

藏药悬钩木的质量标准研究[△]

马志良^{1*}, 多杰^{1,2,3#} (1.青海省藏医药研究院/藏药研发国家重点实验室, 西宁 810016; 2.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; 3.中国科学院大学化学与化工学院, 北京 100049)

中图分类号 R927 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)02-0179-04
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.02.09

摘要 目的: 建立藏药悬钩木的质量标准。方法: 从性状特征、显微特征、薄层色谱(TLC)等方面对药材进行定性鉴别; 测定药材水分、灰分、浸出物的含量。采用高效液相色谱法测定药材中芦丁和金丝桃苷的含量, 色谱柱为 Diamonsil C₁₈, 流动相为乙腈-0.1%磷酸溶液(18:82, V/V), 流速为 1.0 mL/min, 检测波长为 360 nm, 柱温为 30 ℃, 进样量为 10 μL。结果: 药材表面呈灰红色至灰红褐色, 有纵向皱沟, 外皮易剥离, 髓部较大、疏松、呈海绵状。药材粉末呈浅黄色, 木纤维成束或单个散在, 韧皮纤维较粗。药材样品中金丝桃苷的 TLC 图斑点清晰, 分离度好; 水分为 6.71%~7.55%, 总灰分为 1.43%~1.67%, 酸不溶性灰分为 0.41%~0.48%, 水浸出物为 17.70%~19.31%, 醇浸出物为 13.76%~16.99%; 金丝桃苷、芦丁检测质量浓度线性范围均为 3.13~50 μg/mL (*r* 分别为 0.999 2、0.999 5)、定量限分别 0.5、1.8 μg/mL, 检测限分别为 0.2、0.9 μg/mL, 精密性、稳定性、重复性试验的 RSD<2.0% (*n*=6), 加样回收率分别为 92.8%~98.8% (RSD=2.25%, *n*=9)、94.0%~98.6% (RSD=1.71%, *n*=9)。结论: 药材水分、总灰分、酸不溶性灰分分别不得过 10.0%、3.0%、0.6%; 水浸出物、醇浸出物、芦丁和金丝桃苷总量分别不得少于 15.0%、12.0%、1.0 mg/g。所建标准可用于藏药悬钩木的质量控制。

关键词 藏药; 悬钩木; 质量标准; 芦丁; 金丝桃苷; 薄层色谱法; 高效液相色谱法

Study on Quality Standard of Tibetan Medicine *Rubus biflorus*

MA Zhiliang¹, DUO Jie^{1,2,3} (1.Qinghai Tibetan Medicine Research Institute/State Key Lab of Tibetan Medicine Research and Development, Xining 810016, China; 2.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; 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 *Rubus biflorus*. **METHODS:** The qualitative identification was conducted from characters characteristics, microscopic characteristics, TLC. The contents of moisture, ash and extract were determined. HPLC method was adopted for content determination of rutin and hyperoside. The determination was performed on Diamonsil C₁₈ column with mobile phase consisted of acetonitrile-0.1% phosphoric acid solution(18:82, V/V) at the flow rate of 1.0 mL/min. The detection wavelength was set at 360 nm, column temperature was 30 ℃, and sample size was 10 μL. **RESULTS:** The surface of the medicinal material was grayish red to grey red brown, with longitudinal wrinkle grooves, and the peel was easy to peel off. The pith of the medicinal material was large, loose, sponge-like. The powder of the medicine was light yellow; wood fiber was bundle or scattered individually; bast fiber was thick. TLC spot of hyperoside was clear and well-separated.

实验方剂学杂志, 2016, 22 (17): 43-48.

[8] 张枚, 陈曼, 张涵庆, 等. 桑白皮的化学成分研究[J]. 天然

△ 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)

* 研究实习生。研究方向: 藏药质量标准。电话: 0971-8201140。E-mail: mzl3205@126.com

通信作者: 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: 0971-8201140。E-mail: duojie0302@sina.com

产物研究与开发, 2010, 22 (3): 416-418.

[9] 孙洁, 张蕾, 张晓珑, 等. 蒙古黄芪的化学成分研究[J]. 现代药物与临床, 2013, 28 (2): 138-143.

[10] 韩贺东, 胡海清, 林燕, 等. 贵州糯米藤化学成分研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20 (2): 82-85.

