

# 茜草药材及其配方颗粒TLC及HPLC指纹图谱研究

刘红云<sup>1\*</sup>, 刘琴<sup>1</sup>, 王祥培<sup>2</sup>, 吴红梅<sup>1#</sup>

<sup>1</sup>贵州中医药大学药学院, 贵州 贵阳

<sup>2</sup>贵州民族大学民族医药学院, 贵州 贵阳

收稿日期: 2023年5月31日; 录用日期: 2023年7月18日; 发布日期: 2023年7月31日

## 摘要

目的: 建立茜草药材及其配方颗粒的薄层色谱(TLC)和高效液相(HPLC)指纹图谱。方法: TLC法: 展开剂为石油醚-丙酮(4:1.3), 在365 nm紫外光灯下检视。HPLC法: 色谱柱为Diasonsil C<sub>18</sub> (4.6 mm × 250 mm), 流动相为甲醇(A)-0.1%的磷酸水(B), 梯度洗脱, 进样量10 μL, 柱温30℃, 体积流量1.0 mL/min。然后结合中药色谱指纹图谱相似度评价软件(2004A版)进行相似度分析。结果: 所建立的20批茜草药材及其配方颗粒的TLC法, 斑点清晰, 分离度良好; 建立茜草药材及其配方颗粒的指纹图谱, 共有16个共有色谱峰, 20批茜草药材及其配方颗粒的指纹图谱相似度 > 0.527, 两者化学成分存在一定差异。结论: 该研究采用薄层色谱法和HPLC指纹图谱可综合评价茜草药材及其配方颗粒之间的质量差异, 从而为茜草及其配方颗粒的质量控制研究提供参考依据。

## 关键词

茜草, 配方颗粒, 指纹图谱, 质量控制

# Study on TLC and HPLC fingerprint of *Rubia cordifolia* and Its Formula Granules

Hongyun Liu<sup>1\*</sup>, Qin Liu<sup>1</sup>, Xiangpei Wang<sup>2</sup>, Hongmei Wu<sup>1#</sup>

<sup>1</sup>School of Pharmacy, Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang Guizhou

<sup>2</sup>School of Chinese Ethnic Medicine, Guizhou Minzu University, Guiyang Guizhou

Received: May 31<sup>st</sup>, 2023; accepted: Jul. 18<sup>th</sup>, 2023; published: Jul. 31<sup>st</sup>, 2023

\*第一作者。

#通讯作者。

文章引用: 刘红云, 刘琴, 王祥培, 吴红梅. 茜草药材及其配方颗粒 TLC 及 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中医学, 2023, 12(7): 1774-1782. DOI: 10.12677/tcm.2023.127265

## Abstract

**Objective:** To establish thin layer chromatography (TLC) and high-performance liquid chromatography (HPLC) fingerprints of *Rubia cordifolia* L. and its formula granules. **Methods:** TLC method: The developing agent is petroleum ether-acetone (4:1.3), and it is examined under 365 nm ultraviolet light. HPLC method: The chromatographic column is Diansil C18 (4.6 mm × 250 mm), mobile phase is methanol (A)-0.1% phosphoric acid water (B), gradient elution, injection volume 10 μL. The column temperature is 30°C, and the volume flow rate is 1.0 mL/min. Then, similarity analysis was conducted using the similarity evaluation software for traditional Chinese medicine chromatographic fingerprints (2004A version). **Results:** The TLC method for the 20 batches of *Rubia cordifolia* L. and its formula granules established showed clear spots and good separation. HPLC fingerprint of *Rubia cordifolia* L. and its formula granules was established, 16 common peaks were identified. The similarity of fingerprint spectra of 20 batches of *Rubia cordifolia* L. and its formula granules is greater than 0.527, indicating certain differences in their chemical composition. **Conclusion:** This study uses TLC and HPLC fingerprint to comprehensively evaluate the quality differences between *Rubia cordifolia* L. and its formula granules, thus providing a reference basis for the quality control research of *Rubia cordifolia* L. and its formula granules.

