

黄花油点草药材的质量标准研究[△]

任 丽^{1*}, 贾田芊¹, 李兴欢¹, 谢晓林², 谢晓峰², 张德柱², 孙 静^{1#}(1. 陕西中医药大学药学院, 陕西 咸阳 712046; 2. 陕西盘龙药业集团股份有限公司, 西安 710025)

中图分类号 R28 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)08-1083-08

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.08.14

摘要 目的: 建立黄花油点草药材的质量标准。方法: 参照2015年版《中国药典》方法对药材样品的性状、显微结构进行鉴别, 对其水分、灰分及浸出物进行检查; 采用薄层色谱法(TLC)对药材样品中槲皮素、烟花苷进行定性鉴别; 采用高效液相色谱法测定药材样品中葛根素、对羟基苯甲酸、烟花苷、阿魏酸、槲皮素、山柰酚的含量。结果: 性状、显微鉴别具有专属性; 槲皮素、烟花苷的TLC图斑点清晰, 分离度好, 阴性对照无干扰; 10批药材样品水分含量范围为0.61%~1.89%, 总灰分含量范围为6.28%~8.88%, 酸不溶性灰分含量范围为0.76%~1.79%, 醇溶性浸出物含量范围为1.31%~2.00%, 水溶性浸出物含量范围为9.39%~14.27%。葛根素、对羟基苯甲酸、烟花苷、阿魏酸、槲皮素、山柰酚检测进样量线性范围分别为0.031 92~0.111 7 μg ($r=0.999 6$)、0.085 3~0.298 5 μg ($r=0.999 5$)、0.010 76~0.037 66 μg ($r=0.999 8$)、0.070 08~0.245 3 μg ($r=0.999 8$)、0.058 56~0.205 0 μg ($r=0.999 4$)、0.009 860~0.033 88 μg ($r=0.999 4$); 定量限分别为1.06、0.47、0.75、1.40、1.20、0.74 ng, 检测限分别为0.36、0.12、0.30、0.53、0.60、0.31 ng; 精密性、稳定性、重复性试验的RSD均小于2%; 平均加样回收率分别为101.54%、102.10%、101.46%、103.35%、99.36%、96.85%, RSD分别为1.76%、1.68%、1.56%、1.26%、0.91%、1.96% ($n=6$); 样品含量分别为0.017~0.047、0.042~0.140、0.003 8~0.015 0、0.049~0.180、0.024~0.091、0.003 9~0.011 0 mg/g。结论: 所建质量标准可用于黄花油点草的质量控制。

关键词 黄花油点草; 质量标准; 薄层色谱法; 高效液相色谱法; 水分; 灰分; 浸出物; 葛根素; 对羟基苯甲酸; 烟花苷; 阿魏酸; 槲皮素; 山柰酚

Study on Quality Standard of *Tricyrtis maculata*

REN Li¹, JIA Tianqian¹, LI Xinghuan¹, XIE Xiaolin², XIE Xiaofeng², ZHANG Dezhu², SUN Jing¹ (1. College of Pharmacy, Shaanxi University of TCM, Shaanxi Xianyang 712046, China; 2. Shaanxi Panlong Pharmaceutical Group Co., Ltd., Xi'an 710025, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the quality standard of *Tricyrtis maculata*. METHODS: The character and microstructure of *T. maculata* were identified according to the method stated in 2015 edition of *Chinese Pharmacopoeia*. The contents of moisture, ash and extract were determined. TLC was used for qualitative identification of quercetin and nicotiflorin in samples. The contents of puerarin, *p*-hydroxybenzoic acid, nicotiflorin, ferulic acid, quercetin and kaempferol were determined by HPLC. RESULTS: The characters and microscopic identification had specificity. TLC spots of quercetin and nicotiflorin were clear and well-separated without interference from negative control. The water content, total ash content, acid insoluble ash content, alcohol soluble extract and water soluble extract for 10 batches of samples were 0.61% -1.89% , 6.28% -8.88% , 0.76% -1.79% , 1.31% -2.00% and 9.39% -14.27% , respectively. The linear range of puerarin, *p*-hydroxybenzoic acid, nicotiflorin, ferulic acid, quercetin and kaempferol were 0.031 92-0.111 7 μg ($r=0.999 6$), 0.085 3-0.298 5 μg ($r=0.999 5$), 0.010 76-0.037 66 μg ($r=0.999 8$), 0.070 08-0.245 3 μg ($r=0.999 8$), 0.058 56-0.205 0 μg ($r=0.999 4$), 0.009 860-0.033 88 μg ($r=0.999 4$), respectively. The quantitation limits were 1.06, 0.47, 0.75, 1.40, 1.20, 0.74 ng, and the detection limits were 0.36, 0.12, 0.30, 0.53, 0.60, 0.31 ng, respectively. RSDs of precision, stability and repeatability tests were all less than 2%. The average recoveries were 101.54% , 102.10% , 101.46% , 103.35% , 99.36% and 96.85% , respectively; RSDs were 1.76% , 1.68% , 1.56% , 1.26% , 0.91% and 1.96% , respectively ($n=6$); the results of the content were 0.017-0.047, 0.042-0.140, 0.003 8-0.015 0, 0.049-0.180, 0.024-0.091, 0.003 9-0.011 0 mg/g. CONCLUSIONS: The established quality standard can be used for the quality control of *T. maculata*.

KEYWORDS *Tricyrtis maculata*; Quality standard; TLC; HPLC; Moisture; Ash; Extract; Puerarin; *p*-hydroxybenzoic acid; Nicotiflorin; Ferulic acid; Quercetin; Kaempferol

[△] 基金项目: 陕西省科技统筹创新工程计划项目(No.2016KTCQ-03-13); 陕西省中医管理局中医药科研课题(No.15-ZY001)

* 硕士研究生。研究方向: 中药药剂学。电话: 029-38184958。E-mail: 206480045@qq.com

通信作者: 教授, 硕士生导师, 博士。研究方向: 中药制剂过程的关键技术及适宜性研究。电话: 029-38184958。E-mail: ph.175@163.com

