

# 山紫菀药材的质量标准研究<sup>△</sup>

曲艳丽<sup>1\*</sup>, 刘治民<sup>1</sup>, 孙 冶<sup>1</sup>, 刘雨过<sup>2</sup>, 杨建龙<sup>1</sup>(1. 长春市食品药品检验中心, 长春 130012; 2. 长春市食品药品认证中心, 长春 130012)

中图分类号 R28 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)08-1057-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.08.11

**摘要** 目的: 建立山紫菀药材的质量标准。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、浸出物的含量; 采用高效液相色谱法测定药材样品中阿魏酸的含量, 色谱柱为 Waters SunFire C<sub>18</sub>, 流动相为乙腈-0.1% 磷酸溶液(13:87, V/V), 流速为 1.0 mL/min, 检测波长为 319 nm, 柱温为 30 ℃, 进样量为 10 μL。结果: 山紫菀的 TLC 图斑点清晰, 分离度好, 阴性对照无干扰。药材样品水分为 7.6%~9.4%, 总灰分为 11.7%~19.6%, 酸不溶性灰分为 5.9%~14.1%, 浸出物为 25.4%~37.5%。阿魏酸检测进样量线性范围为 0.021 2~0.636 8 μg( $r=0.999\ 9$ ); 定量限为 2.25 ng, 检测限为 0.75 ng; 中间精密性、重复性、稳定性试验的 RSD 均小于 3.0%; 加样回收率为 97.81%~100.59% (RSD=1.02%,  $n=9$ )。结论: 初步拟定山紫菀药材水分不得过 10.0%, 总灰分不得过 19.0%, 酸不溶性成分不得过 12.0%, 浸出物不得少于 25.0%, 阿魏酸含量不得少于 0.1%; 所建标准可为山紫菀药材的质量控制提供参考。

**关键词** 山紫菀; 质量标准; 阿魏酸; 水分; 灰分; 浸出物; 薄层色谱法; 高效液相色谱法

## Study on Quality Standard of *Ligularia fischeri*

QU Yanli<sup>1</sup>, LIU Zhimin<sup>1</sup>, SUN Ye<sup>1</sup>, LIU Yugu<sup>2</sup>, YANG Jianlong<sup>1</sup> (1. Changchun Center for Food and Drug Control, Changchun 130012, China; 2. Changchun Center for Food and Drug Certification, Changchun 130012, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To establish the quality standard of *Ligularia fischeri*. METHODS: TLC was used for qualitative identification of samples. The contents of moisture, ash and extract were determined. The content of ferulic acid in samples was determined by HPLC. The determination was performed on Waters SunFire C<sub>18</sub> column with mobile phase consisted of acetonitrile-0.1% phosphoric acid (13:87, V/V) at the flow rate of 1.0 mL/min. The detection wavelength was set at 319 nm, and column temperature was 30 ℃. The sample size was 10 μL. RESULTS: TLC spots were clear and well-separated without interference from genitive control. The moisture, total ash, acid-insoluble ash and extract of samples were 7.6% -9.4%, 11.7% -19.6%, 5.9% -14.1% and 25.4% -37.5%, respectively. The linear range of ferulic acid were 0.021 2-0.636 8 μg ( $r=0.999\ 9$ ). limited of quantation was 2.25 ng, the limited of detection was 0.75 ng. RSDs of intermediate precision, reproducibility and stability tests were all lower than 3.0%. The recoveries ranged 97.81% -100.59% (RSD=1.02%,  $n=9$ ). CONCLUSIONS: The moisture, total ash and acid-insoluble ash of samples are no more than 10.0%, 19.0%, 12.0%; the extract and the content of ferulic acid are no less than 25.0% and 0.1%. Established standard can provide reference for quality control of *L. fischeri*.