## Keywords

*Rubia cordifolia* L., Formula Granules, Fingerprint, Quality Control

Copyright © 2023 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 引言

中药茜草来源于茜草科茜草属植物茜草 *Rubia cordifolia* L.的干燥根和根茎,其味苦、性寒,具有凉血止血、祛瘀、通经的功效,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]。现代药理学研究表明茜草具有抗菌消炎、止血、抗癌、护肝等药理作用[2] [3] [4] [5],临床上可以用于治疗子宫异常出血等疾病[6]。配方颗粒是中药饮片经过浸提、浓缩、干燥、制粒等工艺加工制成的中药单品,既保存汤剂的特点,又具有携带方便和服用方便等特点,但配方颗粒没有统一的质量控制标准[7] [8] [9] [10]。由于茜草化学成分复杂,制粒过程成分损失严重,导致其质量存在一定的差异。因此,本研究建立茜草药材及其配方颗粒的薄层色谱和 HPLC 指纹图谱,为茜草配方颗粒的质量控制提供参考。

## 2. 实验材料

### 2.1. 仪器

硅胶 G 板(青岛海洋化工厂有限公司), KQ-100E 超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司), 紫外灯(上海智岩科学仪器有限公司), DFT-50A 高速粉碎机(温岭市林大机械有限公司), Waterse-2695 高效液相色谱仪(美国 Waters 公司), HH-6 数显恒温水浴锅(常州澳华仪器有限公司), AL204-IC/万分之一分析天平(METTLER TOLEDO 仪器有限公司)。

### 2.2. 试剂

甲醇(色谱纯, 国药集团化学试剂有限公司), 磷酸(色谱纯, 重庆川东化工有限公司), 石油醚(分析纯,

重庆川东化工有限公司), 丙酮(分析纯, 遵义师范学院化学试剂厂), 水为娃哈哈纯净水(贵州娃哈哈集团有限公司)。

### 2.3. 药材

茜草药材来源不同, 且经贵州中医药大学王祥培教授鉴定, 均为茜草科植物茜草 *Rubia cordifolia* L. 的干燥根和根茎。药材及配方颗粒来源见表 1。

**Table 1.** Source of *Rubia cordifolia* L. and its formula granules

**表 1.** 茜草药材及配方颗粒的来源

样品	样品名	厂家
S1	茜草药材	乐仁堂药房
S2	茜草药材	同仁堂药房
S3	茜草药材	一树药业
S4	茜草药材	一品药业
S5	茜草药材	德昌祥药业
S6	茜草药材	同济堂
S7	茜草药材	芝林大药房
S8	茜草药材	天一大药房
S9	茜草药材	福安康药业
S10	茜草药材	和思源药房
S11	茜草配方颗粒	广东一方制药有限公司
S12	茜草配方颗粒	广东一方制药有限公司
S13	茜草配方颗粒	广东一方制药有限公司
S14	茜草配方颗粒	广东一方制药有限公司
S15	茜草配方颗粒	广东一方制药有限公司
S16	茜草配方颗粒	广东一方制药有限公司
S17	茜草配方颗粒	广东一方制药有限公司
S18	茜草配方颗粒	广东一方制药有限公司
S19	茜草配方颗粒	广东一方制药有限公司
S20	茜草配方颗粒	广东一方制药有限公司

## 3. 实验方法

### 3.1. 薄层色谱鉴别研究

参照《中国药典》2020 版制备供试品溶液, 取本品药材粉末 0.5 g, 加甲醇 10 mL, 超声处理 30 分钟, 滤过, 滤液浓缩至 1 mL。按上述方法制得配方颗粒供试品溶液。吸取以上制备的样品溶液适量, 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 以石油醚 - 丙酮(4:1.3)为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 置紫外光灯(365 nm)下检视。

### 3.2. HPLC 指纹图谱鉴别研究

#### 3.2.1. 供试品溶液的制备

取 10 批茜草药材样品约 2.0 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 加 25 mL 甲醇, 密塞, 称定重量, 超声提取(功率 250 W, 频率 35 kHz) 30 min, 放冷, 再称定重量, 用甲醇补足减失的重量, 摇匀, 过滤, 取续滤液过 0.22 μm 微孔滤膜, 即得茜草药材供试品溶液; 同上述方法制得配方颗粒供试品溶液。

### 3.2.2. 色谱条件

色谱柱为 Diasonsil C<sub>18</sub> (4.6 mm × 250 mm), 流动相为甲醇(A)-0.1%的磷酸水(B), 梯度洗脱见表 2, 进样量为 10 μL, 柱温为 30℃, 体积流量为 1.0 mL/min, 分析时间为 100 min。

