

藏药秦艽花的质量标准提升研究[△]

钟 镛^{1,2*}, 罗世英^{2,3}, 张 静^{1,2#}, 张 艺^{1,2}(1.成都中医药大学民族医药学院,成都 611137;2.成都中医药大学民族医药学术传承创新研究中心,成都 611137;3.成都中医药大学药学院,成都 611137)

中图分类号 R282;R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2022)01-0026-06
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2022.01.05



摘要 目的 提升藏药秦艽花的质量标准,为全面评价其质量提供科学依据。方法 采用显微及薄层色谱(TLC)法对16批不同产地、不同基原的秦艽花药材进行定性分析;参照2020年版《中国药典》(四部)通则中相应方法,分别进行水分、总灰分、酸不溶性灰分、醇溶性浸出物含量的测定;建立高效液相色谱(HPLC)法,同时测定秦艽花中5种成分(马钱苷酸、獐牙菜苦苷、龙胆苦苷、獐牙菜苷、异莛草苷)的含量。结果 秦艽花药材粉末呈浅棕黄色;粉末显微特征清晰,可见花粉粒、导管、非腺毛、花冠表皮细胞和花萼表皮细胞等。TLC鉴别结果显示,在供试品色谱图中,与对照品(异莛草苷)色谱相应位置上显相同颜色的荧光斑点。16批药材的水分、总灰分、酸不溶性灰分、醇溶性浸出物的含量分别为5.40%~8.87%、3.76%~6.40%、0.27%~0.58%、26.81%~42.51%。含量测定方法学考察结果均符合药典要求;16批秦艽花样品中马钱苷酸、獐牙菜苦苷、龙胆苦苷、獐牙菜苷、异莛草苷的含量分别为3.13~9.36、1.26~22.39、13.80~74.60、1.24~12.22、2.58~14.96 mg/g。结论 本研究在秦艽花已有质量标准的基础上增加了显微鉴别、TLC鉴别、含量测定以及水分、总灰分、酸不溶性灰分和醇溶性浸出物等检查项,并初步拟定秦艽花中水分不得过9.0%、总灰分不得过6.5%、酸不溶性灰分不得过0.6%、醇溶性浸出物不得少于26.0%、龙胆苦苷的含量不得低于13.8 mg/g。
关键词 秦艽花;质量标准;显微鉴别;薄层色谱法;高效液相色谱法;含量测定

Study on the improvement of quality standard for Tibetan medicine Qinjiaohua

ZHONG Lu^{1,2}, LUO Shiyong^{2,3}, ZHANG Jing^{1,2}, ZHANG Yi^{1,2}(1. School of Ethnic Medicine, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China; 2. Academic Inheritance and Innovation Research Center of Ethnic Medicine, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China; 3. College of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To improve the quality standard of Tibetan medicine of Qinjiaohua, and to provide scientific basis for comprehensive quality evaluation. **METHODS** The qualitative analysis of 16 batches of Qinjiaohua with different producing areas and different origins was carried out by microscopic and TLC identification. According to the method stated in 2020 edition of *Chinese Pharmacopoeia*, water content, total ash content, acid-insoluble ash content and alcohol-soluble extract content were determined. HPLC method was used to determine the contents of 5 components (loganin, swertiamarin, gentiopicrosin, swertonolol, isoorientin) in Qinjiaohua. **RESULTS** The medicinal powder of Qinjiaohua was light brown-yellow, and the microscopic features of the powder were clear, and pollen grains, ducts, non-glandular hairs, corolla epidermal cells and calyx epidermal cells were all found. The results of TLC identification showed that there were fluorescent spots of the same color in the chromatogram of the tested product and the corresponding position of substance control (isoorientin). The content ranges of water content, total ash content, acid-insoluble ash content and alcohol-soluble extract were 5.40%-8.87%, 3.76%-6.40%, 0.27%-0.58%, 26.81%-42.51%, respectively. The results of content determination methodology met the requirements of pharmacopoeia; the content ranges of loganin, swertiamarin, gentiopicrosin, swertonolol and isoorientin in 16 batches of Qinjiaohua were 3.13-9.36, 1.26-22.39, 13.80-74.60, 1.24-12.22, 2.58-14.96 mg/g, respectively. **CONCLUSIONS** On the basis of the original quality standard of Qinjiaohua, microscopic identification, TLC identification, content determination and examination items of water, total ash, acid-insoluble ash and alcohol-soluble extract are added. It is preliminarily proposed that water content, total ash content and acid-insoluble ash content should not exceed 9.0%, 6.5% and 0.6%, while the contents of ethanol-soluble extract and gentiopicrosin should not be less than 26.0% and 13.8 mg/g, respectively.

