

藏药水柏枝的质量标准研究[△]

多杰^{1,2,3*}, 马志良², 多杰拉旦², 尼玛才让², 东知多杰², 赛桑杰²(1.中国科学院干旱区植物资源化学重点实验室/新疆特有药用资源利用省部共建国家重点实验室培育基地/中国科学院新疆理化技术研究所, 乌鲁木齐 830011; 2.藏药研发国家重点实验室/青海省藏医药研究院, 西宁 810016; 3.中国科学院大学化学与化工学院, 北京 100049)

中图分类号 R917;R927 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)33-4699-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.33.25

摘要 目的:建立藏药水柏枝的质量标准。方法:从性状特征、显微特征、薄层色谱(TLC)方面对药材进行定性鉴别;检测药材水分、灰分和浸出物的含量;采用高效液相色谱法(HPLC)测定药材中没食子酸的含量;色谱柱为 Diamonsil C₁₈, 流动相为乙腈-0.1%磷酸溶液(5:95, V/V), 流速为 1.0 mL/min, 检测波长为 270 nm, 柱温为 30 ℃, 进样量为 10 μL。结果:水柏枝呈圆柱形, 有多数窄条形互生小叶, 质脆, 易折断, 气微, 味淡。木栓细胞表面和下表皮细胞表面可见多角形, 木纤维多成束, 草酸钙簇晶众多。TLC 图斑点清晰, 分离度良好。水分为 6.83%~8.12%, 总灰分为 4.01%~5.01%, 酸不溶性灰分为 1.06%~1.98%, 水浸出物为 17.91%~22.65%, 醇浸出物为 11.29%~15.51%。没食子酸检测质量浓度线性范围为 3.13~50 μg/mL ($r=0.9997$), 精密度、稳定性、重复试验的 RSD<1.0%, 没食子酸加样回收率为 94.0%~100.8% (RSD=2.27%, $n=9$)。结论:该研究所建标准可用于藏药水柏枝的质量评价。

关键词 藏药; 水柏枝; 质量标准; 没食子酸; 薄层色谱法; 高效液相色谱法

Study on Quality Standard of Tibetan Medicine *Myricaria germanica*

DUO Jie^{1,2,3}, MA Zhiliang², Duojieladan², Nimacairang², Dongzhiduojie², Saisangjie² (1.Key Lab of Chemistry of Plant Resources in Arid Regions, Chinese Academy of Sciences/State Key Lab Breeding Base of Xinjiang Indigenous Medicinal Plants Resource Utilization/Xinjiang Technical Institute of Physics and Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Urumqi 830011, China; 2.State Key Lab of Tibetan Medicine Research and Development/Qinghai Tibetan Medicine Research Institute, Xining 810016, China; 3.School of Chemistry and Chemical Engineering, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the quality standard of Tibetan medicine *Myricaria germanica*. METHODS: *M. germanica* was identified in respects of properties, microscopic characteristics and TLC. The contents of moisture, ash and extract were determined. HPLC method was adopted for content determination of gallic acid. The determination was performed on Diamonsil C₁₈ column with mobile phase consisted of acetonitrile -0.1% phosphoric acid solution(5:95, V/V) at the flow rate of 1.0 mL/min. The detection wavelengths were set at 270 nm. The column temperature was 30 ℃ and the sample size was 10 μL. RESULTS: *M. germanica* was cylindrical in shape, and there were many narrow strip alternate leaflets, which were brittle, easily broken, weak in smell, mild in flavor. Cork cell surface and lower epidermal cell surface showed polygon; most of xylon were bunched; there were many clusters of calcium oxalate. TLC spots were clear and well-separated. The contents of moisture, total ash, acid-insoluble ash, water-soluble extract and ethanol were 6.83%-8.12%, 4.01%-5.01%, 1.06%-1.98%, 17.91%-22.65%, 11.29%-15.51%. The linear range of gallic acid were 3.13-50 μg/mL ($r=0.9997$); RSDs of precision, stability and reproducibility tests were lower than 1.0%; the recoveries were 94.0%-100.8% (RSD=2.27%, $n=9$). CONCLUSIONS: Established standard can be used for quality evaluation of Tibetan medicine *M. germanica*.

