



UPLC 测定茜草炭中 4 种醌类成分的含量

陈星, 王侃, 单鸣秋, 丁安伟*

(南京中医药大学 江苏省方剂高技术研究重点实验室, 江苏 南京 210046)

[摘要] 目的:建立同时测定茜草炭中异茜草素、羟基茜草素、1,3,6-三羟基-2-甲基蒽醌、大叶茜草素含量的超高效液相色谱法。方法:采用 Acquity BEH_{C18} 色谱柱(2.1 mm×50 mm, 1.7 μm), 流动相为甲醇-0.3% 甲酸溶液, 梯度洗脱, 流速 0.2 mL·min⁻¹, 进样量 2 μL, 柱温 30 ℃, 检测波长 276 nm。结果:异茜草素、羟基茜草素、1,3,6-三羟基-2-甲基蒽醌、大叶茜草素的质量浓度与峰面积分别在 0.69~34.44 mg·L⁻¹(*r*=0.999 9), 0.66~33.2 mg·L⁻¹(*r*=0.999 7), 0.68~34.08 mg·L⁻¹(*r*=0.999 9), 1.07~53.52 mg·L⁻¹(*r*=0.999 9) 呈良好线性; 平均回收率分别为 96.95%, 95.75%, 102.5%, 96.15%, RSD 均小于 3%。结论:该方法简便、快速、准确, 可作为茜草炭质量控制的一个有效方法。

[关键词] 茜草炭; 异茜草素; 羟基茜草素; 1,3,6-三羟基-2-甲基蒽醌; 大叶茜草素; UPLC

茜草为茜草科植物茜草 *Rubia cordifolia* 的干燥根和根茎。茜草炭为茜草的炮制品,《中国药典》2010 年版(一部)所收载的茜草在其炮制项下明确规定茜草炭为茜草片或段、照炒炭法(附录 II D)炒至表面焦黑色^[1]。茜草炭寒性减弱,性变收涩,以止血为主。《十药神书》对茜草炭的描述为“烧炭存性,研极细末,用纸包,碗盖于地上一夕,出火毒”^[2]。现代药理研究表明茜草炭止血作用增强,可能是由于炒炭产生的炭素的收敛和吸附作用降低了毛细血管的通透性,还与炒炭后微量元素和化学成分的变化以及止血成分的增加等因素有关,表现为复钙时间、凝血酶原时间及白陶土部分凝血酶时间缩短^[3]。《中国药典》2010 年版(一部)以大叶茜草素和羟基茜草素的含量来控制茜草药材和饮片的质量标准^[1],但对炮制品茜草炭没有做相应的规定。目前对茜草炭中的化学成分及其含量的研究较少。本实验利用 UPLC 测定茜草炭品中异茜草素、羟基茜草素、1,3,6-三羟基-2-甲基蒽醌、大叶茜草素的含量,为茜草炭饮片质量标准的建立提供理论支持,也为优选茜草炭炮制工艺提供科学依据。

1 材料

Waters AcquityTM ultra-performance liquid chromatography system, 包括:四元溶剂泵,自动进样器,光电二极管阵列检测器(DAD)。数据工作站:MASSLynx v4.1。超声机(昆山禾创超声仪器有限公司, KH-500B); BP211D 1/10 万电子天平(Sartorius)。

异茜草素对照品(批号 110123),羟基茜草素(批号 110124),1,3,6-三羟基-2-甲基蒽醌(批号 110125),均为自制,经 HPLC 检测纯度 >98%,大叶茜草素(批号 110884-200604,中国食品药品检定研究院,供含量测定用)。甲醇,甲酸均为色谱纯,重蒸水自制。茜草炭购买于全国各地,经南京中医药大学吴启南教授鉴定为茜草科植物茜草 *R. cordifolia* 的干燥根和根茎的炮制品茜草炭。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 混合对照品储备液 精密称取对照品异茜草素、羟基茜草素、1,3,6-三羟基-2-甲基蒽醌、大叶茜草素适量,加甲醇溶解,制成异茜草素、羟基茜草素、1,3,6-三羟基-2-甲基蒽醌、大叶茜草素质量浓度分别为 34.44, 33.20, 34.08, 53.52 mg·L⁻¹ 的混合对照品储备液。

2.1.2 供试品溶液 取茜草炭粉末(过 2 号筛)约 0.5 g,精密称定,置于 50 mL 具塞锥形瓶中,精密加入甲醇 10 mL,密塞,称定质量,超声处理(250 W, 40 kHz) 30 min,放冷,称定质量,用甲醇补足失重,静

[稿件编号] 20120326011

[基金项目] 中医药行业科研专项项目资助(201107007)

