

木豆叶的质量评价研究

张俊清, 李海龙, 谭银丰, 符乃光, 刘明生*

(海南医学院 海南省热带药用植物研究开发重点实验室, 海南 海口 571101)

摘要:目的 对木豆叶药材进行质量评价。方法 使用生药学研究、薄层色谱法、HPLC 法对木豆叶质量进行评价。结果 对木豆叶的性状、显微特征进行了描述, 对牡荆苷、异美五针松双氢黄酮、木豆芪做了 TLC 定性鉴别和 HPLC 定量分析。结论 通过研究制定了木豆叶的质量控制标准。

关键词:木豆叶; 质量标准; 牡荆苷; 异美五针松双氢黄酮; 木豆芪

中图分类号: R284.1 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2010)10-1723-03

木豆 *Cajanus cajan* L. 为豆科木豆属植物, 分布于东南亚、印度、中国西南及海南诸省。民间将木豆嫩叶用于止血、止痛、抗感染, 并用于治疗褥疮、水痘和股骨头坏死等疾病。木豆叶除较早发现的有效成分牡荆苷外, 近年文献报道了木豆叶中的芪类化合物能降低高脂小鼠血清和肝脏脂质水平^[1], 对雌激素缺乏导致的大鼠骨质丢失具有改善作用^[2]。木豆叶药材的现行质量标准收载于《广东省中药材标准》2004 年版, 但标准中无定量测定项。为进一步提高药材的质量控制水平, 本研究对海南产木豆叶进行了检测, 对药材进行了性状、显微特征和 TLC 鉴别, 以及有效成分定量等项目研究, 为海南省中药材地方标准的出台提供参考依据。

1 仪器与试药

ZF-1 型三用紫外分析仪, Waters 515 液相色谱系统(Waters 515 泵; 2996PDA 检测器), 美国 Pall 公司 Cascade IX 超纯水器, 日本 Kubota 公司 KR-702 型离心机。牡荆苷对照品由中国药品生物制品检定所提供(批号 111687-200501), 异美五针松双氢黄酮、木豆芪由暨南大学药学院提供(质量分数大于 99%)。乙醇、磷酸为分析纯, 乙腈为色谱纯, 水为超纯水。木豆叶采于海南省万宁市兴隆华侨农场, 由中国医学科学院兴隆分所陈伟平教授鉴定为豆科木豆属植物木豆 *Cajanus cajan* L.。

2 方法与结果

2.1 性状:三出复叶, 互生; 卷缩或半卷缩, 完整叶片展开后呈卵状披针形, 长 5~10 cm, 宽 1~3.5 cm; 托叶小; 叶柄长约 2 cm, 向上渐短; 叶片先端锐尖, 全缘, 上表面绿色或棕褐色; 下表面绿褐色。两

面均被白毛, 下面具有不明显腺点。

2.2 显微特征:横切面, 上下表面细胞类长方形, 外被角质层; 下表皮具稍凸起的气孔。非腺毛下表皮较上表皮多, 由 1~2 个细胞组成, 上部尖; 腺毛偶见, 腺头细胞一个, 较大, 腺柄细胞一个。栅栏组织为 1 列细胞, 偶见两列; 海绵组织疏松。主脉维管束外韧型, 中柱鞘纤维断续成环, 壁木化, 周围细胞含草酸钙方晶, 形成晶纤维。主脉上表皮内侧有数列厚角细胞; 薄壁细胞含草酸钙方晶。

2.3 薄层色谱鉴定:取木豆叶粉末 0.5 g 置 250 mL 圆底烧瓶中, 加 70% 乙醇 50 mL, 回流提取 20 min, 放凉, 滤过, 滤液蒸干, 用 25 mL 甲醇溶解, 得供试品溶液。另取木豆芪、异美五针松双氢黄酮、牡荆苷对照品加甲醇分别配制成质量浓度分别为 0.034、0.61、0.35 mg/mL 的溶液, 作为对照品溶液。照薄层色谱法(《中国药典》2005 年版一部附录 VIB)试验, 分别吸取异美五针松双氢黄酮、牡荆苷对照品溶液各 10 μ L, 木豆芪对照品溶液和供试品溶液各 20 μ L, 分别点于同一羧甲基纤维素钠为黏合剂的硅胶 G 薄层板上, 以甲苯-丙酮-甲醇(6:2:2), 加两滴醋酸为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 365 nm 紫外灯下观察, 供试品与对照品在相同位置有相同的荧光斑点, 见图 1。

