

蒙药圆柏的质量标准研究^Δ

李珍^{1*}, 杨洋^{1#}, 孟美英¹, 肖斌^{2#} (1. 鄂尔多斯市药品医疗器械检验研究中心, 内蒙古鄂尔多斯 017000; 2. 鄂尔多斯市中心医院临床药学实验室, 内蒙古鄂尔多斯 017000)

中图分类号 R926 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)01-0088-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.01.19

摘要 目的: 建立蒙药圆柏的质量标准, 为其质量控制提供参考。方法: 收集内蒙古地区的圆柏药材, 共9批。观察圆柏样品的性状并对其枝叶横切面和粉末进行显微鉴别; 采用薄层色谱(TLC)法对圆柏样品进行定性分析; 按2015年版《中国药典》(四部)通则方法测定圆柏样品中水分、总灰分、酸不溶性灰分含量和醇溶性浸出物含量; 采用高效液相色谱法测定圆柏样品中槲皮苷和穗花杉双黄酮含量。结果: 圆柏小枝呈圆柱形或四棱形, 刺叶长短不等, 呈深绿色或黄绿色; 显微观察发现, 鳞叶表皮细胞排列整齐, 鳞叶中部有较大空腔, 海绵组织细胞较大, 表皮细胞类长方形, 气孔较多, 保卫细胞较大; TLC结果显示, 在对照品(槲皮苷和芦丁)色谱相应位置上显相同颜色的荧光斑点; 9批样品中水分含量为3.2%~5.6%, 总灰分含量为3.4%~5.8%, 酸不溶性灰分含量均不超过0.8%, 醇溶性浸出物含量为28.0%~33.8%, 槲皮苷含量为0.11%~0.28%, 穗花杉双黄酮含量为0.15%~0.25%。结论: 初步拟定圆柏中水分含量不得超过8.0%、总灰分含量不得超过7.0%、醇溶性浸出物含量不得低于24.0%、槲皮苷含量不得低于0.11%、穗花杉双黄酮含量不得低于0.15%, 制订的标准可用于圆柏药材的质量控制。

关键词 蒙药; 圆柏; 质量标准; 薄层色谱鉴别; 高效液相色谱法; 含量测定

用效果与联苯双酯类似, 也提示甘蔗叶保肝降酶的活性部位为乙醇提取物的乙酸乙酯萃取部位。

中药及其提取物对肝损伤有一定的促进再生和修复作用^[12-15], 在急性肝损伤治疗方面有一定优势和前景。本研究结果揭示了甘蔗叶乙醇提取物抗肝损伤的有效部位, 为甘蔗叶化学成分和物质基础研究提供了线索。本课题组后期将对甘蔗叶乙醇提取物乙酸乙酯部位中的化学成分进行确认, 并对其抗肝损作用机制进行深入研究, 为将甘蔗叶提取物开发为治疗化学性肝损伤的健康产品提供依据。

参考文献

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志[M]. 北京: 科学出版社, 1997, 10(2): 42.
- [2] 郑勇, 王金丽, 李明, 等. 热带农业废弃物资源利用现状与分析: 甘蔗废弃物综合利用[J]. 广东农业科学, 2011, 38(1): 15-18, 26.
- [3] 吴建中, 欧仕益, 汪勇. 甘蔗叶中黄酮类物质的提取及其抗氧化性研究[J]. 现代食品科技, 2009, 25(2): 165-167.
- [4] 吴玉强, 侯小涛, 郭振旺, 等. 多指标正交优选甘蔗叶多糖的提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(19):

Δ 基金项目: 内蒙古自然科学基金资助项目(No.2017MS0870); 内蒙古自治区标准化项目(No.2016-(MB02)-E04)

* 工程师, 硕士。研究方向: 中蒙药材品种、质量、资源开发利用以及食品、化妆品质量技术监督等。电话: 0477-8580563。E-mail: li-zhen733@163.com

#a 通信作者: 高级工程师, 博士。研究方向: 中蒙药材品种、质量、资源开发利用。电话: 0477-8580563。E-mail: yangyangsea@126.com