KEYWORDS Qinjiaohua; quality standard; microscopic identification; TLC; HPLC; content determination

△ 基金项目:国家重点研发计划项目(No.2019YFC1712302)

* 硕士研究生。研究方向:民族药药效物质基础。E-mail: 1984899716@qq.com

通信作者:教授,硕士生导师。研究方向:中药及民族药药效物质基础。电话:028-87714869。E-mail: zhangjingtcm@cducm.edu.cn

秦艽花为我国藏族地区常用的民族药,藏语为“ཞེལ”,音译为“吉解”。秦艽花来源于龙胆科 Gentianaceae 龙胆属 *Gentiana* 数种植物的干燥花枝,于夏、秋二季花将开放时采收,除去杂质,阴干后入药,主要分布于西藏、青海、宁夏、四川甘孜等地^[1]。在藏族临床应用上,秦

芫花常用来治疗四肢肿胀、腑热胆热等症^[2]。研究发现,秦芫花主要含有环烯醚萜苷和黄酮类、三萜类成分,具有抗炎镇痛、抗氧化、润肠通便和抑制乙酰胆碱酯酶活性的作用^[3]。本课题组前期对各大藏医院、药材市场及藏药厂等进行实地调研发现,秦芫花的主流品种主要为麻花秦芫 *G. straminea* Maxim.、西藏秦芫 *G. tibetica* King ex Hook. f.、粗茎秦芫 *G. crassicaulis* Duthie ex Burk.、管花秦芫 *G. siphonantha* Maxim. ex Kusnez.、长梗秦芫 *G. waltonii* Burk. 和黄管秦芫 *G. officinalis* H. Smith. 的干燥花枝。

秦芫花已被《国家藏药标准全书》《中华人民共和国卫生部药品标准(藏药分册)》《中华人民共和国卫生部药品标准(蒙药分册)》《藏药标准》等收载^[1,4-6],但这些标准仅收录了该药材的外观性状、性味和功能主治等,缺乏其他鉴别项,也没有基于药效的化学成分含量测定。基于此,本研究根据2020年版《中国药典》(四部)通则中关于中药材质量控制的要求^[7],使用显微镜及薄层色谱(thin-layer chromatography, TLC)法对其进行定性鉴别,测定其水分、总灰分、酸不溶性灰分和醇溶性浸出物含量,并采用高效液相色谱(high-performance liquid chromatography, HPLC)法测定秦芫花药材中马钱苷酸、獐牙菜苦苷、龙胆苦苷、獐牙菜苷和异荛草苷的含量,以期对该药材的质量进行全面控制。

1 材料

1.1 主要仪器

1260型HPLC仪(包括四元泵、自动进样器、柱温箱、二极管阵列检测器、Chemstation 04.03色谱工作站)购自美国Agilent公司;BH200型显微镜购自舜宇光学科技(集团)有限公司;聚酰胺薄膜(规格10 cm×20 cm)购自台州市路桥四甲生化塑料厂;DHG-9145A型电热鼓风干燥箱购自上海一恒科学仪器有限公司;ZF-20D型暗箱式紫外分析仪购自上海宝山顾村电光仪器厂;FA1004型万分之一电子分析天平购自上海良平仪器仪表有限公司;BSA124S型十万分之一电子分析天平购自赛多利斯科学仪器(北京)有限公司;SB-8200DTS型双频超声仪购自宁波新艺超声设备有限公司;UPH-I型超纯水机购自四川优普超纯科技有限公司。

1.2 主要药品与试剂

马钱苷酸对照品(批号PS012095,纯度≥98.5%)、獐牙菜苦苷对照品(批号PS012298,纯度≥98.5%)、龙胆苦苷对照品(批号PS010423,纯度≥99%)、獐牙菜苷对照品(批号PS010483,纯度≥99%)、异荛草苷对照品(批号PS011444,纯度≥98.5%)均购自成都普思生物科技股份有限公司;甲醇为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为超纯水。

16批秦芫花药材(编号S1~S16)由本课题组自行采集或购买所得,经成都中医药大学民族医药学院张静教授鉴定,S1~S4号样品为粗茎秦芫的干燥花枝、S5~S8号样品为麻花秦芫的干燥花枝、S9~S12号样品为西藏秦芫的干燥花枝、S13号样品为长梗秦芫的干燥花枝、S14号样品为黄管秦芫的干燥花枝、S15~S16号样品为管花秦芫的干燥花枝。16批秦芫花样品的来源信息见表1。