KEYWORDS Tibetan medicine; *Myricaria germanica*; Quality standard; Gallic acid; TLC; HPLC

水柏枝始载于《四部医典》,藏文译音为“翁布”^[1],为柽柳科植物水柏枝 *Myricaria germanica* L.Desv. 的嫩枝及叶、花,主要分布于我国青海、甘肃、四川、云南、西藏等地,生长于山地、河谷、砾石质河滩、河床砂地、河漫滩

△ 基金项目:青海省自然科学基金面上项目(No.2015-ZJ-910);青海省藏药新药开发重点实验室项目(No.2017-ZJ-Y15)

* 主任医师,教授,博士研究生。研究方向:藏药质量标准及药效物质基础。电话:0971-8270006。E-mail: duojie0302@sina.com

及河谷山坡^[2]。水柏枝药材主治风湿痹痛、麻疹不透、瘟病时疫、脏腑毒热、咽喉肿痛、中毒症、黄水病、血热病等症^[3],被广泛用于藏药复方制剂中,如二十五味大汤丸、五味甘露药浴汤散、十九味草果散等^[4]。水柏枝药材含有黄酮、三萜、酚酸、木脂素、甾体和长链脂肪醇类等化合物^[5-7]。现代药理研究表明,水柏枝药材具有抗菌、抗炎、镇痛、抗疲劳、提高细胞免疫以及保护肝损伤等作用^[8]。然而,水柏枝作为常用藏药材,目前缺乏相关质量

标准,给临床用药带来诸多不便。因此,本研究结合2015年版《中国药典》(一部)规定,鉴定10批水柏枝药材样品的原植物性状、显微特征,测定水分、总灰分和浸出物含量,采用薄层色谱法(TLC)和高效液相色谱法(HPLC)进行定性、定量研究,为制定水柏枝药材的质量标准提供参考。

1 材料

1.1 仪器

2695型HPLC仪,包括二元梯度泵,Waters 2996型紫外检测器,EMPOWER色谱工作站(美国Waters公司);UPT-II型超纯水机(成都优普超纯水科技有限公司)。

1.2 试剂

没食子酸对照品(中国食品药品检定研究院,批号:110831-201605,纯度:>98%);硅胶G薄层板(青岛海洋化工厂);甲醇、乙腈为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为纯化水。

1.3 药材

水柏枝药材采集自青海、甘肃和西藏等地(见表1),经笔者鉴定为真品。

表1 水柏枝药材来源

Tab 1 Origin of *M. germanica*

编号	来源	编号	来源
SBZ-1	青海贵德	SBZ-6	青海贵德
SBZ-2	青海互助北山	SBZ-7	海东乐都
SBZ-3	甘肃永登	SBZ-8	甘肃甘南
SBZ-4	青海湟中南朔山	SBZ-9	青海大通
SBZ-5	西藏昌都	SBZ-10	青海西宁

2 方法与结果

2.1 原植物性状

药材原植物枝呈圆柱形,直径3~6 mm。嫩枝表面绿色;老枝表面灰红色、褐色;有少数窄条形互生小叶,长约1~6 cm,常已脱落,枝断面不平整,皮部薄,木部绿色,髓部大,黄白色。质脆,易折断。气微,味淡。

