

苗药透骨香的质量标准研究^Δ

姚成芬^{1,2*}, 张宝^{1,2}, 熊丹丹^{1,2}, 刘亭³, 郑林³, 李月婷³, 陈青凤^{1,2}, 李勇军^{1#}(1.民族药与中药开发应用教育部工程研究中心/国家苗药工程技术研究中心, 贵阳 550004; 2.贵州医科大学药学院, 贵阳 550004; 3.贵州省药物制剂重点实验室, 贵阳 550004)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)33-4711-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.33.28

摘要 目的:建立透骨香药材的质量标准。方法:采用薄层色谱法(TLC)对药材进行定性鉴别;测定药材水分、总灰分和酸不溶性灰分;采用高效液相色谱法测定药材中水杨酸甲酯的含量:色谱柱为Eclipse XDB-C₁₈,流动相为甲醇-水(62:38, V/V),流速为1.0 mL/min,检测波长为307 nm,柱温为30 ℃,进样量为10 μL。结果:药材的TLC图斑点清晰,分离度好。药材水分为8.2%~10.8%,总灰分为0.9%~4.0%,酸不溶性灰分为0.1%~0.9%。水杨酸甲酯检测进样量线性范围为0.045~0.73 μg($r=0.999\ 9$);精密性、稳定性、重复性试验的RSD≤1.0%;水杨酸甲酯加样回收率为97.8%~104.3%(RSD=2.6%, $n=9$)。结论:该研究所建标准可用于透骨香药材的质量控制。

关键词 透骨香;薄层色谱法;高效液相色谱法;质量标准;滇白珠苷A;水杨酸甲酯

Study on Quality Standard of Miao Medicine *Gaultheria yunnanensis*

YAO Chengfen^{1,2}, ZHANG Bao^{1,2}, XIONG Dandan^{1,2}, LIU Ting³, ZHENG Lin³, LI Yueting³, CHEN Qingfeng^{1,2}, LI Yongjun¹(1.Engineering Research Center for the Development and Application of Ethnic Medicines and Traditional Chinese Medicine, Ministry of Education/State Center for Miao Medicine Engineering Technology Research, Guiyang 550004, China; 2.School of Pharmacy, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China; 3.Guizhou Provincial Key Lab of Pharmaceutics, Guiyang 550004, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the quality standard for *Gaultheria yunnanensis*. METHODS: TLC was adopted for qualitative identification of samples. Moisture, total ash and acid-insoluble ash were determined. HPLC method was used to determine the content of methyl salicylate. The determination was performed on Eclipse XDB-C₁₈ column with mobile phase consisted of methanol-water(62:38, V/V) at the flow rate of 1.0 mL/min. The detection wavelength was set at 307 nm, and column temperature was 30 ℃. The sample size was 10 μL. RESULTS: TLC spots of samples were clear and well separated. The moisture was 8.2% -10.8%, total ash was 0.9% -4.0% and acid-insoluble ash was 0.1% -0.9%. The linear range of methyl salicylate were 0.045-0.73 μg ($r=0.999\ 9$). RSDs of precision, stability and reproducibility tests were no more than 1.0%. The recoveries of methyl salicylate were 97.8%-104.3% (RSD=2.6%, $n=9$). CONCLUSIONS: The established standard can be used for quality control of *G. yunnanensis*.

KEYWORDS *Gaultheria yunnanensis*; TLC; HPLC; Quality standard; Gaultheroside A; Methyl salicylate

透骨香为杜鹃花科植物滇白珠 *Gaultheria yunnanensis* (Franch.) Rehd.的干燥全株^[1],为2003年版《贵州省中药材、民族药材质量标准》收载品种^[2],具有清热解毒、活血化淤、祛风湿、顺气平喘的功效,临床主要用于风湿性关节炎、眩晕、闭经、风寒感冒等疾病的治疗^[3-6]。现代药理研究表明,透骨香药材有抗炎、镇痛和抗菌等

^Δ基金项目:贵州省优秀科技人才项目(No.黔科合人字[2015]11);贵州省协同创新中心建设项目(No.黔教合协同创新字[2013]04);贵州省研究生卓越人才计划项目(No.ZYRC2014012);贵州省科技计划项目(No.黔科合平台人才[2016]5613、黔科合平台人才[2016]5677)

