・论著・一次研究・

茜草主要成分提取方法比较及加工前后 变化规律研究



陆元勋1,章哲文1,陈宏降2,罗益远2

- 1. 宁波明贝中药业有限公司质量检测中心(浙江宁波 315192)
- 2. 浙江药科职业大学中药学院(浙江宁波 315500)

【摘要】目的 比较提取方法对茜草中主要成分的影响,并探讨茜草加工前后主要化学成分的变化规律。方法 采用《中国药典(2020年版)》茜草含量测定项下供试品溶液制备方法(药典法)和优化后的供试品溶液制备方法(改良法),分别测定茜草加工前后羟基茜草素和大叶茜草素含量,对比分析其变化特点。结果 用直接酸提的方式代替药典法的醇提酸解过程,操作简便,耗时短。方法学考察结果 24 h 内溶液稳定性良好,羟基茜草素和大叶茜草素的平均回收率分别在 102.12%~104.95%(RSD 为 1.13%)和 93.78%~95.49%(RSD 为 0.80%)范围内(n=6);药典法测定结果显示茜草加工后羟基茜草素含量下降,大叶茜草素含量上升,药典标准与实际变化趋势不完全相符;改良法结果显示对羟基茜草素的提取效率显著提高,能更真实地反映茜草中羟基茜草素的总量。结论 所建立的方法准确、简单有效,为茜草检验标准的合理制订和质量控制提供参考。

【关键词】茜草;含量测定;羟基茜草素;大叶茜草素;饮片加工;检验标准 【中图分类号】R284.1 【文献标识码】A

Comparison of extraction methods of main components of Rubiae radix et rhizoma and study of the changes before and after processing

LU Yuanxun¹, ZHANG Zhewen¹, CHEN Hongjiang², LUO Yiyuan²

- 1. Ningbo Ming Bei China Pharmaceutical Co., LTD, Ningbo 315192, Zhejiang Province, China
- 2. College of Traditional Chinese Medicine, Zhejiang Pharmaceutical University, Ningbo 315500, Zhejiang Province, China

Corresponding authors: ZHANG Zhewen, Email: zhangzw2900@163.com; LUO Yiyuan, Email: luoyiyuan0012@163.com

[Abstract] Objective To compare the impacts of different extraction techniques on the primary components of Rubiae radix et rhizoma and investigate the variations in the major chemical constituents before and after processing. Methods The concentrations of purpurin and rubimaillin were assayed using the methods prescribed in the 2020 edition of the Chinese Pharmacopoeia (pharmacopoeia method) and an optimized method (improved method). The

DOI: 10.12173/j.issn.2097-4922.202405050

基金项目: 浙江省公益基础研究项目(LTGN23H280002); 浙江省高校国内访问工程师"校企合作项目"(FG2023003); 宁波市自然科学基金(2023J306)

通信作者:章哲文,硕士,主管中药师,Email:zhangzw2900@163.com 罗益远,硕士,副教授,Email:luoyiyuan0012@163.com changes in these constituents were then compared and analyzed. Results The acid extraction method was adopted to simplify the alcohol extraction and acid hydrolysis process recommended by the pharmacopoeia method, leading to a more efficient and less time-consuming procedure. The results of methodological investigation showed that the stability of the solution was good within 24 h. The average recovery rates of purpurin and rubimaillin were in the range of 102.12%-104.95% (with the *RSD* of 1.13%) and 93.78%-95.49% (with the *RSD* of 0.80%), respectively (n=6). The determination results of pharmacopoeia method showed that the content of purpurin decreased, while the content of rubiarin increased after processing, which was not completely consistent with the actual trends. The improved method significantly improved the extraction efficiency of purpurin, thus providing a more accurate reflection of the total purpurin content in Rubiae radix et rhizoma. Conclusion The established method is accurate, simple and effective, which provides reference for the reasonable formulation of inspection standards and quality control of madder.