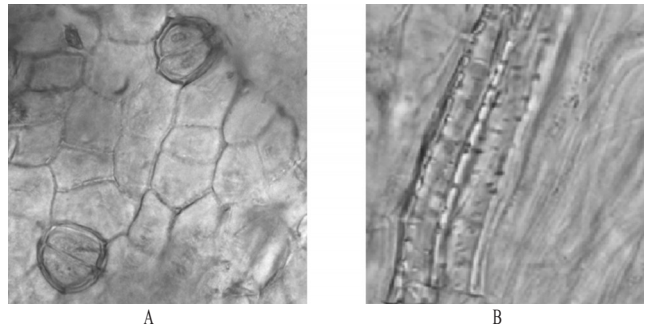
2.2 显微鉴别

药材样品粉末呈绿色。木栓细胞表面观多角形,壁较厚,长160~320 μm,宽90~150 μm;木纤维多成束,无色或淡黄色,直径4~15 μm,壁厚,胞腔细长,纹孔不明显;草酸钙簇晶众多,直径7~13 μm,菱角较钝,有时分布于木纤维周围。下表皮细胞表面观多角形,外壁稍弯曲;可见具缘纹孔纹导管、网纹导管及螺纹导管,详见图1。

2.3 TLC鉴别

取药材样品粉末(过2号筛)1.0 g,加甲醇50 mL,加热回流60 min,滤过,滤液蒸干,残渣加甲醇2 mL使溶解,滤过,取滤液作为供试品溶液。另取没食子酸对照品,加甲醇制成没食子酸质量浓度为2 mg/mL的对照品溶液。按TLC法[2015年版《中国药典》(四部)]^[9]试验,吸取上述2种溶液各2 μL,分别点于同一硅胶G薄层板上,以氯仿-乙酸乙酯-甲酸(5:4:1, V/V/V)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以0.5%三氯化铁乙醇溶液,晾干,置

日光灯下检视。结果,供试品色谱中,在与对照品色谱相应位置上显相同颜色的斑点,详见图2。

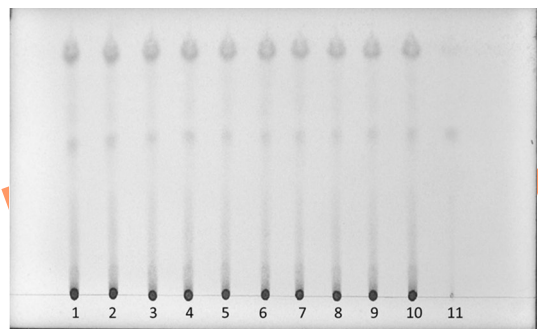


A.表皮细胞;B.螺纹导管

A.epidermal cell;B.threaded catheter

图1 药材样品粉末显微特征图(20×)

Fig 1 Microscopic characteristics of sample powder (20×)



1~10.供试品;11.对照品

1-10.test samples; 11.control reference

图2 薄层色谱图

Fig 2 TLC chromatograms

2.4 水分测定

取10批药材样品粉末(过2号筛)适量,精密称定,按照2015年版《中国药典》(四部)“附录IXH水分测定法”的第一法(烘干法)^[9]测定药材样品水分,每批平行测定3份,详见表2。结果表明,药材样品水分为6.83%~8.12%,平均值为7.40%。初步拟定水柏枝药材水分不得过10.0%。

表2 药材样品水分、灰分、浸出物和没食子酸含量测定结果(n=3)

Tab 2 Content determination of moisture, ash, extract and gallic acid in samples (n=3)

编号	水分, %	总灰分, %	酸不溶性灰分, %	水浸出物, %	醇浸出物, %	没食子酸, mg/g
SBZ-1	8.12	4.20	1.40	17.91	12.59	4.57
SBZ-2	8.05	5.01	1.98	18.59	13.78	5.31
SBZ-3	7.56	4.38	1.17	18.12	13.04	4.42
SBZ-4	7.90	4.78	1.43	18.38	11.29	5.18
SBZ-5	7.38	4.67	1.32	22.65	15.51	4.19
SBZ-6	7.05	4.37	1.42	20.27	12.95	4.25
SBZ-7	7.03	4.51	1.14	21.65	15.40	5.15
SBZ-8	7.01	4.77	1.48	22.56	14.48	4.20
SBZ-9	6.83	4.01	1.06	21.77	14.49	5.22
SBZ-10	7.11	4.78	1.61	20.35	14.98	4.27