**Table 2.** Mobile phase gradient elution table

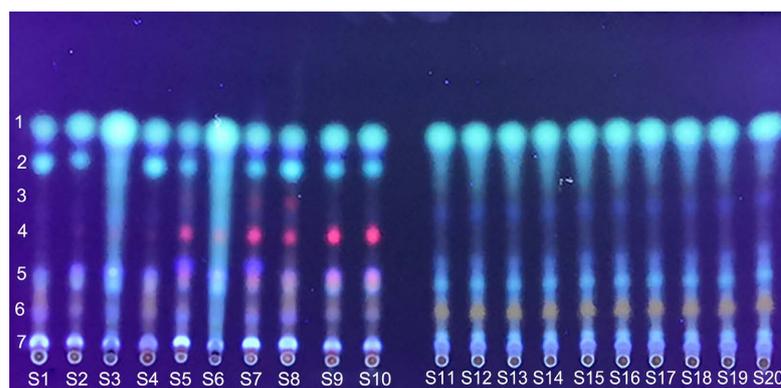
**表 2.** 流动相梯度洗脱表

时间(min)	流动相(A)	流动相(B)
0~5	10%~20%	90%~80%
5~25	20%~30%	80%~70%
25~35	30%~35%	70%~65%
35~65	35%~70%	65%~30%
65~95	70%~85%	30%~15%
95~100	85%	15%

## 4. 实验结果

### 4.1. 薄层色谱鉴别研究

10 批茜草药材色谱图中荧光斑点数为 5~7 个, 10 批配方颗粒样品在相应的图谱位置上均有 7 个相同颜色的斑点, 见图 1。



石油醚 - 丙酮(4:1.3)

**Figure 1.** Thin layer chromatogram of 20 batches of *Rubia cordifolia* and its formula granules

**图 1.** 20 批茜草药材和颗粒薄层色谱图

### 4.2. HPLC 指纹图谱研究

#### 4.2.1. 精密度试验

取同一批次的茜草样品, 按“3.2.1”项下的方法制备供试品溶液, 再按“3.2.2”项下的色谱条件下连续进样 6 次, 并记录各共有峰的保留时间和峰面积, 计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均小于 3.0%, 说明仪器精密度良好。

#### 4.2.2. 稳定性试验

取同一批次的茜草样品, 按“3.2.1”项下的方法制备供试品溶液, 按“3.2.2”项下的色谱条件下分别于 0、2、4、8、12、24 h 进样, 并记录各共有峰的保留时间和峰面积, 计算各共有峰的相对保留时间

与相对峰面积 RSD 均小于 3%，说明茜草样品在 24 h 都稳定。

#### 4.2.3. 重复性试验

取同一批次茜草样品 6 份，按“3.2.1”项下的方法平行制备分析样品，按“3.2.2”项下的色谱条件分别进样，并记录各共有峰的保留时间和峰面积，计算共有峰的相对保留时间和相对峰面积 RSD 均小于 3%，表明该方法的重复性良好。