[11] 何光发, 彭菲菲, 邓秋怡, 等. 白鹤藤化学成分研究[J]. 广东药学院学报, 2016, 32 (2): 135-138.

(收稿日期: 2017-06-17 修回日期: 2017-07-18)

(编辑: 张静)

The contents of moisture, total ash, acid-insoluble ash, water-soluble extract and ethanol extract were 6.71% -7.55% , 1.43% -1.67% , 0.41% -0.48% , 17.70% -19.31% and 13.76% -16.99%. The linear range was 3.13-50 $\mu\text{g/mL}$ for rutin ($r=0.999\ 2$) and hyperoside ($r=0.999\ 5$). The limits of quantitation were 0.5, 1.8 $\mu\text{g/mL}$, and the limits of detection were 0.2, 0.9 $\mu\text{g/mL}$. RSDs of precision, stability and reproducibility tests were all lower than 2.0% ($n=6$). The recoveries were 92.8%-98.8% (RSD=2.25% , $n=9$), 94.0%-98.6% (RSD=1.71% , $n=9$) . CONCLUSIONS: The moisture content, total ash and acid insoluble ash content of medicinal materials is not more than 10.0% , 3.0% and 0.6% , respectively. The total amount of water extract, alcohol extract, rutin and hyperoside is not less than 15.0% , 12.0% , 1.0 mg/g, respectively. Established standard can be used for quality control of Tibetan medicine *R. biflorus*.

KEYWORDS Tibetan medicine; *Rubus biflorus*; Quality standard; Rutin; Hyperoside; TLC; HPLC

藏药悬钩木始载于《四部医典》,为藏医常用药材,藏文译音为“干扎嘎日”^[1],为蔷薇科悬钩子属植物粉枝莓(*Rubus biflorus* Buch.-Ham. ex Smith)的干燥去皮的茎或枝。其分布于我国陕西、甘肃、四川、青海、西藏等地,在印度西北部、克什米尔地区、巴基斯坦、阿富汗、伊朗等地也有分布^[2]。《晶珠本草》记载:“悬钩木味甘、苦、微辛,果味甘、酸,用于治隆热病、培根病、浮肿,治肺病特效,亦治热性时疫^[3]。”悬钩木药材被广泛用于藏药复方制剂中,如十一味能消散、四味土木香散等^[4],其化学成分主要包括槲皮素、木犀草素、芹菜素、山柰酚、矢车菊素及其糖苷类以及金丝桃苷、芦丁、粉枝莓素,二萜、三萜以及少数单萜,没食子鞣质、逆没食子鞣质、可水解鞣质低聚体和咖啡鞣质等^[4-5]。现代药理研究表明,悬钩木具有活血化瘀、清热解毒之功效^[6-8]。本研究结合2015年版《中国药典》(一部)规定,从性状特征、显微特征、薄层色谱(TLC)等方面对悬钩木药材进行定性鉴别,测定药材水分、灰分、浸出物的含量,采用高效液相色谱法(HPLC)测定药材中芦丁和金丝桃苷的含量,从而建立一个相对完善的质量标准,为保障该药材质量提供一定依据。

1 材料

1.1 仪器

2695型HPLC仪,包括二元梯度泵、2996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

芦丁对照品(批号:100080-201610,纯度:>98%)、金丝桃苷对照品(批号:111521-201507,纯度:>98%)均购自中国食品药品检定研究院;硅胶薄层板(青岛海洋化工厂);乙腈为色谱纯,甲醇为色谱纯和优级纯,其余试剂均为分析纯,水为纯化水。

1.3 药材

悬钩木药材采集自青海、甘肃和西藏等地(见表1),经中国科学院新疆理化技术研究所多杰教授鉴定为真品。

2 方法与结果

2.1 性状

药材样品呈圆柱形,长约20 cm,直径0.4~0.8 cm。表面灰红色至灰红褐色,有纵向皱沟、突起的侧枝

表1 悬钩木药材来源

Tab 1 Source of *R. biflorus*

编号	来源	编号	来源
XGM-1	青海坎布拉	XGM-6	西藏昌都
XGM-2	青海互助北山	XGM-7	甘肃永登
XGM-3	青海湟中群加	XGM-8	西藏昌都
XGM-4	青海贵德	XGM-9	甘肃甘南
XGM-5	青海湟源	XGM-10	青海贵德