2.5 灰分测定

取10批药材样品粉末(过2号筛)适量,精密称定,按照2015年《中国药典》(四部)“附录IXK灰分测定法^[9]”测定药材样品灰分。每批平行测定3份,详见表2。结果表明,药材样品总灰分为4.01~5.01%,平均值为4.55%;酸不溶性灰分为1.06~1.98%,平均值为1.40%。初步拟定水柏枝药材总灰分不得过6.0%,酸不溶性灰分不得过2.5%。

2.6 浸出物测定

取10批药材样品粉末(过2号筛)适量,精密称定,按照2015年版《中国药典》(四部)“附录X A浸出物测定法^[9]”测定药材样品浸出物。每批平行测定3份,详见表2。结果表明,药材样品水浸出物为17.91%~22.65%,平均值为20.23%;醇浸出物为11.29%~15.51%,平均值为13.85%。初步拟定水柏枝药材水浸出物不得少于15.0%,醇浸出物不得少于10.0%。

2.7 含量测定

2.7.1 色谱条件与系统适用性试验 色谱柱:Diamonsil C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈-0.1%磷酸溶液(5:95, V/V);流速:1.0 mL/min;检测波长:270 nm;柱温:30 ℃;进样量:10 μL。在上述色谱条件下,理论板数以没食子酸峰计>3 000;待测成分基线分离良好,分离度>1.5,详见图3。

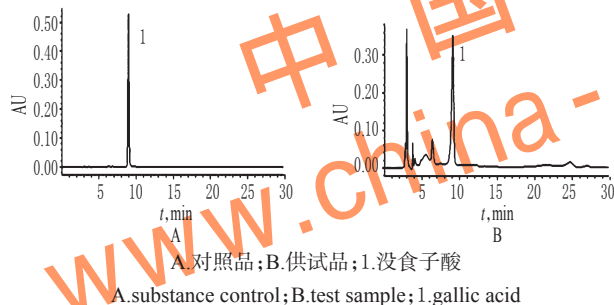


图3 高效液相色谱图

Fig 3 HPLC chromatograms

2.7.2 对照品溶液的制备 精密称取没食子酸对照品5.0 mg,置于100 mL量瓶中,加甲醇定容,摇匀,得没食子酸质量浓度为0.05 mg/mL的对照品溶液。

2.7.3 供试品溶液的制备 取药材样品粉末(过2号筛)0.500 g,置于100 mL回流圆底烧瓶中,加甲醇25 mL,密塞,称定质量,70 ℃回流2 h,放至室温,再次称定质量,用甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,即得。

2.7.4 线性关系考察 分别精密量取“2.7.2”项下对照品溶液适量,倍比稀释为原溶液质量浓度的1、1/2、1/4、1/8、1/16倍,制成系列对照品溶液。精密量取上述系列对照品溶液各10 μL,按“2.7.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以没食子酸质量浓度(x, μg/mL)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归,得没食子酸回归方程 $y=16\ 144x+821$ ($r=0.999\ 7$)。结果表明,没食子酸

检测质量浓度线性范围为3.13~50 μg/mL。

2.7.5 定量限与检测限考察 分别精密量取“2.7.2”项下对照品溶液适量,倍比稀释,并按“2.7.1”项下色谱条件进样测定^[9],当信噪比为10:1时,得定量限为1.0 μg/mL;当信噪比为3:1时,得检测限为0.3 μg/mL^[10]。

2.7.6 精密度试验 取“2.7.2”项下对照品溶液适量,按“2.7.1”项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果,没食子酸峰面积的RSD=0.14%(n=6),表明仪器精密度良好。