表1 16批秦芫花样品的来源信息

编号	采集地/购买单位	采集/购买日期
S1	云南香格里拉纳帕海	2020-08-17
S2	四川甘孜理塘县	2020-09-06
S3	西藏林芝G318国道	2020-08-12
S4	西藏山南市	2020-07-22
S5	青海玉树市下拉秀镇	2020-08-04
S6	四川阿坝松潘包座乡	2020-09-15
S7	青海黄南州藏医院	2020-07-13
S8	青海泽库县藏医院	2020-07-13
S9	西藏山南乃东区	2020-09-10
S10	西藏山南桑日县	2020-08-15
S11	西藏藏医学院藏药有限公司	2020-08-17
S12	西藏拉萨农业农林业农产品质量监督检验测试中心	2020-07-19
S13	西藏山南乃东区	2020-09-10
S14	青海玛沁县拉加镇	2020-07-30
S15	青海玛多县花石峡镇	2020-07-31
S16	青海八一一路药材市场优润堂药房	2020-07-14

2 方法与结果

2.1 显微鉴别

取秦芫花药材粉末(编号S1)在显微镜下观察。结果,本品粉末呈浅棕黄色,花粉粒类圆球形,表面雕纹不明显,直径为36 μm,有3个萌发孔;纤维细长,多成束,直径为3~31 μm;可见螺旋、梯纹及网纹导管,直径约60 μm;非腺毛为单细胞,甚长,多破碎;花冠表皮细胞表面呈类圆形或类多角形,外壁呈乳头状突起,表面具条状纹理;花萼表皮细胞表面呈类多角形,垂周壁略呈连珠状,表面具波状角质纹理。秦芫花药材粉末的显微鉴别图见图1。

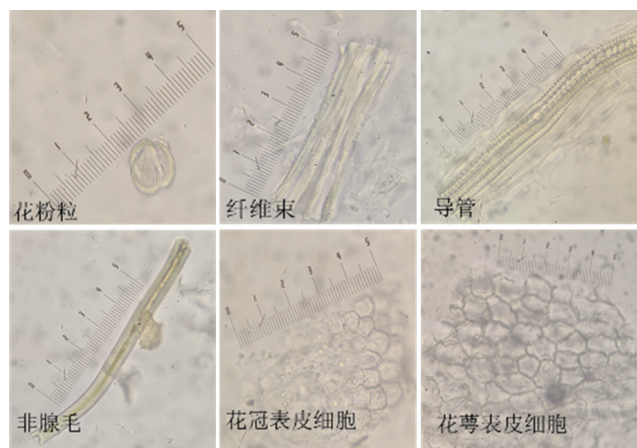
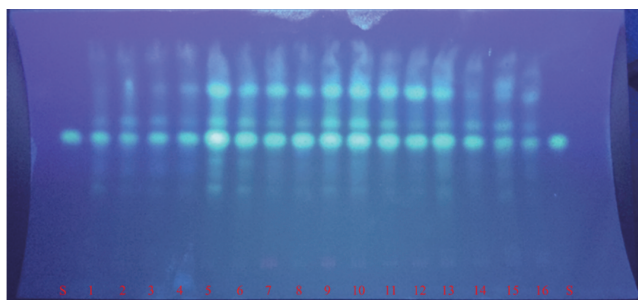


图1 秦芫花药材粉末的显微鉴别图(×40)

2.2 TLC鉴别

取本品粉末0.5 g,加甲醇10 mL,超声(功率400 W,频率40 kHz)处理30 min,滤过,取滤液作为供试品溶液。另取异荛草苷对照品,加甲醇制成每1 mL含0.1 mg的溶液,作为对照品溶液。按照2020年版《中国药典》(四部)通则“0502薄层色谱法”进行实验^[7]。吸取供试品溶液1.5 μ L、对照品溶液1 μ L,分别点样于同一聚酰胺薄层板上,以甲醇-水-冰乙酸(6:1:1, V/V/V)溶液为展开剂展开;取出,晾干,喷3% AlCl₃乙醇溶液,60 $^{\circ}$ C下加热2 min,然后在紫外灯(波长365 nm)下检视。结果,在供试品色谱图中,与对照品色谱相应的位置上显相同颜色的荧光斑点(图2)。



1~16:编号为S1~S16的秦艽花样品;S:异荛草苷对照品

图2 秦艽花药材的TLC图

2.3 检查

2.3.1 水分 取各批次秦艽花药材粉末(过二号筛)各约2 g,按2020版《中国药典》(四部)“通则0832”水分测定法项下第二法进行检测^[7]。每个样本平行测定3次,取平均值。结果显示,16批秦艽花药材的水分含量在5.40%~8.87%之间,平均值为7.54%(RSD=12.36%, n=3)。考虑到药材来源的差异,本研究以略高于最高测定值设限^[8],初步拟定秦艽花药材的水分不得过9.0%。秦艽花药材中水分测定结果见表2。