【Keywords 】 Rubiae radix et rhizoma; Content determination; Purpurin; Rubimaillin; Decoction piece processing; Inspection standards

茜草为茜草科植物茜草 Rubia cordifolia L. 的干燥根和根茎,具有凉血、祛瘀、止血、通经的功效 [1]。茜草主要含有蒽醌类、萘醌类、萜类、环肽类等化学成分 [2-3],其中羟基茜草素是茜草中蒽醌类的活性成分之一,大叶茜草素是茜草中主要的萘醌类成分。《中国药典(2010 版)》以前采用简单的甲醇提取方法测定茜草中大叶茜草素的含量 [4-5]。《中国药典(2010 版)》开始,茜草含量测定项下增加了羟基茜草素的指标,并规定羟基茜草素和大叶茜草素的含量标准,原药材分别不得少于 0.10% 和 0.40%,饮片分别不得少于 0.08% 和 0.20%;供试品溶液制备方法在醇提基础上,增加了酸解等步骤,耗时较长,对检验员的操作要求较高;该法一直沿用至今(以下简称"药典法")[1.6-7]。

2018—2023 年间,本课题组对验收合格的茜草原药材,经净制、水洗、切制、干燥等工序,自主加工为茜草饮片;在按药典法检验过程中发现,相比于原药材,饮片羟基茜草素含量明显下降,而大叶茜草素含量增加,与药典标准的趋势不完全相符。查阅文献,国内关于茜草含量测定方面的研究多局限于单一的饮片(或药材)样品^[8-13],饮片(或药材)样品质量参差不齐。林文华等^[14] 对供试品溶液制备方法进行优化,将醇提酸解步骤直接简化为酸提,结果羟基茜草素和大叶茜草素的提取效率明显高于药典法。杨宇婷等^[15] 通过甲醇提取的方法得出,茜草清炒品的大叶茜草素含量比生品高出 1 倍,认为是清炒过程

使大叶茜草素更好地游离出来。对茜草原药材及 其饮片生品之间含量变化鲜见报道。

为排除净制过程对含量的影响,本研究在实验室条件下模拟大生产的关键工序,制备与原药材来源一致的茜草饮片;借鉴文献^[14]的供试品溶液制备方法,进一步省去三乙胺中和等步骤,仅保留酸提过程(以下简称"改良法"),以药典法和改良法同时确认茜草加工前后羟基茜草素和大叶茜草素的含量变化规律,通过多维度对比分析原因,为茜草检验标准的合理制订和质量控制提供参考。

1 材料

1.1 主要仪器

LC-2030型高效液相色谱仪(日本Shimadzu);XS105DU型电子天平(瑞士Mettler);SA224S型电子天平(德国Sartorius);Milli-QIQ7000型超纯水机(美国Millipore);SB-5200DT型超声波清洗机(宁波新芝生物科技股份有限公司);HH-8型恒温水浴锅(国华仪器制造有限公司);DFT-100A型手提式高速粉碎机(温岭市林大机械有限公司)。

1.2 主要药品与试剂

羟基茜草素(批号: 111898-202004, 纯度98.8%)、大叶茜草素(批号: 110884-202107, 纯度99.5%)购自中国食品药品检定研究院;甲醇和乙腈为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为超纯水。

从市场收集不同产地的茜草干燥药材 10 批,分别为 S1-河南、S2-河南、S3-陕西、S4-甘肃、S5-山西、S6-河北、S7-陕西、S8-陕西、S9-山西、S10-河北;所有样品经宁波市药品检验所林海伦主任中药师鉴定为茜草科植物茜草 Rubia cordifolia L. 的干燥根及根茎。

2 方法与结果

2.1 样品的制备

取除去茎和细根的样品,筛去泥沙,剪成厚片或段,拌匀,作为原药材样品(YP);分取一部分原药材样品,平铺于筛网中,均匀喷淋清水至使其表面充分润湿为度,于阴凉处敞口静置3h,60℃鼓风干燥1h,即得对应的饮片样品(CP)。上述样品分别粉碎过二号筛,置干燥处密封保存备用。

2.2 色谱条件

采用 HPLC 法, 色谱柱为 OmniBond HPLC Column Hubble C_{18} 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 柱温为 40 ℃,流动相为甲醇 – 乙腈 –0.2% 磷酸溶液(18:50:32),检测波长为 250 nm,流速为 1.0 mL/min,进样体积为 10 μL。