* 硕士研究生。研究方向:中药药效物质基础及质量控制。E-mail: 1340642402@qq.com

通信作者:教授,硕士生导师。研究方向:中药药效物质基础及质量控制。E-mail: liyongjun026@126.com

作用^[7-9]。现代化学研究表明,透骨香药材含有黄酮类、木脂素类、挥发油类、萜类、有机酸类、甾体类等化学成分^[10-13]。目前,药材标准中仅有性状和显微鉴别,其质量标准不够完善。本课题组在前期研究的基础上,采用2015年版《中国药典》^[14]中附录及相关方法,采集33批不同产地的透骨香药材,对其进行质量标准研究,为该药材质量标准的提高和修订提供参考。

1 材料

1.1 仪器

LC-10Avp型高效液相色谱(HPLC)仪,包括LC-10ATvp泵、SPD-10Avp紫外检测器、7725i手动进样阀、TC-100柱温箱、WML色谱工作站、UV-2401PC紫外-可见分光光度计(日本Shimadzu公司);TCQ-250型超声波清洗器(北京医疗设备二厂);AE240型电子分析天

平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司];GZX-9420 MBE型电热恒温鼓风干燥箱(上海博讯实业有限公司医疗设备厂)。

1.2 试剂

滇白珠昔A对照品(贵州省药物制剂重点实验室自制,质谱检测确定结构,HPLC测定纯度>98%);水杨酸甲酯对照品(批号:110707-200609,纯度:≥98%)、透骨香对照药材(批号:121292-200402)均购于中国食品药品检定研究院;硅胶G薄层板(青岛海洋化工厂分厂);甲醇为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为纯化水。

1.3 药材

透骨香药材采于贵州省各地(见表1),经贵州医科大学大学生药学教研室龙庆德副教授鉴定为真品。

表1 透骨香药材来源

Tab 1 Source of *G. yunnanensis*

编号	批号	产地	药用部位	编号	批号	产地	药用部位
1	20080506	安顺	茎	18	20090824	铜仁	茎
2	20080502	安顺	茎	19	20100606	安顺	茎
3	20090906	毕节	茎	20	20100314	贵阳	茎
4	20091104	清镇	茎	21	20090305-1	贵阳	茎
5	20091102	龙里	茎	22	20090305-2	贵阳	根
6	20091112	关岭	茎	23	20080405	高坡	根
7	20091101	晴隆	茎	24	20091105	遵义	根
8	20091110	贵定	茎	25	20100713	龙里	根
9	20091203	高坡	茎	26	20101008	毕节	根
10	20080514	高坡	茎	27	20091003-1	六盘水	全株
11	20080608	清镇	茎	28	20091003-2	六盘水	茎
12	20080924	关岭	茎	29	20091003-3	六盘水	根
13	20080925	晴隆	茎	30	20091003-4	六盘水	茎叶
14	20081203	花溪	茎	31	20090918	毕节	茎叶
15	20090406	息烽	茎	32	20081103	开阳	茎叶
16	20090405	安顺	茎	33	20090919	习水	茎叶
17	20090713	龙里	茎				

2 方法与结果

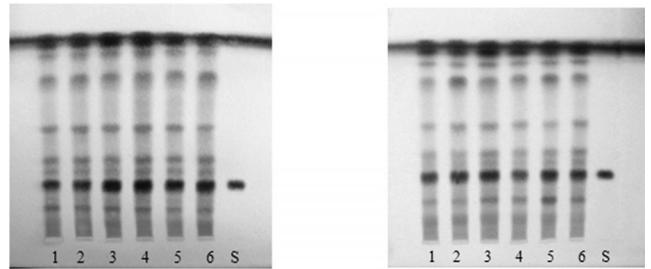
2.1 薄层鉴别

取药材样品粉末(过40目筛)1g,置于量瓶中,加甲醇25 mL,超声(功率:200 W,频率:29 kHz)提取30 min,提取液直接流穿上已处理好的聚酰胺(30~60目,1g)柱,用75 mL乙醇洗脱,收集流穿液与乙醇洗脱液,蒸干,残渣加2 mL甲醇使溶解,滤过,取续滤液作为供试品溶液。另取滇白珠昔A对照品,加甲醇制成滇白珠昔A质量浓度为0.2 mg/mL的对照品溶液。再取对照药材1g,同供试品溶液制备方法制成对照药材溶液。按薄层色谱法[2015年版《中国药典》(四部)]^[14]试验,吸取上述3种溶液各6 μL,分别点于同一硅胶G薄层板上,以乙酸乙酯-甲苯-甲醇-醋酸(9:1:1:0.5, V/V/V/V)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以5%磷钼酸乙醇溶液,在105℃加热至斑点显色清晰,置日光下检视。结果,供试品色谱中,在与对照品和对照药材色谱相应位置上显相同颜色的斑点,详见图1。

