

藏药打箭菊的质量标准研究*

周礼仕, 周 林, 岳清洪, 陈一龙, 叶 凡, 张 艺, 范 刚**

(成都中医药大学民族医药学院 成都 611137)

摘 要:目的:建立藏药打箭菊的质量标准。方法:采用显微、薄层色谱法建立其鉴别方法;参考 2010 年版《中国药典》(一部)相关方法测定其水分、总灰分、酸不溶性灰分和浸出物的含量;采用高效液相色谱法测定木犀草素的含量。结果:藏药打箭菊药材的显微、薄层色谱鉴别特征明显,专属性强;打箭菊药材中木犀草素含量为 0.036%~0.104%(均值 0.078%),水分为 9.32%~15.82%(均值 13.11%),总灰分为 6.65%~8.29%(均值 7.45%),酸不溶性灰分为 0.23%~0.59%(均值 0.42%),浸出物为 21.42%~30.15%(均值 24.86%)。结论:本文建立的方法操作简单、准确可靠、重复性良好,可用于控制打箭菊药材的质量

关键词:藏药 打箭菊 质量标准 木犀草素 高效液相色谱法

doi: 10.11842/wst.2014.01.025 中图分类号:R291.4 文献标识码:A

藏药打箭菊(藏药名:阿夏塞尔郡)为菊科植物川西小黄菊 *Pyrethrum tatsienense* (Bur. et Franch.) Ling 的干燥花序,主要分布于西藏、青海、四川、云南等地^[1]。打箭菊具有散瘀、止痛、敛“黄水”的功效,常用于治疗黄水病、瘟疫病等^[2]。打箭菊药材主要含有黄酮类、萜类、香豆素等化学成分,其中黄酮类成分具有抗炎镇痛、抗缺氧、保肝等药理活性^[3-7]。因此,已有藏药打箭菊中的总黄酮、木犀草素含量测定的文献报道^[8,9]。藏药打箭菊为 1995 年版《卫生部药品标准·藏药(第一册)》收载品种^[10],但该标准未收载其薄层鉴别和含量测定项。本文对不同产地的打箭菊药材进行了显微和薄层鉴别研究,测定了水分、总灰分、酸不溶性灰分、醇溶性浸出物的含量,并采用 HPLC 法测定了木犀草素的含量,为打箭菊药材的质量控制提供了科学依据。

1 仪器与试剂

Agilent 1200 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公

收稿日期:2014-01-02

修回日期:2014-01-07

* 四川省教育厅省属高校科研创新团队建设计划(11TD004):中藏药资源保护与利用,负责人:张艺。

** 通讯作者:范刚,博士,讲师,主要研究方向:中药及民族药质量标准化研究。

司),包括四元泵、自动进样器和 DAD 检测器;ULUP-I-10T 优普超纯水机(成都超纯科技有限公司);CQ-250 型超声波清洗器(上海必能信公司);BP211D 1/10 万电子天平(德国 Sartorius 公司)。

木犀草素对照品(批号:111520-200504,供含量测定用)由中国药品生物制品检定研究院提供;甲醇为色谱纯(Fisher 公司),水为超纯水,其他试剂均为分析纯。打箭菊药材共 9 批,主要来自于四川、云南、西藏、青海等地(见表 1),经成都中医药大学严铸云教授鉴定为川西小黄菊 *P. tatsienense* (Bur. et Franch.) Ling 的干燥花序。

2 方法与结果

2.1 鉴别

2.1.1 显微鉴别

取 9 批打箭菊药材,分别粉碎,按照 2010 年版《中国药典》(一部)附录 IIC 显微鉴别法,观察药材粉末的显微特征。本品粉末棕黄色。花粉粒多见,圆球形,棕黄色,具 3 个萌发孔,萌发沟明显,外壁边缘具刺。花粉囊内壁细胞多见,呈椭圆形或长椭圆