2.3 对照品溶液的制备

精密称取羟基茜草素和大叶茜草素对照品适量,加甲醇分别制成每 mL含羟基茜草素0.428 4 mg、大叶茜草素 1.824 3 mg 的对照品贮

备液;精密吸取上述对照品贮备液适量,加甲醇制成每 mL 含羟基茜草素 128.52 μg、大叶茜草素 273.65 μg 的混合对照品溶液。

2.4 供试品溶液的制备

药典法:取本品粉末,采用《中国药典(2020年版)》^[1]茜草含量测定项下"供试品溶液制备"方法进行制备。

改良法:取本品粉末约 0.5 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇 -25% 盐酸 (4:1)混合溶液 100 mL,称定重量,100 ℃水浴上回流30 min,立即冷却,再称定重量,用甲醇 -25% 盐酸 (4:1)混合溶液补足减失重量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.5 系统适用性试验

分别精密量取混合对照品溶液、两种方法制备的供试品溶液、空白溶剂按 "2.2" 项下色谱条件进样测定,记录色谱图(图1)。结果表明供试品与对照品在相同保留时间处有共同色谱峰,而空白溶剂对测定无干扰。

2.6 线性关系考察

取 "2.3" 项下制备的混合对照品溶液,加甲醇梯度稀释羟基茜草素浓度分别为 2.01、4.02、8.03、16.06、32.13、64.26、64.26 和128.52 μg/mL;大叶茜草素浓度分别为 4.28、8.55、17.10、34.21、68.41、136.82 和 273.65 μg/mL,按 "2.2" 项下色谱条件进样测定,以质量浓度

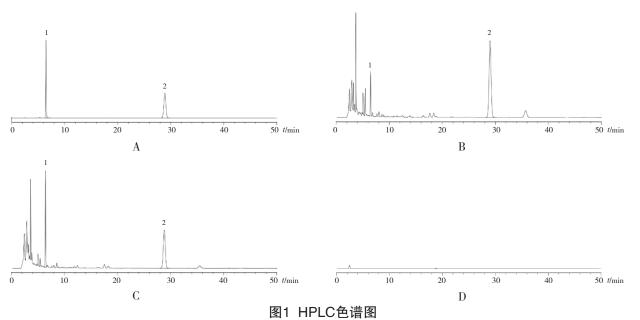


Figure 1. HPLC chromatograms

注: A. 混合对照品; B. 供试品 (药典法制备); C. 供试品 (改良法制备); D. 空白溶剂; 1. 羟基茜草素; 2. 大叶茜草素。

 $(X, \mu g/mL)$ 为横坐标、峰面积 (Y) 为纵坐标绘制标准曲线,计算得羟基茜草素的回归方程为 Y=76 190X+49 402 (r=0.999 9) ,大叶茜草素的回归方程为 Y=44 728X+32 456 (r=1.000 0) ,结果表明羟基茜草素在 2.01~128.52 $\mu g/mL$ 、大叶茜草素在 4.28~273.65 $\mu g/mL$ 浓度范围内线性关系良好。

2.7 精密度试验

取"2.3"项下制备的混合对照品溶液,按"2.2" 项下色谱条件连续进样 6 次, 计算羟基茜草素和大叶茜草素峰面积的 RSD 分别为 0.09% 和 1.36% (n=6),结果表明该仪器精密度良好。

2.8 重复性试验

取 1 份样品粉末,按 "2.4" 项下改良法平行制备 6 份供试品溶液(S5-CP),并按 "2.2" 项下色谱条件进样测定,计算得羟基茜草素和大叶茜草素的平均含量分别为 0.427 6% 和 1.141%, RSD 分别为 0.09% 和 1.36% (n=6),结果表明该方法重复性良好。

2.9 稳定性试验

取"2.4"项下改良法制备的供试品溶液(编号: S5-CP),按"2.2"项下色谱条件分别于 0、4、8、12、16、20、24 h 进样测定,计算羟基茜草素和大叶茜草素峰面积的 RSD 分别为 0.32% 和 1.06% (n=7),结果表明供试品溶液中 24 h 内稳定性良好。