#b 通信作者: 副主任药师, 博士。研究方向: 临床药学。电话: 0477-8576625。E-mail: 524069120@qq.com

- [5] 侯小涛, 邓家刚, 李媛媛, 等. 甘蔗叶不同提取物对3种糖尿病模型的降血糖作用[J]. 华西药学杂志, 2011, 26(5): 451-453.
- [6] 邓家刚, 侯小涛, 李媛媛, 等. 甘蔗叶的药效学初步研究[J]. 广西中医药大学学报, 2008, 11(3): 77-79.
- [7] 侯小涛, 马丽娜, 邓家刚, 等. 甘蔗叶总黄酮提取工艺及抗炎活性的研究[J]. 中成药, 2013, 35(9): 2047-2050.
- [8] 邓家刚, 郭宏伟, 侯小涛, 等. 甘蔗叶提取物的体外抗肿瘤活性研究[J]. 辽宁中医杂志, 2010, 37(1): 32-34.
- [9] 侯小涛, 邓家刚, 马建凤, 等. 甘蔗叶提取物的体外抑菌作用研究[J]. 华西药学杂志, 2010, 25(2): 161-163.
- [10] 庞文箫, 李勇军, 李勇文, 等. 蝉翼藤中甲基阿魏酸对CCl₄致急性肝损伤小鼠模型的影响[J]. 中国药房, 2015, 26(1): 21-24.
- [11] 邓家刚. 农作物废弃物药用研究的战略意义与基本思路[J]. 广西中医药, 2010, 33(1): 1-3.
- [12] 张兰兰, 何承辉, 古丽斯坦·阿吾提, 等. 桑椹提取物对小鼠急性肝损伤保护作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(15): 149-152.
- [13] 马加庆, 云宇, 后文俊, 等. 三七总皂苷对药物性肝损伤小鼠的保护作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(23): 246-249.
- [14] 崔红花, 于治成, 沈志滨, 等. 狗肝菜不同相对分子质量多糖对四氯化碳所致大鼠急性肝损伤的保护作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(9): 185-190.
- [15] 张丛梅. 绞股蓝多糖对四氯化碳所致大鼠肝损伤的保护作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(1): 244-247.

(收稿日期: 2018-09-04 修回日期: 2018-11-08)

(编辑: 林静)

Study on Quality Standard of Mongolia Medicine *Sabina vulgaris*

LI Zhen¹, YANG Yang¹, MENG Meiyang¹, XIAO Bin² (1.Ordos Testing&Research Center of Drug and Medical Devices, Inner Mongolia Ordos 017000, China; 2.Clinical Pharmacy Laboratory, Ordos Central Hospital, Inner Mongolia Ordos 017000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the quality standard of *Sabina vulgaris*, and to provide reference for its quality control. METHODS: Totally 9 batches of *S. vulgaris* were collected from Inner Mongolia area. The characteristics of *S. vulgaris* samples were observed and microscopic identification was conducted for the transverse section and powder of its branches and leaves. TLC was used for qualitative analysis of *S. vulgaris*. The contents of water, total ash, acid-insoluble ash and alcohol-soluble extract in *S. vulgaris* were determined according to the method stated in 2015 edition of *Chinese Pharmacopeia* (part IV). The contents of quercetin and amentoflavone in *S. vulgaris* were determined by HPLC. RESULTS: The branchlets of *S. vulgaris* were cylindrical or rhombic, with varying length of thorns, dark green or yellowish green. The microscopic observation showed that the epidermal cells of scale leaves were arranged orderly; there were larger cavities in the middle of scale leaves, large cells in spongy tissue; epidermal cells were rectangular with more stomata and large guard cells. Results of TLC showed that the spots of the same color were found in the corresponding positions of chromatogram for substance control (dendroside and rutin). In the 9 batch of samples, the contents of water were 3.2% -5.6%; the contents of total ash were 3.4% -5.8%; the contents of acid-insoluble ash were lower than 0.8%; the contents of alcohol-soluble extract were 28.0% -33.8%; the contents of quercetin were 0.11% -0.28%; the contents of amentoflavone were 0.15% -0.25%. CONCLUSIONS: It is preliminarily proposed that the content of water in *S. vulgaris* is not more than 8.0%; the content of total ash is not more than 7.0%; the content of alcohol-soluble extract is not less than 24.0%; the content of quercetin is not less than 0.11%; the content of amentoflavone is not less than 0.15%. Established standard can be used for the quality control of *S. vulgaris*.

KEYWORDS Mongolia medicine; *Sabina vulgaris*; Quality standard; TLC identification; HPLC; Content determination

圆柏为蒙医经验用蒙药材,蒙药名为乌赫日-阿日查,收载于《中国植物志》第七卷和《内蒙古植物志》第一卷,为柏科植物叉子圆柏(*Sabina vulgaris* Antoine)的干燥嫩枝叶,长于海拔1 100~2 800 m(青海可达3 300 m)地带的多石山坡、针叶树或针叶树与阔叶树混交林内以及砂丘上,多分布于新疆天山至阿尔泰山、宁夏贺兰山、内蒙古、青海东北部、甘肃祁连山北坡及古浪、景泰、靖远以及陕西北部榆林等地^[1-2],在内蒙古自治区的阿拉善盟、锡林郭勒盟及鄂尔多斯市等地分布甚广。内蒙圆柏枝叶入药,能祛风湿、活血止痛,主治风湿、类风湿性关节炎、皮肤瘙痒等^[2],有一定开发价值。目前尚未见国内学者对内蒙圆柏药材化学成分、生理活性以及质量标准的研究报道,国家标准和地方标准也均未见收载内蒙圆柏药材。鉴于此,笔者对蒙药圆柏进行了初步研究,并起草了相应的质量标准,为有效控制该药材质量提供依据。