形,具点状、条状或螺旋状增厚的壁。柱头碎片先端表皮细胞呈钝圆头的绒毛凸起,顶端较长。花药与花丝相接处为长方形、类方形或梯形厚壁细胞。非腺毛众多,弯曲,柄部细胞2~5个,扭转或不扭转,内含黄棕色物质。苞片的下表皮细胞类长方形,壁薄,气孔不定式,副卫细胞3~4个。导管多为螺纹导管,偶见双螺纹导管。见图1。

2.1.2 薄层鉴别

取本品粉末约0.5 g,加甲醇5 mL,超声处理15 min,放冷,滤过,滤液作为供试品溶液。另取木犀草素对照品,加甲醇制成每1 mL含0.1 mg的溶液,作为对照品溶液。按照2010年版《中国药典》(一部)附录VI B薄层色谱法^[11],吸取上述两种溶液各3 μ L,分别点于同一硅胶G薄层板上,以三氯甲烷-乙酸乙酯-甲酸(9:5:0.5)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以10%硫酸乙醇溶液,在105℃加热数分钟,置紫外光灯(365 nm)下检视。供试品色谱中,在与对照品色谱相应的位置上,显相同颜色的斑点。见图2。

2.2 检查项及浸出物的测定

水分测定参照2010年版《中国药典》(一部)附

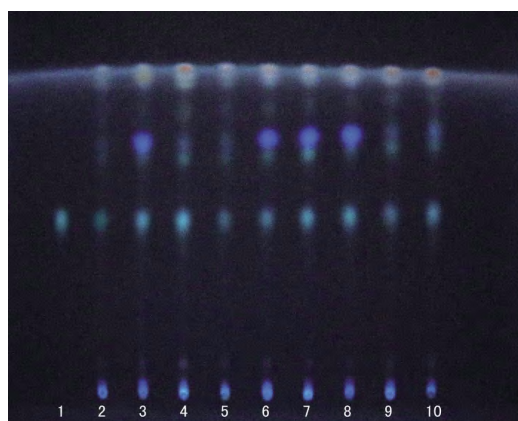


图2 打箭菊的TLC图

注:1.木犀草素对照品 2~10.9批打箭菊药材样品。

录IX H 第一法;总灰分和酸不溶性灰分测定参照附录IX K;浸出物测定参照附录X A 热浸法。9批药材的测定结果见表1。

2.3 含量测定

2.3.1 色谱条件

色谱柱:Ultimate XB-C₁₈ (4.6 mm ×250 mm 5 μ m);流动相:乙腈-0.2%磷酸水溶液(30:70);检测波长 350 nm;流速:1.0 mL·min⁻¹;柱温 30℃;进样量 20 μ L。理论塔板数按木犀草素峰计算应不低于5 000。

2.3.2 对照品溶液的制备

精密称取木犀草素对照品适量,加甲醇制成每1 mL含木犀草素28.08 μ g的溶液,即得。

2.3.3 供试品溶液的制备

取本品粉末约0.5 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入70%甲醇30 mL,密塞,称定重量,超声处理(功率200 W,频率40 kHz)40 min,取出,放冷,再称定重量,用70%甲醇补足减失的重量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.3.4 线性关系考察

精密吸取上述对照品溶液各2、5、10、15、20、25 μ L,注入液相色谱仪,测定其峰面积。以木犀草素峰面积值为纵坐标,进样量(μ g)为横坐标,进行线性回归,得回归方程 $Y = 3\,829.1X + 0.691\,6$ ($r = 0.999\,9$)。结果表明,木犀草素在0.056 2~0.702 0 μ g范围内,进样量与峰面积线性关系良好。

