

基莲心碱 RSD 值分别为 0.84%、0.49%、0.57%。

2.8 加样回收率试验:精密称取 6 份甄城莲子心样品各约 0.125 g,分别精密加入对照品溶液各 12.5 mL,再按照“2.3 供试品溶液的制备”方法制备,进样 10 μL,按上述色谱条件测定 3 次,计算各生物碱的平均回收率及 RSD 值。结果 3 种生物碱平均回收率为莲心碱 96.99%、异莲心碱 104.26% 和甲基莲心碱 100.71%;RSD 值分别为 0.47%、0.21%、0.16%。

2.9 样品测定:取不同产地莲子心药材,按照“2.3 供试品溶液的制备”方法制备样品溶液,分别进样 10 μL,结果见表 1。

表 1 不同产地莲子心中莲心碱、异莲心碱和甲基莲心碱的测定

Table 1 Detemination of liensinine, isoliensinine, and nefe-rine in *Plumula Nelumbinis* from different habitats

产地	莲心碱/ %	异莲心碱/ %	甲基莲心碱/ %
湘潭	0.32	0.34	0.95
襄樊	0.25	0.50	0.89
南京	1.25	—	—
甄城	0.32	0.36	0.97
乐至	0.29	0.46	0.82
蕲春	0.42	0.41	0.64
白洋淀	0.33	0.36	0.73
洪湖	1.31	—	—
杭州	0.91	0.36	0.19
建德	0.94	0.23	0.23

3 讨论

3.1 不同产地莲子心中 3 种生物碱量差异很大,洪湖和南京产莲子心中异莲心碱、甲基莲心碱几乎检测不出,湘潭和甄城 3 种莲心碱量都比较高。应该

根据项目需要选择合适的莲子心产地。

3.2 根据文献资料建立了简单、准确、可操作性强的莲子心中 3 种生物碱量检测方法。与《中国药典》2005 年版(一部)等所用流动相比较简单,毒性也小一些,3 种生物碱分离度很好。

3.3 混合对照品溶液中异莲心碱、甲基莲心碱结构不稳定,在日光条件下长时间放置成分会破坏,无法标定样品的量,笔者在实验过程中将混合对照品溶液避光,冷藏 1 个月时间各成分量变化不大。建议实验者将混合对照品溶液避光,冷藏保存。

参考文献:

[1] 曾宪武,张卫国,梁 赅,等. 莲子心酚性生物碱的抗心律失常作用[J]. 咸宁学院学报:医学版,2007,21(5):369-372

[2] 王瑞芳,欧来良. 莲子心提取物抗心律失常作用及其急性毒性研究[J]. 中草药,2008,39(3):413-415

[3] 潘 扬,蔡宝昌,杨光明,等. 莲子心降血糖活性部位的筛选研究[J]. 南京中医药大学学报,2005,21(4):243-244

[4] 肖希斌,谢兆霞,陈 杰,等. 甲基莲心碱在 K562/A02 细胞对 ST1571 敏感性中的作用[J]. 中南大学学报:医学版,2005,30(5):558-561

[5] 寿国香,刘 冰,周立江,等. 离子对反相 HPLC 法测定 10 个产地莲子心中莲心碱的含量[J]. 中草药,2001,32(11):989-990

[6] 寿国香,刘 冰,郝连淑. 离子对 RP-HPLC 法测定不同产地莲子心中甲基莲心碱的含量[J]. 中草药,2002,33(6):517-518

[7] 吕武清,郑海华,葛 新. 莲子心的研究概况[J]. 中草药,1996,27(7):438-440

[8] 刘 绍,雷 鹏,李新中,等. 大孔吸附树脂分离纯化莲子心生物碱[J]. 中国中药杂志,2007,32(10):912-915

江西道地药材山蜡梅叶质量标准的研究

李诒光^{1,2},卢建中²,陈 杰^{3*},舒任庚³,卢瑞芝³,祝丰溪³

(1 北京中医药大学,北京 100029; 2 江中药业股份有限公司,江西南昌 330096; 3 江西中医学院,江西南昌 330008)

摘要:目的 研究建立江西道地药材山蜡梅叶的质量标准。方法 采用薄层色谱法建立芦丁和蜡梅碱的鉴别项,采用反相高效液相色谱法建立槲皮素、山柰酚、蜡梅碱的定量测定项。结果 首次建立了山蜡梅叶中芦丁和蜡梅碱的薄层鉴别方法,并首次采用高效液相色谱法建立了槲皮素、山柰酚、蜡梅碱的测定方法,平均回收率分别为 96.55%、98.72%、99.02%。结论 建立的方法操作简便,专属性好,结果准确。