1 材料

1.1 仪器

DM3000型显微镜(德国莱卡公司);AL204-IC型电子天平、PB211D型电子天平(北京赛多利斯天平有限公司);KQ-5200DE型超声清洗仪(昆山市超声仪器有限公司);U3000型高效液相色谱(HPLC)仪,包括二极管阵列检测器(DAD)[赛默飞世尔科技(中国)有限公司];1260型HPLC仪,包括DAD(美国Agilent公司)。

1.2 药品与试剂

9批圆柏药材来自内蒙古阿拉善盟和鄂尔多斯市(编号1~9号),其中,1、2号样品均采摘自阿拉善盟贺兰山(批号:20160901、20150923)、3号样品采摘自阿左旗(批号:20170516)、4~9号样品采摘自鄂尔多斯市(批号:分别为20170530、20170615、20170616、20170723、20170830、20170906),上述样品由内蒙古药品检验研究院主任蒙药师康双龙、内蒙古医科大学教授那圣桑以及内蒙古民族大学附属医院的主任蒙药师沙仁高娃等鉴定,确认为柏科植物叉子圆柏真品;芦丁对照品、槲皮苷对照品、穗花杉双黄酮对照品(中国食品药品检定研究院,批号:分别为100080-201610、111538-201105、111902-201603,纯度:分别为91.9%、92.7%、97.7%);乙腈为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为纯化水。

2 方法与结果

2.1 性状描述

圆柏小枝呈圆柱形或四棱形,刺叶长短不等,呈深绿色或黄绿色,直径1~4 mm。鳞叶呈卵形,交互对生,长1~5 mm,背部的椭圆形腺体位于近基部、中下部,干后呈腺槽。球果可见,近球形、宽卵形,长6~16 mm,成熟时呈蓝黑色、灰褐色或黑色,含种子1粒。种子呈卵圆形、宽倒卵形或近球形,直径5~11 mm,两侧有棱脊或上部明显,周围有树脂槽。气微香,味微苦、涩。部分样品示例图见图1。

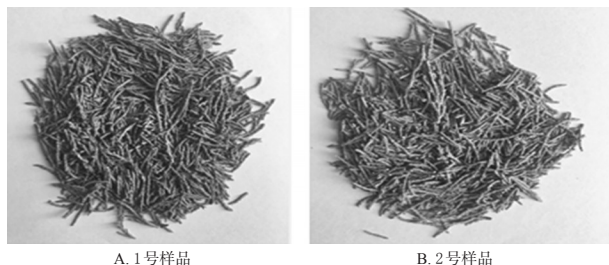


图1 圆柏药材的样品图

Fig 1 Sample diagrams of *S. vulgaris*

2.2 显微鉴别

2.2.1 横切面显微观察 取圆柏药材,用水炮制软化后,刀片切成10~20 μm的薄片,将平整的薄片置于载玻片上,滴加水合氯醛试液1~2滴,在酒精灯上加热透化,盖上盖玻片,置于显微镜下观察。结果,可见鳞叶表皮细胞1列,排列整齐,外被厚角质层;鳞叶中部有较大的类圆形或椭圆形的空腔;叶肉栅栏细胞短柱状,海绵组织细胞较大、排列疏松;中央髓部偏小,射线明显。圆柏药材横切面显微图见图2(1号样品)。

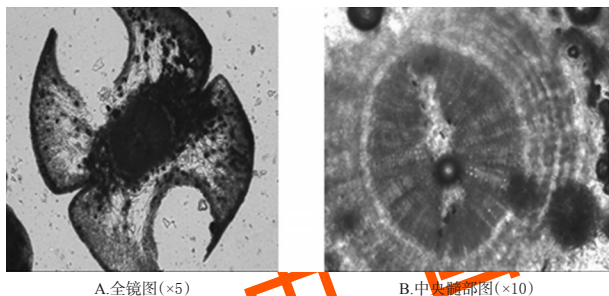


图2 圆柏药材横切面显微图

Fig 2 Micrographs of the cross section of *S. vulgaris*

2.2.2 粉末显微观察 将圆柏药材粉碎,粉末过四号或五号筛,挑取少许粉末置于载玻片上,滴加水合氯醛试液,加热透化后,盖上盖玻片,置于显微镜下观察。结果,可见药材粉末呈绿色或黄绿色;表皮细胞类长方形;气孔甚多,呈凹陷形,保卫细胞较大;纤维细长,单个或成束,木薄壁细胞多见,呈念珠状^[9]。圆柏药材粉末显微图见图3(1号样品)。