2.4 定量测定

2.4.1 对照品溶液的制备:精密称取牡荆苷对照品 3.0 mg、异美五针松双氢黄酮 6.1 mg、木豆芪 3.4 mg, 分别置 10 mL 量瓶中, 甲醇溶解、定容, 作为对照品储备液冷藏保存。依次取上述 3 种对照品溶液

①收稿日期: 2010-03-10

基金项目: 国家科技支撑计划资助项目(2007BA127B06); 海南省自然科学基金资助项目(309030)

作者简介: 张俊清(1964—), 女, 海南医学院药学系教授, 主要从事热带药用植物质量标准研究。

Tel: (0898)66895337 E-mail: 112552819@qq.com

* 通讯作者 刘明生 E-mail: secondmessenger@163.com

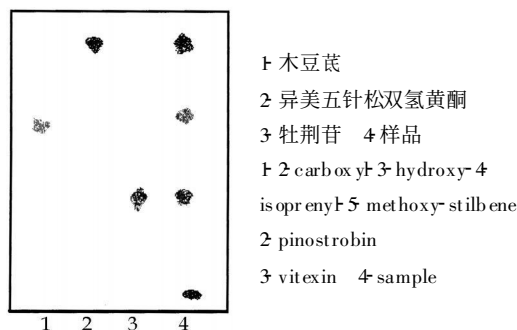


图1 木豆叶薄层色谱图

Fig 1 TLC Chromatogram of *C. cajan* leaves

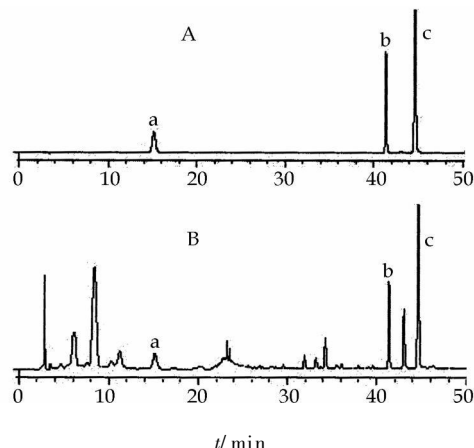
1、2、3 mL 置 10 mL 量瓶中混合, 甲醇定容至刻度, 摇匀得混合对照品溶液。临用前以 0.45 μm 微孔滤膜过滤。

2.4.2 供试品溶液的制备: 精密称取常温减压干燥至恒重的木豆叶细粉 0.5 g, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 70% 乙醇 50 mL, 称定质量, 沸水浴回流提取 20 min, 放冷, 再称定质量, 用 70% 乙醇补足减失的质量, 摇匀, 静置, 吸取上清液, 经 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

2.4.3 色谱系统适用性研究: XTerra C₁₈ 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 0~15 min, 83% A; 15~20 min, 83% A~45% A; 20~30 min, 45% A; 30~35 min, 45% A~30% A; 35~45 min, 30% (A); 体积流量: 1.0 mL/min; 最大吸收波长牡荆苷为 338 nm, 理论塔板数 6000 以上; 异美五针松双氢黄酮为 300 nm, 理论塔板数 10000 以上; 木豆芪为 261 nm, 理论塔板数 10000 以上; 在以上 3 个波长下对应的被测组分分离度均在 1.5 以上, 拖尾因子均小于 1.10, 柱温 40 °C。色谱图见图 2。