2.7.7 稳定性试验 取“2.7.3”项下供试品溶液(批号:SBZ-1)适量,分别于室温下放置0、4、8、12、24 h时按“2.7.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,没食子酸峰面积的RSD=0.91%(n=5),表明供试品溶液室温放置24 h内基本稳定。

2.7.8 重复性试验 精密称取样品(批号:SBZ-1)适量,按“2.7.3”项下方法制备供试品溶液,共6份,再按“2.7.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,没食子酸峰面积的RSD=0.53%(n=6),表明本方法重复性良好。

2.7.9 加样回收率试验 取已知含量样品(批号:SBZ-1)适量,每份0.5 g,共6份,分别加入高、中、低质量的没食子酸对照品,按“2.7.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.7.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算加样回收率,结果见表3。

表3 加样回收试验结果(n=9)

Tab 3 Results of recovery tests(n=9)

样品含量,mg	加入量,mg	测得量,mg	加样回收率,%	平均加样回收率,%	RSD,%
4.57	9.0	13.54	99.7		
4.57	9.0	13.33	97.3		
4.57	9.0	13.64	100.8		
4.57	4.5	8.94	97.1		
4.57	4.5	8.87	95.6	97.0	2.27
4.57	4.5	8.85	95.1		
4.57	2.0	6.45	94.0		
4.57	2.0	6.48	95.5		
4.57	2.0	6.52	97.5		

2.7.10 药材样品含量测定 取10批药材样品各适量,分别按“2.7.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.7.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算药材样品含量,结果见表2。

3 讨论

笔者通过质量标准研究,修订了水柏枝药材性状和显微特征,增加了TLC鉴别,水分、灰分、浸出物及没食子酸的含量测定。TLC预试验中,笔者考察了不同展开系统,并考察了不同点样量(1、2、3、4 μL)^[10],结果发现以氯仿-乙酸乙酯-甲酸(5:4:1, V/V/V)为展开剂,点样2 μL时,斑点清晰,效果最佳;另外,还考察了不同温度、湿度、薄层板对展开的影响,发现各条件对展开结果影响不大。笔者对收集的药材样品进行测定,结果水分为

HPLC法同时测定舒肝宁注射液中5种成分的含量[△]

支旭然*,王 颢,宋浩静,董占军*(河北省人民医院药学部,石家庄 050051)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)33-4702-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.33.26

摘要 目的:建立同时测定舒肝宁注射液中5种成分含量的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为Symmetry[®] C₁₈,流动相为甲醇-0.4%磷酸溶液(梯度洗脱),流速为1.0 mL/min,检测波长为238 nm(栀子苷、黄芩苷)、327 nm(绿原酸、野黄芩苷、黄芩素),柱温为30 ℃,进样量为10 μL。结果:绿原酸、栀子苷、黄芩苷、黄芩素、野黄芩苷检测质量浓度线性范围分别为0.406 2~26.0 μg/mL($r=0.999\ 9$)、2.500 0~160.0 μg/mL($r=0.999\ 9$)、6.562 0~420.0 μg/mL($r=0.999\ 9$)、0.312 5~20.0 μg/mL($r=0.999\ 6$)、0.585 9~37.5 μg/mL($r=0.999\ 8$);定量限≤31.20 ng,检测限≤15.60 ng;精密度、稳定性、重复性试验的RSD<2.0%;加样回收率分别为97.72%~101.10%(RSD=1.21%, $n=6$)、97.67%~102.40%(RSD=1.87%, $n=6$)、97.64%~101.10%(RSD=1.31%, $n=6$)、96.45%~100.10%(RSD=1.47%, $n=6$)、96.16%~101.10%(RSD=1.69%, $n=6$)。结论:该方法操作简便,精密度、稳定性、重复性好,可用于舒肝宁注射液中5种成分含量的同时测定。