关键词:山蜡梅叶;槲皮素;山柰酚;蜡梅碱;高效液相色谱法

中图分类号:R284.1 文献标识码:A 文章编号:0253-2670(2010)05-0836-03

①收稿日期:2009-09-19

基金项目:国家“十一五”科技支撑计划项目(2006BAI06A01-01)

作者简介:李诒光(1974—),男,江西赣州人,北京中医药大学在读博士,江中药业股份有限公司研究员,江西中医学院兼职硕士生导师,副主任中医师,长期从事中药质量与开发工作,已发表论文 10 篇。 Tel:(0791)8115036 E-mail:lyg@jzjt.com

* 通讯作者 陈 杰 E-mail:cjesh@tom.com

山蜡梅叶为蜡梅科植物山蜡梅 *Chimonanthus nitens* Oliv. 的干燥叶, 又名香风茶、毛山茶、岩马桑, 主产于江西、安徽、浙江。功能解表祛风, 清热解毒。用于防治流行性感冒。文献报道山蜡梅叶中含槲皮素^[1,2]、山柰酚^[1,2]、蜡梅碱^[3]。本实验首次对其质量标准进行了研究。

1 仪器、试药与试剂

Agilent 1200 型高效液相色谱仪; 槲皮素(中国药品生物制品检定所, 批号 200805); 山柰酚(中国药品生物制品检定所, 批号 200808); 蜡梅碱对照品自制(质量分数大于 98%); 山蜡梅叶药材采自江西婺源, 部分购自安徽亳州药材市场; 薄层色谱用硅胶购自青岛海洋化工厂, 甲醇、乙腈为色谱纯, 其他试剂均为分析纯, 水为重蒸水。

2 薄层鉴别

2.1 芦丁的薄层鉴别: 取药材粗粉 2 g, 加 95% 乙醇溶液 20 mL, 超声处理 30 min, 滤过, 滤液蒸干, 残渣加甲醇 1 mL 使溶解, 作为供试品溶液。另取芦丁对照品加甲醇制成质量浓度 0.5 mg/mL 的溶液, 作为对照品溶液。按照薄层色谱法(《中国药典》2005 年版一部附录 VIB) 试验, 吸取供试品溶液 10 μ L, 对照品溶液 5 μ L, 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 以醋酸乙酯-甲酸-水(8:1:1) 的上层溶液为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 喷以 1% 三氯化铝乙醇溶液, 在 105 $^{\circ}$ C 烘约 5 min, 置紫外光灯(365 nm) 下检视。供试品色谱中, 在与对照品色谱的相应位置上, 显相同颜色的荧光斑点。色谱图见图 1。

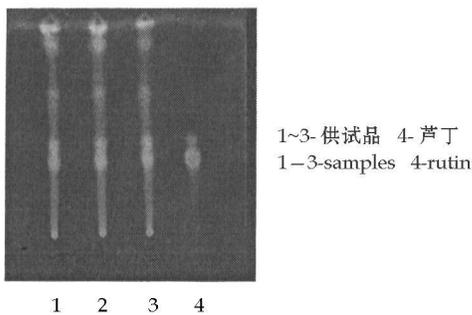


图 1 芦丁薄层色谱图

Fig. 1 TLC Chromatogram of rutin

2.2 蜡梅碱的薄层鉴别: 取药材粗粉 3 g, 加入浓氨试液 3 mL, 氯仿 30 mL, 超声处理 30 min, 滤过, 滤液蒸干, 残渣加甲醇 1 mL 使溶解, 作为供试品溶液。另取蜡梅碱对照品加甲醇制成质量浓度 0.5 mg/mL 的溶液, 作为对照品溶液。按照薄层色谱法(《中国药典》2005 年版一部附录 VIB) 试验, 吸取供试品溶液 8 μ L, 对照品溶液 2 μ L, 分别点于同一块

含氢氧化钠 1% 的碱性硅胶 G 薄层板上, 以氯仿-甲醇(9.2:0.8) 为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 喷以改良碘化铋钾试液。供试品色谱中, 在与对照品色谱的相应位置上, 显相同颜色的斑点。色谱图见图 2。