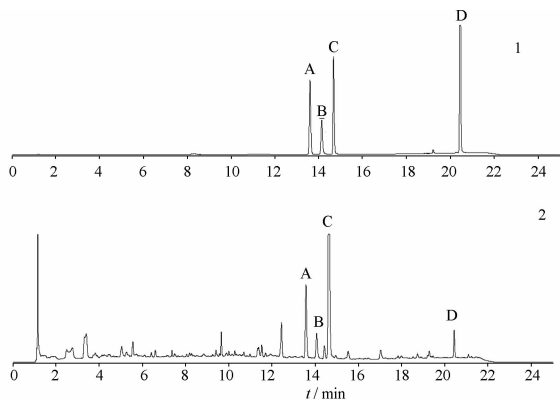
[通信作者] *丁安伟,教授,博士生导师,主要从事中药炮制学及中药复方机制研究, Tel: (025) 85811523, E-mail: awding105@163.com

[作者简介] 陈星,硕士研究生, Tel: 13813843655, E-mail: nanjingchenxing@126.com

置,上清液过 0.22 μm 微孔滤膜,取滤液作为供试品溶液。

2.2 色谱条件及系统适用性试验

Acquity BEH C₁₈ 色谱柱(2.1 mm × 50 mm, 1.7 μm);柱温 30 °C;流动相 A 为 0.3% 甲酸溶液,流动相 B 为甲醇;梯度洗脱,0 ~ 1 min, 90% A, 1 ~ 4 min, 90% ~ 65% A; 4 ~ 9 min, 65% ~ 40% A; 9 ~ 15 min, 40% ~ 30% A; 15 ~ 20 min, 30% ~ 10% A; 20 ~ 22 min, 10% ~ 90% A; 流速 0.2 mL · min⁻¹; DAD 扫描 190 ~ 400 nm, 经选择在 276 nm 下进行测定;进样量 2 μL。色谱图见图 1。



A. 异茜草素; B. 羟基茜草素; C. 1,3,6-三羟基-2-甲基蒽醌; D. 大叶茜草素; 1. 混合对照品; 2. 样品。

图 1 混合对照品与样品的 UPLC 图

Fig. 1 UPLC chromatograms of reference substances and sample

2.3 方法学考察

2.3.1 线性关系考察 分别精密量取混合对照品储备液 0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0 mL 于 5 mL 量瓶中,用甲醇稀释至刻度,摇匀,制得系列混合对照品质量溶液。按上述色谱条件进样测定。以对照品溶液质量浓度 $X(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$ 为横坐标,峰面积 Y 为纵坐标,绘制标准曲线,得异茜草素、羟基茜草素、1,3,6-三羟基-2-甲基蒽醌、大叶茜草素的回归方程,分别为 $Y = 613.59X - 84.71, r = 0.9999$; $Y = 166.43X - 18.14, r = 0.9997$; $Y = 1467.55X - 163.27, r = 0.9999$; $Y = 837.71X - 84.80, r = 0.9999$ 。结果表明异茜草素、羟基茜草素、1,3,6-三羟基-2-甲基蒽醌、大叶茜草素在 0.69 ~ 34.44, 0.66 ~ 33.2, 0.68 ~ 34.08, 1.07 ~ 53.52 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 与峰面积呈良好线性。

2.3.2 精密度试验 取混合对照品溶液,在上述色

谱条件下连续进样 6 次,异茜草素、羟基茜草素、1,3,6-三羟基-2-甲基蒽醌、大叶茜草素色谱峰面积的 RSD 分别为 1.5%, 1.0%, 1.2%, 2.0%。结果表明仪器精密度良好。

2.3.3 重复性试验 取同一批号样品(批号 100418),按 2.1.2 项下方法制备供试品溶液 6 份,在上述色谱条件下进样测定。异茜草素、羟基茜草素、1,3,6-三羟基-2-甲基蒽醌、大叶茜草素含量的平均值($n = 6$)分别为 0.275, 0.144, 0.391, 0.049 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$; RSD 分别为 1.9%, 0.93%, 1.3%, 1.2%。结果表明方法重复性良好。

2.3.4 稳定性试验 取茜草炭样品(批号 091205),按 2.1.2 项下方法制备供试品溶液,室温下放置,分别于 0, 2, 4, 8, 10, 12 h 进样测定,记录色谱峰面积。异茜草素、羟基茜草素、1,3,6-三羟基-2-甲基蒽醌、大叶茜草素色谱峰面积的 RSD 分别为 1.3%, 2.2%, 1.3%, 1.0%。表明供试品溶液在 12 h 内保持稳定。