2.3.2 总灰分和酸不溶性灰分 取各批次秦艽花药材粉末(过二号筛)各约4 g,按2020版《中国药典》(四部)“通则2302”灰分测定法项下总灰分和酸不溶性灰分测定法进行检测^[7]。每个样本平行测定3次,取平均值。结果显示,16批秦艽花药材的总灰分含量在3.76%~6.40%之间,平均值为5.08%(RSD=12.60%, n=3);酸不溶性灰分含量在0.27%~0.58%之间,平均值为0.45%(RSD=17.41%, n=3)。考虑到药材来源的差异,本研究以略高于最高测定值设限^[8],初步拟定秦艽花药材中总灰分不得过6.5%、酸不溶性灰分不得过0.6%。秦艽花药材中总灰分和酸不溶性灰分测定结果见表2。

2.3.3 醇溶性浸出物测定 取各批次秦艽花药材粉末(过二号筛)各约2 g,按2020版《中国药典》(四部)“通则2201”浸出物测定法项下醇溶性浸出物测定法(热浸法)进行检测,溶剂为50%乙醇^[7]。每个样本平行测定3次,

表2 秦艽花药材中水分、总灰分、酸不溶性灰分和醇溶性浸出物测定结果(n=3, %)

编号	水分	总灰分	酸不溶性灰分	醇溶性浸出物
S1	7.67	5.34	0.43	35.11
S2	8.32	5.71	0.58	26.81
S3	7.99	5.76	0.52	42.51
S4	7.10	4.40	0.52	35.67
S5	7.71	5.34	0.27	35.74
S6	5.89	6.40	0.36	29.01
S7	8.87	4.40	0.52	35.83
S8	8.14	5.27	0.50	35.11
S9	5.40	4.71	0.40	37.38
S10	8.28	5.22	0.39	35.54
S11	7.71	4.49	0.49	34.46
S12	8.24	5.03	0.40	38.04
S13	6.82	3.76	0.47	40.82
S14	6.91	5.47	0.43	30.84
S15	7.18	4.86	0.39	35.15
S16	8.17	5.20	0.49	38.04
平均值	7.54	5.08	0.45	35.38
RSD	12.36	12.60	17.41	11.18

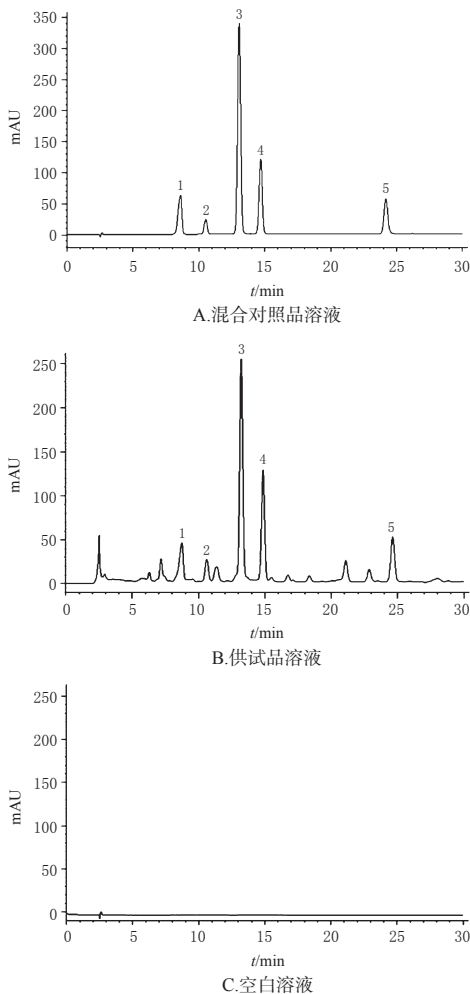
取平均值。结果显示,16批秦艽花药材中醇溶性浸出物含量在26.81%~42.51%之间,平均值为35.38%(RSD=11.18%, n=3)。考虑到药材来源的差异,本研究以略低于最低测定值设限^[8],初步拟定秦艽花药材中醇溶性浸出物不得少于26.0%。秦艽花药材中醇溶性浸出物测定结果见表2。

2.4 含量测定

2.4.1 混合对照品溶液的制备 精密称取马钱苷酸、獐牙菜苦苷、龙胆苦苷、獐牙菜苷和异荛草苷对照品适量,加甲醇制成上述5个成分质量浓度分别为0.367、0.104、2.122、0.636、0.262 mg/mL的混合对照品贮备液。取上述贮备液5 mL,用甲醇稀释4倍,即得混合对照品溶液。将所得溶液置于4 $^{\circ}$ C冰箱中保存,备用。

2.4.2 供试品溶液的制备 取秦艽花药材粉末(过三号筛)0.5 g,精密称定,置于50 mL锥形瓶中,精密加入甲醇25 mL,称定质量,超声(功率400 W,频率40 kHz)处理30 min;放冷至室温,再次称定质量,用甲醇补足减失的质量,摇匀,以0.22 μ m微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。将所得溶液置于4 $^{\circ}$ C冰箱中保存,备用。

