

刺梨叶质量标准研究*

王媛媛¹, 雷艳^{2,3}, 马雪², 刘春花⁴, 黄勇⁴, 王爱民², 李勇军^{2Δ}

(1. 贵州科顿制药有限公司, 贵州 贵阳 550002; 2. 贵州医科大学民族药与中药开发应用教育部工程研究中心, 贵州 贵阳 550004; 3. 贵州医科大学药学院, 贵州 贵阳 550004; 4. 贵州医科大学贵州省药物制剂重点实验室, 贵州 贵阳 550004)

摘要:目的 建立刺梨叶的质量标准。方法 采用薄层色谱法对刺梨叶进行定性鉴别;参照2015年版《中国药典(四部)》标准检测其水分、总灰分和浸出物;采用高效液相色谱法测定刺梨叶中没食子酸含量,色谱柱为 Venusil XBP C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为甲醇-0.5%醋酸溶液(3:97, V:V),流速为1.0 mL/min,柱温为25℃,检测波长为270 nm。结果 薄层色谱斑点清晰,分离度好。没食子酸质量浓度在5.26~99.40 μg/mL范围内与峰面积线性关系良好($r=0.999\ 9$);平均加样回收率为95.59%,RSD为0.23%($n=6$)。结论 该方法简便,结果可靠,重复性好,可用于刺梨叶的质量控制。

关键词:刺梨叶;质量标准;薄层色谱法;高效液相色谱法;没食子酸

中图分类号:R932;R286.0

文献标识码:A

文章编号:1006-4931(2019)13-0036-03

Quality Standard of *Rosa Roxburghii* Leaves

WANG Yuanyuan¹, LEI Yan^{2,3}, MA Xue², LIU Chunhua⁴, HUANG Yong⁴, WANG Aimin², LI Yongjun²

(1. Guizhou Cotton Pharmaceutical Co., Ltd., Guiyang, Guizhou, China 550002; 2. Engineering Research Center for the Development and Application of Ethnic Medicine and TCM <Ministry of Education>, Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou, China 550004; 3. School of Pharmacy, Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou, China 550004; 4. Guizhou Provincial Key Laboratory of Pharmaceutics, Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou, China 550004)

Abstract: Objective To establish a quality standard for *Rosa roxburghii* leaves. **Methods** TLC method was used for qualitative identification of *Rosa roxburghii* leaves. The standards in *Chinese Pharmacopoeia* (2015 edition, volume IV) were adopted for the determination of moisture, total ash and ethanol extract. HPLC method was used for used determination of gallic acid in *Rosa roxburghii* leaves, the chromatographic column was Venusil XBP C₁₈ column (250 mm×4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was methanol-0.5% acetic acid solution (3:97, V:V), the flow rate was 1.0 mL/min, the column temperature was 25℃ and the detection wavelength was 270 nm. **Results** The TLC spots were clear and the degree of separation was good. Gallic acid showed good linear relationship in the range of 5.26~99.4 μg/mL ($r=0.999\ 9$), the average recovery was 95.59% and RSD was 0.23% ($n=6$). **Conclusion** The method is simple, reliable and reproducible, which can be used for quality control of *Rosa roxburghii* leaves.

Key words: *Rosa roxburghii* leaves; quality standard; TLC; HPLC; gallic acid

刺梨叶又称缫丝花叶,为蔷薇科植物缫丝花 *Rosa roxburghii* Tratt. 及单瓣缫丝花 *Rosa roxburghii* Tratt. f. *normalis* Rehd. et Wils. 的干燥叶,收载于2003年版《贵州省中药材、民族药材质量标准》(以下简称《标准》)^[1],其味甘、酸涩,归脾、肾、胃经,用于治疗积食饱胀、疥痛金疮,是小儿消食开胃颗粒的主要药材^[2-4],主要分布于贵州、四川、陕西、甘肃等地亦产^[5]。目前,关于刺梨的研究报道较多^[6-11],但刺梨叶的研究报道较少,且主要集中于化学成分分离和药理活性研究^[12-13],对刺梨叶的质量标准研究尚未见报道,《标准》中也仅见性状描述、简单显色反应及薄层色谱鉴别试验。本研究参考文献^[14-15],重新建立了刺梨叶薄层色谱鉴别方法,并对相关项目进行检查,采用高效液相色谱(HPLC)法