黄花油点草为百合科油点草属多年生草本植物黄花油点草 [*Tricyrtis maculata* (*D. Don*) Machride] 的干燥根或全草^[1], 又名红酸七、粗柄油点草、山竹花等; 其味甘, 性平, 主要分布于浙江、湖北、陕西、四川等地, 多生长在海拔 280~2 300 m 的山坡林下、路旁等处^[2-3]。其具有补肺止咳、理气活血、散结、补虚等功效^[1], 是陕西省民间

用于治疗跌打损伤的重要药材之一。但黄花油点草缺少质量标准,难以控制其质量。为保证用药的有效性和安全性,笔者认为有必要建立黄花油点草的地方质量标准,以期对该药材进行质量控制。文献报道其主要含有酚酸类、黄酮类、甾体类、萜类等成分,现已分离出的成分有甾体类、黄酮类和酚酸类^[3]。为了达到控制黄花油点草质量的目的,本文对黄花油点草的性状、水分、灰分和浸出物进行测定,建立了烟花苷和槲皮素的薄层鉴别方法,测定了对羟基苯甲酸、阿魏酸、葛根素、烟花苷、槲皮素、山柰酚的含量,并根据6种成分的含量推测其二次代谢产物含量在8月底至9月期间较高,为黄花油点草进一步开发提供参考。

1 材料

1.1 仪器

戴安 U-3000 型高效液相色谱 (HPLC) 仪,包括 LPG-3400SD 型四元梯度泵、WPS-3000 型自动进样器、VWD-3x00 (RS) 型检测器、TCC-3x00 (RS) 型柱温箱、Thermo 色谱工作站 (美国赛默飞世尔公司); FA2004A 型电子分析天平 (上海垒固仪器有限公司); KQ-250DE 型超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); Leica ICC50W 型显微镜 (北京冠普佳科技有限公司); ZF-90B 型多功能紫外透射仪 (上海光豪分析仪器有限公司); 101-2A 型电热鼓风干燥箱 (北京科伟永鑫实验仪器设备厂); SX-2-4 马弗炉 (常州市吴江电热器材制造有限公司); 薄层层析硅胶 G 板 (青岛海浪硅胶干燥剂有限公司)。

1.2 药材、药品与试剂

10 批黄花油点草均采自陕西省宝鸡市太白县 (采收时间分别为 2017 年 4 月 20 日、4 月 28 日、6 月 24 日、6 月 29 日、7 月 14 日、7 月 22 日、8 月 10 日、8 月 15 日、8 月 22 日、9 月 12 日,编号: S1~S10), 经陕西中医药大学药学院王继涛教授鉴定为百合科植物黄花油点草 [*Tricyrtis maculata* (D. Don) Machribe] 的干燥全草; 葛根素对照品 (批号: 3681-99-0, 纯度: 98%)、对羟基苯甲酸对照品 (批号: 99-69-7, 纯度: 99%)、槲皮素对照品 (批号: 117-39-5, 纯度: 98%)、烟花苷对照品 (批号: 100080-201610, 纯度: 91.9%)、阿魏酸对照品 (批号: 1135-24-6, 纯度: 98%)、山柰酚对照品 (批号: 520-18-3, 纯度: 98%) 均来自上海源叶生物科技有限公司; 甲醇、乙腈为色谱纯, 其余试剂为分析纯, 水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 性状鉴别

本品株高 50~70 cm, 常切成段, 长 5~10 cm; 根为棕黄色, 多具须根, 根须稍弯曲, 质坚实稍带柔韧; 茎为圆柱形, 表面为棕黄色, 茎痕明显, 质硬易折断, 断面中空呈黄白色; 叶互生, 椭圆形, 顶端渐尖; 叶正面褐绿色,

背面灰绿色, 叶脉较密, 易破碎; 蒴果 2.5~3.0 cm, 具 3 棱, 黄绿色。药材性状见图 1。

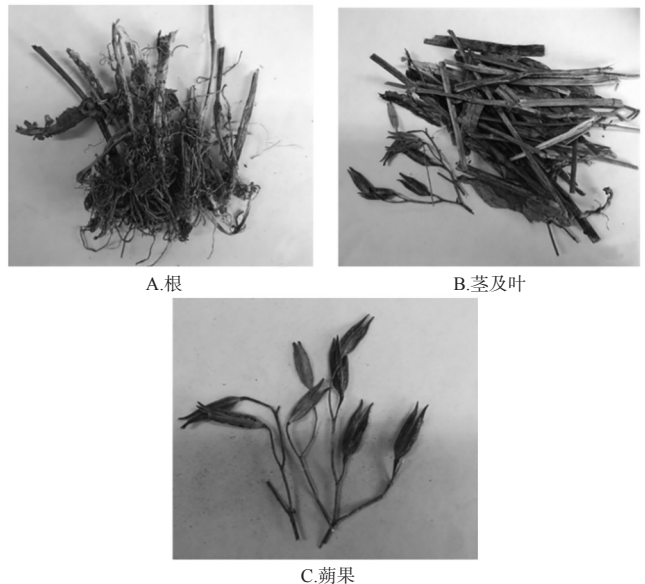


图 1 药材性状图

Fig 1 Properties of medicinal materials

2.2 显微鉴别

2.2.1 茎横切面 药材茎横切面显微图见图 2A、2B。由图 2A、2B 可见, 本品茎表皮细胞 1~2 列, 排列紧密; 其下为厚壁细胞 2~3 列, 周围纤维束成环; 基本组织由大量薄壁细胞组成, 其中散有维管束, 外围维管束排列紧密, 木质部和韧皮部相间排列。

2.2.2 根横切面 药材根横切面显微图见图 2C、2D。由图 2C、2D 可见, 本品根最外层为 1 列整齐的表皮细胞, 表面附着角质层; 基本组织由大量疏松的薄壁细胞组成, 类圆形, 其中散有维管束; 内皮层细胞紧密排列成环, 有明显的凯氏带, 皮层中木质部、韧皮部相间排列。

2.2.3 粉末鉴别 药材粉末显微特征图见图 3。由图 3 可见, 本品全草粉末为黄绿色, 多见非腺毛及其脱落后的疤痕; 单细胞, 壁稍厚, 棕黄色, 部分壁上可见纹理; 茎皮碎片可见, 略显棕黄色, 茎表皮细胞表面观呈多角形、长多角形或长条形; 纤维成束, 可见纹孔; 导管为螺旋纹和环纹导管; 叶下皮细胞可见气孔^[4], 叶上皮细胞呈多边形或类圆形, 壁较厚。