2.3 薄层色谱鉴别

将9批圆柏药材粉碎,过三号筛,取5 g药材粉末,加石油醚(60~90 °C)100 mL加热回流2 h,弃去石油醚液,药渣挥干石油醚,加甲醇20 mL超声(功率:100 W,频率:50 kHz)处理20 min,放冷,滤过,滤液浓缩至2 mL,作为供试品溶液。另取芦丁、槲皮苷对照品适量,分别加甲醇制成1、0.5 mg/mL的溶液,作为对照品溶液。参考2015年版《中国药典》(四部)通则0502法^[4]进行试验:吸取各供试品溶液5 μL和上述2种对照品溶液1 μL或2 μL,分别点于同一硅胶G薄层板上,以乙酸乙酯-丙酮-水-甲酸(7:3:1:0.2, V/V/V/V)为展开剂展开,取

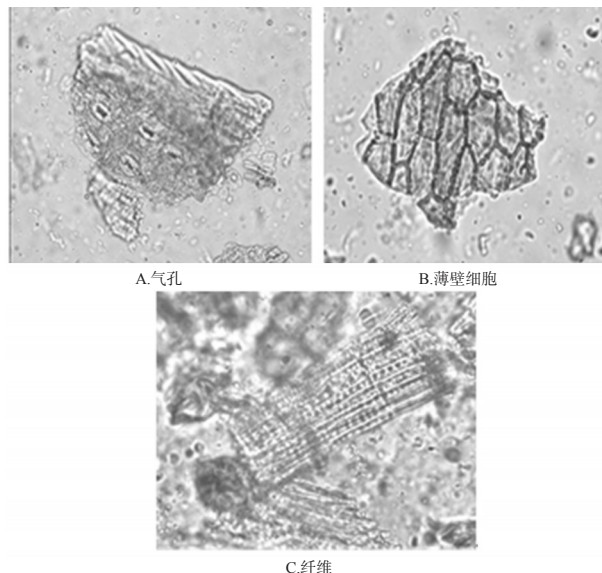
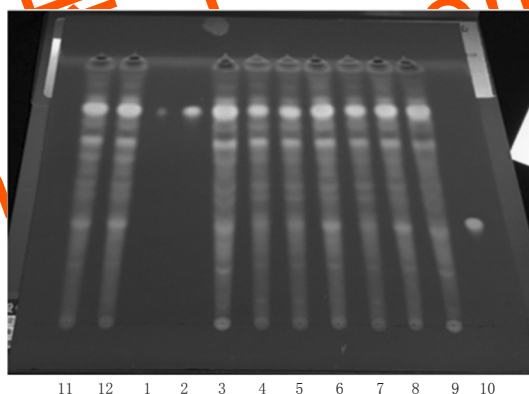


图3 圆柏药材的粉末显微图(×40)

Fig 3 Micrographs of *S. vulgaris* powder(×40)

出,晾干,喷以10%硫酸乙醇溶液,在105 °C加热至斑点显色清晰,置于紫外灯(波长365 nm)下检视。结果表明,在供试品色谱中,与对照品色谱相应的位置上显相同颜色的荧光斑点。薄层色谱图见图4。



注:1~2 槲皮苷对照品(点样量分别为1、2 μL);3~9、11~12.供试品;10.芦丁对照品(点样量为2 μL)

Note: 1-2. substance control of quercetin (sample volume are 1, 2 μL); 3-9, 11-12. test sample; 10. substance control of rutin (sample volume is 2 μL)

图4 薄层色谱图

Fig 4 TLC chromatograms

2.4 水分含量测定

参照2015年版《中国药典》(四部)通则0832第四法^[4]测定。结果表明,9批样品中水分含量为3.2%~5.6%,均在6.0%以下。考虑到不同产地药材之间的差异,并且为了避免贮存过程中因水分含量过高而产生霉变,暂拟定圆柏药材中水分含量不得超过8.0%。圆柏药材中水分含量测定结果见表1。

2.5 总灰分和酸不溶性灰分含量测定

参照2015年版《中国药典》(四部)通则2302法^[4]测

表1 圆柏药材中水分、总灰分、酸不溶性灰分和醇溶性浸出物含量测定结果($n=2, \%$)

Tab 1 Results of content determination of water, total ash, acid-insoluble ash and alcohol-soluble extract in *S. vulgaris* ($n=2, \%$)