#### 4.2.4. 指纹图谱的建立及共有峰的确定

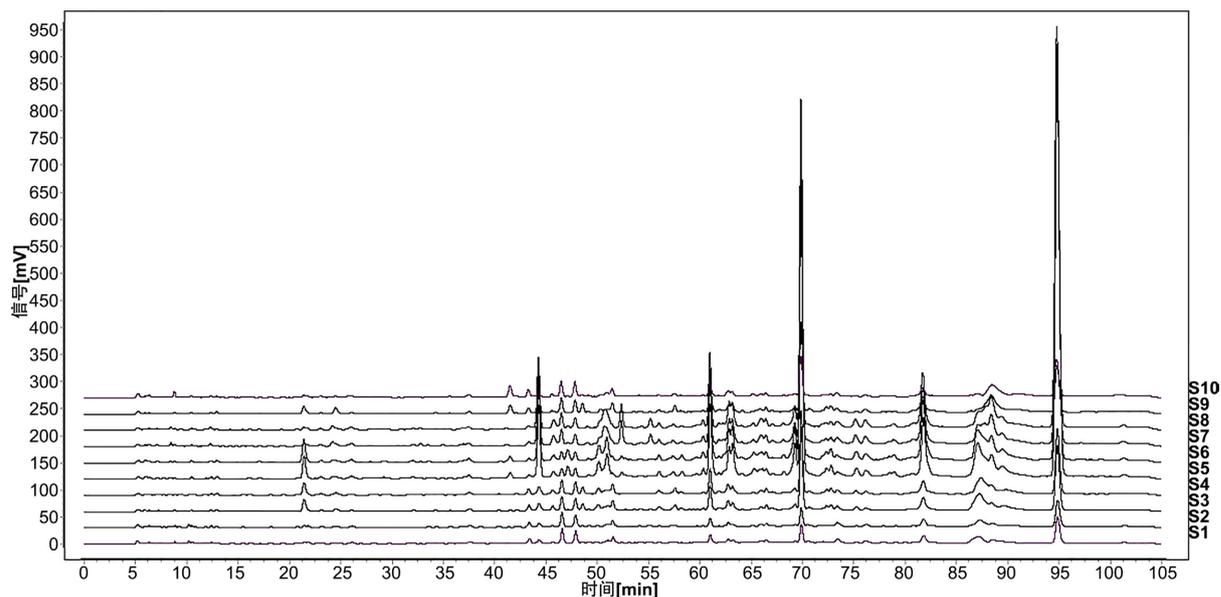


Figure 2. HPLC fingerprint of 10 batches of *Rubia cordifolia*

图 2. 10 批茜草药材 HPLC 指纹图谱

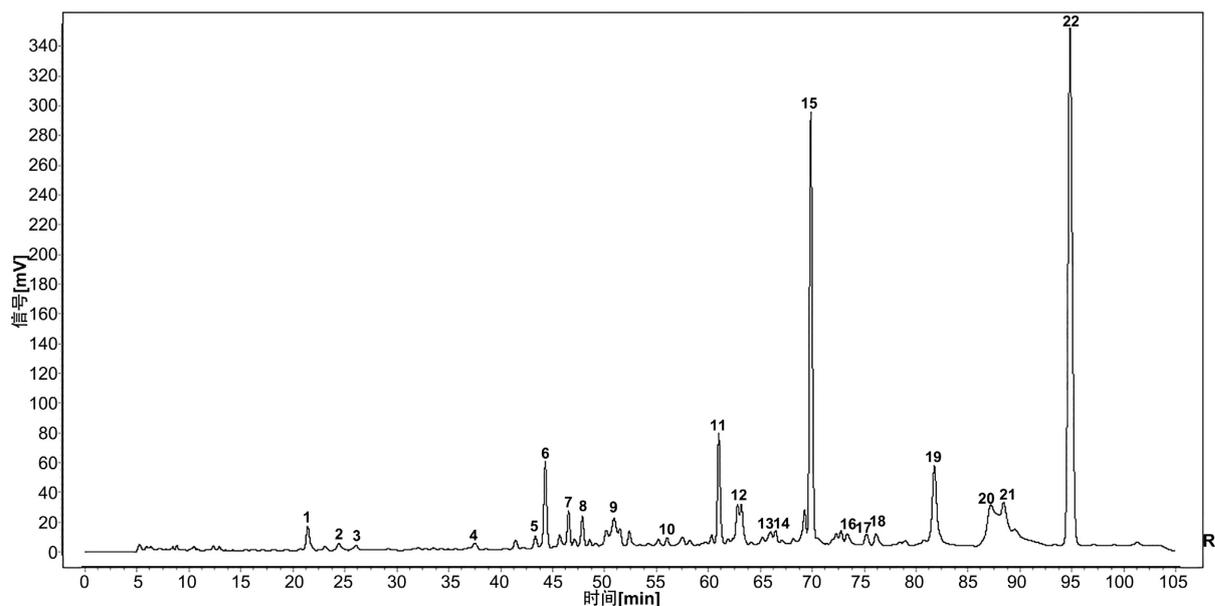


Figure 3. HPLC control spectrum of *Rubia cordifolia*

图 3. 茜草药材对照指纹图谱

通过采用 HPLC 指纹图谱后, 提取茜草药材及其配方颗粒样品在 280 nm 处的色谱图, 导入“中药指纹图谱相似度评价系统”2004A 版后, 进行色谱峰匹配, 应用中位数法, 时间窗宽度为 0.3。生成 10 批茜草样品的 HPLC 指纹图谱及对照指纹图谱, 共标定 22 个共有指纹色谱峰, 见图 2、图 3; 生成配方颗粒样品的 HPLC 指纹图谱及对照指纹图谱, 标定出 22 个共有指纹色谱峰, 见图 4、图 5; 生成茜草及其配方颗粒的 HPLC 指纹图谱及对照指纹图谱, 标定出 16 个共有指纹色谱峰, 见图 6、图 7。