2.3 薄层色谱 (TLC) 鉴别

取烟花苷、槲皮素对照品适量, 分别加甲醇制成质量浓度均为 0.2 mg/mL 的单一对照品溶液。取各批药材粉末 0.5 g, 提取温度为 40 °C, 加甲醇 20 mL, 超声 (功率: 250 W, 频率: 100 kHz) 处理 1 h, 过滤, 浓缩, 干燥, 加甲醇 10 mL 溶解, 即得供试品溶液。以甲醇作为阴性对照溶液。参照 2015 年版《中国药典》(一部) TLC 法^[4] 试验, 吸取上述 3 种溶液各 5 μL, 分别点于硅胶 G 板上, 槲皮素以甲苯-乙酸乙酯-甲酸 (5:4:1, V:V:V) 为展开剂, 稀盐

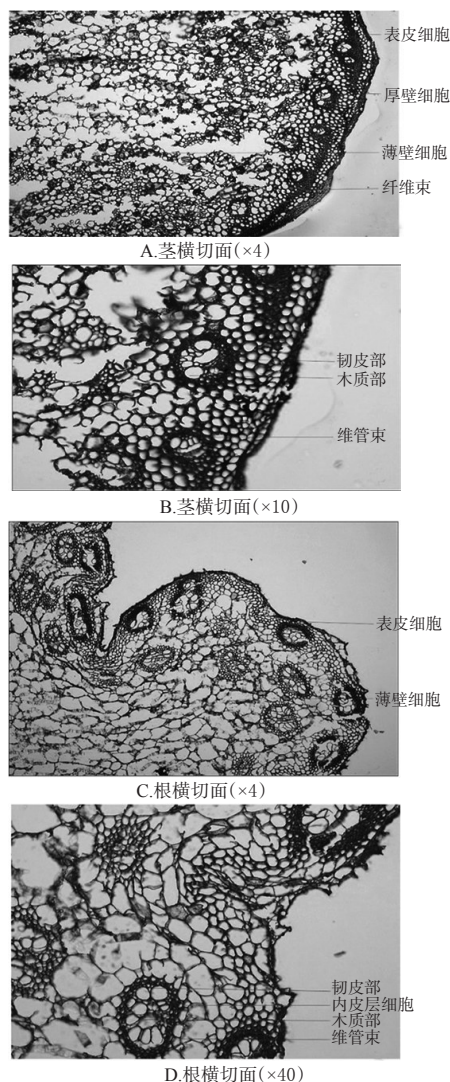


图2 药材的根茎切片显微图

Fig 2 Micrography of root and stem section of medicinal materials

酸蒸气饱和^[5-6],展开,取出,晾干,以2%三氯化铝乙醇溶液显色,于105℃下烘5 min,于365 nm波长下检视;烟花苷以乙酸乙酯-甲酸-水(8:1:1, V:V:V)为展开剂,展开,取出,晾干,以10%硫酸乙醇溶液显色^[7],于365 nm波长下检视。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,阴性对照无干扰,详见图4。

2.4 水分、灰分及浸出物含量检测

2.4.1 水分 取10批药材样品(S1~S10)各适量,精密称定,按2015年版《中国药典》(四部)通则“0832水分测定法”项下烘干法^[8]第二法测定,平行测定3次。结果显示,10批药材样品水分含量范围为0.61%~1.89%,平均值为0.89%,按不高于平均值的120%设限,均符合2015年版《中国药典》(四部)规定的标准(不得超过2.00%)^[9],详见表1。

2.4.2 总灰分 取10批药材样品(S1~S10)各适量,精密称定,按2015年版《中国药典》(四部)通则“2302总灰

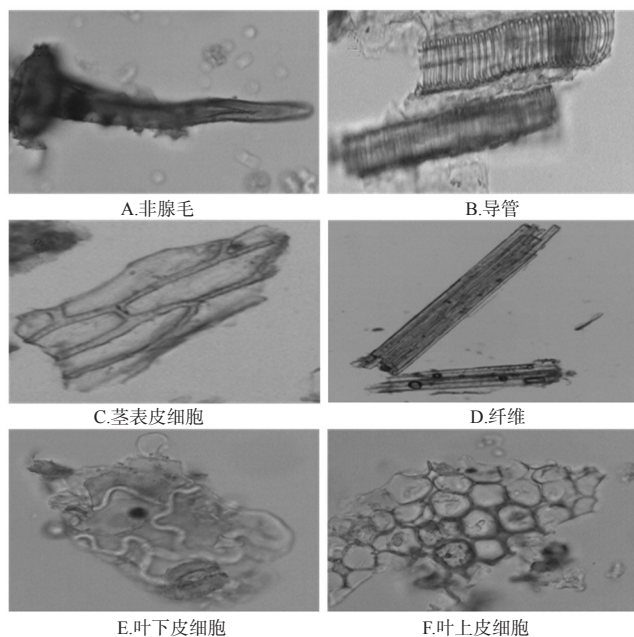
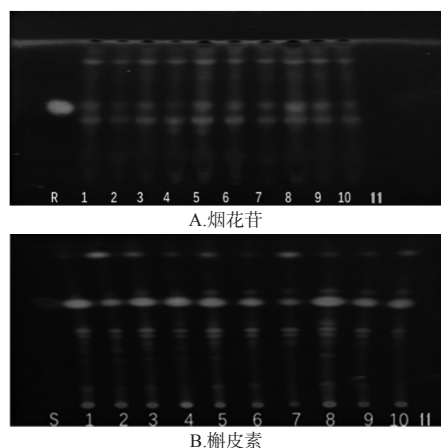


图3 药材粉末显微特征图(x40)

Fig 3 Microscopic characteristics graph of medicinal materials powder (x40)



注:R.烟花苷对照品;S.槲皮素对照品;1~10.供试品;11.阴性对照

Note: R. nicotiflorin control; S. quercetin control; 1-10. test samples; 11. negative control

图4 烟花苷和槲皮素的TLC图

Fig 4 TLC chromatograms of nicotiflorin and quercetin

分测定法”^[8]测定,平行测定3次。结果显示,10批药材样品总灰分含量范围为6.28%~8.88%,平均值为7.96%,按不高于平均值的120%设限,均符合2015年版《中国药典》(四部)规定的标准(不得超过10.00%)^[9],详见表1。