2.10 加样回收率试验

取已知含量的样品粉末(编号: S5-CP)约0.25g,精密称定,置具塞锥形瓶中,分别精密加入"2.3"项下羟基茜草素对照品贮备液2mL,大叶茜草素对照品贮备液1.4mL,按"2.4"项下改良法平行制备供试品溶液6份,并按"2.2"项下色谱条件进样测定,计算得羟基茜草素和大叶茜草素的平均回收率分别在102.12%~104.95%(RSD为1.13%)和93.78%~95.49%(RSD为0.80%)范围内(n=6),结果表明该方法准确度良好。

2.11 含量测定

分别取一定浓度的混合对照品溶液和采用 "2.4" 项下两种方法制备的供试品溶液,按 "2.2" 项下色谱条件进样测定,采用外标法计 算羟基茜草素和大叶茜草素的含量,结果表 1。 药典法测定结果显示,10批原药材的羟基茜草素含量范围为0.0879%~0.1895%(标准要求

≥ 0.10%),对应饮片为 0.053 4%~0.102 7%(标准要求≥0.080%),饮片羟基茜草素均有不同程度的下降;原药材大叶茜草素的含量范围为 0.340%~0.742%(标准要求≥0.40%),对应饮片为 0.946%~1.211%(标准要求≥0.20%),饮片大叶茜草素含量相对原药材提高。按改良法测定结果显示,原药材及饮片羟基茜草素的含量范围均在 0.297 2%~0.453 1%之间,显著高于药典法的测定结果;且值得注意的是,用改良法测得同批药材的 YP和 CP 羟基茜草素含量基本持平,未呈现药典法所得的明显下降趋势。改良法对每批样品的大叶茜草素测定结果与药典法一致。

表1 样品含量测定结果 (%, n=3) Table 1. Results of sample determination (%, n=3)

样品编号-	羟基茜草素		大叶茜草素	
	药典法	改良法	药典法	改良法
S1-YP	0.160	0.453	0.340	0.353
S1-CP	0.089	0.414	0.970	0.991
S2-YP	0.101	0.319	0.742	0.765
S2-CP	0.075	0.341	0.990	0.971
S3-YP	0.134	0.376	0.681	0.692
S3-CP	0.093	0.355	1.211	1.264
S4-YP	0.088	0.297	0.591	0.604
S4-CP	0.053	0.297	0.967	0.978
S5-YP	0.158	0.435	0.556	0.552
S5-CP	0.103	0.428	1.143	1.140
S6-YP	0.190	0.417	0.354	0.369
S6-CP	0.100	0.423	0.946	0.945
S7-YP	0.144	0.403	0.452	0.495
S7-CP	0.096	0.381	1.034	1.025
S8-YP	0.156	0.412	0.423	0.450
S8-CP	0.112	0.314	0.815	1.038
S9-YP	0.164	0.460	0.479	0.455
S9-CP	0.126	0.403	1.014	1.013
S10-YP	0.180	0.363	0.443	0.419
S10-CP	0.110	0.407	0.892	0.957

3 讨论

当采用药典中流动相比例甲醇 - 乙腈 -0.2% 磷酸溶液 (25:50:25)时,药典法制备的供试品羟基茜草素目标峰与右侧的小杂峰难以分离; 随后考察了 25:43:32 和 18:50:32 两个比例, 分离度分别为 1.6 和 1.9,因此选取流动相比例为甲醇 - 乙腈 -0.2%磷酸溶液 (18:50:32)。 改良法制备的供试品杂峰干扰相对较少。在岛津 LC-2030 和岛津 LC-20A 高效液相色谱仪上分别 用 色 谱 柱 OmniBond HPLC Column Hubble C_{18} 柱 $(250 \text{ mm} \times 4.6 \text{ mm}, 5 \text{ } \mu\text{m})$ 和 Shim-pack GIS C_{18} 柱 $(250 \text{ mm} \times 4.6 \text{ } \text{mm}, 5 \text{ } \mu\text{m})$ 进行试验,其分离 度和测定结果均能达到要求。

