作为提取溶剂^[6-7]。酸性溶剂考察了 14 %、10 %、6 %、2 % 盐酸甲醇溶液及甲醇-25 % HCl (4 : 1)，结果显示，大叶茜草素的提取率依次为 0.92 %、0.93 %、0.92 %、0.93 %、0.93 %，羟基茜草素的提取率依次为 0.54 %、0.52 %、0.48 %、0.41 %、0.56 %，表明甲醇-25 % HCl (4 : 1) 的提取效率最高。

比较了超声和加热回流两种不同提取方法，结果两种方法对大叶茜草素的提取率差异不大，但加热对羟基茜草素的提取率较高，故提取方法选用加热回流。另外，比较溶剂用量，提取次数以及是否浸泡过夜，结果以 100 mL 溶剂加热回流 30 min 效果最佳，浸泡过夜对提取率影响不大，故无需浸泡。

由于考虑到色谱柱所能承受的 pH 范围有限，同时，为弃除溶剂中剩余的 Cl⁻，参考药典方法，最后需加入三乙胺。当三乙胺加入量为 2，3，4 mL 时，溶液 pH 分别为 0.03，0.26，2.63，测得大叶茜草素为 0.95 %、0.95 %、0.97 %，羟基茜草素为 0.56 %、0.57 %、0.57 %，即在该范围内，不同 pH 值时所测得的含量差异不大。继续加入三乙胺，当供试品溶液颜色突然加深，由棕黄色变为深红色时，三乙胺加入量约为 4.5 ~ 5 mL，测得 pH > 7，同时所测得的羟基茜草素含量较低，为 0.37 %，故本实验综合考虑色谱柱 pH 范围和检测结果，确定了加入三乙胺的量为 4 mL。

综上所述，优化了茜草中大叶茜草素、羟基茜草素含量测定方法，操作简单，重复性好，为合理制定茜草含量的测量方法提供参考。

参考文献：

[1] 张琳，彭亮，胡本祥. 茜草的化学成分研究进展[J]. 现代中医药，2008，28(2)：52-54.

[2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(1 部)[M]. 北京：中国医药科技出版社，2010：218.

[3] 郭桂明，蔡乐，梁小雨，等. HPLC 法测定茜草饮片中 大叶茜草素和羟基茜草素的含量[J]. 北京中医药，2011，30(7)：541-543.

[4] 陈星，王侃，单鸣秋，等. UPLC 测得茜草炭中 4 中醌类成分的含量[J]. 中国中药杂志，2012，37(19)：2922-2925.

[5] Banyail P, Kuzovkina I N, Kursinszki L, et al. HPLC Analysis of alizarin and purpurin produced by *rubia tinctorum* L. Hairy Root Cultures[J]. Chromatographia, 2006，63：S111-S114.

[6] 陈小全，杨晓东，邵辉莹，等. 超声波作用下提取茜草色素及稳定性实验[J]. 泰山医学院学报，2013，34(3)：173-176.

[7] 吴立军. 天然药物化学[M]. 北京：人民卫生出版社，1988：158.

(编辑：修春)