2.4.3 色谱条件与系统适用性试验 采用Kromasil 100-5-C₁₈色谱柱(250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m);以甲醇(A)-0.2%磷酸水溶液(B)为流动相进行梯度洗脱(0~30 min, 25% A \rightarrow 40% A);检测波长为240 nm;流速为1 mL/min;柱温为30 $^{\circ}$ C;进样量为10 μ L。分别取供试品溶液(编号S1)、混合对照品溶液和空白溶液(甲醇),按上述色谱条件进样测定,记录色谱图。结果显示,理论板数按马钱苷酸计大于3 000,各待测成分峰与其相邻峰间的分离度均大于1.5,均达到基线分离,且空白溶液(甲醇)对5种成分的测定无干扰,色谱图见图3。



1: 马钱苷酸; 2: 獐牙菜苦苷; 3: 龙胆苦苷; 4: 獐牙菜苷; 5: 异苾草苷

图3 系统适用性试验的HPLC图

2.4.4 线性关系考察 将“2.4.1”项下混合对照品贮备液用甲醇分别稀释2、4、8、16、32、64倍,取混合对照品贮备液及各稀释液分别按“2.4.3”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以各待测成分的质量浓度(x)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标绘制标准曲线,计算得5种成分的线性回归方程、线性范围、相关系数(r)。结果显示,各待测成分在其质量浓度范围内线性关系均良好($r \geq 0.9995$),详见表3。

表3 线性关系及检测限、定量限考察结果

成分	回归方程	线性范围/($\mu\text{g/mL}$)	r	检测限/($\mu\text{g/mL}$)	定量限/($\mu\text{g/mL}$)
马钱苷酸	$y=13.573x-2.502$	5.73~367.00	0.9998	0.29	1.69
獐牙菜苦苷	$y=14.881x-2.246$	1.63~104.00	0.9998	0.36	1.35
龙胆苦苷	$y=10.199x+16.732$	33.16~2122.00	0.9995	0.98	1.66
獐牙菜苷	$y=12.417x-6.497$	9.94~636.00	0.9997	0.50	1.42
异苾草苷	$y=17.437x-4.375$	4.09~262.00	0.9997	0.71	1.36

2.4.5 检测限与定量限考察 取“2.4.1”项下混合对照品贮备液适量,用甲醇逐步稀释,然后按“2.4.3”项下色谱条件进样测定,记录峰面积,分别以信噪比3:1、10:1测定检测限、定量限。结果显示,5种成分的检测限和定

量限均满足检测要求,详见表3。

2.4.6 精密性试验 取“2.4.1”项下混合对照品溶液,按“2.4.3”项下色谱条件于同一天内连续进样测定6次,记录峰面积。结果显示,马钱苷酸、獐牙菜苦苷、龙胆苦苷、獐牙菜苷和异苾草苷峰面积的RSD分别为0.65%、0.89%、0.80%、0.71%、0.51% ($n=6$),表明仪器精密性良好。

2.4.7 重复性试验 取同一批次秦艽花药材粉末(过三号筛,编号S1)共6份,每份0.5 g,精密称定,按“2.4.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.4.3”项下色谱条件进样测定,记录5种成分的峰面积,代入标准曲线计算样品中各成分的含量。结果显示,马钱苷酸、獐牙菜苦苷、龙胆苦苷、獐牙菜苷和异苾草苷含量的RSD分别为0.89%、0.97%、0.71%、0.83%、0.98% ($n=6$),表明方法重复性良好。

2.4.8 稳定性试验 取秦艽花药材粉末(过三号筛,编号S1)适量,按“2.4.2”项下方法制备供试品溶液,分别于室温下放置0、2、4、6、8、10、12、24 h时,按“2.4.3”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果显示,马钱苷酸、獐牙菜苦苷、龙胆苦苷、獐牙菜苷和异苾草苷峰面积的RSD分别为0.76%、0.79%、0.55%、0.69%、1.06% ($n=8$),表明供试品溶液在室温下放置24 h内稳定性良好。

2.4.9 加样回收率试验 取已知含量的同一批秦艽花药材粉末(过三号筛,编号S1)共6份,每份0.5 g,精密称定,分别精密加入与样品中各成分含量等量的混合对照品溶液,按“2.4.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.4.3”项下色谱条件进样测定,记录峰面积,计算加样回收率。结果显示,马钱苷酸、獐牙菜苦苷、龙胆苦苷、獐牙菜苷和异苾草苷的平均加样回收率分别为101.20%、101.87%、98.11%、98.29%、96.76%,RSD分别为1.25%、2.19%、2.22%、1.60%、1.86% ($n=6$),表明本方法的准确度良好,详见表4。

