

西藏沙棘质量标准研究*

杨 洋, 苏永文, 刘 悦, 游佳莉, 张 艺, 王毓杰**

(成都中医药大学民族医药学院 成都 611137)

摘 要:目的:建立西藏沙棘药材质量标准。方法:采用显微法及 TLC 法鉴别西藏沙棘药材;按照 2010 年版《中国药典》(一部)测定西藏沙棘药材水分、总灰分、酸不溶性灰分及醇溶性浸出物含量;采用 HPLC 法测定其槲皮素、山柰素及异鼠李素含量。结果:确定西藏沙棘药材显微特征,建立槲皮素、山柰素及异鼠李素 3 种黄酮类成分的薄层鉴别及含量测定方法。结论:本研究建立的定性、定量方法,可用于西藏沙棘药材质量控制。

关键词:藏药 西藏沙棘 质量标准 显微鉴别 薄层鉴别 含量测定

doi: 10.11842/wst.2014.01.027 中图分类号:R291.4 文献标识码:A

西藏沙棘药材来源于胡颓子科植物西藏沙棘 *Hippophae tibetana* Schlechtend. 的干燥成熟果实,分布于西藏、四川、青海等地,具有“滋补肝阴”的功效,用于肝血不足,肝阳上亢之头晕、耳鸣、目赤肿痛诸证^[1]。《晶珠本草》记载,藏药沙棘分为大、中、小 3 种,“小者”称为萨达尔,生于高地的溪水畔、河滩,叶背面白色,状如鞭麻,茎干细小,高约 1 米,与西藏沙棘相符^[2]。西藏沙棘药材可单独使用,也可作为传统藏药沙棘膏的原料药制作成膏使用。此外,由于其含有丰富的维生素 C、口感好等原因被开发为饮料^[3]。目前西藏沙棘药材尚无质量标准,对于其临床用药的安全性和有效性缺乏质量评价依据。本文按照 2010 年版《中国药典》(一部)要求对西藏沙棘药材质量标准进行研究。

1 仪器与材料

岛津 LC-2010A HT 型 HPLC 色谱仪,SHI-MADZU LC solution 工作站,超声波清洗器(KQ-50B

型,昆山市超声仪器有限公司);BP121S 电子天平(德国 Sartorius 公司);OLYMPUS CX41RF 生物显微镜(奥林巴斯中国有限公司)。

槲皮素对照品(批号:100081-200907)、山柰素对照品(批号:10861-201209)、异鼠李素对照品(批号:10860-201109),均由中国食品药品检定研究院提供;甲醇为色谱纯,水为超纯水,其余试剂均为分析纯。共采集西藏、四川及青海 10 批西藏沙棘,经成都中医药大学张艺研究员鉴定为胡颓子科植物西藏沙棘 *H. Tibetana* Schlechtend. 的干燥成熟果实。均粉碎、过筛(三号筛)混匀,置干燥器中备用。

2 方法与结果

2.1 显微鉴别

取 10 批供试品,分别粉碎,按照 2010 年版《中国药典》(一部)附录 II C 中显微鉴别法,观察西藏沙棘药材粉末的显微特征。本品粉末红棕色。果皮表皮细胞较小,单个细胞长 20~50 μm,多角形、类方形,垂周壁稍厚。表皮上盾状毛较多,棕红色,类圆形,直径 100~300 μm。螺纹导管细长,直径 5~10

收稿日期:2014-01-02

修回日期:2014-01-09

* 四川省科学技术厅科技支撑计划项目(2013SZ0114)特色中藏药资源利用的关键技术及产品开发研究,负责人 张艺,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,四川省药检所藏药材标准(2013 年版)科研任务:西藏沙棘质量标准研究,负责人 张艺。

** 通讯作者:王毓杰,讲师,博士,主要研究方向:中药及民族药药效物质基础及作用机制研究。

μm 。油滴甚多,橙黄色或橙红色。散有纤维。考虑标准的可操作性,根据各特征在粉末中所占的比例、观察的难易程度以及在鉴定中的价值,确定果皮表皮细胞、盾状毛、导管、油滴及纤维为其主要鉴别特征(见图 1)。

