

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2020.13.013

不同产地五灵脂质量研究*

李筱婧¹,汪晶^{1,2},江阿古丽·艾山³,韦英杰^{1,2},许欢¹,黄一平^{1,2},江安³,陈斌^{1,2,Δ}

(1. 南京中医药大学第三临床医学院·附属省中西医结合医院,江苏南京 210028; 2. 江苏省中医药研究院·国家中医药管理局中药释药系统重点实验室,江苏南京 210028; 3. 新疆维吾尔自治区伊犁哈萨克自治州中医医院,新疆伊犁 835000)

摘要:目的 建立五灵脂药材的质量控制方法,比较不同产地12批五灵脂药材的质量。方法 按2015年版《中国药典(四部)》通则方法测定五灵脂药材中水分及浸出物含量,采用薄层色谱法定性鉴别五灵脂中的穗花杉双黄酮,采用高效液相色谱法测定不同产地五灵脂药材中穗花杉双黄酮的含量。结果 市售不同产地12批五灵脂药材水分含量为5.11%~10.83%;醇溶性浸出物含量为8.13%~11.20%;五灵脂中穗花杉双黄酮的薄层色谱图斑点清晰、分离较好、方法简便;穗花杉双黄酮含量为0.035%~0.050%。结论 该方法操作简便高效,快速稳定,可用于五灵脂药材的质量控制。测定穗花杉双黄酮的含量有利于五灵脂药材的质量控制,可为其进一步的开发利用提供理论依据。

关键词:五灵脂;穗花杉双黄酮;水分;浸出物;薄层色谱法;高效液相色谱法

中图分类号:R932;R284.1;R286.0

文献标识码:A

文章编号:1006-4931(2020)13-0047-04

Quality Research of *Faeces Troglodyter* from Different Areas

LI Xiaojing¹, WANG Jing^{1,2}, JANAGUL AS³, WEI Yingjie^{1,2}, XU Huan¹, HUANG Yiping^{1,2}, JIANG An³, CHEN Bin^{1,2}

(1. The Third Clinical Medical College of Nanjing University of Chinese Medicine · Affiliated Provincial Hospital of Integrated Traditional Chinese Medicine and Western Medicine, Nanjing, Jiangsu, China 210028; 2. Jiangsu Province Academy of Traditional Chinese Medicine, Key Laboratory for Traditional Chinese Medicine Drug Release System Under State Administration of Traditional Chinese Medicine, Nanjing, Jiangsu, China 210028;

3. Xinjiang Yili Kazakh Autonomous Prefecture Hospital of Traditional Chinese Medicine, Yili, Xinjiang, China 835000)

Abstract: Objective To establish the quality control method of *Faeces troglodyteri* medicinal materials and compare the quality of 12 batches of *Faeces troglodyteri* from different areas. **Methods** The content of moisture and extract in *Faeces troglodyteri* was determined according to the method of the general rules of the *Chinese Pharmacopoeia*(2015); the amentoflavone in *Faeces troglodyteri* was identified by thin layer chromatography(TLC); the content of amentoflavone in *Faeces troglodyteri* from different areas was determined by high performance liquid chromatography(HPLC). **Results** The moisture content of 12 batches of *Faeces troglodyteri* in different areas ranged from 5.11% to 10.83%; the content of ethanol-soluble extractives ranged from 8.13% to 11.20%; the TLC results of amentoflavone in *Faeces troglodyteri* from different areas were clear, the separation was better, and the method was simple; the content of amentoflavone in *Faeces troglodyteri* from different areas ranged from 0.035% to 0.050%. **Conclusion** The method is simple, efficient, fast and stable, and can be used for quality control of *Faeces troglodyteri*. Determining the content of flavonoids is conducive to the quality control of *Faeces troglodyteri* medicinal materials and can provide a theoretical basis for its further development and utilization.

Key words: *Faeces troglodyteri*; amentoflavone; moisture; extract; thin layer chromatography; high performance liquid chromatography

*基金项目:江苏省医学创新团队项目[CXTDB2017003];江苏省研究生培养创新工程项目[SJCX19_0375];江苏省中医药研究院战略合作课题[H201802]。