2.3.5 精密度试验

精密吸取同一对照品溶液,按上述色谱条件连

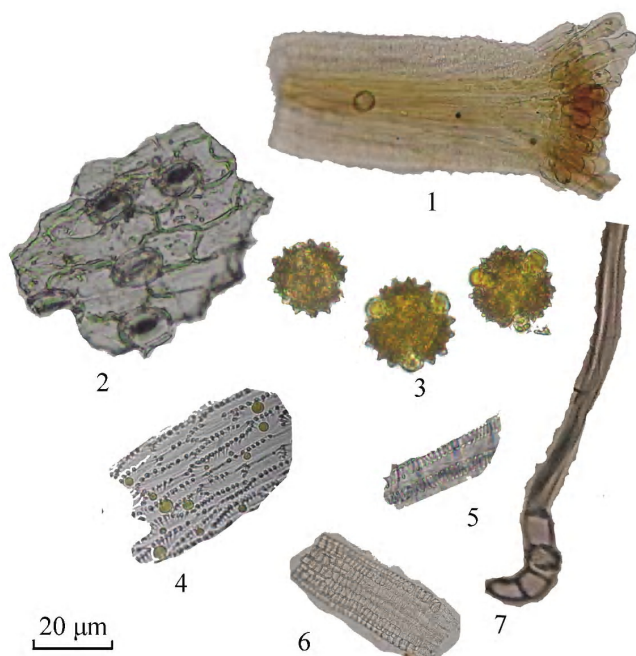


图1 打箭菊药材粉末显微特征图

注:1.柱头先端表皮细胞 2.气孔 3.花粉粒 4.花粉囊内壁细胞, 5.导管 6.厚壁细胞 7.腺毛。

续进样 6 次,记录峰面积。结果木犀草素峰面积的 RSD 为 0.88%,表明仪器精密度良好。

2.3.6 重复性试验

取同一批样品(编号:2)粉末约 0.5 g,共 6 份,精密称定,分别按“2.3.3”项下方法制备供试品溶液,按上述色谱条件进样,记录峰面积,计算木犀草素的含量,其 RSD 为 0.76%,表明重复性良好。

2.3.7 稳定性试验

取同一供试品溶液,按上述色谱条件,分别在 0、1、2、4、8、12 h 进样,记录峰面积,其 RSD 为 0.67%,表明样品在 12 h 内稳定性良好。

2.3.8 加样回收率试验

取已知含量的样品(编号:2)粉末 6 份,每份约 0.25 g,精密称定,分别精密加入对照品适量,按“2.3.3”项下方法制备供试品溶液,在上述色谱条件下测定木犀草素的含量,计算回收率,见表 2。结果木犀草素的加样回收率在 95%~105% 之间,平均回收率为 98.08%,RSD 为 1.57%。

2.3.9 样品含量测定

取不同批次的打箭菊药材样品,平行 2 份,按“2.3.3”项下方法制备供试品溶液,按上述色谱条件

进行含量测定。结果见图 3 和表 1。

3 讨论

藏药打箭菊药材中主要含有黄酮类、香豆素类成分^[12,13]。现代研究表明,木犀草素等黄酮类成分具

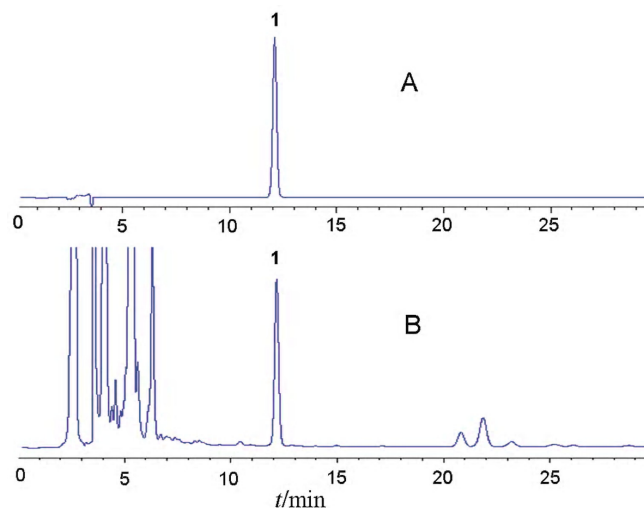


图 3 对照品(A)和供试品(B)的 HPLC 图谱
注:1.木犀草素。

表 1 打箭菊检查项、浸出物及木犀草素含量测定结果($n=2$)