2.4.3 酸不溶性灰分 取10批药材样品(S1~S10)各适量,精密称定,按2015年版《中国药典》(四部)通则“2302酸不溶性灰分测定法”^[8]测定,平行测定3次。结果显示,10批药材样品酸不溶性灰分含量范围为0.76%~1.79%,平均值为1.12%,按不高于平均值的

表1 药材样品的水分、灰分、浸出物含量(n=3, %)

Tab 1 Results of content determination of moisture, ash and extract in *T. maculata* (n=3, %)

编号	水分	总灰分	酸不溶性灰分	醇溶性浸出物	水溶性浸出物
S1	0.93	7.99	1.05	1.31	13.43
S2	0.80	7.89	0.76	1.87	9.52
S3	1.89	6.28	1.49	1.83	9.49
S4	0.64	7.29	0.78	1.72	9.57
S5	0.82	8.22	1.10	1.37	10.52
S6	0.79	7.99	0.99	2.00	14.27
S7	0.61	8.32	1.79	1.64	9.39
S8	0.81	8.39	0.96	1.38	11.22
S9	0.77	8.30	1.21	1.48	14.08
S10	0.81	8.88	1.05	1.51	12.36
平均值	0.89	7.96	1.12	1.61	11.39

120% 设限, 均符合 2015 年版《中国药典》(四部) 规定的标准(不得超过 2.00%)^[8], 详见表 1。

2.4.4 醇溶性浸出物 取 10 批药材样品(S1~S10) 各适量, 精密称定, 按 2015 年版《中国药典》(四部) 通则“2201 醇溶性浸出物测定法”项下热浸法^[8]测定, 平行测定 3 次。结果显示, 10 批药材样品醇溶性浸出物含量范围为 1.31%~2.00%, 平均值为 1.61%, 按不低于平均值的 80% 设限, 均符合 2015 年版《中国药典》(四部) 规定的标准(不得少于 1.00%)^[8], 详见表 1。

2.4.5 水溶性浸出物 取 10 批药材样品(S1~S10) 各适量, 精密称定, 按 2015 年版《中国药典》(四部) 通则“2201 水溶性浸出物测定法”项下冷浸法^[8]测定, 平行测定 3 次。结果显示, 10 批药材样品水溶性浸出物含量范围为 9.39%~14.27%, 平均值为 11.39%, 按不低于平均值的 80% 设限, 均符合 2015 年版《中国药典》(四部) 规定的标准(不得少于 9.00%)^[8], 详见表 1。

2.5 葛根素、对羟基苯甲酸的含量测定

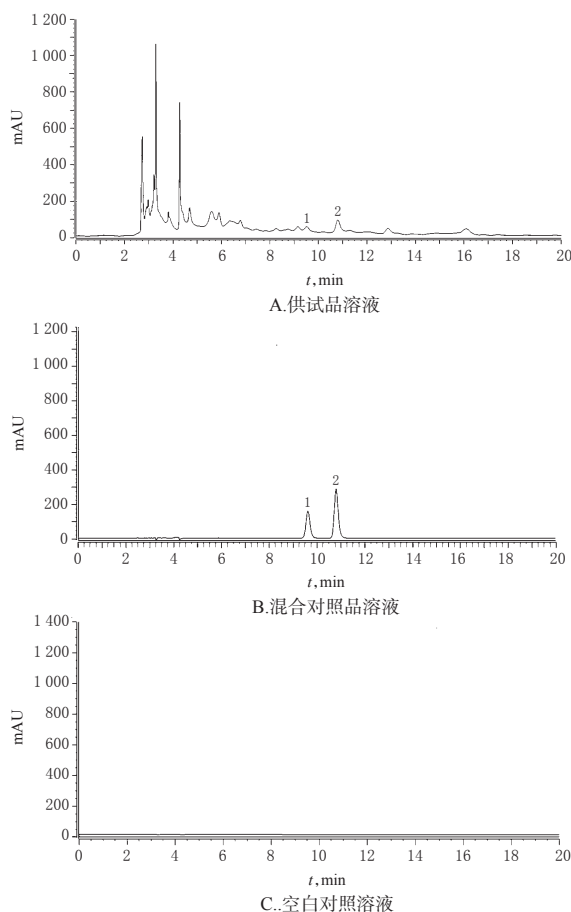
2.5.1 色谱条件 色谱柱: Waters Sunfire C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-0.40% 磷酸水溶液(15:85, V/V)^[9-10]; 检测波长: 250 nm; 流速: 0.8 mL/min; 柱温: 35 °C; 进样量: 10 μL。

2.5.2 混合对照品溶液的制备 取葛根素、对羟基苯甲酸对照品适量, 精密称定, 分别置于 10 mL 量瓶中, 加甲醇适量, 超声(功率: 250 w, 频率: 100 kHz) 处理 10 min 使其溶解, 加甲醇定容, 制成葛根素、对羟基苯甲酸质量浓度分别为 0.285、0.205 mg/mL 的单一对照品溶液。精密吸取上述各单一对照品溶液 0.7、2.6 mL, 置于同一 25 mL 量瓶中, 加甲醇定容, 摇匀, 即得。

2.5.3 供试品溶液的制备 取药材样品粉末 10 g, 精密称定, 加石油醚脱脂 2 h, 加 70% 乙醇 400 mL 回流提取, 提取时间依次为 1 h、30 min^[11], 提取液过滤浓缩至 10 mL; 精密吸取上述浓缩液 5 mL, 加甲醇定容, 摇匀, 经 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

2.5.4 空白对照溶液 以甲醇作为空白对照。

2.5.5 系统适用性试验 取上述供试品溶液、混合对照品溶液、空白对照溶液各 10 μL, 按“2.5.1”项下色谱条件进样测定, 记录色谱, 详见图 5。由图 5 可见, 供试品与混合对照品相应的出峰时间一致, 分离度 > 4, 理论板数以葛根素峰计不低于 10 000, 空白对照对测定无干扰。