2.4.4 线性关系考察: 分别精密吸取混合对照品溶液 4、6、8、10、12、14、16 μL, 进样, 测定。以对照品的量为横坐标, 峰面积为纵坐标, 绘制标准曲线, 牡荆苷、异美五针松双氢黄酮、木豆芪的回归方程依次为: $Y_1 = 2.8 \times 10^6 X - 6.93 \times 10^3$, $r = 0.9999$, 线性范围 0.120~0.480 μg (338 nm); $Y_2 = 4.99 \times 10^6 X - 1.05 \times 10^5$, $r = 0.9999$, 线性范围 0.488~1.952 μg (300 nm); $Y_3 = 5.25 \times 10^6 X - 7.28 \times 10^4$, $r = 0.9999$, 线性范围 0.408~1.632 μg (261 nm)。

2.4.5 精密度试验: 精密吸取混合对照品溶液 10 μL, 重复进样 5 次, 求得峰面积 RSD 分别为牡荆苷 0.55%、异美五针松双氢黄酮 0.67%、木豆芪为 0.62%。



a 牡荆苷 b 异美五针松双氢黄酮 c 木豆芪
a vitexin b pinostrobin c 2-carboxy-3-hydroxy-4-isoprenyl-5-methoxy-stilbene

图2 混合对照品(A)和木豆叶样品(B)的 HPLC 色谱图

Fig 2 HPLC Chromatograms of mixed reference substances (A) and *C. cajan* leaves samples (B)

2.4.6 稳定性试验: 供试品溶液在室温下放置, 按上述色谱条件, 在放置 0、4、8、24 h 进样测定, 进样量为 20 μL, 测定峰面积, 计算牡荆苷、异美五针松双氢黄酮、木豆芪的 RSD 分别为 0.88%、0.50%、1.84%, 说明供试品在 24 h 内稳定性较好。

2.4.7 重现性试验: 取木豆叶粉末 0.5 g, 共 6 份, 制备供试品溶液, 按选定色谱条件各取 20 μL, 测定, 计算质量分数, 结果牡荆苷、异美五针松双氢黄酮、木豆芪的 RSD 分别为 1.31%、1.69%、1.60%。

2.4.8 加样回收率试验: 取上述已知牡荆苷、异美五针松双氢黄酮、木豆芪量的木豆叶粉末 6 份, 每份约 0.125 g, 精密称定, 分别置具塞锥形瓶中, 每组分别加入一定量的对照品溶液, 按供试品溶液制备方法制备, 按选定的色谱条件各取 20 μL 进行测定, 根据测定结果, 计算加样回收率。牡荆苷、异美五针松双氢黄酮、木豆芪平均回收率分别为 99.5%、99.3%、103.7%, RSD 分别为 1.6%、1.4%、2.0%。

2.4.9 样品测定: 精密称取 5 批木豆叶粉末各 0.5 g, 按供试品溶液制备方法制备, 取 20 μL, 进样测定。结果牡荆苷、木豆芪、异美五针松双氢黄酮质量分数分别为 0.114%、0.515%、0.463%, RSD 分别为 1.29%、1.75%、1.97%。

3 讨论

进行定量测定时比较了木豆叶 60%、70%、80% 乙醇超声提取、索氏提取、水浴回流提取 3 种方法后, 确定该供试品最佳提取方法为 70% 乙醇水浴加热回流 20 min。

研究表明木豆叶中异美五针松双氢黄酮、木豆芪的量较高。同时木豆叶中活性成分主要为黄酮类和芪类化合物,所以,选择该 3 种成分作为指标成分具有较好的代表性,本方法选择 3 种主要成分作为木豆叶质量控制指标成分是可行的。

参考文献:

- [1] 骆庆峰,孙 兰,斯建勇,等. 木豆叶 芪类提取物对高脂模型小鼠血脂和肝脏胆固醇的降低作用[J]. 药学学报, 2008, 43(2): 145-149
- [2] 郑元元,杨 京,陈迪华,等. 木豆叶 芪类提取物对雌激素缺乏性大鼠骨质丢失的影响[J]. 药学学报, 2007, 42(5): 562-565

RP-HPLC 法测定鹿衔草中水晶兰苷

赵明波,屠鹏飞*

(北京大学药学院 天然药物及仿生药物国家重点实验室,北京 100191)

