十大功劳叶药材的质量标准提高研究Δ

杨昌贵[1*],肖承鸿[1],江维克[2#],周　涛[1],胡红莲[2](1.贵阳中医学院实验中心,贵阳　550002;2.贵阳中医学院药学院,贵阳　550002)

中图分类号　R927　　**文献标志码**　A　　**文章编号**　1001-0408(2018)04-0470-04
DOI　10.6039/j.issn.1001-0408.2018.04.10

摘　要　目的:提高十大功劳叶药材的质量标准。方法:采用薄层色谱法(TLC)对药材样品进行定性鉴别。测定药材样品水分、灰分、醇浸出物。采用高效液相色谱法测定药材样品中盐酸小檗碱的含量,色谱柱为WondaSil C_{18},流动相为乙腈-0.05 mol/L磷酸二氢钾溶液(25∶75,*V*/*V*),流速为1.0 mL/min,检测波长为264 nm,柱温为30 ℃,进样量为10 μL。结果:药材样品TLC图斑点清晰,分离度好。药材样品水分为3.92%～7.03%,总灰分为3.65%～6.95%,酸不溶性灰分为0.05%～1.03%,醇浸出物为10.87%～33.14%。盐酸小檗碱检测进样量线性范围为0.183～0.915 μg(r=0.999 9);定量限、检测限分别为0.143、0.095 μg;精密度、稳定性、重复性试验的RSD<2.0%(n=6);加样回收率为95.21%～103.10%(RSD=2.95%,n=6)。结论:药材水分、总灰分、酸不溶性灰分分别不得过8.0%、6.0%、0.4%,醇浸出物、盐酸小檗碱含量分别不得低于16.0%、1.0%。所建标准可用于十大功劳叶药材的质量控制。

关键词　十大功劳叶;质量标准;高效液相色谱法;薄层色谱法

Study on the Improvement of Quality Standard for Folium Mahoniae

YANG Changgui[1], XIAO Chenghong[1], JIANG Weike[2], ZHOU Tao[1], HU Honglian[2] (1. Experimental Center, Guiyang University of TCM, Guiyang 550002, China; 2. College of Pharmacy, Guiyang University of TCM, Guiyang 550002, China)

ABSTRACT　OBJECTIVE: To improve the quality standard of Folium Mahoniae. METHODS: TLC was used for qualitative identification. The contents of moisture, ash and ethanol extract were determined. The content of berberine hydrochloride was determined by HPLC. The determination was performed on WondaSil C_{18} column with mobile phase consisted of acetonitrile-0.05 mol/L monopotassium phosphate solution (25∶75, *V*/*V*) at the flow rate of 1.0 mL/min. The detection wavelength was 264 nm, column temperature was 30 ℃, and sample size was 10 μL. RESULTS: TLC spots were clear and well-separated. The contents of moisture, total ash, acid-insoluble ash and ethanol extract were 3.92%-7.03%, 3.65%-6.95%, 0.05%-1.03% and 10.87%-33.14%, respectively. The linear range of berberine hydrochloride was 0.183-0.915 μg (r=0.999 9); quantitation limit and detection limit was 0.143, 0.095 μg, respectively. RSDs of precision, stability and reproducibility tests were lower than 2.0% (n=6); recovery was 95.21%-103.10% (RSD=2.95%, n=6). CONCLUSIONS: The content of moisture, total ash and acid-insoluble ash of medicinal materials is not exceed 8.0%, 6.0% and 0.4%, respectively. The content of ethanol extract and berberine hydrochloride is not less than 16.0% and 1.0%, respectively. Established standard can be used for quality control of Folium Mahoniae.

KEYWORDS　Folium Mahoniae; Quality standard; HPLC; TLC

中国药房网 www.china-pharmacy.com

十大功劳叶味苦、寒,归肺、肝、肾经,具有滋阴、清热、止咳化痰的功效,贵州少数民族多用于治疗肺痨咳嗽、骨蒸潮热[1]。我国十大功劳属的植物有250多种[2],在贵州境内有14个种,分布广泛[3]。2003年版《贵州中药材、民族药材质量标准》收载了长柱十大功劳(*Mahonia duclouxiana* Gagnep)、小果十大功劳(*M. bodinieri* Gagnep)、细叶十大功劳[*M. fortunei* (Lindl.) Fedde]、宽苞十大功劳(*M. eurybracteata* Fedde)及阔叶十大功劳[*M. bealei* (Fort.) Carr]5个种作为十大功劳叶药材来源[1]。但该标准中仅有药材的性状描述和阔叶十大功劳叶的横切面显微鉴别,难以评价药材的优劣。