注: 1. 葛根素; 2. 对羟基苯甲酸

Note: 1. puerarin; 2. *p*-hydroxybenzoic acid

图5 葛根素、对羟基苯甲酸的 HPLC 图

Fig 5 HPLC chromatograms of puerarin and *p*-hydroxybenzoic acid

2.5.6 线性关系考察 取“2.5.2”项下混合对照品溶液适量, 加甲醇稀释, 制得系列对照品工作溶液, 按“2.5.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积。以各待测成分进样量(x)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归, 得葛根素、对羟基苯甲酸回归方程分别为 $y=239.868x+11\ 761$ ($r=0.999\ 6$)、 $y=792.368x+26\ 921$ ($r=0.999\ 5$), 表明两者进样量分别在 0.031 92~0.111 7、0.085 3~0.298 5 μg 范围内时线性关系良好。

2.5.7 定量限与检测限考察 取“2.5.2”项下混合对照品溶液适量, 倍比稀释, 按“2.5.1”项下色谱条件进样测定, 以信噪比为 10:1、3:1 分别计算定量限、检测限。结果, 葛根素、对羟基苯甲酸的定量限分别为 1.06、0.47

ng,检测限分别为0.36、0.12 ng。

2.5.8 精密度试验 取“2.5.3”项下供试品溶液(编号:S4)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,葛根素、对羟基苯甲酸峰面积的RSD分别为1.95%、1.98%($n=6$),表明本方法精密度良好。

2.5.9 稳定性试验 取“2.5.3”项下供试品溶液(编号:S4)适量,分别于室温下放置0、4、6、8、10、12、24 h时按“2.5.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,葛根素、对羟基苯甲酸峰面积的RSD分别为1.86%、1.95%($n=7$),表明供试品溶液在室温下放置24 h内稳定性良好。

2.5.10 重复性试验 取药材样品粉末(编号:S4)适量,共6份,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,并按标准曲线方法计算含量。结果,葛根素、对羟基苯甲酸平均含量分别为0.017 2、0.042 5 mg/g,RSD分别为1.09%、1.01%($n=6$),表明本方法重复性好。

2.5.11 加样回收率试验 取药材样品粉末(编号:S4),共6份,每份约2.5 g,分别加入一定量的葛根素、对羟基苯甲酸对照品溶液,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并计算加样回收率,结果见表2。

表2 葛根素、对羟基苯甲酸的加样回收率($n=6$)

Tab 2 Recovery of puerarin and *p*-hydroxybenzoic acid($n=6$)

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, %
葛根素	0.041 0	0.039 9	0.081 6	101.75	101.54	1.76
	0.041 0	0.039 9	0.081 1	100.50		
	0.041 0	0.039 9	0.080 6	99.23		
	0.041 0	0.039 9	0.081 2	100.75		
	0.041 0	0.039 9	0.082 0	102.76		
	0.041 0	0.039 9	0.082 6	104.26		
对羟基苯甲酸	0.105 5	0.106 6	0.214 4	102.16	102.10	1.68
	0.105 5	0.106 6	0.214 3	102.06		
	0.105 5	0.106 6	0.212 5	100.38		
	0.105 5	0.106 6	0.213 2	101.03		
	0.105 5	0.106 6	0.217 3	104.88		
	0.105 5	0.106 6	0.215 4	103.10		

2.5.12 耐用性试验 取药材样品粉末(编号:S4)适量,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,分别考察不同色谱柱[Waters Sunfire C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm)、Agilent ZORBAX Eclipse Plus C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm)、Thermo Hypersil BDS C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm)]、流动相(水相中磷酸比例为0.30%、0.35%、0.40%)、流速(0.8、0.9、1.0 mL/min)、柱温(34、35、36 ℃)对样品含量测定结果的影响,结果见表3。

表3。

表3 葛根素、对羟基苯甲酸的耐用性($n=3$)

Tab 3 Durability of puerarin and *p*-hydroxybenzoic acid($n=3$)

试验条件	葛根素		对羟基苯甲酸		
	含量,mg/g	RSD,%	含量,mg/g	RSD,%	
色谱柱	Waters Sunfire C ₁₈	0.017 7	1.75	0.041 3	1.84
	Agilent ZORBAX Eclipse Plus C ₁₈	0.017 5		0.042 3	
	Thermo Hypersil BDS C ₁₈	0.017 1		0.040 8	
流动相	乙腈-0.30%磷酸水溶液	0.017 3	1.67	0.040 7	1.45
	乙腈-0.35%磷酸水溶液	0.016 8		0.041 3	
	乙腈-0.40%磷酸水溶液	0.017 1		0.041 9	
流速	0.8 mL/min	0.016 6	1.49	0.040 6	1.49
	0.9 mL/min	0.016 9		0.041 0	
	1.0 mL/min	0.017 1		0.041 8	
柱温	34 ℃	0.016 9	1.57	0.041 7	1.32
	35 ℃	0.016 5		0.041 2	
	36 ℃	0.017 0		0.042 3	

2.5.13 样品含量测定 取10批药材样品粉末(编号:S1~S10),约10 g,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,并按标准曲线方法计算葛根素、对羟基苯甲酸的含量,结果见表4。

表4 药材样品中葛根素和对羟基苯甲酸含量($n=3$, mg/g)

Tab 4 Content of puerarin and *p*-hydroxybenzoic acid in medicinal materials($n=3$, mg/g)

编号	葛根素	对羟基苯甲酸
S1	0.035	0.079
S2	0.034	0.086
S3	0.045	0.140
S4	0.017	0.042
S5	0.043	0.100
S6	0.047	0.110
S7	0.045	0.064
S8	0.042	0.072
S9	0.044	0.130
S10	0.044	0.083
平均值	0.040	0.091

