

苗药血人参的质量标准研究[△]

朱新宇*, 骆瀚超, 何茂秋, 胡朝阳, 梁妍, 郝小燕[△](贵州医科大学药学院, 贵阳 550025)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)27-3829-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.27.28

摘要 目的:建立苗药血人参药材的质量标准。方法:鉴别药材性状和显微特征;采用薄层色谱法(TLC)对药材进行定性鉴别;采用高效液相色谱法测定药材中表儿茶素、 $2\alpha, 3\alpha$ -epoxy-5, 7, 3', 4' -tetra-hydroxy-flavan-($4\beta \rightarrow 8$)-epicatechin(成分A)的含量;色谱柱为 Comatex TM C₁₈, 流动相为乙腈-水(梯度洗脱), 流速为 1.0 ml/min, 检测波长为 210 nm, 柱温为 30 ℃, 进样量为 5 μ l。结果:药材性状和粉末显微鉴别图谱清晰。血人参的 TLC 图斑点清晰, 分离良好。表儿茶素、成分 A 检测进样量线性范围分别为 0.274 5~4.392 0 μ g($r=0.999 6$)、0.103 0~1.648 3 μ g($r=0.999 4$);精密性、稳定性、重复性试验的 RSD<3%;加样回收率分别为 99.76%~104.82% (RSD=2.42%, $n=6$)、97.98%~104.99% (RSD=2.75%, $n=6$)。结论:该研究所建标准可用于血人参的质量控制。

关键词 血人参;生药学鉴别法;薄层色谱法;高效液相色谱法;含量测定

Study on the Quality Standard of Miao Medicine *Indigofera stachyoides*

ZHU Xinyu, LUO Hanchao, HE Maoqiu, HU Zhaoyang, LIANG Yan, HAO Xiaoyan (School of Pharmacy, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the quality standard for Miao medicine *Indigofera stachyoides*. METHODS: Medicinal properties and microscopic characteristics were identified; TLC was used for the qualitative identification; HPLC was conducted for content determination of epicatechin and $2\alpha, 3\alpha$ -epoxy-5, 7, 3', 4' -tetra-hydroxy-flavan-($4\beta \rightarrow 8$)-epicatechin(reference A): the column was Comatex TM C₁₈ with mobile phase of acetonitrile - water at a flow rate of 1.0 ml/min, and detection wavelength was 210 nm, column temperature was 30 ℃, injection volume was 5 μ l. RESULTS: It showed clear microscopic identification map. *I. stachyoides* TLC had clear spots and well separated. The linear range was 0.274 5-4.392 0 μ g ($r=0.999 6$) for epicatechin, and 0.103 0-1.648 3 μ g for reference A ($r=0.999 4$), RSDs of precision, stability and reproducibility tests were lower than 3%, recoveries were 99.76%-104.82% (RSD=2.42%, $n=6$) and 97.98%-104.99% (RSD=2.75%, $n=6$) respectively. CONCLUSIONS: The established standard can be used for the quality control of *I. stachyoides*.

KEYWORDS *Indigofera stachyoides*; Pharmacognostic identification; TLC; HPLC; Content determination

血人参是豆科蝶形花亚科植物茸毛木蓝 *Indigofera stachyoides* Lindl. 的根,为贵州省苗族用药,收载于 2003 年版《贵州省中药材、民族药材质量标准》,别名为山红花、铁刷子、红苦刺。血人参主要分布在云南、贵州、四川、广西等地,尤其在贵州贵阳、安顺、黔东南、黔西南等地有较为广泛的分布。血人参性温,味微苦涩,有补气摄血、滋阴补肾之功效,主治崩漏、跌打、风湿、肝硬化、痢疾及疝积等^[1-3]。在对其化学成分及生物活性研究中,本课题组发现了有一定抗肝细胞损伤活性的 $2\alpha, 3\alpha$ -epoxy-5, 7, 3', 4' -tetra-hydroxy-flavan-($4\beta \rightarrow 8$)-epicatechin(成分 A)以及可以辅助放疗化疗的化合物表儿茶素^[4-7]。迄今为止,对于血人参药材鉴别方法的相关研究文献极少,因此笔者对血人参药材进行性状和显微特征鉴别,采用薄层色谱法(TLC)对其进行定性鉴别,采用高效液相色谱法(HPLC)测定药材中表儿茶素和成分 A 的含量,以期为该药材的后续质量控制和研发提供参考。

1 材料

[△] 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81460640);贵州省中药现代化科技产业研究开发专项项目(No.黔科合 ZY 字[2013]3006 号)