样品编号(批号)	水分	总灰分	酸不溶性灰分	醇溶性浸出物
1号(20160901)	5.6	4.6	0.6	33.2
2号(20150923)	5.0	4.3	0.5	30.3
3号(20170516)	5.4	4.4	0.5	31.3
4号(20170530)	5.2	4.1	0.6	28.0
5号(20170615)	4.0	3.4	0.4	33.8
6号(20170616)	5.0	3.9	0.7	32.3
7号(20170723)	4.3	5.8	0.4	32.5
8号(20170830)	4.3	4.3	0.3	29.6
9号(20170906)	3.2	3.6	0.2	33.3

定。结果表明,9批样品中总灰分含量为3.4%~5.8%,均在6.0%以下,为保证药品的纯度,初步拟定圆柏药材中总灰分含量不得超过7.0%。因9批圆柏样品中酸不溶性灰分含量均在0.8%以下,测得值较小,故暂不进行限度控制。圆柏药材中总灰分、酸不溶性灰分含量测定结果见表1。

2.6 醇溶性浸出物含量测定

参照2015年《中国药典》(四部)通则2201项下醇溶性浸出物测定法——热浸法^[4]测定,用95%乙醇作溶剂。结果表明,9批样品中醇溶性浸出物含量为28.0%~33.8%,平均值为31.6%。考虑到各地药材质量不同,按平均值下浮约20%计算,初步拟定圆柏药材中醇溶性浸出物含量不得低于24.0%。

2.7 槲皮苷含量测定

2.7.1 溶液的制备 (1)供试品溶液A:取本品(1号样品)粉末(过三号筛)约0.5 g,精密称定,置于具塞锥形瓶中,精密加入甲醇25 mL,称定质量,超声(功率:300 W,频率:50 kHz)处理45 min,放冷,再次称定质量,用甲醇补足减失的质量,摇匀,用滤纸滤过,弃去初滤液,取续滤液,即得。(2)槲皮苷对照品溶液:取槲皮苷对照品适量,精密称定,加甲醇制成每mL含槲皮苷46 μg的溶液,即得。

2.7.2 色谱条件与系统适用性试验 色谱柱:Tnature C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈-0.01 mol/L磷酸二氢钾溶液-冰醋酸(14:86:1.5, V/V/V);流速:1.0 mL/min;检测波长:254 nm;柱温:30 ℃;进样量:10 μL。分别取“2.7.1”项下制备的供试品溶液A和槲皮苷对照品溶液在此色谱条件下进样测定,记录色谱图。结果,各成分间分离度均不小于1.5,按槲皮苷计理论板数不低于3 000。高效液相色谱图见图5。

2.7.3 线性关系考察 取槲皮苷对照品适量,用甲醇制成质量浓度为0.230 8 mg/mL的贮备液。分别精密吸取0.2、0.4、1.0、2.0、3.0、4.0 mL贮备液,置于不同10 mL

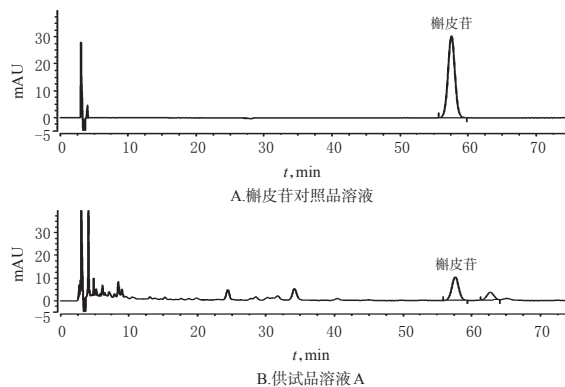


图5 槲皮苷含量测定的高效液相色谱图

Fig 5 HPLC chromatograms of quercetin

量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀。精密吸取上述溶液10 μL注入色谱仪,按“2.7.2”项下色谱条件测定,以峰面积(y)为纵坐标、进样量(x)为横坐标进行回归分析,得到回归方程为: $y=0.312 5x+0.115 1$ ($r=0.999 6$)。结果表明,槲皮苷检测在46.16~923.2 ng进样量范围内与峰面积呈良好的线性关系。

2.7.4 精密度试验 取“2.7.1(2)”溶液,按“2.7.2”色谱条件连续进样6次进行测定,记录峰面积。结果显示,槲皮苷峰面积的RSD为0.30%($n=6$)。

2.7.5 重复性试验 取供试品(1号样品)粉末6份,各约0.5 g,精密称定,按“2.7.1(1)”项下方法制备供试品溶液A,按“2.7.2”项下色谱条件进行测定。结果,测得供试品中槲皮苷含量的RSD为0.84%($n=6$)。