2.2 TLC 法鉴别

取本品粉末约 1.0 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,分别精密加入甲醇 40 mL,称定重量,加热回流提取 60 min,放冷,再称定重量,用甲醇补足减失的重量,摇匀,滤过。精密量取续滤液 20 mL,置具塞锥形瓶中,加盐酸 3 mL,在 75℃水浴中加热水解 30 min,立即冷却,滤过。取滤过液 10 mL,蒸干,加 20 mL 水溶解,用乙酸乙酯萃取 2 次,每次 15 mL,合并乙酸乙酯液,蒸干,残渣加甲醇 1 mL 溶解,作为供试品溶液。精密称定槲皮素、山柰素、异鼠李素对照品适量,加甲醇制成浓度分别为 1.0、1.0、0.1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液。按照 2010 年版《中国药典》(一部)附录 VIB 薄层色谱法,吸取供试品溶液 3 μL 、对照品槲皮素 1 μL 、山柰素 1 μL 及异鼠李素 2 μL ,分别点于同一含 3% 醋酸钠硅胶 G 薄层板上,以三氯甲烷-甲酸乙酯-甲酸(5:4:1)为展开剂展开,取出,晾干,喷以三氯化铝试液,热风下吹干,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,显相同颜色的荧光斑点(见图 2)。

2.3 检查项及浸出物的测定

按照 2010 年版《中国药典》(一部)中水分测定法(附录 IX H 第一法)、总灰分测定法(附录 IX K)、酸不溶性灰分测定法(附录 IX K)、浸出物(附录 X A)项下热浸法分别测定 10 批西藏沙棘药材,水分、总灰分、酸不溶性灰分及浸出物分别在 6.86%~10.94%、2.70%~3.98%、0.15%~0.28%、36.33%~42.58% 之间,平均值分别为 8.26%、3.21%、0.21%、38.89%。

2.4 含量测定

2.4.1 色谱条件

色谱柱 Agilent Zorbax SB-C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm),以甲醇-0.2%磷酸水溶液(48:52)为流动相,流速 1.0 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$,柱温 30℃,检测波长 370 nm,进样量 10 μL 。在此条件下,槲皮素、山柰素、异鼠李素保留时间、分离度、理论板数等色谱参数均符合要求(见图 3)。

2.4.2 对照品溶液的制备

精密称定槲皮素、山柰素、异鼠李素对照品适量,加甲醇制成浓度分别为 3、6、12 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液。

2.4.3 供试品溶液的制备

取本品粉末约 1.0 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,分别精密加入甲醇 40 mL,称定重量,加热回流提取 60 min,放冷,再称定重量,用甲醇补足减失的重量,摇匀,滤过。精密量取续滤液 20 mL,置具塞锥形瓶中,加盐酸 3 mL,在 75℃水浴中加热水解 30 min,立即冷却,滤过,取续滤液作为供试品溶液。