2.4.10 样品含量测定 精密称取16批秦艽花药材粉末,每份约0.5 g,按“2.4.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.4.3”项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并根据标准曲线计算各成分的含量。每批样品平行测定3次,取平均值。结果显示,16批秦艽花样品中马钱苷酸、獐牙菜苦苷、龙胆苦苷、獐牙菜苷和异苾草苷的含量分别为3.13~9.36、1.26~22.39、13.80~74.60、1.24~12.22、2.58~14.96 mg/g。考虑到质量标准制定的适用性和药材来源的差异性,本研究选择含量最高的龙胆苦苷作为该药材含量限定的指标成分,以略低于含量最低值设限^[8],初步拟定本品中龙胆苦苷的含量不得低于13.8 mg/g,结果见表5。

表4 秦艽花中5种成分的加样回收率试验结果(n=6)

成分	称样量/ g	已知量/ mg	加入量/ mg	测得量/ mg	加样回收 率/%	平均加样回 收率/%	RSD/ %
马钱苷酸	0.500 0	2.272 5	2.293 0	4.595 3	101.30	101.20	1.25
	0.500 1	2.273 0	2.293 0	4.625 4	102.59		
	0.500 2	2.273 4	2.293 0	4.620 8	102.37		
	0.500 3	2.273 9	2.293 0	4.602 5	101.56		
	0.500 1	2.273 0	2.293 0	4.556 3	99.58		
	0.500 0	2.272 5	2.293 0	4.560 7	99.79		
獐牙菜苦苷	0.500 0	0.627 5	0.650 0	1.290 1	101.94	101.87	2.19
	0.500 1	0.627 6	0.650 0	1.280 4	100.43		
	0.500 2	0.627 8	0.650 0	1.285 3	101.15		
	0.500 3	0.627 9	0.650 0	1.308 0	104.63		
	0.500 1	0.627 6	0.650 0	1.304 9	104.20		
	0.500 0	0.627 5	0.650 0	1.270 0	98.84		
龙胆苦苷	0.500 0	13.300 0	13.284 0	26.310 3	97.94	98.11	2.22
	0.500 1	13.302 7	13.284 0	26.361 6	98.31		
	0.500 2	13.305 3	13.284 0	26.261 8	97.53		
	0.500 3	13.308 0	13.284 0	25.960 8	95.25		
	0.500 1	13.302 7	13.284 0	26.848 9	101.97		
	0.500 0	13.300 0	13.284 0	26.269 7	97.63		
獐牙菜苷	0.500 0	3.975 0	3.975 0	7.919 0	99.22	98.29	1.60
	0.500 1	3.975 8	3.975 0	7.887 4	98.41		
	0.500 2	3.976 6	3.975 0	7.928 2	99.41		
	0.500 3	3.977 4	3.975 0	7.767 8	95.36		
	0.500 1	3.975 8	3.975 0	7.930 9	99.50		
	0.500 0	3.975 0	3.975 0	7.865 2	97.87		
异荭草苷	0.500 0	1.561 0	1.630 0	3.115 2	95.35	96.76	1.86
	0.500 1	1.561 3	1.630 0	3.126 6	96.03		
	0.500 2	1.561 6	1.630 0	3.126 5	96.01		
	0.500 3	1.561 9	1.630 0	3.135 1	96.52		
	0.500 1	1.561 3	1.630 0	3.197 0	100.35		
	0.500 0	1.561 0	1.630 0	3.131 0	96.32		

表5 样品含量测定结果(n=3, mg/g)

编号	马钱苷酸	獐牙菜苦苷	龙胆苦苷	獐牙菜苷	异荭草苷
S1	4.61	1.26	25.96	7.77	3.14
S2	3.22	1.74	16.57	1.24	2.62
S3	3.46	3.00	53.44	2.37	4.19
S4	5.79	2.49	24.07	6.74	2.58
S5	5.50	8.66	36.67	6.34	14.96
S6	3.88	3.19	17.04	3.76	7.14
S7	4.87	3.68	33.10	3.97	5.46
S8	3.13	1.98	25.88	4.14	7.94
S9	6.62	8.39	48.49	12.13	8.90
S10	4.87	3.68	33.10	3.97	5.46
S11	9.36	9.71	54.84	3.92	6.76
S12	8.83	4.84	45.56	7.02	8.59
S13	5.42	22.39	74.60	11.01	7.83
S14	8.34	2.33	13.80	2.55	5.06
S15	7.12	4.18	34.61	12.22	2.79
S16	5.79	2.49	24.07	6.74	2.58
平均值	5.68	5.25	35.11	5.99	6.00