痕及白色的皮刺基。外皮易剥离,剥离后呈红褐色。易折断,断面不平整,皮部较薄,呈红褐色,木部黄白色至浅红褐色。髓部较大,疏松呈海绵状,呈白色至黄白色,体轻,质坚硬。气微,味淡。

2.2 显微鉴别

药材样品粉末呈浅黄色。木纤维成束或单个散在,壁较薄,壁孔不明显,木射线宽1~3列细胞,射线细胞类方形,壁孔及纹孔明显。韧皮纤维较粗,两端稍钝,胞腔较大。木栓细胞类方形或长方形,黄棕色。草酸钙簇晶较多,棱角圆钝或稍尖,大小不等。具缘纹孔导管较大,纹孔较密。显微特征详见图1。

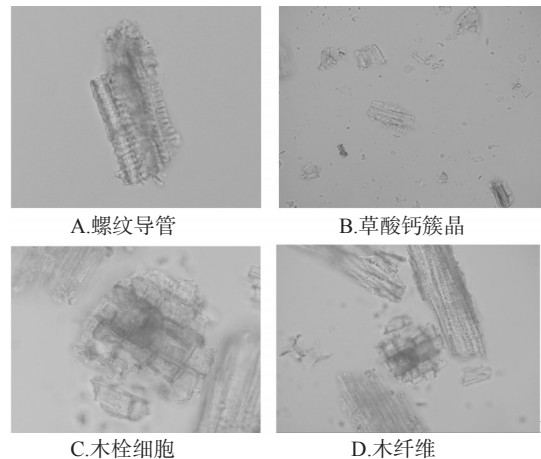


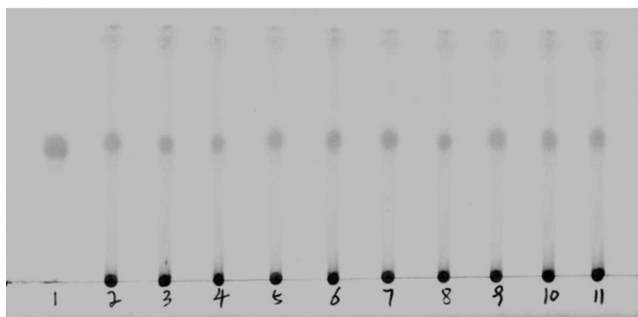
图1 药材样品粉末显微特征图

Fig 1 Microscopic characteristics of *R. biflorus* powder

2.3 TLC鉴别

取药材样品粉末(过2号筛)1.0 g,加甲醇20 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。另取金丝桃苷对照品适量,加甲醇制成金丝桃苷质量浓度为2 mg/mL的对

照品溶液。按2015年版《中国药典》(四部)TLC法^[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,以乙酸乙酯-甲酸-水(8:1:1, V/V/V)为展开剂,避光展开,取出,晾干,喷以1%三氯化铝溶液,晾干,置日光下检视。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。



注:1. 对照品;2~11. 供试品

Note: 1. control substance; 2-11. test samples

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》(一部)附录IXH水分测定法的第一法(烘干法)^[10]测定其中水分,每批平行测定3份。结果显示,药材样品水分分为6.71%~7.55%,平均值为7.13%,详见表2。初步拟定悬钩木药材水分不得过10.0%。

表2 药材样品中水分、灰分、浸出物与芦丁、金丝桃苷含量测定结果(n=3)

Tab 2 Results of content determination of moisture, ash, extract, rutin and hyperoside in medicinal materials (n=3)

编号	水分, %	总灰分, %	酸不溶性灰分, %	水浸出物, %	醇浸出物, %	芦丁, mg/g	金丝桃苷, mg/g	总量, mg/g
XGM-1	7.31	1.64	0.47	18.07	14.50	0.930	0.280	1.210
XGM-2	7.31	1.61	0.46	18.34	13.76	0.974	0.274	1.248
XGM-3	7.48	1.61	0.46	19.31	16.87	0.872	0.266	1.138
XGM-4	7.55	1.58	0.45	18.47	16.99	0.905	0.302	1.207
XGM-5	7.08	1.58	0.45	18.84	16.17	0.847	0.293	1.140
XGM-6	6.89	1.43	0.41	18.16	16.12	0.832	0.271	1.103
XGM-7	6.73	1.53	0.44	18.64	15.96	0.994	0.266	1.260
XGM-8	7.10	1.59	0.45	18.42	15.55	1.037	0.294	1.331
XGM-9	7.03	1.67	0.48	17.70	14.06	0.954	0.285	1.239
XGM-10	6.71	1.51	0.43	17.74	15.02	0.886	0.269	1.155