2.3.5 回收率试验 取已知含量(批号 100418)的茜草炭样品 6 份,每份约 0.25 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,分别精密加样异茜草素($0.203 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)对照品溶液 0.3 mL,羟基茜草素($0.312 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)对照品溶液 0.1 mL,1,3,6-三羟基-2-甲基蒽醌($0.51 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)对照品溶液 0.2 mL,大叶茜草素($0.116 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)对照品溶液 0.1 mL。然后按 2.1.2 项下方法制备供试品溶液,按上述色谱条件测定,计算回收率,结果见表 1。

2.4 样品测定

取各批次茜草炭样品约 0.5 g,精密称定,按 2.1.2 项下方法制备供试品溶液。在上述色谱条件下对样品进行了样本分析,以外标法计算含量。结果见表 2。

3 讨论

据文献报道大叶茜草素具有对花生四烯酸(AA)和胶原诱导的兔血小板聚集有明显的抑制作用,对血小板激活因子诱导的聚集也有一定的抑制作用^[4]。羟基茜草素可作为血浆透明质酸结合蛋白(PHBP)的特异性抑制剂,抑制 PHBP 对凝血因子 VII 的激活作用^[5]。本研究对茜草炭中的大叶茜草素和羟基茜草素含量测定表明,大叶茜草素和羟基茜草素在茜草炭中的含量远低于《中国药典》2010 年版(一部)所收录的茜草在其含量测定项下对大



表1 茜草炭加样回收率($n=6$)

Table 1 Recoveries rate of carbonized Rubiae Radix et Rhizoma($n=6$)

化合物	样品中量/ μg	加入量/ μg	测得量/ μg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
异茜草素	68.72	60.90	128.15	97.59	96.95	1.2
	68.25	60.90	127.54	97.36		
	69.13	60.90	129.21	98.65		
	68.35	60.90	127.32	96.83		
	68.45	60.90	126.69	95.63		
	69.49	60.90	127.73	95.63		
羟基茜草素	36.00	31.20	66.31	97.14	95.75	1.4
	35.89	31.20	66.02	96.57		
	36.21	31.20	65.74	94.65		
	36.13	31.20	65.38	93.75		
	36.25	31.20	66.19	95.96		
	35.43	31.20	65.52	96.44		
1,3,6-三羟基-2-甲基蒽醌	97.76	102.00	199.82	100.1	102.5	1.5
	97.35	102.00	202.44	103.0		
	98.14	102.00	203.83	103.6		
	98.27	102.00	202.35	102.0		
	97.41	102.00	201.38	101.9		
	98.10	102.00	204.69	104.5		
大叶茜草素	12.45	11.60	23.50	95.26	96.15	1.0
	12.10	11.60	23.23	95.95		
	12.17	11.60	23.40	96.81		
	12.84	11.60	24.18	97.76		
	12.96	11.60	24.08	95.86		
	12.27	11.60	23.32	95.26		

表2 茜草炭中4种醌类成分的质量分数($n=3$)

Table 2 Contents of four quinone compounds in carbonized Rubiae Radix et Rhizoma($n=3$)

茜草炭品	生产批号	异茜草素	羟基茜草素	1,3,6-三羟基-2-甲基蒽醌	大叶茜草素
安徽铜陵	100326	0.181	0.295	0.317	0.192
江苏	091205	0.308	0.191	0.173	0.316
河南	101104	0.517	0.415	0.325	0.720
山东	100418	0.275	0.144	0.391	0.050
湖北	100305	0.177	0.106	0.346	0.133
安徽	091116	0.130	0.252	0.152	0.096
山西	090912	0.153	0.084	0.605	0.050
陕西	101127	0.379	0.356	0.367	0.472
陕西	110427	0.599	0.338	0.216	0.526
四川	110609	0.246	0.267	0.217	0.760
河北	110402	0.284	0.324	0.234	0.076