测定了刺梨叶中水解没食子酸含量,可有效控制刺梨叶药材的质量。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Camag Reprostar 3 型薄层数码成像系统(瑞士卡玛公司);EL204 型电子天平(梅特勒-托利多仪器有限公司);CQ-250A-ST 型超声波清洗机(上海跃进医用光学器械厂);WP-UP-II-20 型超纯水机(四川沃特科技发展有限公司);UltiMate 3000 型高效液相色谱仪(包括系统控制器、输液泵、脱气组件、低压梯度组件、自动进样器、柱温箱、温控样品室、MV-VIS 检测器及 Chromeleon 色谱数据工作站);Allegra64R 型台式冷冻离心机(美国贝克曼公司)。

*基金项目:贵州省优秀青年科技人才培养对象项目[黔科合人字(2015)11号];贵州省科技计划项目[黔科合平台人才[2016]5613,黔科合平台人才[2016]5677]。

第一作者:王媛媛,女,执业药师,研究方向为中药质量控制,(电子信箱)1191923986@qq.com。

Δ通信作者:李勇军,男,教授,研究方向为中药药效物质基础及质量控制,(电子信箱)liyongjun026@126.com。

1.2 试药

刺梨叶对照药材(批号为121355-200401)、没食子酸对照品(批号为110831-200302)均购于中国食品药品检定研究院;薄层色谱硅胶板G(青岛海洋化工有限公司);甲醇为色谱纯,水为超纯水,其余试剂均为分析纯;刺梨叶药材共7批,样品为贵州不同地区采收的4批药材和收购的3批药材样品,由贵阳中医学院药学院生药实验室孙庆文教授鉴定为蔷薇科植物缙丝花 *Rosa roxburghii* Tratt. 的干燥叶,具体采收地见表1。

表1 刺梨叶药材信息

序号	样品批号	采收地	序号	样品批号	采收地
1	20170901	贵州安龙(收购)	5	20160824	贵州贵阳(采收)
2	20170806	贵州贵定(收购)	6	20160817	贵州盘县(采收)
3	20161011	贵州晴隆(收购)	7	20160816	贵州盘县(采收)
4	20160825	贵州贵阳(采收)			

2 方法与结果

2.1 薄层色谱鉴别

取样品粉末0.2g,加无水乙醇15mL,超声处理10min,滤过,滤液蒸干,残渣加无水乙醇1mL使其溶解,作为供试品溶液。另取刺梨叶对照药材0.2g,同法制成对照药材溶液。照2015年版《中国药典(四部)》通则0502薄层色谱法试验,吸取上述溶液各3 μ L,分别点于同一硅胶G板上,以石油醚-丙酮(3:1, V:V)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以5%磷钼酸乙醇溶液,于105 $^{\circ}$ C加热至斑点显色清晰。供试品溶液色谱中,在与对照药材溶液色谱相应位置上显相同颜色的斑点,详见图1。

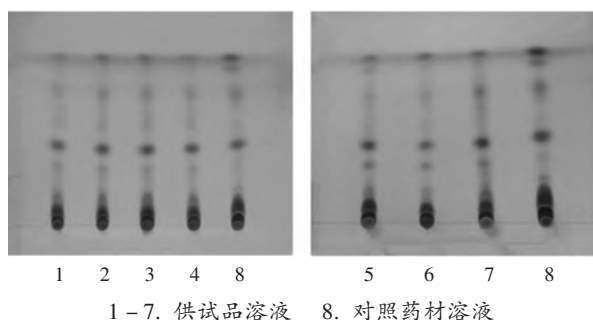


图1 薄层色谱图

2.2 相关项目检查

照2015年版《中国药典(四部)》通则0832第二法中水分测定法、通则2302中总灰分测定法、通则2201中的醇溶性浸出物测定法项下热浸法测定7批刺梨叶药材的水分、总灰分及浸出物,结果见表2。暂定本品水分不超过12.0%,总灰分不超过9.0%,乙醇浸出物不少于15.0%。

2.3 没食子酸含量测定

2.3.1 色谱条件及系统适用性试验

色谱柱: Venusil XBP C₁₈ 柱(250 mm $\times$ 4.6 mm,

表2 刺梨叶水分、总灰分及浸出物测定结果(% , n=7)

序号	批号	水分	总灰分	浸出物
1	20170901	11.28	8.09	16.72
2	20170806	9.21	6.53	19.86
3	20161011	8.83	8.45	17.88
4	20160825	11.27	7.45	15.80
5	20160824	8.86	5.55	23.19
6	20160817	10.19	6.27	20.04
7	20160816	7.84	7.81	18.60
$\bar{X}$		9.64	7.16	18.87

5 μ m);流动相:甲醇-0.5%醋酸溶液(3:97, V:V);流速:1 mL/min;柱温:25 $^{\circ}$ C;检测波长:270 nm;进样量:10 μ L。在此色谱条件下,样品中其他成分与没食子酸分离度良好,色谱图见图2。