* 硕士研究生。研究方向:天然药物化学。E-mail: zxyys2009@126.com

通信作者:教授。研究方向:天然产物成分分析、质量标准。E-mail: haoxiaoyan@vip.163.com

1.1 仪器

DFT-200 型粉碎机(温岭市林大机械有限公司);YS-100 型双目生物显微镜(日本 Nikon 公司);KQ-250B 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);B-490 型旋转蒸发器(瑞士 BUCHI 公司);AE240 型 1/10 万电子天平(瑞士 Mettler-Toledo 公司);ZF-2 型三用紫外分析仪(上海安亭电子仪器厂);1100 型 HPLC 仪(美国 Agilent 公司);AY-120 型电子分析天平(日本 Shimadzu 公司);硅胶 GF254 薄层板(美国 Merk 公司)。

1.2 试剂

表儿茶素对照品(贵州省食品药品检验所,批号:800-2000014,纯度:98%);成分 A 对照品(笔者自制,以氢谱、碳谱确定结构, HPLC 测定纯度为 98%);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

血人参(见表 1)经贵阳中医学院陈德媛研究员鉴定为真品。

2 方法与结果

2.1 性状鉴别

血人参根部形大而不规则,表面粗糙;下部较细长,表面有细微的纵皱纹;全体均有皮孔,外皮呈灰棕色,去皮后内显灰紫色。质坚硬,断面淡黄色,纤维性,稍有香气,详见图 1。

2.2 显微鉴别^①

药材粉末在显微镜下可见:①棕色块多见,形状大小不规

表1 血人参来源

Tab 1 Origin of *I. stachyoides*

样品批号	产地	样品批号	产地
HIS20101023	六枝	HIS20120918	六枝
HIS20110920	六枝	HIS20120923	扎佐
HIS20110925	普安	HIS20120924	花溪
HIS20111017	普安	HIS20121019	扎佐
HIS20111020	花溪	HIS20121021	普安



图1 血人参药材

Fig 1 *I. stachyoides*

则;②草酸钙方晶极易可见;③泌细胞呈长管道状,充满黄色分泌物;④导管以网状及梯纹为主;⑤淀粉粒类球或长圆形,脐点状,复粒2~8粒;⑥纤维分布较多,棕黄色,单个存在或集成束,有时亦与方晶结合成晶鞘纤维,晶纤维常成束;⑦木纤维较细长,壁较薄,纹孔稀疏点状;韧皮纤维纺锤或梭形,壁厚;⑧木栓细胞呈淡黄色或棕黄色,细胞壁略微增厚,形状不规则;⑨石细胞偶见。血人参粉末显微特征见图2。

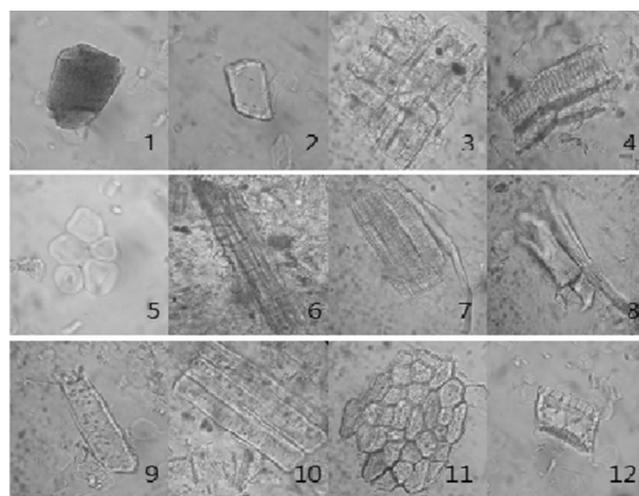


图2 血人参粉末显微特征

1.棕色块;2.草酸钙方晶;3.树脂道;4.导管;5.淀粉粒;6.纤维;7.晶纤维束;8.晶鞘纤维;9.木纤维;10.韧皮纤维;11.木栓细胞;12.石细胞

Fig 2 Microscopic characteristics of *I. stachyoides* powder

1.brown block; 2.calcium oxalate crystal; 3.resin canal; 4.catheter; 5.starch grain; 6.fiber; 7.crystal fiber bundle; 8.crystal sheath fiber; 9.wood fiber; 10.bast fiber; 11.cork cell; 12.stone cell

2.3 TLC鉴别^[9-10]

取样品粉末5.0 g(过40目筛),精密称定,加30倍量80%甲醇于圆底烧瓶中回流提取1 h,静置放冷,滤过,滤液蒸干,残渣加80%甲醇10 ml使溶解,作为供试品溶液。另分别精密称定表儿茶素和成分A对照品适量,加80%甲醇制成表儿茶素、成分A质量浓度均为1 mg/ml的单一对照品溶液和混合对照品溶液。按TLC法[2015年版《中国药典》(四部)]^[11]试验,吸取