2.6 烟花苷、阿魏酸、槲皮素、山柰酚的含量测定

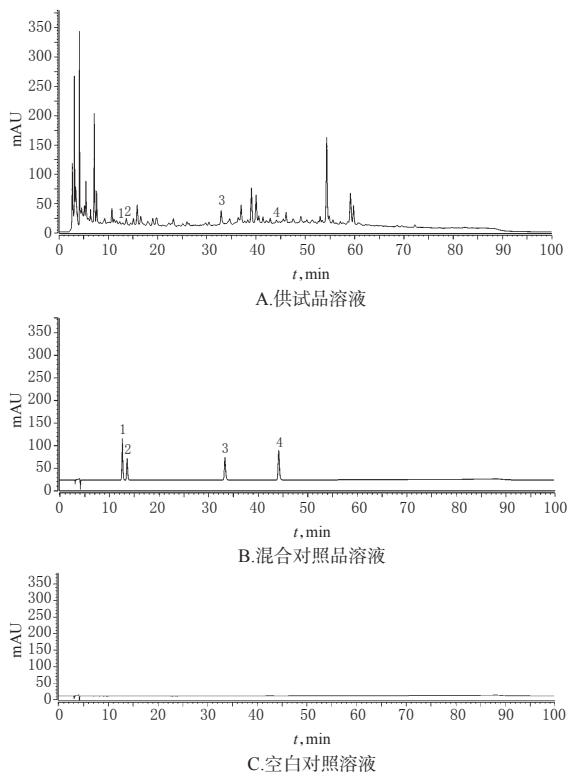
2.6.1 色谱条件 色谱柱:Waters Sunfire C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈(A)-0.40%磷酸水溶液(B),梯度洗脱(0~20 min,80% A→75% A;20~85 min,75% A→45% A;85~90 min,45% A→80% A;90~100 min,80% A);检测波长:360 nm^[12-13];流速:0.8 mL/min;柱温:35 ℃^[13-15];进样量:10 μL。

2.6.2 混合对照品溶液的制备 取烟花苷、阿魏酸、槲皮素、山柰酚对照品适量,精密称定,制成质量浓度分别为0.269、0.292、0.122、0.121 mg/mL的单一对照品溶液。分别精密吸取上述各单一对照品溶液0.6、0.13、0.07、0.3 mL,置于同一25 mL量瓶中,加甲醇定容,摇匀,即得。

2.6.3 供试品溶液的制备 按“2.5.3”项下方法制备供试品溶液。

2.6.4 空白对照溶液 以甲醇作为空白对照溶液。

2.6.5 系统适用性试验 分别精密吸取上述供试品溶液、混合对照品溶液、空白对照溶液各 10 μ L,按“2.6.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱,详见图 6。由图 6 可见,供试品和混合对照品相应的出峰时间一致,分离度 >3 ,理论板数以烟花苷峰计不低于 20 000,空白对照对测定无干扰。



注:1.烟花苷;2.阿魏酸;3.槲皮素;4.山柰酚

Note: 1. nicotiflorin; 2. ferulic acid; 3. quercetin; 4. kaempferol

图 6 烟花苷、阿魏酸、槲皮素、山柰酚的 HPLC 图

Fig 6 HPLC chromatograms of nicotiflorin, ferulic acid, quercetin and kaempferol

2.6.6 线性关系考察 取“2.6.2”项下混合对照品溶液适量,按“2.6.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以各待测成分进样量(x)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归,得烟花苷、阿魏酸、槲皮素、山柰酚回归方程分别为 $y=103.617x+2\ 106.3$ ($r=0.999\ 8$)、 $y=57.905x+5\ 122.7$ ($r=0.999\ 8$)、 $y=127.471x+18\ 072$ ($r=0.999\ 4$)、 $y=384.620x+2\ 241.9$ ($r=0.999\ 4$),表明四者进样量分别在 0.010 76~0.037 66、0.070 08~0.245 3、0.058 56~0.205 0、0.009 860~0.033 88 μ g 范围内时线性关系良好。

2.6.7 定量限与检测限考察 取“2.6.2”项下混合对照品溶液适量,倍比稀释,按“2.6.1”项下色谱条件进样测定,以信噪比为 10:1、3:1 分别计算定量限、检测限。结

果,烟花苷、阿魏酸、槲皮素、山柰酚的定量限分别为 0.75、1.40、1.20、0.74 ng,检测限分别为 0.30、0.53、0.60、0.31 ng。

2.6.8 精密度试验 取“2.6.3”项下供试品溶液(编号:S10)适量,按“2.6.1”项下色谱条件连续进样测定 6 次,记录峰面积。结果,烟花苷、阿魏酸、槲皮素、山柰酚峰面积的 RSD 分别为 1.58%、1.58%、1.90%、1.94% ($n=6$),表明本方法精密度良好^[16]。

2.6.9 稳定性试验 取“2.6.3”项下供试品溶液(编号:S10)适量,分别于室温下放置 0、4、6、8、10、12、24 h 时按“2.6.1”项下色谱条件进样测定。结果,烟花苷、阿魏酸、槲皮素、山柰酚峰面积的 RSD 分别为 1.64%、1.45%、1.24%、1.78% ($n=7$),表明供试品溶液于室温下放置 24 h 内稳定性良好。

2.6.10 重复性试验 取药材样品粉末(编号:S10)适量,共 6 份,按“2.6.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.6.1”项下色谱条件进样测定,并按标准曲线方法计算含量。结果,烟花苷、阿魏酸、槲皮素和山柰酚的平均含量分别为 0.007 65、0.088 2、0.082 3、0.008 65 mg/g, RSD 分别为 1.95%、1.75%、1.14%、1.45% ($n=6$),表明本方法重复性好。

2.6.11 加样回收率试验 取药材样品粉末(编号:S10),共 6 份,每份约 1 g,精密加入一定量的混合对照品溶液,按“2.6.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.6.1”项下色谱条件进样测定并计算加样回收率,结果见表 5。

2.6.12 耐用性试验 取药材样品粉末(编号:S10)适量,按“2.6.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.6.1”项下色谱条件进样,分别考察不同色谱柱[Waters Sunfire C₁₈(250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m)、Agilent ZORBAX Eclipse Plus C₁₈(250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m)、Thermo Hypersil BDS C₁₈(250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m)]、流动相(水相中磷酸比例为 0.30%、0.35%、0.40%)、流速(0.8、0.9、1.0 mL/min)、柱温(34、35、36 $^{\circ}$ C)对样品含量测定结果的影响,结果见表 6。

2.6.13 样品含量测定 取 10 批药材样品粉末,约 10 g,按“2.6.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.6.1”项下色谱条件进样测定,并按标准曲线方法计算样品中烟花苷、阿魏酸、槲皮素、山柰酚的含量,结果见表 7。

3 讨论

有文献报道,黄花油点草中含有多种黄酮类成分^[2-3]。故笔者参考上述文献选择烟花苷和槲皮素两种成分进行定性鉴别,并以烟花苷为特性检测成分、槲皮素为通用性检测成分。本文采用甲醇提取药材样品时发现,当提取温度低于 40 $^{\circ}$ C 时烟花苷的 TLC 斑点较暗,这可能与烟花苷可溶于热甲醇有关。槲皮素 TLC 鉴别分别