图 1 西藏沙棘粉末显微图

注:1.盾状毛 2.表皮细胞 3.油滴 4.纤维 5.螺旋导管。

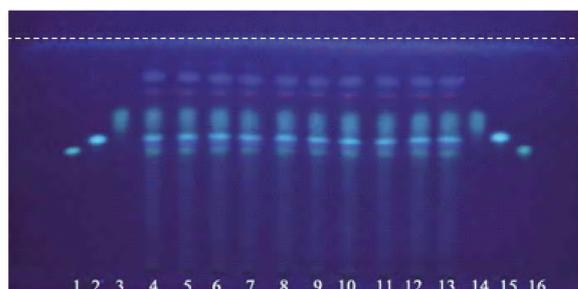


图 2 西藏沙棘 TLC 图

注:1、16:槲皮素,2、15:山柰素,3、14:异鼠李素,4~13:10批样品。

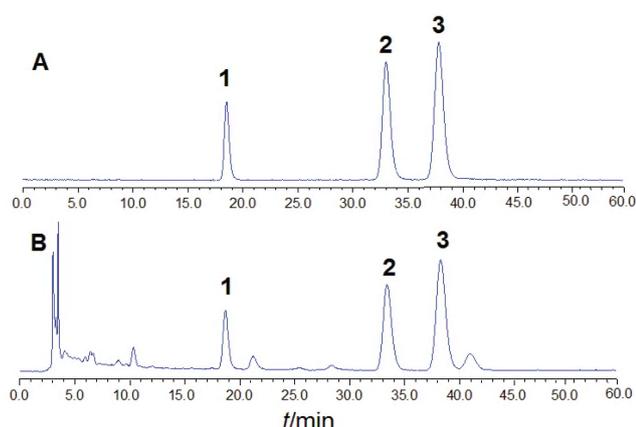


图3 西藏沙棘 HPLC 图

注:A.混合对照品 B.样品 1.槲皮素 2.山柰素 3.异鼠李素。

2.4.4 线性关系的考察

精密称定槲皮素、山柰素、异鼠李素对照品适量,加甲醇制成浓度分别为 1.033、0.932、0.224 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液,作为贮备液;分别精密吸取槲皮素、山柰素、异鼠李素 1.8、4.0、35.0 mL,置于 100 mL 容量瓶内,加甲醇定容。取该混合对照品适量,稀释成不同的浓度,槲皮素:19.102、12.607、6.304、3.152、2.364、1.891、1.248 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,山柰素:37.746、24.912、12.456、6.228、4.671、3.737、2.466 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,异鼠李素:78.400、51.744、25.872、12.936、9.702、7.762、5.123 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。精密吸取上述对照品溶液 10 μL ,注入液相色谱仪,记录色谱图,测定其峰面积,并以峰面积(Y)为纵坐标,槲皮素、山柰素、异鼠李素不同浓度(X)为横坐标进行线性回归,得回归方程:槲皮素 $Y=4.3413\times 10^4X-3552.9$, $r=0.9999$;山柰素 $Y=4.3075\times 10^4X-5154.8$, $r=0.9999$;异鼠李素 $Y=4.0814\times 10^4X-12521$, $r=0.9999$ 。结果表明,槲皮素、山柰素、异鼠李素分别在 1.248~19.102 μg 、2.466~37.746 μg 、5.123~78.400 μg 之间,与峰面积线性关系良好。

2.4.5 精密度试验

精密吸取槲皮素、山柰素、异鼠李素混合对照品溶液 10 μL ,注入液相色谱仪,共 6 次,记录色谱图,测得槲皮素、山柰素、异鼠李素峰面积 RSD 分别为 1.08%、0.29%、0.74%,表明该仪器精密度良好。

2.4.6 稳定性试验

精密吸取供试品溶液,置阴暗处室温密闭放

置,分别在 0、1、2、4、8、12 h 测定其峰面积,槲皮素、山柰素、异鼠李素峰面积 RSD 分别为 1.62%、0.65%、0.72%,表明供试品在 12 h 内有较好的稳定性。

2.4.7 重复性试验

取本品粉末约 1.0 g,精密称定,共 6 份,按照“2.4.3”项下方法制备供试品溶液,进样 10 μL ,记录色谱图,计算含量。6 份供试品中槲皮素、山柰素、异鼠李素平均含量分别为 184.26、333.44、530.42 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$,RSD 分别为 1.48%、1.77%、1.03%,表明本法具有较好的重复性。

2.4.8 加样回收率试验

取已知含量的供试品约 0.5 g,共 9 份,置具塞锥形瓶中,分别按已知含量的 80%、100%、120% 加入对照品,按照“2.4.3”项下方法制备供试品溶液,依次测定,计算含量,结果见表 1。

2.4.9 含量测定

取 10 批西藏沙棘药材,按照“2.4.3”项下方法制备供试品溶液,按上述方法测定含量,结果见表 2。

3 讨论

薄层色谱鉴别中,常规硅胶薄层的供试品溶液斑点脱尾严重,而采用含 3% 醋酸钠硅胶板能有效抑制脱尾。异鼠李素、山柰素难于分离,控制相对湿度 32%、温度 25 $^{\circ}\text{C}$ 进行展开,斑点清晰,分离效果较好^[4]。此外,本文对薄层色谱的展开条件、显色条件、点样量及方法耐用性(不同厂家薄层板、不同展开温度、不同展开湿度)等影响薄层展开效果的因素进行考察。

HPLC 法同时测定山柰素、槲皮素、异鼠李素的色谱条件成熟,在 2010 年版《中国药典》(一部)银杏叶及相关制剂^[5]中广泛使用,测定波长均为 360 nm,而本实验通过 DAD 数据分析槲皮素、山柰素、异鼠李素吸收情况,发现 3 个成分均在 370 nm 处有最大吸收,与文献报道^[6-8]一致,因此,建议采用 370 nm 进行测定。实验过程中还发现,水解时间过长、盐酸用量过多会导致样品槲皮素、山柰素、异鼠李素含量下降,这可能与酸性条件下,黄酮类成分在水中溶解度降低有关。

本研究分别在西藏、四川及青海收集了 10 批西藏沙棘,其槲皮素、山柰素及异鼠李素平均含量

表1 槲皮素、山柰素、异鼠李素的加样回收率试验结果($n=9$)