2.5 灰分测定

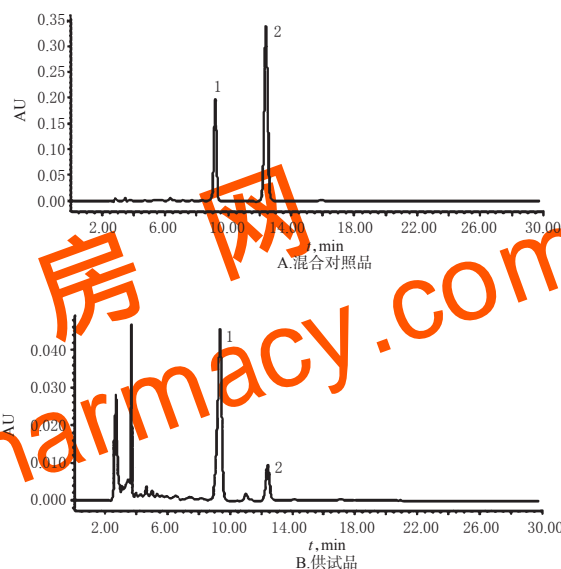
取10批药材样品粉末(过2号筛)适量,精密称定,按照2015年版《中国药典》(一部)附录IXK灰分测定法^[10]测定其中灰分。每批平行测定3份。结果显示,药材样品总灰分为1.43%~1.67%,平均值为1.58%;酸不溶性灰分为0.41%~0.48%,平均值为0.45%,详见表2。初步拟定悬钩木药材总灰分不得过3.0%,酸不溶性灰分不得过0.6%。

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》(一部)附录XA浸出物测定法^[10]测定其中水浸出物和醇浸出物(乙醇体积分数为95%),每批平行测定3份。结果显示,药材样品水浸出物为17.70%~19.31%,平均值为18.40%;醇浸出物为13.76%~16.99%,平均值为15.50%,详见表2。初步拟定悬钩木药材水浸出物不得少于15.0%,醇浸出物不得少于12.0%。

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(18:82, V/V);流速:1.0 mL/min;检测波长:360 nm;柱温:30 ℃;进样量:10 μL^[11]。在上述色谱条件下,理论板数以芦丁和金丝桃苷峰计均不低于5 000;各成分基线分离良好,分离度大于1.5,详见图3。



注:1. 芦丁;2. 金丝桃苷

Note: 1. rutin; 2. hyperoside

图3 高效液相色谱图

Fig 3 HPLC chromatograms

2.7.2 混合对照品溶液的制备 精密称取芦丁、金丝桃苷对照品各5.0 mg,置于同一100 mL量瓶中,加乙腈溶解并定容,摇匀,得芦丁、金丝桃苷质量浓度均为0.05 mg/mL的混合对照品溶液。

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,加乙腈25 mL,密塞,称定质量,70 ℃回流2 h;放冷至室温,再次称定质量,用乙腈补足减失的质量,摇匀,滤过,即得。

2.7.4 线性关系考察 分别精密量取“2.7.2”项下混合对照品溶液适量,倍比稀释为原溶液质量浓度的1/2、1/4、1/8、1/16,制成系列混合对照品溶液。精密量取上述混合对照品原溶液和系列稀释溶液各10 μL,按“2.7.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以芦丁、金丝桃苷质量浓度(x, μg/mL)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归,得芦丁、金丝桃苷回归方程分别为 $y=147\ 120x+$

27 634($r=0.999 2$)、 $y=227 953x-1 338 091$ ($r=0.999 5$)。结果表明,芦丁、金丝桃苷检测质量浓度线性范围均为3.13~50 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.7.5 定量限与检测限考察 分别精密量取“2.7.2”项下混合对照品溶液适量,倍比稀释,并按“2.7.1”项下色谱条件进样测定。当信噪比为10:1时,得定量限;当信噪比为3:1时,得检测限。结果,芦丁、金丝桃苷的定量限分别为0.5、1.8 $\mu\text{g/mL}$,检测限分别为0.2、0.9 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.7.6 精密度试验 取“2.7.2”项下混合对照品溶液适量,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,芦丁、金丝桃苷峰面积的RSD分别为0.79%、0.12%($n=6$),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(编号:XGM-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,芦丁、金丝桃苷峰面积的RSD分别为1.01%、1.72%($n=6$),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(编号:XGM-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,记录峰面积并计算样品含量。结果,芦丁、金丝桃苷含量平均值分别为0.930、0.280 mg/g,RSD分别为1.94%、1.06%($n=6$),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(编号:XGM-1)适量,共9份,分别加入高、中、低质量的待测成分对照品,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 加样回收率试验结果($n=9$)