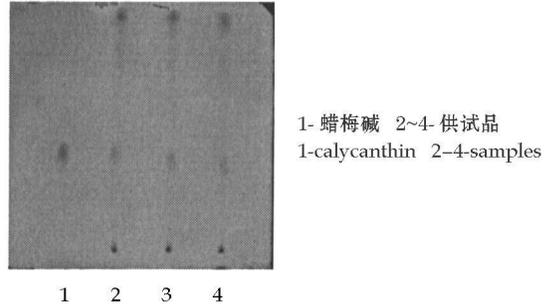


图 2 蜡梅碱薄层色谱图

Fig. 2 TLC Chromatogram of calycanthin

3 山蜡梅叶的定量测定

3.1 槲皮素与山柰酚的定量测定

3.1.1 色谱条件: 色谱柱为 Zorbax SB-C₁₈ (150 mm \times 4.6 mm, 5 μ m); 流动相为甲醇-0.1% 磷酸(40:60); 体积流量为 1 mL/min; 柱温为 35 $^{\circ}$ C; 检测波长为 365 nm。

3.1.2 对照品溶液的制备: 分别精密称取经五氧化二磷干燥的对照品, 加甲醇溶解, 制成含槲皮素 12 μ g/mL、山柰酚 50 μ g/mL 的溶液。

3.1.3 供试品溶液的制备: 取本品粉末(过 3 号筛) 约 1 g, 精密称定, 加石油醚(60~90 $^{\circ}$ C) 超声提取 2 次, 每次 20 mL, 每次 15 min, 倾出石油醚液, 挥干残留溶剂。残渣用甲醇加热回流提取 2 次, 每次 20 mL, 每次 60 min, 滤过。滤液置 50 mL 量瓶中, 用少量甲醇洗涤滤器和残渣, 加甲醇至刻度, 摇匀, 即得。

3.1.4 线性关系的考察: 精密称取槲皮素对照品 15 mg, 置 250 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 作为母液 A; 精密称取山柰酚对照品 6 mg, 置 25 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 作为母液 B; 分别精密量取 2 种母液各 0.5、1、2、3、4 mL, 将同体积的 A、B 液置于同一 10 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀。分别精密吸取对照品混合溶液 5 μ L, 注入高效液相色谱仪测定。以浓度为横坐标(X), 峰面积为纵坐标(Y), 分别绘制槲皮素和山柰酚标准曲线, 并计算回归方程。槲皮素的回归方程: $Y = 15.605 X + 3.210 4$ ($r = 0.999 9$); 山柰酚的回归方程: $Y = 13.08 X + 9.473 8$ ($r = 0.999 8$)。结果表明, 槲皮素在 2.93~23.44 μ g/mL 呈良好的线性关系; 山柰酚在 12.56~100.48 μ g/mL 呈良好的线性关系。

3.1.5 精密度试验: 精密吸取混合对照品溶液 5 μL , 测定槲皮素和山柰酚峰面积, 连续测定 6 次, 槲皮素的峰面积 RSD 为 0.13%, 山柰酚的峰面积 RSD 为 0.15%, 表明本方法精密度良好。

3.1.6 重现性试验: 取同批样品 6 份, 按供试品溶液的制备方法处理, 依上述色谱条件测定, 槲皮素质量分数为 367.67 $\mu\text{g/g}$, RSD 为 2.43% ($n=6$); 山柰酚质量分数为 2.21 mg/g , RSD 为 1.94% ($n=6$)。以上结果表明, 本方法重现性良好。

3.1.7 稳定性试验: 精密吸取供试品溶液 5 μL , 按上述色谱条件, 每隔 1 h 测定槲皮素与山柰酚的量, 结果槲皮素、山柰酚的峰面积 8 h 内 RSD 分别为 0.23% ($n=6$)、0.28% ($n=6$)。以上结果表明, 本方法 8 h 内稳定性良好。

3.1.8 加样回收率试验: 取已测定的本品 5 份, 每份 0.5 g, 精密称定, 分别精密加入一定量的槲皮素和山柰酚母液, 挥尽溶剂, 按供试品溶液制备方法处理, 依法测定, 槲皮素、山柰酚平均回收率分别为 96.55%、98.72%, RSD 分别为 2.46%、1.89%。表明本方法回收率良好。