关键词 高效液相色谱法;舒肝宁注射液;绿原酸;栀子苷;黄芩苷;黄芩素;野黄芩苷;含量

Simultaneous Determination of 5 Components in Shuganning Injections by HPLC

ZHI Xuran, WANG Mi, SONG Haojing, DONG Zhanjun (Dept. of Pharmacy, Hebei Provincial People's Hospital, Shijiazhuang 050051, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To develop a method for the simultaneous determination of 5 components in Shuganning injections. METHODS: HPLC method was adopted. The determination was performed on Symmetry[®] C₁₈ column with mobile phase consisted of methanol-0.4% phosphoric acid (gradient elution) at the flow rate of 1.0 mL/min. The detection wavelengths were set at 238 nm (geniposide, baicalin) and 327 nm (chlorogenic acid, baicalein, scutellarin). The column temperature was 30 ℃ and the sample size was 10 μL. RESULTS: The linear ranges were 0.406 2-26.0 μg/mL for chlorogenic acid ($r=0.999\ 9$), 2.500 0-160.0 μg/mL for geniposide ($r=0.999\ 9$), 6.562 0-420.0 μg/mL for baicalin ($r=0.999\ 9$), 0.312 5-20.0 μg/mL for baicalein ($r=0.999\ 6$), 0.585 9-37.5 μg/mL for scutellarin ($r=0.999\ 8$). The limits of quantify were no higher than 31.20 ng, limits of detection were no higher than 15.60 ng. RSDs of precision, stability and reproducibility tests were lower than 2.0%; the recoveries were

6.83%~8.12%,总灰分为4.01%~5.01%,酸不溶性灰分为1.06%~1.98%,水浸出物为17.91%~22.65%,醇浸出物为11.29%~15.51%,因此暂定水分、总灰分、酸不溶性灰分分别不得过10.0%、6.0%、2.5%,水和醇浸出物分别不得少于15.0%、10.0%。

通过研究发现,不同产地水柏枝药材中没食子酸含量略有差异,经HPLC法测定,根据结果、药材来源、存放等原因,为保证其临床效果,暂定没食子酸含量不得少于4 mg/g。

综上所述,本研究所建方法可用于水柏枝药材的质量控制。

参考文献

- [1] 宇妥·元丹贡波,毛继祖.医学四续[M].上海:上海科学技术出版社,2012:1-13.
- [2] 中国科学院西北高原生物研究所.藏药志[M].西宁:青海

人民出版社,1991:26.

- [3] 帝玛尔·丹增彭措,毛继祖.晶珠本草[M].上海:上海科学技术出版社,2012:108.
- [4] 青海省药品检验所,青海省藏医药研究所.中国藏药:第一卷[M].上海:上海科学技术出版社,1996:1-203.
- [5] Li S, Dai SJ, Chen RY, *et al.* Triterpenoids from the stems of *Myricaria paniculata*[J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2005, 7(3):253-257.
- [6] 喇晓琴,曾阳,许敏,等.藏药翁布的黄酮类化学成分研究[J].天然产物研究与开发,2011,23(4):596-599.
- [7] 刘佳宝,张瑛,崔保松,等.宽苞水柏枝化学成分研究[J].中草药,2013,44(19):2661-2665.
- [8] 国家中医药管理局《中华本草》编委会.中华本草:藏药卷[M].上海:上海科学技术出版社,2002:1-125.
- [9] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:四部[S].2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:57、103、202、204.
- [10] 田荣,隋忠国,曹玉,等.牛蒡根药材的质量标准研究[J].中国药房,2014,25(31):2934-2936.

(收稿日期:2017-03-28 修回日期:2017-08-08)

(编辑:张 静)

[△]基金项目:政府资助省级临床医学优秀人才项目

*药师,硕士。研究方向:药物分析与药动学。E-mail: zhixuran@163.com

#通信作者:主任药师,硕士生导师。研究方向:医院药事管理、中药质量控制。电话:0311-85988604。E-mail:hbghyxb123@163.com