叶茜草素和羟基茜草素含量要求的最低限^[1],这也与茜草炒炭后止血作用增强的传统炮制理论相吻合。

异茜草素有明显缩短小鼠凝血时间的作用,是

茜草炭主要止血成分之一^[6]。研究发现异茜草素在茜草生品中含量极微,炮制成茜草炭以后,异茜草素含量增加,并且止血作用增强^[7]。所以对茜草炭中异茜草素含量的测定具有重要的意义,可以作为茜草炭质量标准的指标性成分。本实验对茜草炭中1,3,6-三羟基-2-甲基蒽醌的含量测定,发现其含量较高。茜草中除了含有1,3,6-三羟基-2-甲基蒽醌,还含有较多的以1,3,6-三羟基-2-甲基蒽醌为苷元的糖苷^[8],如1,3,6-三羟基-2-甲基蒽醌-3-O-(O-6-乙酰基)新橙皮苷、1,3,6-三羟基-2-甲基蒽醌-3-O-新橙皮苷、1,3,6-三羟基-2-甲基蒽醌-3-O-(O-6-乙酰基)- β -D-吡喃葡萄糖苷、1,3,6-三羟基-2-甲基蒽醌-3-O- β -D-吡喃葡萄糖苷、1,3,6-三羟基-2-甲基蒽醌-3-O- β -D-吡喃木糖-(1-2)- β -D(6-O-乙酰基)吡喃葡萄糖苷,炒炭后1,3,6-三羟基-2-甲基蒽醌含量较高,可能与炒炭过程中上述糖苷的苷键断裂释放出苷元有关,所以茜草炭中含量较高的1,3,6-三羟基-2-甲基蒽醌也可以用来控制茜草炭的质量。

目前对茜草的含量测定已有很多相关的研究,



但对茜草炒炭后含量测定的研究较少,本实验建立了 UPLC 测定茜草炭中异茜草素、羟基茜草素、1,3,6-三羟基-2-甲基蒽醌、大叶茜草素含量的方法,此方法较 HPLC 更加快速、准确,可以为茜草炭饮片质量标准的建立及茜草炭炮制工艺的优选提供参考。关于茜草炭止血作用的增强与异茜草素、羟基茜草素、1,3,6-三羟基-2-甲基蒽醌、大叶茜草素之间的具体关系还需进一步研究。

[参考文献]

[1] 中国药典. 一部[S]. 2010:218.
[2] 叶定江,原思通. 中药炮制学辞典[M]. 上海:上海科学技术出版社,2005:283.
[3] 张卫华,张振凌,黄显峰,等. 茜草炭饮片炒炭前后止血机制

的比较[J]. 中华中医药杂志,2006,21(3):160.
[4] 田代华. 实用中药辞典. 下卷[M]. 北京:人民卫生出版社,2002:1258.
[5] Naoko N, MasaYuki T, Eisaku Y, et al. Purpurin as a specific Inhibitor of fipermidine-induced autoactivation of the protease plasma hyaluronan-binding protein[J]. Biol Pharm Bull, 2010, 33(8):1430.
[6] 张振凌,周艳,黄显峰. 茜草炭止血成分的研究[J]. 中成药,2007,29(12):1803.
[7] 康辉,张震凌,周艳,等. HPLC 测定茜草炭饮片中1,3-二羟基蒽醌含量[J]. 中成药,2010,32(6):980.
[8] 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.

Simultaneous determination of four quinone compounds in carbonized Rubiae Radix et Rhizoma by UPLC

CHEN Xing, WANG Kan, SHAN Ming-qiu, DING An-wei*

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

[Abstract] **Objective:** To establish an UPLC method for simultaneous determination of purpuroxanthine, purpurin, 1,3,6-trihydroxy-2-methylanthraquinone, rubimaillin in carbonized Rubiae Radix et Rhizoma. **Method:** The components were separated on Acquity BEHC₁₈ (2.1 mm × 50 mm, 1.7 μm) using methanol and 0.3% formic acid solution as the mobile phase; The flow rate was 0.2 mL · min⁻¹ and the volume of injection was 2 μL; the column temperature was maintained at 30 °C and the detective wavelength was set at 276 nm. **Result:** There were good liner relationships between the peak area and concentration at ranges of 0.68-34.44 mg · L⁻¹ ($r=0.9999$), 0.66-33.2 mg · L⁻¹ ($r=0.9997$), 0.68-34.08 mg · L⁻¹ ($r=0.9999$), 1.07-53.52 mg · L⁻¹ ($r=0.9999$) for purpuroxanthine, purpurin, 1,3,6-trihydroxy-2-methylanthraquinone, rubimaillin, respectively; the average recovery rates of purpuroxanthine, purpurin, 1,3,6-trihydroxy-2-methylanthraquinone, rubimaillin were 96.95%, 95.75%, 102.5%, 96.15%, respectively, with RSD less than 3%. **Conclusion:** The established method was rapid and simple with good accuracy and reproducibility for the determination of carbonized Rubiae Radix et Rhizoma, the method was suitable for the quality control of carbonized Rubiae Radix et Rhizoma.

[Key words] carbonized Rubiae Radix et Rhizoma; purpuroxanthine; purpurin; 1,3,6-trihydroxy-2-methylanthraquinone; rubimaillin; UPLC

doi:10.4268/cjcm20121919

[责任编辑 孔晶晶]