表5 烟花苷、阿魏酸、槲皮素、山柰酚的加样回收率 (n=6)

Tab 5 Recovery of nicotiflorin, ferulic acid, quercetin and kaempferol (n=6)

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, %
烟花苷	0.007 591	0.007 345	0.014 96	100.33	101.46	1.56
	0.007 591	0.007 345	0.015 15	102.91		
	0.007 591	0.007 345	0.015 07	101.82		
	0.007 591	0.007 345	0.014 90	99.51		
	0.007 591	0.007 345	0.015 20	103.59		
	0.007 591	0.007 345	0.014 98	100.60		
阿魏酸	0.085 55	0.087 60	0.177 0	104.39	103.35	1.26
	0.085 55	0.087 60	0.174 0	100.97		
	0.085 55	0.087 60	0.176 0	103.25		
	0.085 55	0.087 60	0.176 3	103.60		
	0.085 55	0.087 60	0.177 2	104.62		
	0.085 55	0.087 60	0.176 0	103.25		
槲皮素	0.082 65	0.083 20	0.164 3	98.14	99.36	0.91
	0.082 65	0.083 20	0.165 7	99.82		
	0.082 65	0.083 20	0.165 1	99.10		
	0.082 65	0.083 20	0.165 8	99.94		
	0.082 65	0.083 20	0.166 3	100.54		
	0.082 65	0.083 20	0.164 7	98.62		
山柰酚	0.008 36	0.008 47	0.016 63	97.64	96.85	1.96
	0.008 36	0.008 47	0.016 84	100.12		
	0.008 36	0.008 47	0.017 01	102.13		
	0.008 36	0.008 47	0.016 65	97.87		
	0.008 36	0.008 47	0.016 95	101.42		
	0.008 36	0.008 47	0.016 67	98.11		

表6 烟花苷、阿魏酸、槲皮素、山柰酚耐用性试验结果 (n=3)

Tab 6 Results of durability tests of nicotiflorin, ferulic acid, quercetin and kaempferol (n=3)

试验条件	烟花苷		阿魏酸		槲皮素		山柰酚	
	含量, mg/g	RSD, %	含量, mg/g	RSD, %	含量, mg/g	RSD, %	含量, mg/g	RSD, %
色谱柱 Waters Sunfire C ₁₈	0.007 54	1.03	0.089 0	1.31	0.082 0	1.21	0.008 60	1.45
Agilent ZORBAX Eclipse Plus C ₁₈	0.007 43		0.087 0		0.084 0		0.008 47	
Thermo Hypersil BDS C ₁₈	0.007 62		0.089 0		0.082 8		0.008 72	
流动相 乙腈-0.30%磷酸水溶液	0.007 59	1.41	0.089 9	1.21	0.082 5	1.46	0.008 73	1.11
乙腈-0.35%磷酸水溶液	0.007 47		0.087 8		0.081 3		0.008 61	
乙腈-0.40%磷酸水溶液	0.007 38		0.088 5		0.083 7		0.008 54	
流速 0.8 mL/min	0.007 41	1.29	0.090 0	1.18	0.083 7	1.35	0.008 72	1.72
0.9 mL/min	0.007 44		0.087 9		0.082 4		0.008 45	
1.0 mL/min	0.007 59		0.089 0		0.081 5		0.008 69	
柱温 34 °C	0.007 47	1.33	0.087 6	1.37	0.083 5	1.10	0.008 73	1.12
35 °C	0.007 64		0.085 5		0.082 8		0.008 54	
36 °C	0.007 65		0.085 6		0.081 7		0.008 67	

以甲苯-乙酸乙酯-甲酸(5:2:1, 5:4:0.5, 9:3:1, 5:4:1, V/V/V)^[8,16-17]、氯仿-乙酸乙酯-甲酸(10:3:1, 9:3:2, V/V/V)、正丁醇-乙酸乙酯-水(4:2:1, V/V/V)^[17]为展开剂时展开效果均不好,而采用稀盐酸蒸气饱和的甲苯-乙酸乙酯-甲酸(5:4:1, V/V/V)^[5]展开时斑点清晰。烟花苷TLC鉴别分别以氯仿-甲醇-水(5:2:0.1, 5:2:0.3, 5:2:0.2, V/V/V)^[14]、乙酸乙酯-甲酸-水(上层)(10:1:2, V/V/V)^[7]为展开剂

表7 药材样品中烟花苷、阿魏酸、槲皮素、山柰酚含量 (n=3, mg/g)

Tab 7 Content of nicotiflorin, ferulic acid, quercetin and kaempferol in medicinal materials (n=3, mg/g)

编号	烟花苷	阿魏酸	槲皮素	山柰酚
S1	0.004 8	0.067	0.024	0.009 4
S2	0.015 0	0.099	0.031	0.005 4
S3	0.005 4	0.066	0.032	0.004 0
S4	0.003 8	0.052	0.064	0.011 0
S5	0.004 0	0.071	0.082	0.008 8
S6	0.004 6	0.049	0.091	0.004 1
S7	0.004 6	0.180	0.079	0.005 7
S8	0.005 2	0.097	0.048	0.003 9
S9	0.005 0	0.071	0.082	0.005 3
S10	0.007 6	0.089	0.082	0.008 6
平均值	0.006 0	0.084	0.062	0.006 6