3 讨论

3.1 定性和定量分析指标的选择

据现有研究报道,秦艽花药材中含环烯醚萜苷和黄酮类、三萜类等多种成分,具有抗炎镇痛、抗氧化、润肠通便和抑制乙酰胆碱酯酶活性的作用^[3]。异荭草苷为黄酮苷类成分,具有抗氧化、保肝、抗炎等作用^[9-11];马钱苷

酸、獐牙菜苦苷、龙胆苦苷、獐牙菜苷均为环烯醚萜苷类成分,均具有抗炎、镇痛、保肝等作用^[10-18]。这些成分的生物活性与秦艽花的抗炎、镇痛药理作用相符,提示这5种成分均是该药材的有效成分。因此,本课题组最终选择异荭草苷作为秦艽花药材的定性分析指标成分,并选择马钱苷酸、獐牙菜苦苷、龙胆苦苷、獐牙菜苷和异荭草苷作为秦艽花药材的定量分析指标成分。

3.2 TLC鉴别条件的选择

本课题组前期分别考察了不同展开剂[甲醇-水-冰乙酸(6:1:1, V/V/V)、乙醇-水-冰乙酸(4:1:1, V/V/V)、丙酮-水-冰乙酸(3:1:1, V/V/V)]、不同点样量(0.5、1、1.5、2 μL)、不同显色方式(3% AlCl₃乙醇溶液显色和10%硫酸乙醇显色)、不同温度(4、20、35 ℃)及不同相对湿度(32%、58%和72%)对鉴别结果的影响。结果表明,异荭草苷以甲醇-水-冰乙酸(6:1:1, V/V/V)为展开剂展开、3% AlCl₃乙醇溶液显色时,其分离度较好,比移值适宜,斑点清晰;且该方法在不同温度和相对湿度下均能对样品溶液有很好的分离效果,说明该方法的耐用性良好。

3.3 浸出物测定条件的考察

在前期研究中,本课题组考察了不同浸出方法(冷浸法和热浸法)、不同浸出溶剂(水,30%、50%、70%、100%的乙醇,30%、50%、70%、100%的甲醇)对浸出效果的影响,且将相应浸出条件下的溶液处理(0.22 μm微孔滤膜滤过,取续滤液)后按“2.4.3”项下色谱条件进样测定,计算出各有效成分的含量,然后以浸膏得率和有效成分的浸出含量为共同指标筛选浸出条件。结果,当浸出方式为热浸法且以50%乙醇作为溶剂时,浸出效果最好。因此,在本研究中选择50%乙醇作为浸出物的提取溶剂。

3.4 供试品溶液制备条件的选择

在前期研究中,本课题组以待测物有效成分的相对含量为指标,分别对供试品溶液制备的提取溶剂(70%、50%、30%、100%的乙醇,70%、50%、30%、100%的甲醇)、提取方式(回流提取、超声提取)、提取溶剂用量(25、50、100 mL)、提取时间(15、30、60 min)进行了考察,最终选择以甲醇溶液25 mL、超声提取30 min为秦艽花供试品溶液的制备方法(此条件下各待测成分的相对含量较高)。

3.5 HPLC检测条件的选择

本课题组前期对不同流动相(甲醇-0.1%磷酸水溶液、甲醇-0.2%磷酸水溶液、乙腈-0.1%磷酸水溶液、甲醇-水)、不同检测波长(230、240、270、330、370 nm)、不同色谱柱(Chromsil C₁₈、Kromasil 100-5-C₁₈、Zorbax Eclipse XDB-C₁₈)、不同柱温(25、30、35 ℃)、不同流速(0.9、1.0、1.1 mL/min)等色谱条件进行了考察,最终确定了“2.4.3”项下色谱条件。

3.6 不同样品的含量测定结果分析

本研究通过含量测定发现,云南、四川、青海、西藏等不同产地的秦艽花样品中各成分的平均含量差异较大:马钱苷酸的平均含量分别为4.61、3.55、5.79、6.34 mg/g(RSD=24.55%, $n=4$),獐牙菜苦苷的平均含量分别为1.26、2.47、3.89、7.79 mg/g(RSD=73.63%, $n=4$),龙胆苦苷的平均含量分别为25.96、16.81、28.02、47.73 mg/g(RSD=43.92%, $n=4$),獐牙菜苦苷的平均含量分别为7.77、2.50、5.99、6.74 mg/g(RSD=39.76%, $n=4$),异菝葜草苷的平均含量分别为3.14、4.88、6.47、6.33 mg/g(RSD=29.84%, $n=4$)。这可能与样品的不同生长环境及采收时间等因素有关,也表明不同产地的秦艽花在不同化学成分方面有各自的产地优势,可为后续秦艽花化学成分的深入研究提供数据支撑。本研究通过含量测定发现,秦艽花药材中龙胆苦苷含量最高,占测定的5种成分总含量的60%左右。据文献报道,龙胆苦苷具有抗炎、镇痛、保肝等多种药理活性^[9],与秦艽花传统功效一致,且龙胆苦苷也是龙胆属植物的代表性成分。因此,本研究选择秦艽花中的功效性成分,同时也是其中含量较高的成分——龙胆苦苷作为该药材含量限定的指标成分。