**KEYWORDS** *Ligularia fischeri*; Quality standard; Ferulic acid; Moisture; Ash; Extract; TLC; HPLC

山紫菀为地方习用药材, 始载于宋代苏颂所著的《图经本草》, 具有“温肺下气, 消痰止嗽”的功效, 可用于风寒咳嗽气喘、虚劳咳吐脓血的治疗, 现代药理研究表明, 其具有抗炎作用<sup>[1]</sup>。山紫菀主要分布于我国四川省、湖北省、贵州省和东北地区等, 其基源也不统一。东北地区习用的山紫菀来源为菊科植物蹄叶橐吾 [*Ligularia fischeri* (Ledeb.) Turcz.] 的干燥根及根茎, 多生于林下或林缘阴湿草地<sup>[2]</sup>。吉林省内蹄叶橐吾分布广泛, 资源丰富, 延边地区民众常将其嫩叶“马蹄叶”作为山野菜食用。但 1997 年版《吉林省药品标准》及 2009 年版《辽宁

省中药材标准》(第一册) 中收载“山紫菀”检验项目较少, 且没有含量测定项, 无法有效地控制山紫菀药材的质量。已有报道多集中于研究山紫菀药材的性状特征和显微鉴别<sup>[3-4]</sup>, 而对其薄层色谱鉴别、水分、灰分、浸出物和含量测定等项未作研究。笔者采集 10 批山紫菀药材, 对其薄层色谱、水分、总灰分、酸不溶性灰分、浸出物、含量测定等项目进行了系统研究, 制定了以山紫菀对照药材为对照的薄层色谱鉴别和以阿魏酸为对照品的含量测定方法, 旨在为山紫菀药材质量控制和评价标准的建立提供参考。

## 1 材料

### 1.1 仪器

1260 型高效液相色谱(HPLC)仪, 包括二极管阵列

<sup>△</sup> 基金项目: 吉林省地方标准项目(No.DBXM111-2016)

\* 副主任药师。研究方向: 中药材和中成药的检验与质量标准控制。E-mail: 191017253@qq.com

检测器(美国 Agilent 公司);HP1100 型 HPLC 仪,包括紫外检测器(美国 HP 公司);2010C 型 HPLC 仪,包括紫外检测器(日本 Shimadzu 公司);TU-1900 型紫外分光光度计(北京普析通用仪器有限公司);GR-202 型电子分析天平(日本 AD 公司);KQ-500VDE 型双频数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);SX2-4-10 型高温箱型电炉(上海博迅实业有限公司);101-1A 型电热鼓风干燥箱、DK-98-II 型电热恒温水浴锅(天津市泰斯特仪器有限公司)。

## 1.2 试剂

阿魏酸对照品(中国食品药品检定研究院,批号:110773-201614,纯度:99.0%);硅胶 G 薄层板(青岛海洋化工厂分厂);乙腈、甲醇为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为纯化水。

## 1.3 药材

10 批山紫菀药材采自吉林省珲春、图们、汪清等地(见表 1),经长春中医药大学张景龙教授和通化师范学院于俊林教授鉴定为真品(以编号 1 为对照药材)。

表 1 山紫菀药材来源

Tab 1 Sources of *L. fischeri*

编号	采集地点	采集时间
1	珲春雪岱山村木耳场	2016年8月
2	图们市凉水镇东山村	2016年8月
3	图们市林场沟	2016年8月
4	珲春哈达门乡马滴达南别里	2016年8月
5	珲春敬信四道沟二夹山	2016年9月
6	图们市凉水镇石头河子大黄山	2016年9月
7	珲春春化乡草帽山	2016年9月
8	汪清县复兴镇满营沟	2016年9月
9	汪清县大平岗	2016年7月
10	汪清县复兴镇草堂子	2016年8月