2.2 水分检查

按2015年版《中国药典》(四部)水分测定法^[14]测定

药材样品水分。结果表明,33批药材样品水分为8.2%~10.8%(见表2)。拟定透骨香药材水分不得过11.0%。



A.根;B.茎;1~5.供试品;6.对照药材;S.对照品

A.root; B.steam; 1-5.test samples; 6.reference medicinal materials; S.substance control

图1 薄层色谱图

Fig 1 TLC chromatograms

表2 药材样品水分、总灰分、酸不溶性灰分测定结果 (n=3, %)

Tab 2 Content determination of moisture, total ash and acid insoluble ash in samples (n=3, %)

编号	水分	总灰分	酸不溶性灰分	编号	水分	总灰分	酸不溶性灰分
1	8.6	1.0	0.2	18	9.5	1.4	0.6
2	9.1	1.1	0.3	19	8.5	1.9	0.1
3	9.5	1.6	0.4	20	8.6	1.4	0.6
4	9.3	1.0	0.2	21	9.7	1.2	0.1
5	9.4	1.8	0.6	22	10.0	1.9	0.9
6	9.5	1.1	0.2	23	10.0	1.7	0.7
7	9.8	0.9	0.1	24	9.4	1.5	0.4
8	9.3	1.2	0.5	25	9.9	1.2	0.3
9	9.3	1.2	0.3	26	9.7	1.2	0.3
10	8.4	1.2	0.3	27	10.8	4.0	0.3
11	8.6	1.3	0.4	28	10.8	1.4	0.3
12	8.2	1.1	0.2	29	9.8	1.4	0.4
13	8.6	1.0	0.1	30	8.3	1.6	0.7
14	8.5	1.5	0.6	31	9.5	3.2	0.9
15	8.9	1.2	0.3	32	9.3	1.4	0.2
16	8.4	1.9	0.7	33	9.4	3.1	0.1
17	8.6	1.1	0.3	平均值	9.0	1.5	0.4

2.3 总灰分和酸不溶性灰分检查

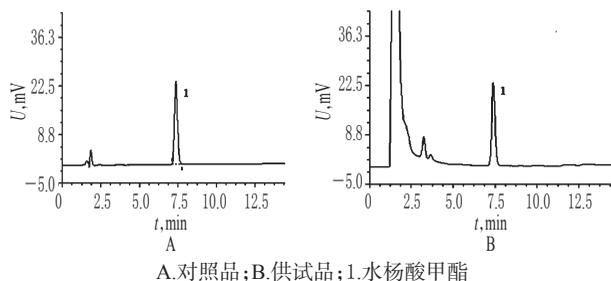
按2015年版《中国药典》(四部)灰分测定法^[14]测定药材样品总灰分和酸不溶性灰分。结果表明,33批药材样品总灰分为0.9%~4.0%,酸不溶性灰分为0.1%~0.9%(见表2)。拟定透骨香药材总灰分不得过4.0%,酸不溶性灰分不得过1.0%。

2.4 含量测定

2.4.1 色谱条件与系统适用性试验 色谱柱:Eclipse XDB-C₁₈(150 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:甲醇-水(62:38, V/V);流速:1.0 mL/min;检测波长:307 nm;柱温:30℃;进样量:10 μL。在上述色谱条件下,理论板数按水杨酸甲酯峰计>4 000;分离度>1.5,各成分基线分离良好,详见图2。

2.4.2 对照品溶液的制备 精密称取水杨酸甲酯对照

品 11.36 mg, 置于 100 mL 量瓶中, 加甲醇定容, 摇匀, 即得。



A. substance control; B. test sample; 1. methyl salicylate

图2 高效液相色谱图

Fig 2 HPLC chromatograms

2.4.3 供试品溶液的制备 精密称取药材样品粉末(过20目筛)约0.6 g, 置于量瓶中, 精密加甲醇50 mL, 密塞, 称定质量, 加热回流2 h, 冷却至室温, 再次称定质量, 用甲醇补足减失的质量, 混匀, 取上清液, 经0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

2.4.4 线性关系考察 分别精密量取“2.4.2”项下对照品溶液0.2、0.4、0.8、1.6、3.2 mL, 分别置于5 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“2.4.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积。以水杨酸甲酯进样量(x, μg)为横坐标, 峰面积(y)为纵坐标进行线性回归, 得水杨酸甲酯回归方程 $y = 2.85 \times 10^4 x - 3.99 \times 10^3$ ($r = 0.9999$)。结果表明, 水杨酸甲酯检测进样量线性范围为0.045~0.73 μg。