综上所述,本研究按照2020版《中国药典》(四部)药材标准起草的技术要求,对秦艽花进行了显微鉴别、TLC鉴别以及水分、总灰分、酸不溶性灰分和醇溶性浸出物等检查项的考察,对秦艽花中马钱苷酸、獐牙菜苦苷、龙胆苦苷、獐牙菜苦苷和异菝葜草苷进行了含量测定,并初步拟定了各指标的限度标准,为秦艽花药材质量标准的制定奠定了基础。但本研究中所用的样品批次、数量均较少,后续本课题组还将继续采集其他不同产地、不同基原的样品进行研究,以建立更加完善的药材质量标准。

参考文献

[1] 卫生部药典委员会.中华人民共和国卫生部药品标准:藏药:第1册[S].北京:人民卫生出版社,1995:76,143.

[2] 帝玛尔·丹增彭措.晶珠本草[M].上海:上海科学技术出版社,1986:119.

[3] 彭美晨,艾晓辉.秦艽花化学成分、药理作用及其临床应用的研究进展[J].中南药学,2021,19(6):1243-1249.

[4] 王宝勤.国家藏药标准全书[M].北京:中华医学电子音像出版社,2004:139-140.

[5] 卫生部药典委员会.中华人民共和国卫生部药品标准:蒙药分册[S].北京:人民卫生出版社,1995:5,157.

[6] 西藏卫生局,青海卫生局,四川卫生局,等.藏药标准[S].西宁:青海人民出版社,1979:70.

[7] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:四部[S].2020年版.北京:中国医药科技出版社,2020:61,59,114,230-234.

[8] 黄建猷,胡筱希,谭晓,等.瑶药消瘤藤的质量标准研究[J].中国药房,2021,32(21):2624-2630.

[9] LI Y G, ZHAO Y J, TAN X Q, et al. Isoorientin inhibits inflammation in macrophages and endotoxemia mice by regulating glycogen synthase kinase 3B[J]. Mediators Inflamm, 2020, 2020:8704146.

[10] 陈永欣,黄权芳,林兴,等.满天星异菝葜草苷对大鼠酒精性肝纤维化保护作用的实验研究[J].中国中药杂志,2013,38(21):3726-3730.

[11] 马羚.藏药“榜间嘎保”品种整理及主流品种的品质研究[D].成都:成都中医药大学,2014.

[12] 陈长勋,刘古文,孙峥嵘,等.龙胆苦苷抗炎药理作用研究[J].中草药,2003,34(9):814-816.

[13] 陈康,吴涛,宋红萍.獐牙菜苦苷的药理作用研究进展[J].现代药物与临床,2016,31(10):1684-1688.

[14] RAMÍREZ-CISNEROS M Á, RIOS M Y, AGUILAR-GUADARRAMA A B, et al. In vitro COX-1 and COX-2 enzyme inhibitory activities of iridoids from *Penstemon barbatus*, *Castilleja tenuiflora*, *Crescentia alata* and *Vitex mollis*[J]. Bioorg Med Chem Lett, 2015, 25(20):4505-4508.

[15] JIA N, LI Y W, WU Y, et al. Comparison of the anti-inflammatory and analgesic effects of *Gentiana macrophylla* Pall. and *Gentiana straminea* Maxim., and identification of their active constituents[J]. J Ethnopharmacol, 2012, 144(3):638-645.

[16] JIA N, CHU W, LI Y W, et al. Iridoid glycosides from the flowers of *Gentiana macrophylla* Pall. ameliorate collagen-induced arthritis in rats[J]. J Ethnopharmacol, 2016, 189:1-9.

[17] GONG J T, YANG F, YANG Q L, et al. Sweroside ameliorated carbon tetrachloride (CCl₄)-induced liver fibrosis through FXR-miR-29a signaling pathway[J]. J Nat Med, 2020, 74(1):17-25.

[18] WANG R, DONG Z Y, LAN X Z, et al. Sweroside alleviated LPS-induced inflammation via SIRT1 mediating NF-κB and FOXO1 signaling pathways in RAW264.7 cells[J]. Molecules, 2019, 24(5):872.

[19] 李生浩,李俊义,武昆利,等.龙胆苦苷的药理作用及分子机制研究进展[J].昆明医科大学学报,2020,41(1):158-162.

(收稿日期:2021-10-22 修回日期:2021-11-19)

(编辑:林静)