摘 要:目的 建立鹿衔草中水晶兰苷的测定方法。方法 采用 RP-HPLC 法,色谱柱为 Agilent Zorbax SB-Aq (250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为甲醇 0.1% 磷酸溶液(5:95),体积流量 1.0 mL/min,检测波长 235 nm,柱温 25 ℃。结果 水晶兰苷在 0.254~5.088 μg 线性良好, $R^2=0.9999$; 平均回收率 97.2%,检测限为 13 ng。结论 该方法稳定可靠,回收率高,可用于鹿衔草的质量控制。

关键词:鹿衔草;水晶兰苷;RP-HPLC

中图分类号:R284.1

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2010)10-1725-02

鹿衔草为《中国药典》一部收载的中药品种,是鹿蹄草科植物鹿蹄草 *Pyrola calliantha* H. Andres 或普通鹿蹄草 *P. decorata* H. Andres 的干燥全草,具有祛风湿、强筋骨、止血等功效^[1]。现代药理学研究表明,鹿衔草对心血管系统有一定的作用,并具有抗菌、抗炎、镇痛等活性^[2]。鹿衔草中主要含有黄酮类、酚类、醌类和环烯醚萜苷类化合物^[2]。水晶兰苷属于环烯醚萜苷类化合物,与其抗炎镇痛作用相关^[3]。目前,对鹿衔草的研究主要集中于黄酮类^[4]、酚苷类^[5]和三萜类^[6]化合物,而环烯醚萜苷类成分的研究未见报道。本实验采用 RP-HPLC 法,建立了鹿衔草中水晶兰苷的测定方法,为鹿衔草的质量控制提供了参考。

1 仪器和试剂

高效液相色谱仪为 Agilent 1100 高效液相色谱仪;四元泵,在线脱气机,自动进样器,柱温箱,二极管阵列检测器,Agilent 1100 化学工作站。乙晴(J. T. Baker, 色谱纯,美国);水为乐百事纯净水;磷酸(分析纯)为北京化工厂;水晶兰苷对照品为实验室自制, HPLC 检查质量分数大于 98% (面积归一化法);鹿衔草药材为各地收集,由北京大学药学院屠鹏飞教授鉴定为鹿蹄草 *Pyrola calliantha* H. Andres 或普通鹿蹄草 *Pyrola decorata* H. Andres 的干燥全草。

2 方法和结果

2.1 色谱条件:Agilent Zorbax SB-Aq 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相:甲醇 0.1% 磷酸溶液(5:95);检测波长:235 nm 体积流量:1.0 mL/min;柱温:25 ℃。

2.2 对照品溶液的制备:精密称取干燥至恒质量的水晶兰苷对照品适量,加甲醇溶解制成 0.25 mg/mL 的溶液,即得。

2.3 供试品溶液的制备:取本品粗粉约 2 g,精密称定,加水 50 mL,称定质量,在 80 ℃水浴中提取 1 h,放冷,称定重量,用水补足减失的质量,滤过,精密量取续滤液 20 mL 减压浓缩至干,残渣加水适量使溶解,转入 5 mL 量瓶中,用水分次洗涤容器,洗涤液并入量瓶中,再加水至刻度,摇匀,即得。

2.4 线性关系考察:取水晶兰苷对照品适量,配制 1.272 mg/mL 对照品溶液,精密吸取 0.4、0.8、1.6、2.4、4.8 mL 置于 10 mL 量瓶中,加水稀释至刻度,配制成不同质量浓度的对照品溶液。精密吸取上述溶液 5 μL 进样,测定峰面积。以质量为横坐标,峰面积为纵坐标作标准曲线。结果表明,水晶兰苷在 0.254~5.088 μg 线性良好,回归方程为 $Y=1106.4X-24381$, $R^2=0.9999$ 。水晶兰苷的检测限为 13 ng(S/N=3)。

2.5 精密度试验:取编号 25 样品,制备供试品溶

①收稿日期:2009-12-27

作者简介:赵明波 北京大学医学部植化教研室 Tel/Fax:(010)82802859 E-mail:zmb_77@163.com