小檗碱又名黄连素,为十大功劳叶药材中主要的药效成分,具有良好的抗菌、抗微生物、消炎的作用[4-5],这与该药材的治疗范围相符。本研究以盐酸小檗碱、盐酸巴马汀、盐酸药根碱为定性指标,建立了薄层色谱(TLC)定性鉴别方法;以盐酸小檗碱为定量指标,建立了高效液相色谱(HPLC)定量法;完成了水分、灰分和醇浸出物的检查,制订了合理的限度,旨在为提高十大功劳叶药材的质量标准提供一定参考。

1　材料

1.1　仪器

Δ基金项目:贵州省中药材、民族药材质量标准研究课题(No.2015);贵州省研究生工作站建设项目(No.黔教研合JYSZ字〔2014〕016);贵阳市科技计划项目(No.筑科合同〔20151001〕药01号)

*助理实验师,硕士研究生。研究方向:中药、民族药分类鉴定及质量控制。E-mail:1101784323@qq.com

#通信作者:教授。研究方向:中药资源品种整理。E-mail:jwk_88@163.com

LC-20AD型HPLC仪，包括SPD-M20型二极管阵列检测器（日本Shimadzu公司）；XS205型电子分析天平（瑞士Mettler Toledo公司）；SK1200H型超声波清洗器（上海科导超声仪器有限公司）；101-1AB型电热鼓风干燥箱（天津泰斯特仪器有限公司）；ZF-2型三用紫外分析仪（上海安亭电子仪器厂）。

1.2 试剂

盐酸小檗碱对照品（批号：110713-201212，纯度：86.7%）、盐酸巴马汀对照品（批号：110732-201510，纯度：87.4%）均购于中国食品药品检定研究院；盐酸药根碱对照品（成都植标化纯生物技术有限公司，批号：MUST-16040702，纯度：94.0%）；硅胶G（100～200目，青岛海洋化工有限公司）；乙腈为色谱纯，其余试剂均为分析纯；水为纯化水。

1.3 药材

药材样品为本课题组实地采集（见表1），经贵阳中医学院生药学教研室江维克教授鉴定为真品。

表1 十大功劳叶药材来源

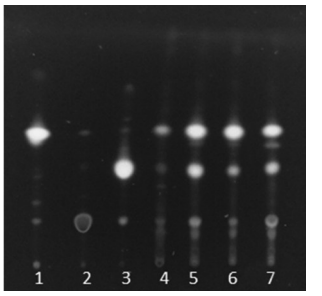
Tab 1 Sources of Folium Mahoniae

编号	来源	采集地	采集时间
S-1	小果十大功劳叶	贵定县石巩固乡	2016-07-23
S-2	小果十大功劳叶	施秉县牛大场镇	2016-08-18
S-3	小果十大功劳叶	施秉县牛大场镇	2016-08-18
S-4	小果十大功劳叶	修文县六广镇	2016-08-14
S-5	小果十大功劳叶	修文县六广镇	2016-08-14
S-6	长柱十大功劳叶	修文县六广镇	2016-08-18
S-7	长柱十大功劳叶	修文县六广镇	2016-08-18
S-8	宽苞十大功劳叶	关岭县下坝村	2016-07-20
S-9	细叶十大功劳叶	开阳县禾丰乡	2016-07-28
S-10	细叶十大功劳叶	开阳县禾丰乡	2016-07-28
S-11	细叶十大功劳叶	开阳县禾丰乡	2016-07-28
S-12	细叶十大功劳叶	晴隆县三宝乡	2016-08-03
S-13	细叶十大功劳叶	花溪区党武乡	2016-08-20

2 方法与结果

2.1 定性鉴别

取药材样品粉末（过2号筛）2.5 g，置于提取瓶中，加乙醇50 mL，回流提取3 h，趁热滤过，滤液浓缩至10 mL，作为供试品溶液。另取盐酸小檗碱、盐酸巴马汀、盐酸药根碱对照品各适量，加甲醇制成各待测成分质量浓度均为0.5 mg/mL的单一对照品溶液。按2015年版《中国药典》（四部）TLC法[6]试验，吸取上述4种溶液各3 μL，分别点于同一硅胶G薄层板上，以甲苯-乙酸乙酯-甲醇-异丙醇-氨溶液（6∶3∶1.5∶1.5∶0.5，*V*/*V*/*V*/*V*/*V*）为展开剂，置于氨蒸气饱和的展开缸内饱和20 min，展开，取出，晾干，置紫外光灯（365 nm）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1。