上述供试品溶液2 μl、单一对照品溶液和混合对照品溶液各4 μl,分别点于同一硅胶GF₂₅₄薄层板上,以氯仿-甲醇-甲酸(30:10:1, V/V/V)为展开剂,置于氨蒸气饱和的展开缸内,展开,取出,晾干,喷以5%硫酸乙醇,于105 ℃加热至斑点显色清晰,置日光下检视。结果,供试品色谱中,在与对照药材和对照品色谱相应位置上显相同颜色的斑点,详见图3。

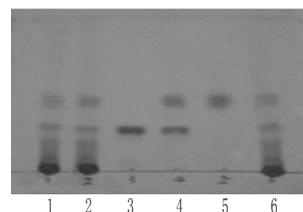


图3 薄层色谱图

1.六枝产血人参;2.普安产血人参;3.成分A对照品;4.混合对照品;5.表儿茶素对照品;6.花溪产血人参

Fig 3 TLC chromatograms

1.*I. stachyoides* in Liuzhi; 2.*I. stachyoides* in Puan; 3.reference substance of reference A; 4.mixed references; 5.reference substance of epicatechin; 6.*I. stachyoides* in Huaxi

2.4 含量测定^[12-13]

2.4.1 色谱条件 色谱柱:Comatex™ C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈(A)-水(B),梯度洗脱(洗脱程序见表2);流速:1.0 ml/min;检测波长:210 nm;柱温:30 ℃;进样量:5 μl。色谱见图4。

表2 梯度洗脱程序

Tab 2 Gradient elution program

时间,min	A,%	B,%	时间,min	A,%	B,%
0	5	95	32	14	86
4	9	91	42	18	82
8	9	91	68	32	68
18	14	86	69	100	0

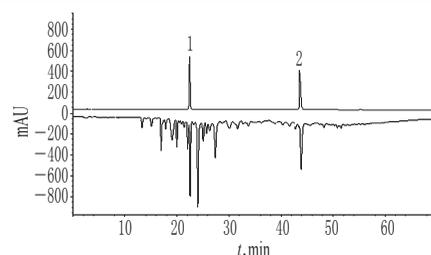


图4 样品和对照品高效液相色谱比较图

1.表儿茶素;2.对照品A

Fig 4 Comparison of chromatograms of sample and reference substance

1.epicatechin; 2.reference A

2.4.2 混合对照品溶液的制备 分别取表儿茶素对照品、成分A对照品适量,精密称定,置于同一10 ml量瓶中,用5%乙腈溶液溶解并定容,摇匀,即得表儿茶素、成分A质量浓度分别为0.171 7、0.457 5 mg/ml的混合对照品溶液。

2.4.3 供试品溶液的制备 称取样品5 g,粉碎成粗粉,过40目筛,用80%甲醇125 ml回流提取2 h,冷却,以80%甲醇补足质量,滤过,浓缩得浓稠浸膏。上述浓稠浸膏用适量水分散,依次用石油醚、乙酸乙酯萃取,所得的乙酸乙酯部分用5%乙腈溶液稀释至25 ml,用0.45 μm微孔滤膜滤过,备用。

2.4.4 线性关系考察 分别精密量取“2.4.2”项下混合对照品溶液0.6、1.2、2.4、4.8、9.6 μl,按“2.4.1”项下色谱条件进样测定,

记录峰面积。以表儿茶素、成分A进样量($x, \mu\text{g}$)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归,得表儿茶素、成分A回归方程分别为 $y=7\ 753.1x+547.65$ ($r=0.999\ 6$)、 $y=11\ 552x+403.02$ ($r=0.999\ 4$)。结果表明,表儿茶素、成分A检测进样量线性范围分别为 $0.274\ 5\sim 4.392\ 0$ 、 $0.103\ 0\sim 1.648\ 3\ \mu\text{g}$ 。

2.4.5 精密度试验 取“2.4.2”项下对照品溶液适量,按“2.4.1”项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果,表儿茶素、成分A峰面积的RSD分别为2.57%、1.77% ($n=6$),表明仪器精密度良好。

2.4.6 稳定性试验 取“2.4.3”项下供试品溶液(批号:HIS20101023)适量,分别于室温下放置0、2、4、8、10、12 h时按“2.4.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,表儿茶素、成分A峰面积的RSD分别为2.78%、2.25% ($n=6$),表明供试品溶液在12 h内基本稳定。

2.4.7 重复性试验 精密称取同一批样品(批号:HIS20101023)适量,按“2.4.3”项下方法制备供试品溶液,共6份,再按“2.4.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,表儿茶素、成分A峰面积的RSD分别为1.63%、2.70% ($n=6$),表明本方法重复性良好。