## 2 方法与结果

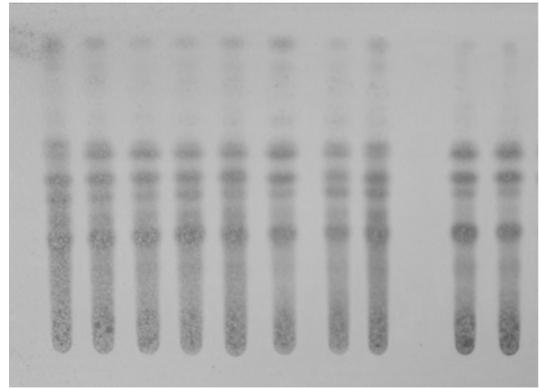
### 2.1 定性鉴别

取药材样品 1 g,粉碎,加稀乙醇(529→1 000,下同) 50 mL,浸泡 12 h 后回流提取 30 min,滤过,滤液蒸干,残渣加乙醇 2 mL 使溶解,即得供试品溶液。取山紫菀对照药材 1 g,按上述供试品溶液制备方法制成对照药材溶液。量取稀乙醇 50 mL,放置 12 h 后加热回流 30 min,滤过,滤液蒸干,残渣加乙醇 2 mL 使溶解,即得阴性对照溶液。按 2015 年版《中国药典》(四部)TLC 法<sup>[9]</sup>试验,吸取上述 3 种溶液各 5 μL,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以甲苯-乙酸乙酯-甲酸(5:2:1, V/V/V)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以 1% 三氯化铁溶液-1% 铁氰化钾溶液(1:1, V/V)(临用新配),放置 15 min 后置日光下检视。结果,供试品色谱中,在与对照药材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 1。

### 2.2 水分、灰分、浸出物检测

2.2.1 水分 取各批次药材样品粉末适量,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)<sup>[6]</sup>测定药材样品水分,每批平行测

定 3 份,详见表 2。结果表明,药材样品水分为 7.6%~9.4%,平均值为 8.6%。初步拟定山紫菀药材水分不得过 10.0%。



注:S.对照药材;1~7,9~10.供试品;8.阴性对照

Note: S. reference substance; 1-7, 9-10. test samples; 8. negative control

图 1 薄层色谱图

Fig 1 TLC chromatograms

表 2 水分、灰分、浸出物、阿魏酸含量测定结果(n=3, %)

Tab 2 Results of content determination of moisture, ash, extract and ferulic acid(n=3, %)

批号	水分	总灰分	酸不溶性灰分	浸出物	阿魏酸
1	8.6	12.8	5.9	37.5	0.20
2	9.4	14.2	7.4	34.1	0.30
3	8.1	11.7	7.1	36.7	0.27
4	8.2	16.6	10.3	32.1	0.15
5	9.0	17.9	11.4	29.6	0.12
6	7.6	18.1	11.5	29.4	0.10
7	8.6	19.6	14.1	26.7	0.08
8	8.5	15.8	10.2	27.1	0.14
9	9.0	16.1	11.3	26.5	0.14
10	9.1	18.5	13.4	25.4	0.10
平均值	8.6	16.1	10.3	30.5	0.15

2.2.2 总灰分 取各批次药材样品粉末适量,精密称定,按照 2015 年版《中国药典》(四部)“通则 2302 总灰分测定法”<sup>[6]</sup>测定药材样品总灰分,每批平行测定 3 份,详见表 2。结果表明,药材样品总灰分为 11.7%~19.6%,平均值为 16.1%。初步拟定山紫菀药材总灰分不得过 19.0%。

2.2.3 酸不溶性灰分 取各批次药材样品粉末适量,精密称定,按照 2015 年版《中国药典》(四部)“通则 2302 酸不溶性灰分测定法”<sup>[6]</sup>测定药材样品酸不溶性灰分,每批平行测定 3 份,详见表 2。结果表明,药材样品酸不溶性灰分为 5.9%~14.1%,平均值为 10.3%。初步拟定山紫菀药材酸不溶性灰分不得过 12.0%。

2.2.4 浸出物 取各批次药材样品粉末适量,精密称定,按照 2015 年版《中国药典》(四部)“通则 2201 醇溶性浸出物测定法热浸法”<sup>[6]</sup>,以 25% 乙醇溶液为溶剂测定药材样品醇溶性浸出物,每批平行测定 3 份,详见表 2。结果表明,药材样品醇溶性浸出物为 25.4%~37.5%,平均

值为30.5%。初步拟定山紫菀药材醇溶性浸出物不少于25.0%。

### 2.3 含量测定

2.3.1 色谱条件 色谱柱: Waters SunFire C<sub>18</sub> (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-0.1%磷酸溶液(13:87, V/V); 流速: 1.0 mL/min; 检测波长: 319 nm; 柱温: 30 ℃; 进样量: 10 μL<sup>[6-7]</sup>。