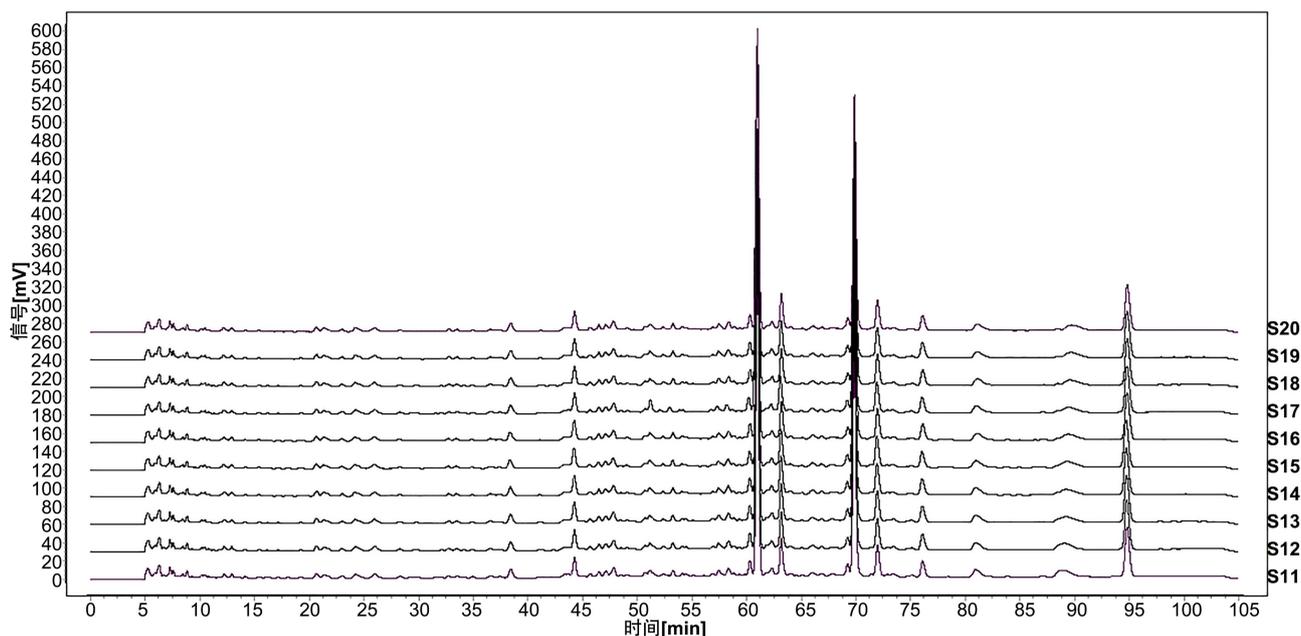


Figure 4. HPLC fingerprint of 10 batches of *Rubia cordifolia* formula granules

图 4. 10 批茜草配方颗粒 HPLC 指纹图谱

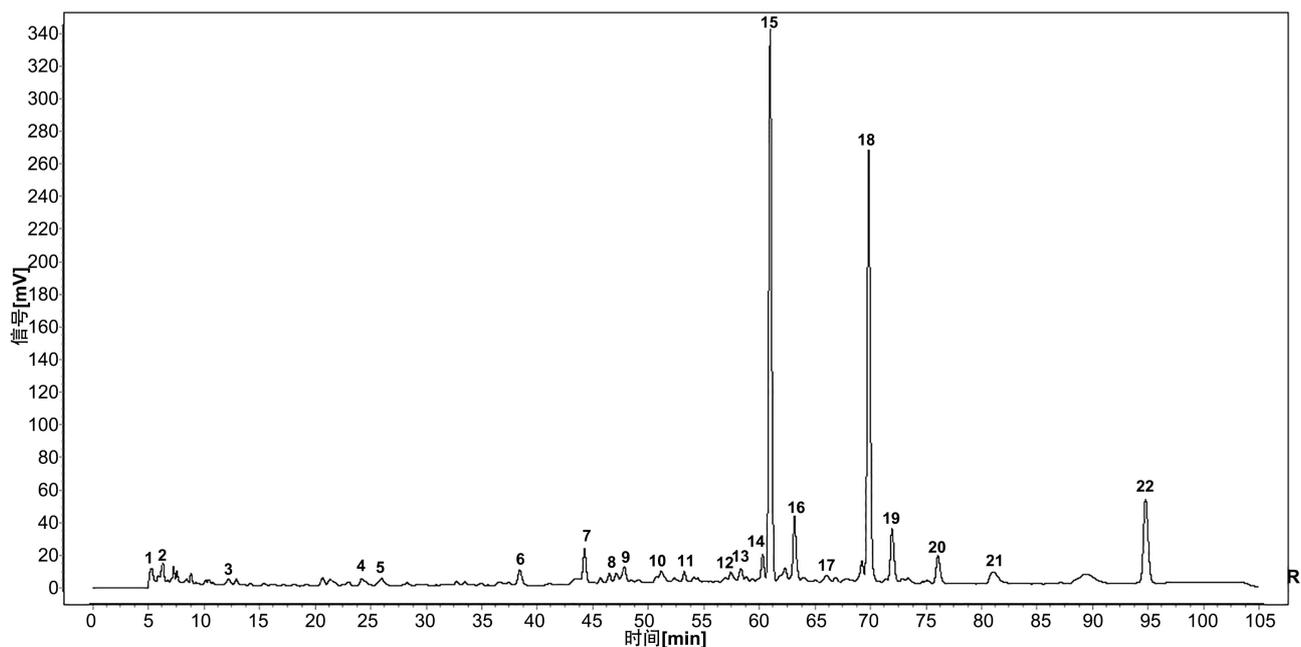