2.7.6 稳定性试验 取同一供试品(1号样品)按“2.7.1(1)”方法制备供试品溶液A,分别于室温条件下放置0、5、10、18、24 h后,按“2.7.2”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,槲皮苷峰面积的RSD为0.69%($n=5$),表明供试品溶液在室温条件下24 h内稳定。

2.7.7 准确度试验 精密称定已知槲皮苷含量的供试品(1号样品)粉末9份,每份约0.5 g,加入槲皮苷对照品75%、100%、125%浓度的溶液适量,每个浓度平行制备3份,按“2.7.1(1)”方法制备供试品溶液A,然后按“2.7.2”项下色谱条件进行测定。结果表明,槲皮苷平均加样回收率为98.27%,RSD为0.47%($n=9$),表明试验准确度较好。

2.7.8 耐用性试验 取药材样品(1号样品)适量,各3份,按“2.7.1(1)”方法制备供试品溶液A,由2个不同试验人员,分别用Tnature C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm)色谱柱、U3000型HPLC仪和WondaCract ODS-2 C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm)色谱柱、1260型HPLC仪按“2.7.2”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。另外一组数据由复核单位提供。结果,样品主峰的分离度均符合要求,测得3份供试品中槲皮苷含量的RSD小于2.0%($n=3$)。

2.7.9 样品中槲皮苷含量测定 分别取9批圆柏药材适

量,按照“2.7.1(1)”方法制备样品溶液A,然后按“2.7.2”项下色谱条件进样测定。结果表明,9批圆柏药材中槲皮苷含量为0.11%~0.28%。考虑各地药材的质量差别,建议以最低值定限,即按干燥品计算槲皮苷($C_{21}H_{20}O_{11}$)含量不得低于0.11%。9批圆柏药材中槲皮苷含量测定结果见表2。

表2 圆柏药材中槲皮苷、穗花杉双黄酮含量测定结果 ($n=2, \%$)

Tab 2 Results of content determination of quercetin and amentoflavone in *S. vulgaris* ($n=2, \%$)

样品编号(批号)	槲皮苷	穗花杉双黄酮
1号(20160901)	0.18	0.19
2号(20150923)	0.11	0.21
3号(20170516)	0.22	0.15
4号(20170530)	0.16	0.25
5号(20170615)	0.28	0.18
6号(20170616)	0.25	0.22
7号(20170723)	0.25	0.23
8号(20170830)	0.23	0.19
9号(20170906)	0.27	0.20

2.8 穗花杉双黄酮含量测定

2.8.1 溶液的制备 (1)供试品溶液B:取本品(1号样品)粉末(过三号筛)约0.5 g,精密称定,置于具塞锥形瓶中,精密加入甲醇50 mL,称定质量,静置过夜,加热回流30 min,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)穗花杉双黄酮对照品溶液:取穗花杉双黄酮对照品适量,精密称定,加甲醇制成每mL含穗花杉双黄酮13 μ g的溶液,即得。

2.8.2 色谱条件与系统适用性试验 色谱柱:Tnature C_{18} (250 mm \times 4.6 mm,5 μ m);流动相:乙腈-0.1%磷酸溶液(34:66, V/V);流速:1.0 mL/min;检测波长:337 nm;色谱柱温度:30 $^{\circ}$ C;进样量:10 μ L。取上述供试品溶液B、穗花杉双黄酮对照品溶液,在此色谱条件下进样测定,记录色谱图。结果,相邻峰间分离度不低于1.5,理论板数按穗花杉双黄酮计不低于5 000。高效液相色谱图见图6。

2.8.3 线性关系考察 制备穗花杉双黄酮对照品质量浓度为0.152 8 mg/mL的贮备液。精密吸取0.2、0.5、1.0、1.5、2.0、3.0 mL,置于不同的10 mL量瓶中,加甲醇使溶解并稀释至刻度,摇匀。精密吸取10 μ L注入液相色谱仪,按“2.8.2”项下色谱条件进样测定,以峰面积(y)为纵坐标、进样量(x)为横坐标进行回归分析,得到回归方程为: $y=4\ 425.06x-6\ 596.04$ ($r=0.999\ 9$)。结果表明,穗花杉双黄酮在进样量为30.56~458.35 ng范围内与峰面积呈良好的线性关系。

2.8.4 精密度试验 取“2.8.1(2)”溶液,按“2.8.2”项下色谱条件连续进样6次进行测定,记录峰面积。结果,穗花杉双黄酮峰面积的RSD为0.44%($n=6$)。