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, 水杨酸甲酯峰面积的RSD=0.4% ($n=9$), 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(编号: 1)适量, 分别于室温下放置0、1、2、4、8 h时按“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积。结果, 水杨酸甲酯峰面积的RSD=1.0% ($n=5$), 表明供试品溶液室温放置8 h内基本稳定。

2.4.7 重复性试验 精密称取样品(编号: 1)适量, 按“2.4.3”项下方法制备供试品溶液, 共9份, 再按“2.4.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积并计算含量。结果, 水杨酸甲酯含量平均值为0.92 mg/g, RSD=0.8% ($n=9$), 表明本方法重复性良好。

2.4.8 加样回收率试验 取已知含量药材样品(编号: 1)适量, 共6份, 分别加入低、中、高质量的水杨酸甲酯对照品, 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。

2.4.9 药材样品含量测定 取33批药材样品各适量, 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, 记录峰面积并计算药材样品含量, 结果见表4。

表3 加样回收率试验结果($n=9$)

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

取样量, 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, %
0.302 4	0.279 4	0.137 9	0.423 3	104.3		
0.306 1	0.282 8	0.137 9	0.418 1	98.1		
0.301 5	0.278 6	0.137 9	0.421 7	103.8		
0.298 8	0.276 1	0.275 8	0.550 8	99.6		
0.306 3	0.283 0	0.275 8	0.562 4	101.3	101.1	2.6
0.304 6	0.281 5	0.275 8	0.553 6	98.7		
0.303 2	0.280 2	0.413 7	0.705 2	102.7		
0.300 8	0.277 9	0.413 7	0.682 6	97.8		
0.303 2	0.280 2	0.413 7	0.710 2	104.0		

表4 药材样品含量测定结果($n=3$, %)

Tab 4 Results of content determination of samples ($n=3$, %)

编号	含量	编号	含量	编号	含量	编号	含量
1	0.299 9	10	0.099 1	19	0.092 4	28	0.182 9
2	0.258 1	11	0.101 3	20	0.267 1	29	0.251 4
3	0.274 0	12	0.223 3	21	0.251 8	30	0.084 8
4	0.246 2	13	0.242 7	22	0.360 4	31	0.142 5
5	0.367 2	14	0.250 5	23	0.389 9	32	0.175 3
6	0.459 1	15	0.135 5	24	0.335 9	33	0.109 5
7	0.410 2	16	0.137 1	25	0.212 4	平均值	0.229 1
8	0.292 6	17	0.233 1	26	0.168 0		
9	0.135 4	18	0.209 1	27	0.162 2		

3 讨论

2003年版《贵州省中药材、民族药材质量标准》中透骨香药材使用部位为全株, 透骨香药材主要用于治疗风湿性关节炎。研究表明, 滇白珠苷A具有抗关节炎的药理活性^[15], 该药理活性符合透骨香药材的主治功能, 即滇白珠苷A为透骨香药材的有效成分。因此, 本研究将滇白珠苷A作为药材样品的TLC定性鉴别研究的对照品, 建立透骨香药材TLC的定性鉴别。通过TLC鉴别结果可知, 透骨香药材起作用的部位可能为根和茎, 叶是否有药效有待进一步研究。

文献报道, 透骨香药材挥发油成分主要为水杨酸甲酯, 其测定方法多用气相色谱法^[16], 少数用TLC法和荧光分析法^[17]。TLC法分离度低, 操作复杂; 荧光法前处理较烦琐。本研究采用HPLC法测定水杨酸甲酯的含量, 优点在于处理简单, 操作简单, 重复性好。

综上所述, 本研究所建标准可用于透骨香药材的质量控制。

参考文献

- [1] 何顺志, 徐文芬. 贵州中草药资源研究[M]. 贵阳: 贵州科技出版社, 2007: 510-511.
- [2] 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: 308-309.
- [3] 江苏新医学院. 中药大辞典: 上[M]. 上海: 上海人民出版社, 2001: 1879-1880.
- [4] 陈娟, 孟祥武, 张朝贵, 等. 滇白珠糖浆对老年眩晕及脑血流的影响[J]. 中国老年学杂志, 2016, 36(9): 2156-2158.
- [5] 熊玉兰, 肖冰, 马小军, 等. 滇白珠抗风湿性关节炎活性成

火把花根片中间体的HPLC指纹图谱研究^Δ

郑丁丁^{1,2*}, 张小梅¹, 杨怡², 陈一龙¹, 励娜¹, 姚媛媛¹, 杨大坚^{1#} (1.重庆市中药研究院, 重庆 400065; 2.西南大学药学院, 重庆 400715)

中图分类号 R284 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)33-4714-04
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.33.29