2.4.8 加样回收率试验 取已知含量样品适量,共6份,分别加入一定质量的表儿茶素、成分A,按“2.4.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.4.1”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($n=6$)

待测成分	称样量, g	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, %
成分A	2.503 1	4.734 9	4.729 0	9.452 6	99.76	103.34	2.42
	2.500 7	4.730 3	4.729 0	9.527 5	101.44		
	2.504 7	4.737 9	4.729 0	9.657 4	104.03		
	2.504 9	4.738 3	4.729 0	9.673 0	104.35		
	2.504 3	4.737 1	4.729 0	9.590 5	102.63		
	2.502 9	4.734 5	4.729 0	9.691 4	104.82		
表儿茶素	2.503 1	1.903 9	1.901 5	3.894 2	104.67	102.32	2.75
	2.500 7	1.902 0	1.901 5	3.765 1	97.98		
	2.504 7	1.905 1	1.901 5	3.804 9	99.91		
	2.504 9	1.905 2	1.901 5	3.858 6	102.73		
	2.504 3	1.904 8	1.901 5	3.827 9	103.56		
	2.502 9	1.903 7	1.901 5	3.900 0	104.99		

2.4.9 样品含量测定 取10批样品各适量,分别按“2.4.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.4.1”项下色谱条件进样测定,计算样品含量,结果见表4。

3 讨论

笔者分别考察了80%甲醇回流提取不同时间(设为2、4、6、8 h)和超声提取不同时间(设为15、30、45、60 min)的方法,通过外标法分别计算并比较表儿茶素和成分A的含量,结果表明,以80%甲醇回流2 h时提取效率较高。

本研究表明,血人参药材的性状、粉末显微鉴别、TLC鉴别可作为苗药血人参的专属性定性鉴别依据,可较好地排除混淆品种;同时,本研究建立的血人参中表儿茶素和成分A含

表4 样品含量测定结果($n=3, \text{mg/g}$)

Tab 4 Results of contents determination of samples ($n=3, \text{mg/g}$)

样品批号	表儿茶素	成分A
HIS20101023	0.745 4	1.959 0
HIS20110920	0.758 2	1.865 6
HIS20110925	0.491 6	1.506 4
HIS20111017	0.503 9	1.547 8
HIS20111020	0.372 9	1.409 6
HIS20120918	0.765 9	2.013 9
HIS20120923	0.607 0	1.647 2
HIS20120924	0.473 5	1.268 5
HIS20121019	0.662 5	1.681 5
HIS20121021	0.506 1	1.517 5

量测定方法简单可行,结果准确可靠。综上,本研究所建标准可用于苗药血人参的质量控制。

参考文献

- [1] 国家中医药管理局《中华本草》编委会.中华本草:第四卷[M].上海:上海科学技术出版社,1999:3 233-3 234.
- [2] 江苏新医学院.中药大辞典:下[M].上海:上海科学技术出版社,2001:2 085-2 089.
- [3] 贵州省药品监督管理局.贵州省中药材、民族药材质量标准[M].贵阳:贵州科技出版社,2003:176.
- [4] 裘璐,梁妍,唐贵华,等.茸毛木蓝根的化学成分研究[J].中成药,2013,35(2):320.
- [5] Qiu L, Liang Y, Tang GH, et al. Two new flavonols including one flavan dimer from the roots of *Indigofera stachyodes*[J]. *Phytochemistry Letters*, 2013, 6(3):368.
- [6] Li YY, Li CQ, Xu QT, et al. Antioxidant, α -glucosidase inhibitory activities in vitro and alloxan-induced diabetic rats' protective effect of *Indigofera stachyodes* Lindl. root [J]. *J Med Plants Res*, 2011, 5(14):3 321.
- [7] 裘璐.苗药血人参化学成分及其质量控制研究[D].贵阳:贵阳医学院,2013.
- [8] 罗晓霞.草果与拟草果的性状与显微鉴别[J].中草药, 2014, 37(2):227.
- [9] 胡曙晨,马雪红,李新霞,等.肉桂子药材的薄层鉴别方法研究[J].中药及天然药物,2014,29(2):111.
- [10] 张学兰,徐苹,李慧芬.焦栀子的薄层鉴别与有效成分含量控制方法研究[J].辽宁中医杂志,2011,38(2):335.
- [11] 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.
- [12] 赫军,马秉智,梁莹莹,等.HPLC法测定藤梨根中表儿茶素的含量[J].中国药房,2016,27(3):378.
- [13] 李如标,王梅娟.高效液相色谱法测定复方醋酸地塞米松搽剂中2组分的含量[J].中国新药与临床杂志,2011,30(8):623.

(收稿日期:2016-04-06 修回日期:2016-05-15)

(编辑:张 静)