Figure 5. HPLC control spectrum of *Rubia cordifolia* formula granules

图 5. 茜草配方颗粒对照指纹图谱

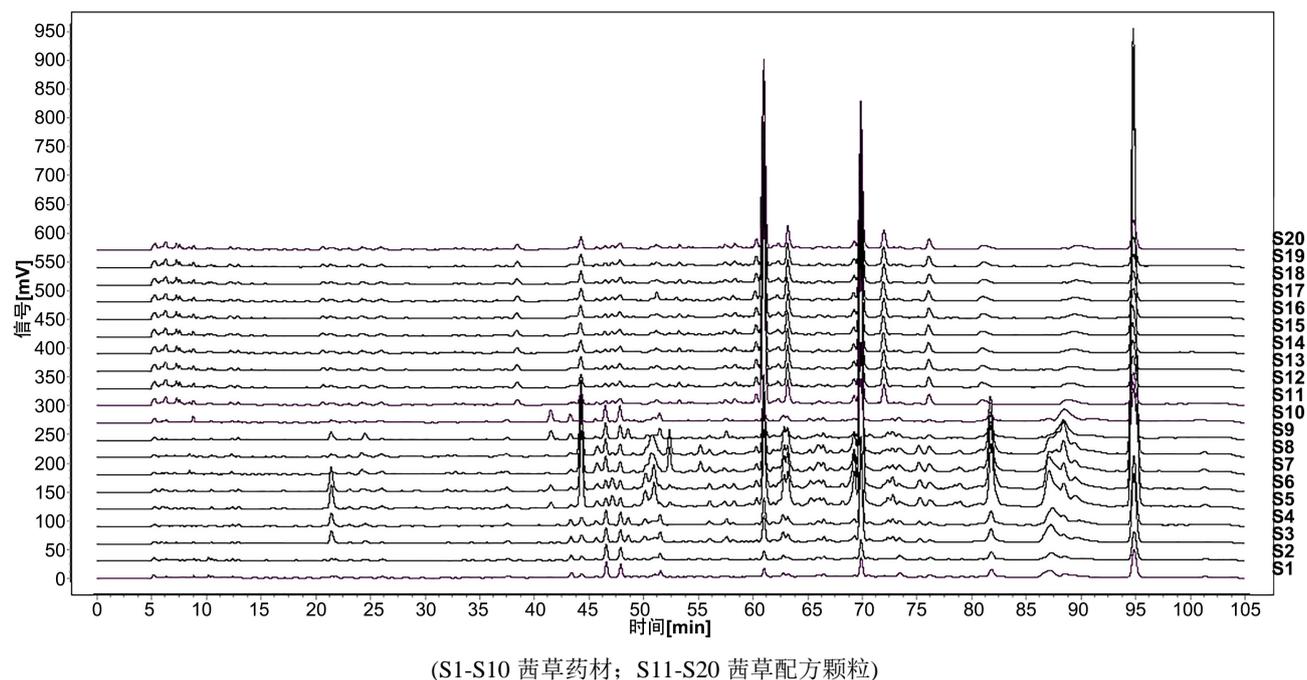


Figure 6. HPLC fingerprint of 20 batches of *Rubia cordifolia* and its formula granules  
图 6. 20 批茜草药材及配方颗粒 HPLC 指纹图谱