编号	产地	水分/%	总灰分/%	酸不溶性灰分/%	浸出物/%	木犀草素/%
1	西藏山南金珠雅藏药厂	11.66	7.27	0.23	25.64	0.103
2	西藏雄巴拉曲藏药厂	9.32	7.31	0.59	26.16	0.062
3	云南省德钦县人民医院藏医科	14.18	—	—	30.15	0.103
4	云南省香格里拉县格咱乡	15.71	7.42	0.47	23.57	0.086
5	云南省德钦县茫雪山	15.82	7.53	0.33	23.46	0.104
6	四川省若尔盖县藏医院	12.32	7.92	0.43	25.57	0.086
7	四川省康定县雅加梗	15.38	6.65	0.40	23.13	0.061
8	四川省阿坝州藏医院	11.08	7.23	0.43	24.61	0.058
9	青海省西宁市八一路药材市场	12.48	8.29	0.47	21.42	0.036
均值/%		13.11	7.45	0.42	24.86	0.078

注 第 3 批样品量不足,故未测定其总灰分和酸不溶性灰分。

表 2 木犀草素加样回收率试验结果

编号	取样量/g	样品中量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
1	0.250 4	0.140 4	0.140 4	0.277 3	100.10	98.08	1.57
2	0.250 5	0.140 3	0.140 4	0.276 3	97.91		
3	0.250 3	0.140 3	0.140 4	0.272 8	96.07		
4	0.250 7	0.140 4	0.140 4	0.274 0	98.42		
5	0.250 6	0.140 4	0.140 4	0.274 3	99.35		
6	0.250 6	0.140 4	0.140 4	0.276 1	96.64		

有抗炎、镇痛的作用^[14-16],这与打箭菊药材的传统功效基本一致。因此,本文选择木犀草素作为打箭菊药材的薄层鉴别、含量测定的指标性成分。

本文考察了三氯甲烷-乙酸乙酯-甲酸(9:5:0.5)、环己烷-乙酸乙酯-甲酸(8:9:0.5)展开系统,显色条件(10%硫酸乙醇溶液,3%三氯化铝溶液)和点样量(1、3、5、8 μL)。结果表明,以三氯甲烷-乙酸乙酯-甲酸(9:5:0.5)为展开剂,以10%硫酸乙醇溶液为显色剂,供试品和对照品溶液点样量为3 μL时,打箭菊供试品溶液中的木犀草素能得到良好的分离,斑点清晰、圆整。此外,还考察了不同薄层板、不同温度、不同湿度对薄层展开效果的影响,结果发现木犀草素均能得到很好的分离,说明该薄层鉴别方法的耐用性较好。

将木犀草素对照品溶液进行DAD全波长扫描,并参考相关文献^[8,9],最终确定350 nm为检测波长。本文考察了不同流动相体系,最终确定乙腈-0.2%磷酸水溶液(30:70)为最佳流动相。考察了不同柱温(25℃、30℃、40℃)和不同色谱柱(DiamonsiL-C₁₈、ULTimate XB-C₁₈、WeLchrom-C₁₈)对木犀草素分离效果的影响,结果木犀草素均能得到良好的分离,表明所建立的HPLC方法有较好的耐用性。另外,在供试品溶液制备时,考察了不同提取方法(超声和回流)、不同提取时间(20、30、40、60 min)、不同提取溶媒(50%、70%、80%、100%甲醇)和溶媒用量(15、30、40 mL)的提取情况,最终确定了最佳的供试品溶液制备方法。

藏医药学是祖国医学宝库的重要组成部分。由于藏药材的品种整理、药效学、药效物质基础筛选

等基础性研究工作仍然处于起步阶段,因此目前藏药材的质量控制水平均较低,这直接影响和制约了藏药的现代化和产业化发展。在继承民族药传统特色的前提下,积极采用现代质量标准研究技术和方法,建立和完善常用藏药材的质量标准体系,对于提高藏药及其复方制剂的质量,保证临床用药的安全性与有效性有着重要的意义。本文根据《中国药典》中药质量标准研究制定技术要求,开展了常用藏药材“打箭菊”的质量标准规范化研究,所建立的方法操作简单、准确可靠、重复性良好,为打箭菊药材的质量控制提供了科学依据。