时展开效果均不好,而采用乙酸乙酯-甲酸-水(8:1:1, V/V/V)^[17]展开时效果较好。

本试验尝试依次用水煎煮、甲醇超声、80%甲醇回流、70%乙醇回流、石油醚脱脂后70%乙醇回流的方法提取,结果发现以石油醚脱脂后70%乙醇回流提取可同时提取出葛根素、对羟基苯甲酸、烟花苷、阿魏酸、槲皮素、山柰酚,但烟花苷和山柰酚的含量低,可控程度较低,检测过程中偏差较大,因此笔者认为下一步应对黄花油点草进行分离,寻找更容易实现质量控制的成分。现有相关文献中黄花油点草已确定的化学成分种类较少,目前确定的化学成分有葛根素、阿魏酸、对羟基苯甲酸、3-甲氧基槲皮素、β-谷甾醇、槲皮素、山柰酚、烟花苷^[1-3,14]。本研究以葛根素、对羟基苯甲酸、烟花苷、阿魏酸、槲皮素、山柰酚为检测指标,建立了HPLC法测定其6种成分含量的方法。笔者曾采用全波长扫描以及在250、340、225、360 nm波长下检测发现,在225、250 nm波长处葛根素、对羟基苯甲酸、烟花苷、阿魏酸、槲皮素、山柰酚都可出现,杂质峰吸收较多,峰形较差,在340 nm波长处对羟基苯甲酸吸收不明显,在360 nm波长处溶剂峰较小,因此选择250、360 nm两个波长对黄花油点草的6种成分进行检测。此外,本试验考察了不同柱温(25、30、35、36 °C)对分离度的影响,结果柱温为35 °C时,在250 nm波长下葛根素、对羟基苯甲酸和在360 nm波长下烟花苷、阿魏酸、槲皮素、山柰酚的分离度最好,因此选择柱温为35 °C对黄花油点草中6种成分进行检测。色谱图中部分未知成分峰面积所占比例大,因此对黄花油点草中的其他成分还有待进一步确定^[18-19]。

含量测定结果显示,葛根素、对羟基苯甲酸含量范围分别为0.017~0.047、0.042~0.140 mg/g,平均值分别为0.040、0.091 mg/g,按不低于平均值的80%设限,暂定两者含量分别不得低于0.032、0.073 mg/g。烟花苷、

阿魏酸、槲皮素、山柰酚含量范围分别为 0.003 8~0.015 0、0.049~0.180、0.024~0.091、0.003 9~0.011 0 mg/g, 平均值分别为 0.006、0.084、0.062、0.006 6 mg/g, 按不低于平均值的 80% 设限, 暂定四者含量分别不得低于 0.004 8、0.067、0.050、0.005 3 mg/g。10 批样品测定结果表明, 从表 4 和表 7 中得出同一批药材样品中葛根素、对羟基苯甲酸、阿魏酸、槲皮素的含量接近, 差异较小, 烟花苷、山柰酚的含量较低, 差异较大; 10 批药材样品中葛根素、对羟基苯甲酸、阿魏酸含量相对较稳定, 槲皮素、烟花苷、山柰酚含量差异较小, 最高含量均为最低含量的 3 倍左右。根据采收时间对 10 批药材中的 6 种成分含量进行分析, 结果表明, 7、8、9 月份采收药材中 6 种成分的含量升高, 9 月份采收药材中 6 种成分的含量较为稳定。这提示随着时间的变化药材本身的次生代谢产物含量也逐渐累积, 到 8 月底至 9 月份趋于稳定, 与黄花点油草的正常采收期 9 月份相吻合。

综上所述, 本文所建质量标准全面、可行, 可用于黄花油点草的质量控制。

参考文献

[1] 孙静, 寇文龙, 刘文文, 等. 陕产黄花油点草的生药鉴别[J]. 中药材, 2012, 35(5): 717-719.

[2] 孙静, 刘洁琼, 张丽梅. 陕产黄花油点草化学成分初步研究[J]. 陕西中医, 2012, 33(5): 605-606.

[3] 杨洁, 张东东, 张欣, 等. 黄花油点草化学成分研究[J]. 中南药学, 2017, 15(7): 922-924.

[4] 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: 299.

[5] 王晓飞, 于玲, 杜华霜, 等. 三白草中槲皮素的薄层色谱鉴别[J]. 中国民族民间医药, 2010, 19(23): 61-64.

[6] 王祥培, 许士娜, 吴红梅, 等. 天胡荽药材中槲皮素的薄层鉴别与含量测定[J]. 时珍国医国药, 2010, 21(1): 44-45.

[7] 盛萍, 帕丽达·阿不力孜, 张焯, 等. 维吾尔药睡莲花中烟

花苷的含量测定[J]. 中药材, 2006, 29(12): 1313-1314.

[8] 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: 104, 202, 204.

[9] 肖楠, 王路宏, 赵磊. HPLC 法测定五味子膏中葛根素的含量[J]. 中国药物评价, 2018, 35(4): 267-270.

[10] 咎珂, 黄莉莉, 刘杰, 等. HPLC 法同时测定民族药材青阳参中 6 种酚类成分的含量[J]. 药物分析杂志, 2017, 37(8): 1447-1452.

[11] 宋敏, 李晨阳, 谭为, 等. 雪白睡莲花中烟花苷的提取工艺研究[J]. 食品研究与开发, 2016, 37(9): 128-131.

[12] 曹晓华, 沈旭斌, 程先骄, 等. HPLC 双波长法测定豌豆尖中槲皮素和山柰酚的含量[J]. 食品科技, 2017, 42(4): 270-276.

[13] 高松红, 单柏宇, 徐阳, 等. HPLC 法同时测定五加生化胶囊中阿魏酸和槲皮素的含量[J]. 长春师范大学学报, 2018, 37(6): 112-116.

[14] 孙静, 何晓娟, 刘洁琼. HPLC 法测定陕西产黄花油点草中烟花苷的含量[J]. 中国药房, 2015, 26(9): 1246-1247.

[15] 罗慧玉, 闫伟伟, 曾春萍, 等. HPLC 法同时测定杏花中阿魏酸、芦丁和异槲皮苷[J]. 实用药物与临床, 2017, 20(6): 701-704.

[16] 曲艳丽, 刘治民, 孙冶, 等. 山紫菀药材的质量标准研究[J]. 中国药房, 2018, 29(8): 1057-1060.

[17] 林海霞. 竹叶柴胡的质量研究[D]. 成都: 成都中医药大学, 2012.

[18] 贾田芊, 王媚, 崔春丽, 等. 超高效液相色谱指纹图谱快速测定复方丹参片与复方丹参滴丸活性成分[J]. 医药导报, 2018, 37(10): 1241-1246.

[19] 贾田芊, 王媚, 李兴欢, 等. 复方丹参方快速 UPLC 指纹图谱研究[J]. 中国医院药学杂志, 2018, 38(5): 474-477, 495.

(收稿日期: 2018-09-02 修回日期: 2019-01-09)

(编辑: 余庆华)

《中国药房》杂志——中国科技论文统计源期刊, 欢迎投稿、订阅