本研究在实验室条件下模拟茜草饮片加工过 程,药材净制后,将切制过程提前,以保证后续 制备的 CP 和 YP 具有均一来源。在 CP 样品的制 备中,为避免成分流失,省去水洗步骤,考察了 润湿时间、干燥温度的影响。结果显示:干燥温 度分别设置60、80、100℃,随着温度升高,羟 基茜草素稍呈下降趋势, 而大叶茜草素总体变化 不明显,最终选择干燥温度为60℃,干燥时间 为1h,控制样品水分在8%~10%。对于润湿程度, 药典规定应润透, 在预试验中发现, 润湿 1 h, 样品仍有硬心,成分转化也不明显;润湿3h后, 样品基本软化;实际生产中完整药材的软化需要 更长时间,一般采取润湿过夜。通过试验考察了 切段样品润湿3h和润湿过夜的含量,结果显示, 随着润湿时间的延长,由药典法测得的羟基茜草 素含量下降较为显著,由 0.099 8%降至 0.069 1%; 大叶茜草素含量由 0.946% 增至 1.037%。由此可 见, 润湿过程是导致含量变化的关键因素。试验 中选择润湿 3 h, 此时样品软化程度以及含量变 化程度与大生产的情况较为相符。

根据优化的方法将 10 批不同产地 YP 制备成 CP, 并测定每批 YP 和 CP 中羟基茜草素和大叶 茜草素的含量。结果显示两种成分均呈现相同的 含量变化趋势,与大生产的情况一致。其中,对于羟基茜草素,样品 S2 原药材来货合格,其对应饮片含量低于标准;而对于大叶茜草素,样品 S1 和 S6 来货均不符合规定,但制成饮片后含量 却达标 4 倍以上,因此在标准制定的过程中,可同时考察药材和对应饮片的含量变化情况。

为探究上述含量变化原因,本试验参照文献^[14]方法,进一步改良供试品溶液制备方法,结果溶液稳定性得到提高,含量测定结果与原文献法相比无明显差异,且操作更简便、耗时更短。从提取原理角度分析,药典法先用甲醇提取,再进行水解,提取得到的成分含量主要取决于甲醇的提取能力;改良法直接加酸回流提取,一方面酸性环境有利于含酚羟基化合物及其结合盐的溶

出,另一方面水解可以释放目标苷元,可获得较 高的提取率[14]。结果显示改良法可提高羟基茜草 素的提取率。另外,试验过程同时对《中国药典 (2020年版)》供试品溶液制备中醇提液进行 了检测, 羟基茜草素的含量较少, 大叶茜草素的 含量与其对应酸解液相当。综合以上结果分析茜 草中羟基茜草素大部分以结合盐的形式存在, 甲 醇只能提取出少量的游离苷,而同批药材 YP 和 CP 的改良法制备供试品溶液测定结果持平,说明 药典法羟基茜草素的降低不是水洗损耗或降解所 致, 而是加工过程导致游离苷减少; 基于茜草酸 黄碱红的指示剂性质, 以及羟基茜草素在碱性溶 液中含量降低的现象,发现茜草药材润湿后,颜 色变红,且随着润湿时间的延长,红色逐渐加深, 提示润湿过程可能碱化了茜草的内环境, 使羟基 茜草素游离苷更趋向于形成结合盐, 造成饮片加 工后含量降低;由此可见,改良法能够更真实地 反映茜草中羟基茜草素的总量。茜草中大叶茜草 素主要以游离形式存在,加工后其含量升高的可 能原因是发生了其他化学转化, 具体机制还有待 进一步研究。

本研究在实验室条件下模拟大生产的关键工序,制备与原药材来源一致的茜草饮片;以药典法和改良法同时确认茜草加工前后羟基茜草素和大叶茜草素的含量变化规律,通过多维度对比分析原因,为茜草检验标准的合理制订和质量控制提供参考。

参考文献

- 1 中国药典 2020 年版. 一部 [S]. 2020: 245-246.
- 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. [Chen Y, Wang HL, Xue L, et al. Research progress on Rubiae Radix et Rhizoma[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2017, 48(13): 2771–2779.] DOI: 10.7501/j.issn.0253–2670.2017.13.029.
- 3 张琳, 胡本祥, 安衍茹, 等. 茜草本草考证 [J]. 吉林中 医药, 2018, 38(3): 317–320. [Zhang L, Hu BX, An YR, et al. Herbalogical study on Rubiae Radix et Rhizoma[J]. Jilin Journal of Traditional Chinese Medicine, 2018, 38(3): 317– 320.] DOI: 10.13463/j.cnki.jlzyy.2018.03.020.
- 4 中国药典 2000 年版. 一部 [S]. 2000: 187-188.
- 5 中国药典 2005 年版. 一部 [S]. 2005: 162.
- 6 中国药典 2010 年版. 一部 [S]. 2010: 218-219.