参考文献

1 罗达尚.新修晶珠本草.成都:四川科学技术出版社,2004:636.
2 四川省卫生厅.四川省中药材标准.1987:22
3 Liu X, Yang A M, Shi Y P. Determination of flavonoids in Tibetan herbal medicine of Pyrethum tatsienense by HPLC with photodiode array detection. *J Anal Chem*, 2008, 63(5):472~476.
4 Yang A M, Liu X, Lu R H, et al. Triterpenoids from Pyrethrum tatsienense. *Pharmazie*, 2006, 61(1):70~73.
5 张军民,傅思武,赵晋,等.藏药材川西小黄菊化学成分、药理活性及质量标准研究进展.药物分析杂志,2012,32(11):2089~2093.
6 严海英,李永芳,钱蔚.藏药川西小黄菊抗缺氧作用研究.安徽农业科学,2011,39(20):12151~12153.
7 严海英,李永芳,钱蔚.打箭菊对D-半乳糖胺所致大鼠急性肝损伤的保护作用.中药药理与临床,2011,27(5):79~81.
8 林朝展,贝日泽仁达瓦,柴玲,等.RP-HPLC测定打箭菊中的木犀草素.华西药学杂志,2009,24(2):184~185.
9 张凌,张道英,刘亚丽,等.藏药打箭菊中总黄酮及木犀草素的含量测定.药物分析杂志,2008,28(5):755~758.
10 国家药典委员会.卫生部药品标准藏药(第一册).北京:中华人民共和国卫生部,1995:22.

- 11 国家药典委员会.中国药典(一部).北京:中国医药科技出版社, 2010:91
- 12 杨爱梅,鲁润华,师彦平.藏药川西小黄菊化学成分的研究.中成药,2008(5):731~733.
- 13 杨爱梅,刘霞,鲁润华,等.藏药川西小黄菊中黄酮类成分的分离与结构鉴定.中草药,2006,37(1):25~27.
- 14 Funakoshi-Tago M, Nakamura K, Tago K, *et al.* Anti-inflammatory activity of structurally related flavonoids, apigenin, luteolin and fisetin. *Int Immunopharmacol*, 2011, 11(9):1150~11508.
- 15 Li Z Y, Zhou Y M, Zhang N, *et al.* Evaluation of the anti-inflammatory activity of luteolin in experimental animal models. *Planta Med*, 2007, 73(3):221~225.
- 16 王继双,何焱,张文静,等.木犀草素的药理作用研究进展.生命科学,2013,25(6):560~564.

Quality Standard of Pyrethri Tatsienensis Flos

Zhou Lishi, Zhou Lin, Yue Qinghong, Chen Yilong, Ye Fan, Zhang Yi, Fan Gang

(College of Ethnic Medicine, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China)

Abstract: This study was aimed to establish the quality standard of Pyrethri Tatsienensis Flos. The medical material was identified by the microscopy and the thin layer chromatography (TLC) methods. The moisture, total ash, acid-insoluble ash and alcohol-soluble extract were determined according to procedures recorded in the *Chinese Pharmacopoeia* (2010 edition). The content of luteolin was determined by the HPLC method. The results showed a strong characteristic microscopic of Pyrethri Tatsienensis Flos, and its TLC identification had a good resolution with clear spots. The mass fractions of luteolin was 0.036%~0.104% (average of 0.078%), moisture was 9.32%~15.82% (average of 13.11%), total ash was 6.65%~8.29% (average of 7.45%), acid-insoluble ash was 0.23%~0.59% (average of 0.42%), and the extraction was 21.42%~30.15% (average of 24.86%). It was concluded that this established standard was simple to operate with good stability and reproducibility, which can be used for quality evaluation of Pyrethri Tatsienensis Flos.

Keywords: Tibetan medicine, Pyrethri Tatsienensis Flos, quality standard, luteolin, HPLC

(责任编辑 李沙沙 张志华,责任译审 王 晶)