第一作者:李筱婧,女,在读硕士研究生,研究方向为中药检验与分析,(电子信箱)369820425@qq.com。

Δ通信作者:陈斌,男,博士研究生,研究员,研究方向为中药物质基础和炮制,(电子信箱)jeromechen@126.com。

- Journal of Endocrinological Investigation, 2016, 39(9): 983-990.
- [9] SHI L, ZHANG J, LAI Z, et al. Long-Term Moderate Oxidative Stress Decreased Ovarian Reproductive Function by Reducing Follicle Quality and Progesterone Production[J]. PLoS One, 2016, 11(9): 115-123.
- [10] AGARWAL A, GUPTA RS, SHARMA K. Role of oxidative stress in female reproduction[J]. Reprod Biol Endocrinol, 2005, 3(28): 1123-1129.
- [11] AHANGARPOUR A, NAJIMI SA, FARBOOD Y. Effects of Vitex agnus-castus fruit on sex hormones and antioxidant indices in a d-galactose-induced aging female mouse model[J]. J Chin Med Assoc, 2016, 79(11): 589-596.
- [12] GUPTA S, AHMAD G, TRAN M, et al. Oxidative Stress in Human Reproduction[M]. Berlin: Springer International Publishing, 2017: 107-127.
- [13] PARAMESHWARAN K, IRWIN MH, STELIOU K, et al. D-galactose effectiveness in modeling aging and therapeutic antioxidant treatment in mice[J]. Rejuvenation Res, 2010, 13(6): 729-735.
- [14] 钟灵,王振富,文德鉴. 黄芪多糖抗衰老作用的实验研究[J]. 中国应用生理学杂志, 2013, 29(4): 350-352.
- [15] LI XT, ZHANG YK, KUANG HX, et al. Mitochondrial protection and anti-aging activity of *Astragalus polysaccharides* and their potential mechanism[J]. Int J Mol Sci, 2012, 13(2): 1747-1761.
- [16] TAMURA H, KAWAMOTO M, SATO S, et al. Long-term melatonin treatment delays ovarian aging[J]. J Pineal Res, 2017, 62(2): 1238-1251.
- [17] MATOS L, STEVENSON D, GOMES F, et al. Superoxide dismutase expression in human cumulus oophorus cells[J]. Mol Hum Reprod, 2009, 15(7): 411-419.

(收稿日期:2019-12-25)

五灵脂 *Faecestrogopteron* 为鼯鼠科动物复齿鼯鼠 *Trogopterus xanthipes* Milne - Edwards 的干燥粪便, 又名药本、寒号虫粪、灵脂等, 主产于河北、山西、陕西、内蒙古、吉林、新疆等地。其全年均可采收, 除去杂质, 晒干, 味咸、甘, 性温, 归肝经, 具有活血、化瘀、止痛功效, 主治胸胁或脘腹刺痛、痛经、经闭、产后血瘀疼痛、跌扑肿痛、蛇虫咬伤^[1-8]。其主要化学成分有黄酮类、三萜类、苷类、有机酸等^[9], 其中最主要的双黄酮类成分是穗花杉双黄酮(amentoflavone)。目前, 国内外对穗花杉双黄酮的抗炎、抗氧化、抗病毒、抗肿瘤、抗微生物、降血糖、扩张血管等多种药理作用均有研究^[10-13]。由于穗花杉双黄酮的显著药理活性与五灵脂的中医临床功效相符, 故国内外正开展一系列新药开发研究。但 1990 年版《中国药典(一部)》仅记载了五灵脂的性状、炮制、性味、功能、主治等项目, 2015 年版《陕西省药材标准》中记载了其薄层鉴别法, 目前并未制订五灵脂药材的含量限度, 相关法定药材标准仍不完善。本研究中对不同产地五灵脂的水分及浸出物含量、穗花杉双黄酮进行薄层鉴别和含量测定^[14-15]进行了研究, 为五灵脂药材的质量控制和进一步开发利用提供参考。现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Agilent 1260 型高效液相色谱仪(包括四元泵、在线脱气机、自动进样器、DAD 检测器和色谱工作站, 美国 Agilent 公司); MT5 型电子天平(瑞士 Mettler Toledo 公司, 精度为百万分之一); ZF-90D 型暗箱式紫外分析仪(上海广豪分析仪器有限公司)。

1.2 试药

穗花杉双黄酮对照品(批号为 111902-201603, 中国食品药品检定研究院); 甲醇、磷酸均为色谱纯; 其他试剂均为分析纯; 水为超纯水; 五灵脂样品经江苏省中医药研究院黄一平研究员鉴定为鼯鼠科动物复齿鼯鼠 *Trogopterus xanthipes* Milne - Edwards 的干燥粪便, 其他信息详见表 1。