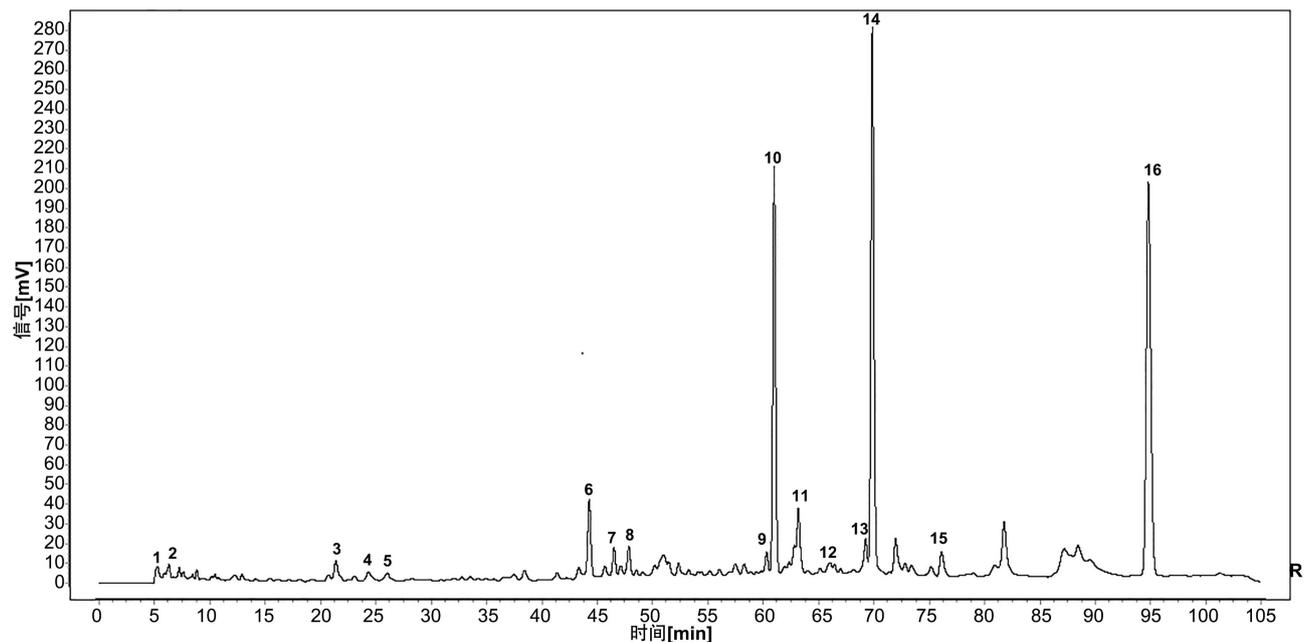


Figure 7. HPLC control spectrum of 20 batches of *Rubia cordifolia* and its formula granules  
图 7. 茜草药材及配方颗粒 HPLC 指纹图谱

#### 4.2.5. 相似度评价

采用国家药典委员会颁布的《中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004A 版》对样品之间进行相似度评价分析, 10 批茜草药材相似度为 0.879~0.963、10 批配方颗粒相似度为 0.997~1.000, 20 批茜草药材及配方颗粒相似度为 0.527~0.984, 见表 3、表 4。

**Table 3.** Evaluation of similarity *Rubia cordifolia* and formula granules**表 3.** 茜草药材和配方颗粒相似度评价

药材	相似度	配方颗粒	相似度
S1	0.879	S11	0.997
S2	0.891	S12	0.997
S3	0.955	S13	0.998
S4	0.963	S14	0.998
S5	0.940	S15	0.998
S6	0.940	S16	0.999
S7	0.904	S17	1.000
S8	0.911	S18	1.000
S9	0.956	S19	1.000
S10	0.937	S20	1.000

**Table 4.** Evaluation of similarity between *Rubia cordifolia* and formula granules**表 4.** 茜草药材与配方颗粒的相似度评价

编号	相似度	编号	相似度
S1	0.527	S11	0.607
S2	0.538	S12	0.983
S3	0.686	S13	0.983
S4	0.691	S14	0.983
S5	0.617	S15	0.983
S6	0.615	S16	0.983
S7	0.555	S17	0.983
S8	0.568	S18	0.983
S9	0.768	S19	0.984
S10	0.527	S20	0.984

## 5. 讨论

### 5.1. 薄层色谱研究分析

TLC 法成本低、速度快、样品处理少、直观性强, 被广泛用于中药材、提取物、制剂等质量的定性鉴别。本研究建立 20 批不同产地茜草药材及其配方颗粒 TLC 鉴别方法, 结果显示不同厂家的茜草药材的薄层色谱图所反映出的化学成分信息存在差异, 而同一来源的茜草颗粒的色谱图在相对应的位置上具有相同颜色的斑点, 说明不同批次的颗粒具有相似的化学成分。此外, 两者在 1、3、5、6、7 号上有相同位置的斑点, 但其斑点颜色不同, 配方颗粒无 2、4 号斑点, 说明茜草药材和配方颗粒的化学成分存在差异。