3.1.9 样品的测定: 取本品按测定项下供试品溶液的制备方法处理, 按上述色谱条件测定, 结果见表 1。

3.2 蜡梅碱的定量测定

3.2.1 色谱条件: 色谱柱为 Agilent H G-C₁₈ (150 mm \times 4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-0.05% 磷酸溶液(8: 92); 体积流量 1.0 mL/min; 柱温为 30 $^{\circ}\text{C}$; 检测波长为 240 nm。

3.2.2 对照品溶液的制备: 精密称取蜡梅碱对照品适量, 加甲醇制成含蜡梅碱 8 $\mu\text{g/mL}$ 的溶液。

3.2.3 供试品溶液的制备: 称取干燥粉碎后的山蜡梅叶 1 g, 加乙醇 100 mL, 回流提取 1 h。滤过, 滤液蒸干, 加 2% 盐酸 100 mL 加热溶解, 离心 15 min (4 000 r/min), 上清液加氯仿萃取 2 次, 每次 20 mL, 取酸水层, 加浓氨水调 pH 9~10, 加氯仿萃取 3 次, 每次 30 mL, 合并氯仿层, 蒸干, 加甲醇溶解至 10 mL 量瓶并稀释至刻度, 微滤, 即得。

3.2.4 线性关系的考察: 精密吸取浓度为 1.6、3.2、4.8、6.4、8.0、16.0 $\mu\text{g/mL}$ 的对照品溶液, 分别注入高效液相色谱仪中。以进样量为横坐标, 峰面积为纵坐标, 绘制标准曲线, 蜡梅碱回归方程为: $Y = 2\,601.1X - 0.387\,8$, $r = 0.999\,8$ 。结果表明,

蜡梅碱在 0.016~0.16 μg 线性关系良好。

3.2.5 精密度试验: 精密吸取对照品溶液 10 μL , 依法连续测定 5 次, 记录峰面积, RSD 为 0.99%, 表明本方法精密度良好。

3.2.6 稳定性试验: 取供试品溶液, 每隔 2 h 进样 10 μL , 记录峰面积, 8 小时内, 蜡梅碱峰面积 RSD 为 1.69%, 表明本方法稳定性良好。

3.2.7 重现性试验: 取同批样品, 依法制备 5 份供试品溶液, 按上述色谱条件测定, 蜡梅碱质量分数 RSD 为 0.64%, 表明本方法重现性良好。

3.2.8 回收率试验: 精密称取已知量的样品, 分别精密加入蜡梅碱对照品溶液适量, 挥干溶剂, 按上述供试品溶液制备方法制备, 测定其质量分数, 计算回收率。蜡梅碱平均回收率为 99.17%, RSD 为 1.02%, 表明本方法回收率较好。

3.2.9 样品测定: 取本品按上述供试品溶液制备方法制备, 依上述色谱条件测定, 按外标法计算蜡梅碱量, 结果见表 1。

表 1 不同产地山蜡梅叶样品中 3 种成分的测定 ($n=3$)

Table 1 Determination of three components in samples from different regions ($n=3$)

产地	批号	槲皮素/	山柰酚/	蜡梅碱/
		($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)	($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)
江西婺源	20070801	365.60	1.96	148.9
江西婺源	20070901	356.54	1.86	147.3
江西婺源	20080801	360.77	2.10	151.2
江西婺源	20080901	367.67	2.21	158.6
江西婺源	20090810	301.55	1.75	72.4
江西婺源	20090909	298.75	1.76	70.4
浙江松阳	20080811	288.61	1.53	87.8
浙江松阳	20080901	285.87	1.71	97.9
浙江松阳	20090410	268.61	1.50	81.2
浙江松阳	20090910	485.87	1.63	90.2

4 讨论

江西产山蜡梅叶 3 种成分的量较高, 各成分的变化趋势不完全一致。采收季节和植株年龄对成分量的影响还需进一步研究。

参考文献:

- [1] 孙丽仁, 何明珍, 冯育林, 等. 山蜡梅叶的化学成分研究 [J]. 中草药, 2009, 40(8): 1214-1216
- [2] 李清华, 汪丽燕, 韩传环, 等. 香风茶化学成分的分离及其药理作用 [J]. 中草药通讯, 1979, 10(1): 1
- [3] 肖炳坤, 刘耀明, 冯淑香, 等. 山蜡梅叶的化学成分研究 (I) [J]. 中草药, 2005, 36(2): 187-188