2.3.2 对照品溶液的制备 精密称取阿魏酸对照品适量, 加70%甲醇溶液制成质量浓度为21.2 μg/mL的对照品溶液。

2.3.3 供试品溶液的制备 取药材样品粉末(过3号筛)约0.25 g, 置于具塞锥形瓶中, 精密加入含0.5%氢氧化钠溶液的70%甲醇溶液25 mL, 密塞, 称定质量, 超声(功率: 300 W, 频率: 45 kHz)处理30 min后80 ℃加热回流2 h, 用含0.5%氢氧化钠溶液的70%甲醇溶液补足缺失的质量, 滤过; 精密吸取续滤液5 mL, 置于10 mL棕色量瓶中, 精密加入0.1 mol/L盐酸溶液4 mL, 摇匀, 加70%甲醇溶液定容, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.3.4 阴性对照溶液的制备 缺药材样品, 按“2.3.3”项下方法制备阴性对照溶液。

2.3.5 系统适用性试验 取上述对照品溶液、供试品溶液各适量, 按“2.3.1”项下色谱条件进样测定, 记录色谱, 详见图2。结果, 理论板数按阿魏酸峰计应不低于3 000; 分离度>1.5, 基线分离良好。

2.3.6 专属性试验 取上述对照品溶液、阴性对照溶液各适量, 按“2.3.1”项下色谱条件进样测定, 记录色谱图, 详见图2。结果表明, 阴性对照溶液在与阿魏酸对照品保留时间相同处无色谱峰干扰, 说明专属性良好。

2.3.7 线性关系考察 分别精密量取“2.3.2”项下对照品溶液1、2、5、10、20、30 μL, 按“2.3.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积。以阿魏酸进样量( $x, \mu\text{g}$ )为横坐标、峰面积( $y$ )为纵坐标进行线性回归, 得回归方程 $y=5\ 651.2x+4.550\ 4$  ( $r=0.999\ 9$ )。结果表明, 阿魏酸检测进样量线性范围为0.021 2~0.636 8 μg。

2.3.8 定量限与检测限考察 分别精密量取“2.3.2”项下对照品溶液适量, 倍比稀释, 并按“2.3.1”项下色谱条件进样测定, 当信噪比为10:1时, 得定量限为2.25 ng; 当信噪比为3:1时, 得检测限为0.75 ng。

2.3.9 中间精密度试验 取同一批药材样品(批号: 3)适量, 由3个不同操作人员, 使用3台不同型号的HPLC仪(Agilent1260、HP1100、Shimadzu 2010C), 分别在不同日期按“2.3.3”项下方法制备供试品溶液, 共6份, 再按“2.3.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积并计算样品含量。结果, 阿魏酸含量平均值分别为0.195%、0.198%、0.193%, 总平均值为0.20%, RSD为1.29%, 说明中间精密度良好。

2.3.10 稳定性试验 取“2.3.3”项下供试品溶液(编号: 3)适量, 分别于室温下放置0、4、8、12、24 h时按“2.3.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积。结果, 阿魏酸峰面积的RSD为1.90% ( $n=5$ ), 表明供试品溶液室温放置24 h内基本稳定。

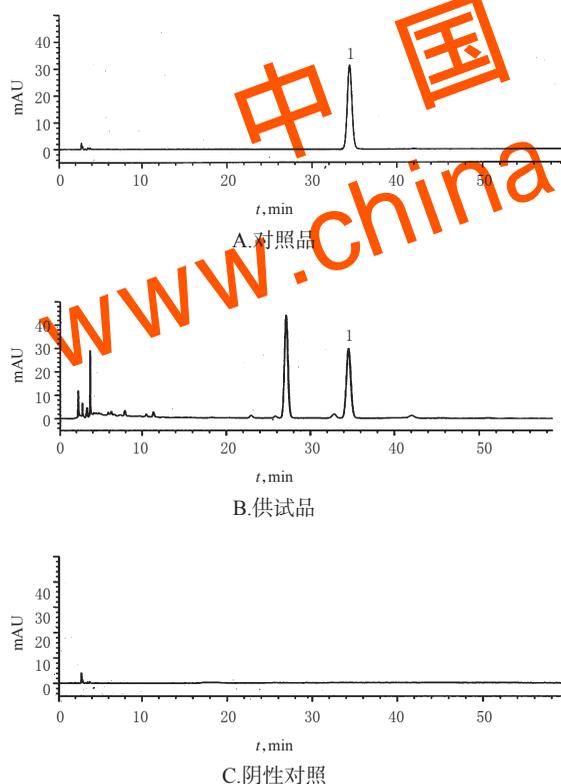
2.3.11 重复性试验 精密称取药材样品(编号: 3)适量, 按“2.3.3”项下方法制备供试品溶液, 共6份, 再按“2.3.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积并计算样品含量。结果, 阿魏酸含量平均值为0.20%, RSD为2.12% ( $n=6$ ), 表明本方法重复性良好。