茜草药材化学成分之间的差异可能是由于药材来源不同, 不同来源的药材因其采收、气候和土壤环境等条件的不同导致其化学成分种类和含量存在差异[11] [12]。而药材与配方颗粒之间的差异可能由饮片的质量以及饮片经水提、浓缩、干燥和制粒等制备工艺所导致的。利用薄层色谱法可直观观察药材及配

方颗粒间的化学成分信息,但薄层色谱法不能全面反映茜草药材内部的化学信息,因此本研究还采用茜草及其配方颗粒的 HPLC 指纹图谱,以全面地反映其化学成分信息差异性。

## 5.2. HPLC 指纹图谱研究分析

本研究以茜草药材和配方颗粒为研究对象,建立 HPLC 指纹图谱并结合 2004A 相似度软件对其色谱图进行分析。本研究对 254~280 nm 波长色谱峰的个数和强度进行考查,结果发现 280 nm 处可较为全面地反映药材及其配方颗粒的图谱信息。10 批茜草药材指纹图谱共有峰 22 个共有色谱峰,相似度均大于 0.879,可知药材之间质量存在差异,这可能由于药材来源不同其生长环境、采收加工、贮存条件和运输等因素的影响。10 批配方颗粒指纹图谱共有 22 个共有色谱峰,相似度均大于 0.997,表明茜草配方颗粒制备工艺比较稳定。20 批茜草药材及其配方颗粒指纹图谱共有 16 个共有色谱峰,分析可知相似度低,药材与配方颗粒之间质量差异较大,可能是由原药材的生长环境、采收加工、配方颗粒的加工工艺等引起(比如:温度、煎煮、干燥、制粒、环境和人为因素)。该方法稳定、可靠、重现性好,可为茜草药材和配方颗粒质量分析、评价与控制提供依据。

综上所述,该实验建立的茜草药材及配方颗粒的 TLC 鉴别和 HPLC 指纹图谱方法稳定可靠,可为提升该药材整体质控方法奠定一定基础。但该研究所收集的茜草配方颗粒均为统一厂家,若能收集不同厂家的茜草配方颗粒,并在本实验基础上建立不同厂家茜草药材及其配方颗粒的 TLC 鉴别和 HPLC 指纹图谱,将更用于评价茜草的质量。

## 基金项目

贵州省一流课程重点建设项目(项目合同编号:黔教高发[2017]158)。

## 参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 一部. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 245.
- [2] 陈毅, 王海丽, 薛露, 等. 茜草的研究进展[J]. 中草药, 2017, 48(13): 2771-2779.
- [3] 余旭东, 杨季菱. 茜草与茜草炭药理作用比较研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2007, 13(9): 53-56.
- [4] Zhang, L., Wang, H., Zhu, J., Xu, J., *et al.* (2014) Mollugin Induces Tumor Cell Apoptosis and Autophagy via the PI3K/AKT/mTOR/p70S6K and ERK Signaling Pathways. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **450**, 247-254. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.05.101>
- [5] 黄桥华, 刘心强, 邱倩. 茜草双酯对缺氧/复氧心肌细胞的保护作用研究[J]. 中国现代药物应用, 2012, 6(19): 13-14.
- [6] 高兰, 王侃, 贾媛, 等. 茜草不同炮制品对子宫内膜出血模型大鼠的影响[J]. 中医学报, 2020, 35(1): 144-148.
- [7] 林文华. 茜草药材及其配方颗粒质量和体外抗炎作用初步研究[D]: [硕士学位论文]. 广州: 广州中医药大学, 2014.
- [8] 朱丽红, 贺文娟, 王梅, 等. 茜草配方颗粒的制备工艺及质量评价研究[J]. 陕西中医学院学报, 2016, 36(3): 100-103.
- [9] 吴思佳, 王可可, 徐双双, 等. 基于 HPLC 指纹图谱和含量测定的皂角刺配方颗粒质量控制研究[J]. 上海中医药大学学报, 2023, 37(2): 54-60+95.
- [10] 代良敏, 代良萍, 陈永钧, 等. 我院中药配方颗粒使用情况分析[J]. 临床合理用药, 2023, 16(5): 162-165.
- [11] 王闰予, 何民友, 李国卫, 等. 不同产地茜草药材 UPLC 指纹图谱研究及化学计量学分析[J]. 广东药科大学学报, 2020, 36(5): 609-614.
- [12] 李鹏, 胡正海. 陕西省 9 个地市产茜草药材中大叶茜草素含量比较研究[J]. 西北药学杂志, 2014, 29(5): 458-460.