摘要 目的:建立火把花根片中间体的高效液相色谱(HPLC)指纹图谱。方法:采用HPLC法。色谱柱为用Inertsil ODS-4,流动相为乙腈-0.1%磷酸溶液(梯度洗脱),流速为0.75 mL/min,检测波长为220 nm,柱温为30 ℃,进样量为10 μL。以雷公藤晋碱为参照,测定10批样品的HPLC图谱,采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2004 A版)进行共有峰指认和相似度评价。结果:10批火把花根片中间体的HPLC图谱有25个共有峰,相似度均>0.90。经验证,10批样品HPLC图谱与对照指纹图谱具有较好的一致性。结论:该研究所建指纹图谱可为火把花根片中间体的鉴别和质量评价提供参考。

关键词 火把花根片;中间体;高效液相色谱法;指纹图谱

Study on HPLC Fingerprints of Huobahuagen Tablets Intermediate

ZHENG Dingding^{1,2}, ZHANG Xiaomei¹, YANG Yi², CHEN Yilong¹, LI Na¹, YAO Yuanyuan¹, YANG Dajian¹ (1. Chongqing Academy of Traditional Chinese Medicine, Chongqing 400065, China; 2. College of Pharmacy, Southwest University, Chongqing 400715, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the HPLC fingerprints for Huobahuagen tablets intermediate. METHODS: HPLC was performed on Inertsil ODS-4 column with mobile phase consisted of acetonitrile-0.1% phosphoric acid (gradient elution) at the flow rate of 0.75 mL/min. The detection wavelength was set at 220 nm, and column temperature was 30 ℃. The sample size was 10 μL. Using wilforgine as reference, HPLC chromatograms of 10 batches of samples were determined. Common peak identification and similarity evaluation were performed by using *Similarity Evaluation System for TCM Chromatographic Fingerprint* (2004 A edition). RESULTS: There were 25 common peaks in HPLC chromatograms of 10 batches of samples, and similarity degrees were higher than 0.9. After validated, HPLC chromatograms of 10 batches of samples were in good agreement with control fingerprints. CONCLUSIONS: The established fingerprint can provide reference for identification and quality evaluation of Huobahuagen tablets intermediate.

KEYWORDS Huobahuagen tablets; Intermediate; HPLC; Fingerprint

- 分研究[J].中国中药杂志,2009,34(19):2516-2518.
- [6] 李东宸,折改梅,万钦黎.民族药:抗风湿滇白珠的研究进展[C]//2010施惠达杯第十届全国青年药理学工作者最新科研成果交流会论文集,2010:38-47.
- [7] 肖朝江,徐伟,刘子琦,等.滇西地区25种药用植物抗疟活性研究[J].中国病原生物学杂志,2014,9(6):542-544.
- [8] 李东宸,郭志琴,吕海宁,等.民族药滇白珠的体外抗氧化活性研究[J].中医药学报,2010,38(6):62-66.
- [9] 程燕,缪剑华,马丽焱,等.白珠树属植物化学成分及药理活性研究进展[J].时珍国医国药,2009,20(2):399-400.
- [10] 徐晏.苗药透骨香的研究概况[J].医学信息,2013,26(4):677-678.
- [11] 张永峰,曾常茜,黄雯,等.透骨草化学成分和药理学作用研究进展[J].中华中医药学刊,2010,28(9):1960-1962.
- [12] 扶教龙,谭昌恒,谭俊杰,等.云南透骨草的化学成分研究[J].天然产物研究与开发,2012,24(1):8-11.
- [13] 雷银瓶,徐冠玲,谢梦,等.紫外分光光度法测定滇白珠中的总酚酸[J].华西药学杂志,2015,30(1):124-125.
- [14] 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,2015:57,103,204.
- [15] 陈应康,余福强,刘大腾,等.苗药透骨香抗急性痛风性关节炎作用的实验研究[J].中药材,2016,39(9):2118-2121.
- [16] 蒋忠军,陈新国,张莉,等.GC法同时测定跌打万花油中4种成分的含量[J].中国药房,2013,24(48):4588-4590.
- [17] 周晓霞,魏永巨.荧光分析法测定中药透骨香中水杨酸甲酯的含量[J].河北师范大学学报,2013,37(1):82-84.

Δ 基金项目:重庆市应用开发计划项目(No.cstc2014yykfC10005)
* 硕士研究生。研究方向:中药学。E-mail:1563472460@qq.com
通信作者:研究员,博士。研究方向:中药品种及品质。电话:023-89029081。E-mail:yangdajian@foxmail.com

(收稿日期:2017-03-07 修回日期:2017-04-16)

(编辑:张静)