- 7 中国药典 2015 年版. 一部 [S]. 2015: 234-235.
- 8 姜云, 乔春凤, 刘华, 等. HPLC 多指标成分定量联合化学计量学评价不同产地茜草 [J]. 现代药物与临床, 2024, 39(1): 94-101. [Jiang Y, Qiao CF, Liu H, et al. Evaluation of Rubiae Radix from different regions by HPLC multi indexcomponents combined with chemometrics[J]. Drugs & Clinic, 2024, 39(1): 94-101.] DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2024.01.012.
- 9 李欣,高天鹏,张明童,等.基于多组分含量测定及多元统计分析研究茜草、大茜草及大叶茜草[J].药物分析杂志,2023,43(12):2072-2080. [Li X, Gao TP, Zhang MT, et al. Based on multi-component content determination and multivariate statistical analysis study Rubiae Radix et Rhizoma, Rubia magna P.G. Hsiao. and Rubia schumanniana Pritz[J]. Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis, 2023, 43(12): 2072-2080.] DOI: 10.16155/j.0254-1793.2023.12.12.
- 10 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. [Guo GM, Cai L, Liang XY, et al. Determination of rubitin and hydroxyl rubitin in Rubiae Radix et Rhizoma decoction slices by HPLC[J]. Beijing Journal of Traditional Chinese Medicine, 2011, 30(7):541-543.] DOI: 10.16025/j.1674-1307.2011.07.027.
- 11 王锐,曹赢,王知斌:"一测多评"法测定茜草中 3 种有效成分百分含量 [J]. 哈尔滨商业大学学报 (自然科学版), 2016, 32(4): 426–428, 432. [Wang R, Cao Y, Wang ZB. Determination of three active ingredients in Radix Rubiae by quantitative analysis of multi-components with single-marker[J]. Journal of Harbin University of Commerce (Natural

- Sciences Edition), 2016, 32(4): 426–428, 432.] DOI: 10.19492/j.cnki.1672–0946.2016.04.011.
- 12 于瑞,高明洁,崔彬彬,等. HPLC 法测定中药茜草中茜草素、羟基茜草素和大叶茜草素的含量 [J]. 哈尔滨 医科大学学报,2017,51(3): 195-199. [Yu R, Gao MJ, Cui BB, et al. Simultaneous determination of alizarin, purpurin and mollugin in *Rubia cordifolia* L. by HPLC[J]. Journal of Harbin Medical University, 2017, 51(3): 195-199.] DOI: 10.3969/j.issn.1000-1905.2017.03.002.
- 13 杨丽. 对 2015 年版《中国药典》中茜草定量测定方法的改进 [J]. 中成药, 2020, 42(9): 2527-2529. DOI: 10. 3969/j.issn.1001-1528.2020.09.054.
- 14 林文华,朱喜梅,严萍,等. 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 [J]. 中药新药与临床药理,2014,25(3): 345-348. [Lin WH, Zhu XM, Yan P, et al. Experiment research on optimization of determination method for rubimaillin and purpurin in *Radix Rubiae*[J]. Traditional Chinese Drug Research and Clinical Pharmacology, 2014, 25(3): 345-348.] DOI: 10.3969/j.issn.1003-9783.2014.03.027.
- 15 杨宇婷,康文艺. HPLC 法测定茜草及不同炮制品中大叶茜草素 [J]. 中成药, 2011, 33(12): 2125–2127. [Yang YT, Kang WY. Determination of rubimaillin contents in *Rubia Cordifolia* L. and different processed products by HPLC[J]. Chinese Traditional Patent Medicine, 2011, 33(12): 2125–2127.] DOI: 10.3969/j.issn.1001–1528.2011.12.028.

收稿日期: 2024年05月10日 修回日期: 2024年09月14日 本文编辑: 钟巧妮 李 阳