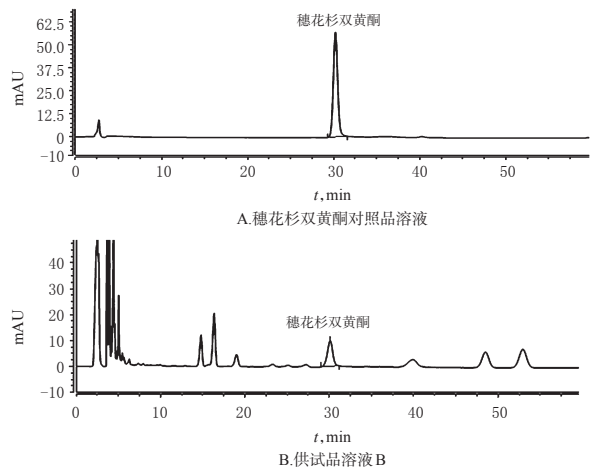


图6 穗花杉双黄酮含量测定的高效液相色谱图

Fig 6 HPLC chromatograms of content determination of amentoflavone

2.8.5 重复性试验 取供试品(1号样品)粉末6份,各约0.5 g,精密称定,按“2.8.1(1)”方法制备供试品溶液B,然后按“2.8.2”项下色谱条件进行测定,记录峰面积。结果,穗花杉双黄酮含量的RSD为0.28%($n=6$)。

2.8.6 稳定性试验 取同一供试品(1号样品)溶液,分别于室温下放置0、5、10、18、24 h,然后按“2.8.2”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果显示,穗花杉双黄酮峰面积的RSD为0.53%($n=5$),表明供试品溶液在室温条件下24 h内稳定。

2.8.7 准确度试验 精密称定供试品(1号样品)共9份,各约0.5 g,加入穗花杉双黄酮对照品75%、100%、125%浓度的溶液适量,按“2.8.1(1)”方法制备供试品溶液B,每个浓度平行制备3份,然后按“2.8.2”项下色谱条件进样测定。结果表明,穗花杉双黄酮的平均加样回收率为98.83%,RSD为0.89%($n=9$)。

2.8.8 耐用性试验 取供试品(1号样品)适量,各3份,按“2.8.1(1)”方法制备供试品溶液B,由2个不同试验人员进行试验,条件同“2.7.8”项下。结果,测得3份供试品中穗花杉双黄酮含量的RSD小于2.0%($n=3$)。

2.8.9 样品中穗花杉双黄酮含量测定 分别取9批圆柏药材适量,按“2.8.1(1)”方法制备样品溶液B,然后按“2.8.2”项下色谱条件进样测定。结果表明,9批圆柏药材中穗花杉双黄酮的含量为0.15%~0.25%。考虑各地药材的质量差别,建议以最低值定限,即按干燥品计算,圆柏药材中穗花杉双黄酮($C_{30}H_{18}O_{10}$)含量不得低于0.15%。9批圆柏药材中穗花杉双黄酮含量测定结果见表2。

3 讨论

3.1 指标成分的选择

据文献报道^[3,5-8],在新疆圆柏中分离得到了芦丁、槲皮苷和山柰酚等黄酮类化合物。故笔者在前期研究中

选择芦丁、槲皮苷和山柰酚3个成分进行了研究,并以乙腈-0.3%磷酸梯度洗脱^[9]测定其含量。结果,色谱图中未见山柰酚成分峰,这提示蒙药圆柏中可能不含此成分,虽然芦丁和槲皮苷可有效分离且峰形良好,但芦丁成分检测的耐用性试验结果不符合要求,故未进行芦丁和山柰酚含量的测定。柏科植物中黄酮以及双黄酮类化合物普遍存在,其中以槲皮苷、穗花杉双黄酮等最普遍^[3,5-8,10-11]。现代研究发现,柏科植物中的槲皮苷具有抗炎、抗菌、抗氧化、抗病毒等多种药理作用,穗花杉双黄酮具有抗肿瘤、抗炎、抗病毒、舒张血管、降血糖等作用^[12]。两者的生物药理活性与蒙药圆柏的抗炎、抗病毒的主治功能相符,故最终将其作为标示性成分进行测定并给定定量。经测定,槲皮苷、穗花杉双黄酮也是内蒙圆柏中含量较高的成分。