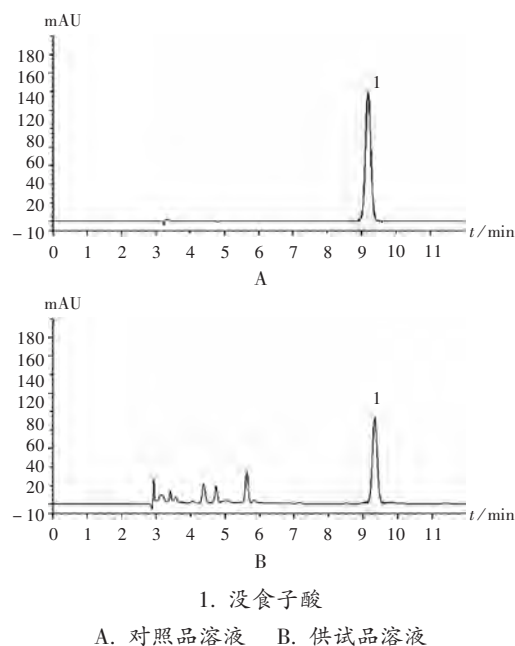


图2 高效液相色谱图

2.3.2 溶液制备

取刺梨叶药材粉末(过3号筛)约0.25g,精密称定,精密加入10%盐酸25mL,称定质量,加热回流1h,放冷,再称定质量,用10%盐酸补足减失的质量,摇匀,滤过,精密吸取续滤液5mL,以水稀释至25mL,离心,去上清液,即得供试品溶液。取没食子酸对照品适量,精密称定,加30%甲醇溶解,制成每1mL含没食子酸0.526mg的溶液,摇匀,即得对照品贮备液,精密量取适量,配制质量浓度为52.60 μ g/mL的对照品溶液。

2.3.3 方法学考察

线性关系考察:分别精密量取对照品贮备液适量,置10mL容量瓶中,用30%甲醇定容,配制质量浓度分别为5.26, 26.30, 52.60, 78.90, 99.40 μ g/mL的系列对照品溶液,依法进样,测定峰面积,以对照品溶液质量

浓度($X, \mu\text{g/mL}$)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程 $Y=0.4811X-0.2064$, $r=0.9999$ ($n=5$)。结果表明,没食子酸质量浓度在 $5.26\sim99.40\mu\text{g/mL}$ 范围内与峰面积线性关系良好。

中间精密度试验:以不同的试验人,在不同时间分别取同一批药材(批号为 20160824)粉末各 0.25 g ,精密称定,制备供试品溶液,分别进样,测定峰面积。结果的 RSD 为 0.66% ($n=6$),表明中间精密度良好。

重复性试验:分别取同一批刺梨叶药材(批号为 20160824)粉末 $0.125, 0.25, 0.50\text{ g}$ 各 3 份,精密称定,制备供试品溶液,分别进样,测定峰面积。结果的 RSD 为 1.21% ($n=9$),表明方法重复性良好。

稳定性试验:精密吸取同一供试品溶液 $10\mu\text{L}$,按拟订色谱条件分别于 $0, 1, 2, 4, 8, 24\text{ h}$ 时进样测定峰面积。结果的 RSD 为 1.33% ($n=6$),表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

加样回收试验:分别取已知含量的 6 份同一批样品(批号为 20160824)粉末各 0.25 g ,精密加入没食子酸对照品,分别进样测定,计算回收率。结果见表 3。

表 3 没食子酸加样回收试验结果($n=6$)

称样量(g)	样品含量(mg)	加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	$\bar{X}$ (%)	RSD (%)
0.1255	1.921	2.042	3.880	95.94	95.59	0.23
0.1257	1.924	2.042	3.874	95.49		
0.1251	1.915	2.042	3.869	95.66		
0.1253	1.918	2.042	3.868	95.46		
0.1257	1.924	2.042	3.871	95.31		
0.1252	1.917	2.042	3.871	95.69		

2.3.4 样品含量测定

精密称取 7 批刺梨叶药材(批号分别为 20170901, 20170806, 20161011, 20160825, 20160824, 20160817, 20160816)适量,按拟订方法制备供试品溶液,依法测定没食子酸含量。结果 7 批样品中没食子酸的含量分别为 $0.85\%, 1.26\%, 0.97\%, 0.91\%, 1.53\%, 1.04\%, 0.86\%$,平均含量为 1.06% 。暂定刺梨叶药材没食子酸含量不得少于 0.80% 。