注：1. 盐酸小檗碱对照品；2. 盐酸药根碱对照品；3. 盐酸巴马汀对照品；4.长柱十大功劳叶药材（S-6）；5. 小果十大功劳叶药材（S-5）；6. 宽苞十大功劳叶药材（S-8）；7. 细叶十大功劳叶药材（S-9）

Note：1. berberine hydrochloride control；2. jatrorrhizine hydrochloride control；3. palmatine hydrochloride control；4. *Mahonia duclouxiana* Gagnep（S-6）；5. *M. bodinieri* Gagnep（S-5）；6. *M. eurybracteata* Fedde（S-8）；7. *M. fortunei*（Lindl.）Fedde（S-9）

图1 薄层色谱图

Fig 1 TLC chromatograms

2.2 水分测定

取各批次药材样品粉末（过2号筛）适量，精密称定，按照2015年版《中国药典》（四部）通则“0832水分测定法”的第二法烘干法[6]测定药材样品水分，每批平行测定2份。结果显示，药材样品水分为3.92%～7.03%，平均值为5.75%，详见表2。初步拟定十大功劳叶药材水分不得过8.0%。

表2 药材样品中水分、灰分、醇浸出物、盐酸小檗碱含量检测结果（n=2，%）

Tab 2 Results of content determination of moisture, ash, ethanol extract and berberine hydrochloride in samples（n=2，%）

编号	水分	总灰分	酸不溶性灰分	醇浸出物	盐酸小檗碱
S-1	5.57	5.37	1.03	24.97	2.25
S-2	6.41	5.65	0.05	11.00	1.58
S-3	6.37	5.70	0.13	10.87	1.53
S-4	5.22	6.23	0.10	14.93	1.45
S-5	5.18	6.40	0.07	16.85	1.52
S-6	4.08	6.95	0.36	19.16	1.42
S-7	3.92	5.88	0.25	17.98	1.34
S-8	6.48	3.65	0.16	18.73	0.99
S-9	6.95	4.92	0.31	22.88	1.48
S-10	7.03	5.18	0.31	22.37	1.58
S-11	6.15	5.08	0.20	24.44	1.77
S-12	6.28	6.90	0.30	20.10	2.12
S-13	5.15	3.65	0.67	33.14	0.21
平均值	5.75	5.50	0.30	19.80	1.48

2.3 灰分测定

取各批次药材样品粉末（过2号筛）适量，精密称定，按照2015年版《中国药典》（四部）通则“2302灰分测定法”的总灰分测定法的酸不溶性灰分测定法[6]测定药材样品总灰分和酸不溶性灰分，每批平行测定2份。结果显示，药材样品总灰分为3.65%～6.95%，平均值为5.50%；酸不溶性灰分为0.05%～1.03%，平均值为

www.china-pharmacy.com 中国药房网

0.30%，详见表2。初步拟定十大功劳叶药材总灰分不得过6.0%，酸不溶性灰分不得过0.4%。

2.4 醇浸出物测定

取各批次药材样品粉末（过2号筛）适量，精密称定，提取溶液为50%乙醇溶液，按照2015年版《中国药典》（四部）通则“2201浸出物测定法”的热浸法[6]测定药材样品醇浸出物，每批平行测定2份。结果显示，药材样品醇浸出物为10.87%～33.14%，平均值为19.80%，详见表2。初步拟定十大功劳叶药材醇浸出物不得低于16.0%。

2.5 含量测定

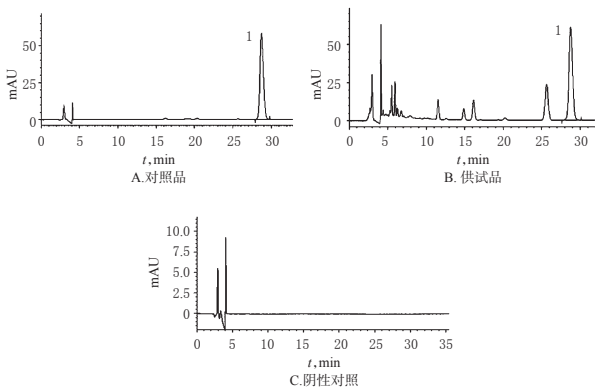
2.5.1 色谱条件 色谱柱：WondaSil C_{18}（250 mm×4.6 mm，5 μm）；流动相：乙腈-0.05 mol/L磷酸二氢钾溶液（25∶75，*V*/*V*）；流速：1.0 mL/min；检测波长：264 nm；柱温：30 ℃；进样量：10 μL。