Table 3 Results of recovery tests ($n=9$)

待测成分	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,%
芦丁	0.930	1.193	2.270	96.2	95.5	2.25
	0.930	1.397	2.286	97.1		
	0.930	1.410	2.323	98.8		
	0.930	0.925	1.811	95.2		
	0.930	0.931	1.795	92.9		
	0.930	0.927	1.836	97.7		
	0.930	0.461	1.367	94.8		
	0.930	0.468	1.368	93.6		
	0.930	0.462	1.359	92.8		
金丝桃苷	0.280	0.121	0.398	97.4	96.2	1.71
	0.280	0.115	0.393	98.2		
	0.280	0.119	0.397	98.6		
	0.280	0.076	0.352	95.3		
	0.280	0.079	0.355	94.7		
	0.280	0.074	0.351	96.3		
	0.280	0.037	0.315	94.0		
	0.280	0.035	0.314	96.7		
	0.280	0.039	0.317	94.7		

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,记录峰面积并计算样品含量。结

果显示,药材样品中芦丁和金丝桃苷总量为1.103~1.331 mg/g,平均值为1.203 mg/g,详见表2。初步拟定两者总量不得少于1.0 mg/g。

3 讨论

笔者研究了藏药悬钩木药材原标准中的性状和显微特征,增加了TLC鉴别,水分、灰分、浸出物与芦丁、金丝桃苷的含量测定。在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)对展开结果的影响,发现以乙酸乙酯-甲酸-水(8:1:1, $V/V/V$)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、薄层板对展开结果的影响,发现各条件对展开结果影响不大。

笔者对收集的10批悬钩木药材样品进行了测定,结果水分为6.71%~7.55%,总灰分为1.43%~1.67%,酸不溶性灰分为0.41%~0.48%,水浸出物为17.70%~19.31%,醇浸出物为13.76%~16.99%,因此,暂定水分、总灰分、酸不溶性灰分分别不得过10.0%、3.0%、0.6%,水和醇浸出物分别不得少于15.0%、12.0%。研究发现,不同产地悬钩木药材中芦丁和金丝桃苷含量略有差异,结合药材来源、存放等原因,为保证其临床疗效,暂定芦丁和金丝桃苷总量不得少于1.0 mg/g。

综上所述,所建立的标准可用于藏药悬钩木的质量控制。

参考文献

- [1] 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,1996:102.
- [2] 杨永昌. 藏药志[M]. 西宁:青海人民出版社,1991:38.
- [3] 帝玛尔·丹增彭措. 晶珠本草[M]. 毛继祖,译. 上海:上海科学技术出版社,2012:135.
- [4] 甘露,蒋凤池. 粗叶悬钩子化学成分的分鉴定[J]. 北京医科大学学报,2000,32(3):226-228.
- [5] 孟祥娟,刘斌,折改梅,等. 悬钩子属植物化学成分及药理活性研究进展[J]. 天然产物研究与开发,2011,23(4):767-775.
- [6] 李维林,贺善安,顾姻. 中国悬钩子属植物的利用价值概述[J]. 武汉植物学研究,2000,18(3):237-243.
- [7] 傅正生,杨爱梅,梁卫东,等. 悬钩子属植物化学成分及生物活性研究新进展[J]. 天然产物研究与开发,2001,13(5):86-91.
- [8] 孙长清,邵小明,王黎明,等. 悬钩子属植物的开发利用概述[J]. 广西植物,2004,24(6):578-582.
- [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.
- [10] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 2015年版. 北京:中国医药科技出版社,2015:103,202,204.
- [11] 杨建冬,邓茂芝. 地稔药材的质量标准研究[J]. 中国药房,2015,26(6):818-820.

(收稿日期:2017-04-21 修回日期:2017-07-03)

(编辑:张 静)