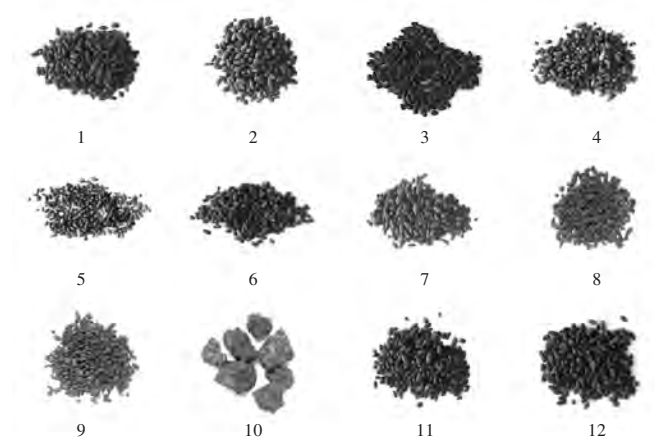
2 方法与结果

2.1 性状鉴别

根据外形不同, 五灵脂分为灵脂米和灵脂块, 常用产地中大部分为灵脂米, 新疆产五灵脂多为灵脂块, 详见图 1。灵脂米为长椭圆形颗粒, 长 0.5~1.5 cm, 直径 3~5 mm, 表面颜色为黄棕色至黑棕色不等, 表面微粗糙, 可见淡黄色的纤维, 有的略平滑具光泽; 质轻, 易折断, 断面黄绿色或棕褐色, 纤维性; 气微, 详见样品 1~9, 11~12。灵脂块为不规则的块状, 大小不一, 表面黑棕色, 凹凸不平, 断面黄棕色或棕褐色, 间或有黄棕色树脂状物质, 质硬, 气腥臭, 详见样品 10。

表 1 不同产地五灵脂药材水分、浸出物含量测定结果
($\bar{X} \pm s, \%, n=3$)

编号	产地	批号	水分	浸出物
1	内蒙古	190102341	6.63 ± 0.21	9.26 ± 0.15
2	吉林	20190313	8.55 ± 0.16	10.01 ± 0.11
3	湖北	150524	6.63 ± 0.23	11.20 ± 0.12
4	广东	20190515	6.85 ± 0.20	9.97 ± 0.05
5	广东	20190585	7.26 ± 0.09	8.94 ± 0.09
6	山西	20190313	7.52 ± 0.13	9.73 ± 0.08
7	山西	20190301	5.36 ± 0.05	9.54 ± 0.10
8	陕西	1903001	5.99 ± 0.03	10.23 ± 0.22
9	陕西	1903021	7.20 ± 0.13	11.07 ± 0.23
10	新疆	180501	10.83 ± 0.13	8.13 ± 0.09
11	河北	180508	5.11 ± 0.17	10.61 ± 0.18
12	河北	190301	5.66 ± 0.32	10.53 ± 0.25



注: 1-12 为样品产地编号, 详见表 1。

图 1 五灵脂药材样品性状

2.2 水分测定

参照 2015 年版《中国药典(四部)》通则 0832 水分测定法中第二法(烘干法)^[15], 对 12 批样品进行水分测定。取样品粉末约 2 g, 平铺于干燥至恒重的扁形称量瓶中, 精密称定, 开启瓶盖在 100~105 °C 干燥 5 h, 盖好瓶盖, 移置干燥器中, 放冷 30 min, 精密称定质量, 100~105 °C 干燥 1 h, 放冷, 称定质量, 至连续 2 次称定质量的差异不超过 5 mg 为止, 根据减失的质量, 计算药材中含水量(%)。结果药材含水量为 5.11%~10.83%, 详见表 1。

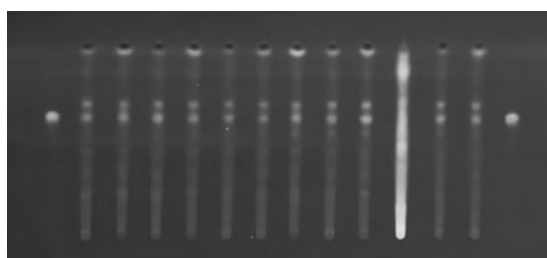
2.3 浸出物测定

参照 2015 年版《中国药典(四部)》通则 2201 浸出物测定法^[15]。以 20% 乙醇为溶剂, 对 12 批样品的浸出物含量进行测定。取样品粉末, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 加 20% 乙醇 50 mL, 密塞, 称定质量, 静置 1 h, 加热回流 1 h, 放冷后, 再称定质量, 用 20% 乙醇补足减失的质量, 摇匀, 过滤, 量取滤液 25 mL, 置蒸发皿中, 水浴蒸干, 于 105 °C 干燥 3 h, 置干燥器中冷却 30 min, 称定质量。结