成分	取样量/g	样品含量/ μg	加入量/ μg	测得量/ μg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
槲皮素	0.500 1	92.61	74.34	165.04	97.43	99.22	1.60
	0.499 9	92.57	74.34	165.59	98.21		
	0.500 2	92.63	74.34	167.31	100.46		
	0.500 0	92.59	92.93	183.40	97.72		
	0.500 4	92.66	92.93	186.20	100.66		
	0.500 2	92.63	92.93	183.16	97.42		
	0.500 1	92.61	111.52	203.13	99.11		
	0.500 0	92.59	111.52	205.90	101.61		
	0.500 2	92.63	111.52	204.50	100.32		
山柰素	0.500 1	167.53	134.21	298.18	97.35	99.10	1.37
	0.499 9	167.46	134.21	300.40	99.05		
	0.500 2	167.56	134.21	299.04	97.96		
	0.500 0	167.49	167.76	335.38	100.07		
	0.500 4	167.63	167.76	333.24	98.72		
	0.500 2	167.56	167.76	334.74	99.66		
	0.500 1	167.53	201.31	371.78	101.46		
	0.500 0	167.49	201.31	368.96	100.07		
	0.500 2	167.56	201.31	363.89	97.53		
异鼠李素	0.500 1	265.36	201.60	466.65	99.85	99.24	1.57
	0.499 9	265.25	201.60	462.68	97.93		
	0.500 2	265.41	201.60	468.64	100.81		
	0.500 0	265.30	257.60	525.73	101.10		
	0.500 4	265.52	257.60	522.33	99.70		
	0.500 2	265.41	257.60	518.10	98.09		
	0.500 1	265.36	313.60	581.84	100.92		
	0.500 0	265.30	313.60	571.62	97.68		
	0.500 2	265.41	313.60	569.79	97.06		

表 2 10 批西藏沙棘药材测定结果($n=2$)

批号	产地	槲皮素/%	山柰素/%	异鼠李素/%
20130801	西藏拉萨市墨竹工卡县日多乡	0.008	0.038	0.013
20130802	西藏山南地区浪卡子县热龙乡	0.023	0.034	0.060
20130803	四川阿坝州若尔盖县白河牧场	0.032	0.030	0.082
20130804	四川阿坝州红原县龙日坝	0.043	0.026	0.138
20130805	四川阿坝州红原县安曲乡	0.034	0.045	0.066
20130806	四川阿坝州红原县江茸乡	0.041	0.046	0.099
20130807	四川阿坝州阿坝县查理乡	0.030	0.034	0.108
20130808	四川阿坝州若尔盖县达渣寺镇	0.029	0.021	0.077
20130809	四川阿坝州若尔盖县阿西哇乡	0.031	0.032	0.078
20130810	青海大通县向化乡	0.035	0.046	0.071
平均含量		0.031	0.035	0.079

注 所有含量均按干燥品计算。

分别为 0.031%、0.035%、0.079%，其中批号为 20130801 的西藏沙棘槲皮素、山柰素、异鼠李素含量较低，这可能与药材的生态环境有关。

参考文献

- 1 冉先德主编.中华药海(下).北京:东方出版社,1993:643.
- 2 罗达尚主编.新修晶珠本草.成都:四川科学技术出版社,2004:462.
- 3 索朗白珍,央珍.西藏沙棘属植物的多样性及利用.西藏科技,2005(12):47~51.
- 4 王毓杰,张艺,古锐,等.心迪软胶囊质量标准研究.中国中药杂志,2006,31(7):52~554.
- 5 国家药典委员会.中华人民共和国药典(一部).北京:中国医药科技出版社,2010.
- 6 刘亚蓉.HPLC 法同时测定沙棘膏中槲皮素、山柰素、异鼠李素的含量.药物分析杂志,2008,28(5):759~761.
- 7 Zu Y, Li C, Fu Y, et al. Simultaneous determination of catechin, rutin, quercetin kaempferol and isorhamnetin in the extract of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) leaves by RP-HPLC with DAD. *J Pharmaceut Biomed*, 2006, 41(3):714~719.
- 8 Li Y, Yang Y, Wang S, et al. Simultaneous LC determination of quercetin, kaempferol and isorhamnetin in rabbits after intragastric administration of an ethanol extract from pollen typhae. *Chromatographia*, 2009, 69(1):117~121.

Research on Quality Standards of Fruit of *Hippophae Tibetana* Schlechtend.

Yang Yang, Su Yongwen, Liu Yue, You Jiali, Zhang Yi, Wang Yujie

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

Abstract: This study was aimed to establish quality standards of fruit of *Hippophae tibetana* Schlechtend.. The medical material was identified by microscopy and thin layer chromatography (TLC). According to methods recorded in the *Chinese Pharmacopoeia* (2010 edition), the contents of moisture, total ash, acid-insoluble ash and alcohol-soluble extract were determined. The HPLC method was applied in the determination of quercetin, kaempferol and isorhamnetin content. The results showed that the microscopic characteristics of Tibetan medicine *H. tibetana* were identified. The TLC and content determination methods of quercetin, kaempferol and isorhamnetin were established. It was concluded that the established qualitative and quantitative methods can be used for quality control of the fruit of *H. tibetana*.

Keywords: Tibetan medicine, fruit of *H. tibetana*, quality standards, microscopic identification, TLC, content determination

(责任编辑 叶丽萍 张志华, 责任译审 王 晶)