3 讨论

分别考察了以氯仿-甲醇-甲酸($7:1:0.1, V:V$)、氯仿-乙酸乙酯($50:1, V:V$)和石油醚-丙酮($3:1, V:V$)为展开剂,5%磷钼酸乙醇溶液显色,于 $105\text{ }^\circ\text{C}$ 加热至斑点显色清晰,试验结果表明,以石油醚-丙酮($3:1, V:V$)为展开剂的分离度良好, R_f 值适中,显色清晰,故选择石油醚-丙酮($3:1, V:V$)为展开剂。

分别以 8% 盐酸、10% 盐酸、12% 盐酸为提取溶剂进行考察,分别加热回流提取 1.0 h ,结果表明,10% 盐酸对没食子酸提取率最高,故选择 10% 盐酸作为提取

溶剂。以 10% 盐酸作为提取溶剂,分别加热回流提取 $0.5, 1.0, 2.0\text{ h}$,结果提取时间为 1.0 h 时没食子酸已提取完全,当提取时间继续增加时,提取率不再增加,因此确定提取时间为 1.0 h 。

分别考察了不同色谱柱,ODS-3 柱($250\text{ mm}\times4.6\text{ mm}, 5\mu\text{m}$), Venusil XBP C_{18} 柱($250\text{ mm}\times4.6\text{ mm}, 5\mu\text{m}$), Luna C_{18} 柱($250\text{ mm}\times4.6\text{ mm}, 5\mu\text{m}$);不同流速,如 $0.90\text{ mL/min}, 1.0\text{ mL/min}, 1.1\text{ mL/min}$;不同柱温,如 $22, 25, 28\text{ }^\circ\text{C}$ 。结果显示,在上述条件下,供试品溶液中,在与对照品溶液相同时间的出峰一致,综合考虑分离度、理论板数及出峰时间等因素的影响,发现以甲醇-0.5% 醋酸溶液($3:97, V:V$)为流动相,柱温为 $25\text{ }^\circ\text{C}$ 时,没食子酸与其他组分的分离度良好。另外,在测定没食子酸的紫外吸收光谱图时发现,在 270 nm 波长处有最大吸收,故以此为检测波长。

参考文献:

- [1] 贵州省药品监督管理局. 贵州省中药材、民族药材质量标准(2003 年版)[M]. 贵阳:贵州科技出版社,2003:231,499.
- [2] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志(第 37 卷)[M]. 北京:科学出版社,1985:452.
- [3] 邱德文,杜江,夏同珩. 中华本草苗药卷彩色图谱[M]. 北京:中医古籍出版社,2006:227.
- [4] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草(苗药卷)[M]. 贵阳:贵州科技出版社,2005:222.
- [5] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草(第四册)[M]. 上海:上海科学技术出版社,1999:235.
- [6] 王慧竹. 刺梨有效成分分析及其体外生物活性研究[D]. 吉林:吉林大学,2018.
- [7] 侯璐,钱和. 高效液相色谱法测定刺梨中维生素 C 的含量[J]. 食品工业科技,2009,30(8):311-313.
- [8] 吕佳敏,刘同亭,田璞. 刺梨的主要医学功效及应用研究进展[J]. 实用医药杂志,2018,35(4):370-372.
- [9] 许梦捷,李祖望,李祯鑫,等. 刺梨不同提取成分对 B16 细胞增殖及酪氨酸酶活性的影响[J]. 浙江中医药大学学报,2018,42(11):883-889.
- [10] 李志. 正交试验法优化刺梨黄酮提取工艺研究[J]. 云南师范大学学报(自然科学版),2018,38(6):40-45.
- [11] 夏仕青,张爱华. 刺梨的营养保健功能及其开发利用研究进展[J]. 贵州医科大学学报,2018,43(10):1129-1132.
- [12] 李福明,汪洋,韦敏. 刺梨叶醇提物体外抗氧化活性和 α -葡萄糖苷酶抑制活性研究[J]. 中国现代应用药学,2015,32(6):685-688.
- [13] 孙兆峰,张霞,夏作理. 刺梨叶对 2 型糖尿病大鼠脂代谢的影响[J]. 社区医学杂志,2015,13(10):53-55.
- [14] 韩越,邹恺平,周琴妹,等. 叶下珠饮片质量标准研究[J]. 中国药业,2017,26(10):14-17.
- [15] 王刚,陈向东,罗海龙,等. 垂葇酒肝丸质量标准研究[J]. 中国药业,2018,27(9):13-16.

(收稿日期:2019-01-09)