2.5.2 对照品溶液的制备 精密称取盐酸小檗碱对照品23.18 mg，置于10 mL量瓶中，加甲醇溶解并定容，得盐酸小檗碱质量浓度为2.318 mg/mL的对照品贮备液。精密吸取上述对照品贮备液0.2 mL，置于10 mL量瓶中，加甲醇定容，得盐酸小檗碱质量浓度为46.36 μg/mL的对照品溶液。

2.5.3 供试品溶液的制备 取药材样品粉末（过2号筛）约0.25 g，精密称定，置于具塞锥形瓶中，精密加入甲醇50 mL，密塞，称定质量，超声（功率：100 W，频率：59 kHz）处理45 min；取出，放冷，再次称定质量，用甲醇补足减失的质量，摇匀，滤过，取续滤液，即得。

2.5.4 阴性对照溶液的制备 以甲醇为阴性对照溶液。

2.5.5 系统适用性试验 取上述对照品溶液、供试品溶液、阴性对照溶液各适量，按“2.5.1”项下色谱条件下进样测定。结果显示，理论板数以盐酸小檗碱峰计>5 000；基线分离良好，分离度>1.5，详见图2。



注：1. 小檗碱

Note：1. berberine

图2 高效液相色谱图

Fig 2 HPLC chromatograms

2.5.6 线性关系考察 精密量取“2.5.2”项下对照品贮备液0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 mL，分别置于10 mL量瓶中，加甲醇定容，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“2.5.1”项下色谱条件进样测定，记录峰面积。以盐酸小檗碱进样量（*x*，μg）为横坐标、峰面积（*y*）为纵坐标进行线性回归，得盐酸小檗碱回归方程$y=43\ 421x+11\ 613$（$r=0.999\ 9$）。结果表明，盐酸小檗碱检测进样量线性范围为0.183～0.915 μg。

2.5.7 定量限与检测限考察 精密量取“2.5.2”项下对照品溶液适量，倍比稀释，并按“2.5.1”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。结果显示，盐酸小檗碱定量限、检测限分别为0.143、0.095 μg。

2.5.8 精密度试验 取“2.5.2”项下对照品溶液适量，按“2.5.1”项下色谱条件连续进样测定6次，记录峰面积。结果，盐酸小檗碱峰面积的RSD为1.00%（$n=6$），表明仪器精密度良好。

2.5.9 稳定性试验 取“2.5.3”项下供试品溶液（编号：S-4）适量，分别于室温下放置0、2、4、6、8、10 h时按“2.5.1”项下色谱条件进样测定，记录峰面积。结果，盐酸小檗碱峰面积的RSD为1.68%（$n=6$），表明供试品溶液室温放置10 h内基本稳定。

2.5.10 重复性试验 精密称取药材样品（编号：S-4）适量，按“2.5.3”项下方法制备供试品溶液，共6份，再按“2.5.1”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，盐酸小檗碱含量平均值为0.9%，RSD为1.62%（$n=6$），表明本方法重复性良好。

2.5.11 加样回收率试验 取已知含量药材样品（编号：S-4）6份，每份80 mg，分别加入一定量的盐酸小檗碱对照品溶液，按“2.5.3”项下方法制备供试品溶液，再按“2.5.1”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*=6）

Tab 3 Results of recovery tests（*n*=6）

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，%
1.131 5	1.159 0	2.326 4	103.10	98.75	2.95
1.136 9	1.159 0	2.240 5	95.21		
1.137 8	1.159 0	2.261 7	96.97		
1.137 8	1.159 0	2.261 3	96.94		
1.132 4	1.159 0	2.300 3	100.77		
1.132 4	1.159 0	2.285 9	99.53		

2.5.12 药材样品含量测定 取13批药材样品各适量，分别按“2.5.3”项下方法制备供试品溶液，再按“2.5.1”项下色谱条件进样测定，记录峰面积并计算药材样品含