2.3.12 加样回收率试验 取已知含量的样品(编号: 3)适量, 共9份, 分别加入低、中、高质量浓度的阿魏酸对照品溶液, 按“2.3.3”项下方法制备供试品溶液, 再按“2.3.1”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( $n=9$ )

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, %
0.124 4	0.248 8	0.128 0	0.374 0	97.81		
0.123 6	0.247 2	0.128 0	0.373 2	98.44		
0.131 4	0.262 8	0.128 0	0.388 5	98.20		
0.125 1	0.250 2	0.256 0	0.507 5	100.51		
0.128 2	0.256 4	0.256 0	0.509 0	98.67	99.23	1.02
0.127 0	0.254 0	0.256 0	0.511 5	100.59		
0.123 5	0.247 0	0.384 0	0.630 6	99.90		
0.127 0	0.254 0	0.384 0	0.636 4	99.58		
0.130 2	0.260 4	0.384 0	0.642 0	99.38		



注: 1. 阿魏酸

Note: 1. ferulic acid

图2 高效液相色谱图

Fig 2 HPLC chromatograms

2.3.13 耐用性试验 (1)色谱柱考察。取药材样品(编号:1)适量,按“2.3.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.3.1”项下色谱条件[色谱柱分别为Agilent TC-C<sub>18</sub>(250 mm×4.6 mm, 5 μm)、SunFire (250 mm×4.6 mm, 5 μm)、Shimadzu Shim-pack vp-ods(250 mm×4.6 mm, 5 μm)]进样测定,记录峰面积并计算样品含量。结果,阿魏酸含量分别为0.206%、0.196%、0.201%,平均值为0.201%,RSD为2.49%,表明本色谱条件在一定色谱柱变动情况下耐用。(2)流动相考察。取药材样品(编号:8)适量,按“2.3.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.3.1”项下色谱条件[流动相分别为乙腈-0.1%磷酸溶液(13:87, V/V)、乙腈-0.1%磷酸溶液(12:88, V/V)、乙腈-0.1%磷酸溶液(11:89, V/V)]进样测定,记录峰面积并计算样品含量。结果,阿魏酸含量分别为0.133%、0.138%、0.137%,平均值为0.136%,RSD为1.95%,表明本色谱条件在一定流动相变动情况下耐用。(3)流速考察。取药材样品(编号:4)适量,按“2.3.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.3.1”项下色谱条件(流速分别为0.8、1.0、1.2 mL/min)进样测定,记录峰面积并计算样品含量。结果,阿魏酸含量分别为0.149%、0.145%、0.147%,平均值为0.147%,RSD为1.37%,表明本色谱条件在一定流速变动情况下耐用。(4)柱温考察。取药材样品(编号:4)适量,再按“2.3.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.3.1”项下色谱条件(柱温分别为30、35、40 ℃)进样测定,记录峰面积并计算样品含量。结果,阿魏酸含量分别为0.135%、0.139%、0.132%,平均值为0.135%,RSD为2.60%,表明本色谱条件在一定柱温变动情况下耐用。(5)进样体积考察。取药材样品(编号:3)适量,按“2.3.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.3.1”项下色谱条件(进样体积分别为5、10、20 μL)进样测定,记录峰面积并计算样品含量。结果,阿魏酸含量分别为0.148%、0.148%、0.149%,平均值为0.148%,RSD为0.39%,表明本色谱条件在一定进样体积变动情况下耐用。