3.2 薄层色谱条件的选择

在前期预试验中,笔者参照文献中的薄层鉴别方法^[13],分别以三氯甲烷-乙酸乙酯-甲酸(10:3:1, V/V/V)、甲苯-乙酸乙酯-甲酸(5:4:1, V/V/V)、乙酸乙酯-丙酮-水-甲酸(7:3:1:0.2, V/V/V/V)为展开剂进行试验。结果,以乙酸乙酯-丙酮-水-甲酸(7:3:1:0.2, V/V/V/V)为展开剂时分离效果最好,主斑点的比移值(R_f 值)适宜,但是在该文献显色条件下,芦丁对照品和槲皮苷对照品的斑点模糊,且样品图中未出现与山柰酚对照品一致的斑点,这也再次证明了所收集的内蒙古圆柏药材中不含山柰酚。为此,笔者分别考察以10%硫酸乙醇溶液和3%三氯化铝乙醇溶液为显色剂时的效果。结果,以后者为显色剂时显色效果不佳,而以前者为显色剂时,日光下对照品斑点清晰,置于紫外灯(波长365 nm)下观察亮绿色的荧光斑点同样清晰可见, R_f 值适中,分离效果良好,故在本研究中选用10%硫酸乙醇溶液为显色剂。另外,因样品的提取步骤烦琐,在薄层鉴别中笔者将脱脂步骤改为加石油醚(60~90℃)100 mL加热回流2 h,结果薄层色谱中特征斑点清晰、分离良好,故在薄层鉴别中以此方法进行样品处理。

3.3 HPLC流动相的选择

在前期预试验中,关于槲皮苷含量测定流动相的选择,笔者参考文献报道^[3,5-8],先以乙腈-0.3%磷酸梯度洗脱后进行测定,但其耐用性试验不符合要求;接着,笔者又参考文献中侧柏叶含量测定方法^[10],分别以甲醇-0.01 mol/L磷酸二氢钾溶液-冰醋酸(14:86:1.5, V/V/V)、甲醇-0.1%冰醋酸0.01 mol/L磷酸二氢钾溶液(14:86, V/V)、甲醇-0.1%冰醋酸溶液(14:86, V/V)等作为流动相进行测定,但在上述流动相条件下供试品的峰形均不理

想;之后,笔者又以乙腈替代甲醇并调整流动相比比例,以乙腈-0.01 mol/L磷酸二氢钾溶液-冰醋酸(14:86:1.5, V/V/V)为流动相进行测定,结果各成分可有效分离,故在本研究中将此确定为流动相。在穗花杉双黄酮含量测定流动相的选择上,在预试验中笔者曾参考相关报道^[12-13],以甲醇-0.1%磷酸溶液作为流动相进行梯度洗脱测定含量,但供试品中各成分的分离效果不太理想,故在此基础上用乙腈代替甲醇并调整流动相比比例,以乙腈-0.1%磷酸溶液(34:66, V/V)为流动相进行测定,结果在此条件下各成分的分离效果好、保留时间适中。

综上所述,本研究所建标准可为蒙药圆柏药材的质量控制提供一定参考。但是对2种指标性成分分别进行含量测定无疑增加了监控质量的难度,若能做到同时测定即可大大提高监督效率,故本法还有待改进。

参考文献

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会.中国植物志:第七卷[M].北京:科学出版社,1978:359-360.
- [2] 内蒙古植物志编辑委员会.内蒙古植物志:第一卷[M].呼和浩特:内蒙古人民出版社,1985:146-147.
- [3] 玛依拉·买买提依明,满尔哈巴·海如拉,于睿,等.新疆圆柏叶药材质量标准的探讨[J].时珍国医国药,2010,21(7):1686-1687.
- [4] 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,2015:103、202、204.
- [5] 赵军,闫明,黄毅,等.新疆圆柏黄酮类成分的研究[J].林产化学与工业,2008,43(19):33-37.
- [6] 武雪.藏药刺柏和圆柏药材质量标准的提高研究[D].兰州:兰州大学,2015:22-23.
- [7] 李晨阳,高慧,陈燕,等.HPLC测定不同产地新疆圆柏中的槲皮苷[J].华西药学杂志,2015,30(6):720-721.
- [8] 李晨阳,高慧,陈燕,等.新疆圆柏叶中芦丁含量的测定[J].中国中医药信息杂志,2016,23(2):90-92.
- [9] 马志良,多杰.藏药悬钩木的质量标准研究[J].中国药房,2018,29(2):179-182.
- [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,2015:215-216.
- [11] 陈燕,李倩,李晨阳,等.不同产地、不同采收期新疆圆柏叶中穗花杉双黄酮的含量测定[J].新疆医科大学学报,2017,40(3):369-371.
- [12] 王彦志,张萌,刘阳,等.穗花杉双黄酮在大鼠体内的药理学研究[J].中成药,2015,11(37):2397-2401.
- [13] 陈燕,谭为,李晨阳,等.新疆圆柏叶的质量标准研究[J].中国民族民间医药,2016,25(16):14-16.

(收稿日期:2018-09-29 修回日期:2018-11-26)

(编辑:林静)