中国药房网 www.china-pharmacy.com

量。结果显示，药材样品含量为0.21%～2.25%，平均值为1.48%。拟定十大功劳叶药材中盐酸小檗碱含量不得低于1.0%。

3 讨论

笔者参考相关文献[7-8]，对TLC鉴别中供试品溶液的制备方法进行了考察，比较了甲醇浸渍24 h、甲醇超声15 min、乙醇回流3 h 3种提取方法。结果，以甲醇浸渍和超声方法提取时，盐酸药根碱斑点不清晰，而乙醇回流提取3 h后，待测成分斑点清晰，杂质干扰小，故选择后者进行提取。同时，笔者比较了甲苯-乙酸乙酯-甲醇-异丙醇-氨溶液（6∶3∶1.5∶1.5∶0.5，*V*/*V*/*V*/*V*/*V*）[8]、正丁醇-乙酸-水（7∶1∶2，*V*/*V*/*V*）[9]、氯仿-甲醇-氨溶液（9∶1∶0.5，*V*/*V*/*V*）[10]、苯-乙酸乙酯-甲醇-异丙醇-氨溶液（6∶3∶2∶2∶0.3，*V*/*V*/*V*/*V*/*V*）[11]4种展开剂，发现待测成分在甲苯-乙酸乙酯-甲醇-异丙醇-氨溶液（6∶3∶1.5∶1.5∶0.5，*V*/*V*/*V*/*V*/*V*）中展开良好、斑点清晰、无边缘效应，因此以其作为TLC的展开剂。

十大功劳叶药材药效成分以生物碱类为主[7]，故按“烘干法”测定水分。生物碱类成分易溶于乙醇，控制醇浸出物含量，对确保药材样品质量稳定具有重要意义。笔者在醇浸出物测定时比较了冷浸、热浸2种方法，发现热浸法优于冷浸法；同时，考察了不同体积分数乙醇的提取率，结果显示50%乙醇溶液提取率最高。检测十大功劳叶药材样品总灰分和酸不溶性灰分含量，可控制药材样品中泥土、砂石等外来无机物的量，对确保药材样品净度具有重要意义。

在HPLC含量测定中，通过二极管阵列检测器扫描，笔者发现盐酸小檗碱在229、264、345 nm处均有吸收峰，而在229 nm处峰面积虽然最大，但接近末端吸收，易受到杂峰的干扰，故选择264 nm作为检测波长。在供试品溶液制备中，笔者比较了回流、超声2种提取方法，发现后者较前者待测成分含量更高，故采用超声提取。而超声提取45、60 min效果相当，从保证提取率和节约时间两方面综合考虑，将超声提取时间确定为45 min。在流动相选择过程中，笔者尝试过不同系统及比例[8,12]，发现以乙腈-0.05 mol/L磷酸二氢钾溶液（25∶75，*V*/*V*）为流动相时，色谱峰分离度和峰形均较好。

综上所述，所建标准可用于十大功劳叶药材的质量控制。

参考文献

[1] 贵州省药品监督管理局.贵州省中药材、民族药材质量标准[S].贵阳：贵州科技出版社，2003：8.

[2] 中国科学院中国植物志编辑委员会.中国植物志：第二十九卷[M].北京：科学出版社，2001：54.

[3] 贵州植物志编辑委员会.贵州植物志：三卷[M].贵阳：贵州人民出版社，1990：310-324.

[4] 万强，杨玉萍，刘中勇.小檗碱对PM2.5诱导的血管内皮细胞损伤的抑制作用及其p38 MAPK通路机制研究[J].中国药房，2016，27(25)：3464-3467.

[5] 李最琼.小檗碱对Toll样受体2信号通路和炎症因子的影响[J]. 中国药房，2010，21(11)：980-982.

[6] 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、104、202、204.

[7] 樊丽博，张晓会，刘兴金，等. 狭叶十大功劳化学成分分析[J].中国兽药杂志，2011，45(10)：34-36.

[8] 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，2015：85.

[9] 国家中医药管理局.中华本草：第三册[M].上海：上海科学技术出版社，1999：317-319.

[10] 孙巍，于东华.常山及其伪品功劳木的鉴别[J].中国药业，2005，14(7)：71-72.

[11] 刘偲翔，何开家，蔡全玲，等. 长柱十大功劳的定性鉴别研究[J].广西中医学院学报，2008，11(1)：48-49.

[12] 卢荣枝，李嫦珍，李运景，等. RP-HPLC法测定妇洁洗剂中小檗碱的含量[J].中国药房，2010，21(27)：2539-2540.

（收稿日期：2017-05-08　修回日期：2017-06-15）

（编辑：张　静）

《中国药房》杂志——中文核心期刊，欢迎投稿、订阅

中国药房网 www.china-pharmacy.com