2.3.14 样品含量测定 取10批药材样品各适量,分别按“2.3.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.3.1”项下色谱条件进样测定,平行测定3次,记录峰面积并计算药材样品含量,结果见表2。结果表明,阿魏酸含量为0.08%~0.27%,差异较大。考虑药材样品产地不同,生长年限不同,参考10批药材样品含量测定结果,建议山紫菀药材含阿魏酸(按干燥品计)不得少于0.1%。

### 3 讨论

薄层鉴别预试验中,笔者分别考察了甲苯-乙酸乙酯-甲酸(5:2:1, V/V/V)、乙醚-三氯甲烷-甲酸(1:5:0.1, V/V/V)、甲苯-甲醇-冰醋酸(30:3:1, V/V/V)、环己烷-二氯甲烷-乙酸乙酯-甲酸(4:1:1:0.1, V/V/V/V)<sup>[8-10]</sup>对展开结果的影响。结果表明,展开系统为甲苯-乙酸乙酯-甲酸(5:2:1, V/V/V)时,薄层斑点数量较多且清晰,比移值

适中,分离度较好。

预试验中,笔者按照2015年版《中国药典》(四部)“通则2201醇溶性浸出物测定法”,分别考察了以水为溶剂的热浸法、冷浸法对结果的影响,同时也考察了不同体积分数乙醇溶液(25%、50%、75%、95%)、甲醇溶液(25%、50%、75%、100%)为溶剂时对结果的影响。结果表明,以25%乙醇溶液为溶剂时,热浸提取所得到的浸出物含量最高。

阿魏酸在植物中是以游离态及结合态两种形式存在,甲醇回流提取30 min测得的游离态阿魏酸含量为0.007%,无太大意义;而结合态的阿魏酸在酸性、碱性、中性条件下均可水解生成阿魏酸,即使水浴加热都可能不同程度水解生成阿魏酸。阿魏酸有顺式和反式两种结构,在植物中二者共存,以反式为主,二者可以相互转化;反式阿魏酸较稳定,市场上提供的阿魏酸对照品均为反式阿魏酸,因此,本试验中测定的是反式结合态阿魏酸。阿魏酸在溶液酸碱度趋于中性时相对稳定,因此,笔者以含0.5%氢氧化钠溶液的70%甲醇溶液提取后,溶液pH值为14,稳定性较差,经盐酸调节pH值至6~7,阿魏酸在此环境下相对稳定。

综上所述,本研究所建标准可为山紫菀药材的质量控制提供参考。

### 参考文献

- [1] 程晷,韩伟佳,王玉,等.蹄叶囊吾醇化乙酸乙酯萃取物JNK通路抗炎机制研究[J].中国实验方剂学杂志,2014,20(12):183-184.
- [2] 赵国禹,董然,王守海,等.长白山3种囊吾光适应性的初步研究[J].北方园艺,2011(5):4-8.
- [3] 张勉,赵显国,王崢涛,等.山紫菀类药材的性状和显微鉴别:一[J].中国药科大学学报,1997,28(1):11-16.
- [4] 张勉,徐络珊,王崢涛,等.山紫菀类药材的性状和显微鉴别:V[J].中草药,1999,30(4):299-301.
- [5] 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.
- [6] 林丽,晋玲,李应东,等.当归干、鲜品中游离阿魏酸和总阿魏酸含量[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(22):94-97.
- [7] 李俊平,王彩芳,刘婷,等.河南蹄叶囊吾根的化学成分研究[J].天然产物研究与开发,2011,23(6):1014-1016.
- [8] 牛倩倩,陈梦钰,焦海胜.健肾II号胶囊质量标准研究[J].中华中医药学刊,2016,34(7):1781-1783.
- [9] 吕光华,程世琼,陈金泉,等.HPLC测定川芎药材和饮片中游离阿魏酸和总阿魏酸的含量及其质量评价指标[J].中国中药杂志,2010,35(2):194-197.
- [10] 张海波,高羽,梁侨丽,等.HPLC测定中药三棱中游离阿魏酸和总阿魏酸含量[J].南京中医药大学学报,2011,27(3):169-171.

(收稿日期:2017-10-11 修回日期:2017-11-13)

(编辑:张 静)