果醇溶性浸出物含量为 8.13% ~ 11.20%, 详见表 1。

2.4 薄层色谱鉴别

取药材粉末约 1 g, 置具塞锥形瓶中, 加 50 mL 90% 甲醇, 加热回流 30 min, 放冷, 静置, 取上清液滤过, 取滤液 25 mL, 蒸干, 加 2 mL 甲醇溶解残渣, 作为供试品溶液。另取穗花杉双黄酮对照品, 加甲醇制成每 1 mL 含 0.2 mg 穗花杉双黄酮的溶液, 作为对照品溶液。照薄层色谱法(通则 0502)试验, 吸取供试品溶液 3 μ L, 对照品溶液 1 μ L, 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 以异丙醇-浓氨-水(13:1:1, V/V/V)为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 喷以 5% 三氯化铝甲醇溶液, 置紫外光灯(365 nm)下检视。结果见图 2。



S. 穗花杉双黄酮对照品溶液 1-12. 供试品溶液

图2 五灵脂薄层色谱图

2.5 含量测定

2.5.1 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱: X-bridge C₁₈ 柱(250 mm × 4.60 mm, 5 μ m); 流动相: 甲醇-0.1% 磷酸(60:40, V/V); 流速: 1.0 mL/min; 柱温: 25 $^{\circ}$ C; 检测波长: 330 nm; 进样量: 10 μ L。理论板数按穗花杉双黄酮峰计应不低于 3 000。

2.5.2 溶液制备

取穗花杉双黄酮对照品 2 mg, 精密称定, 置 10 mL 容量瓶中, 加甲醇溶解, 定容, 制成每 1 mL 含穗花杉双黄酮 202.6 μ g 的溶液, 即得对照品溶液。取五灵脂药材粉末 1 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 90% 甲醇 50 mL, 称定质量, 加热回流 30 min, 放冷, 再称定质量, 用 90% 甲醇补足缺失的质量, 摇匀, 滤过, 经微孔滤膜

(0.45 μ m) 滤过, 即得供试品溶液。

2.5.3 方法学考察

专属性试验: 取对照品溶液、供试品溶液和空白溶剂, 按拟订色谱条件进样测定, 记录色谱图, 详见图 3。在该色谱条件下, 该成分达到基线分离, 分离度大于 1.5, 理论板数大于 3 000; 供试品溶液色谱峰紫外吸收光谱与对照品溶液完全一致, 表明其他成分对测定无干扰。

线性关系考察: 取 2.5.2 项下对照品溶液适量, 配制成质量浓度为 2.026, 4.052, 8.104, 10.130, 16.208 μ g/mL 的系列标准溶液。按拟订色谱条件分别进样 10 μ L, 以质量浓度(X, μ 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 $Y = 40.145X - 5.5133$, $R = 0.9999$ 。结果表明, 穗花杉双黄酮质量浓度在 2.026 ~ 16.208 μ g/mL 范围内与峰面积线性关系良好。

精密度试验: 取适量同一对照品溶液, 按拟订色谱条件测定, 连续进样 6 次。结果穗花杉双黄酮峰面积的 RSD 为 0.31% ($n = 6$), 表明仪器的精密度良好。

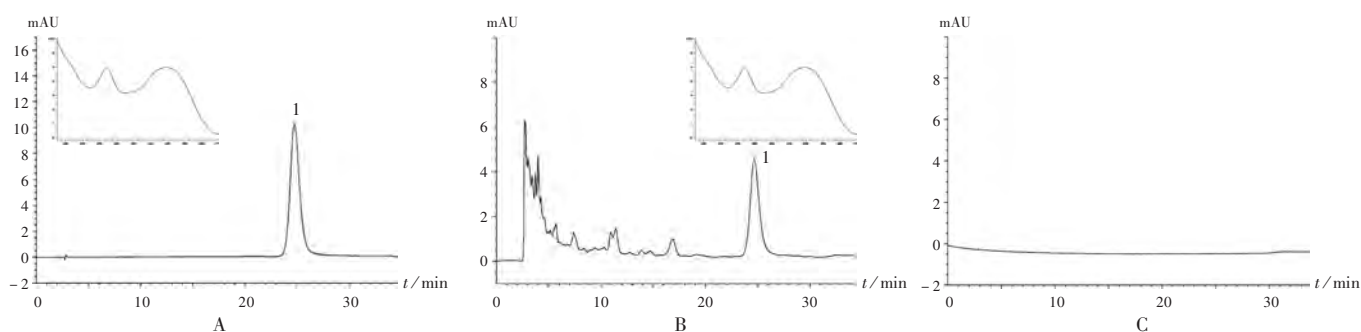
重复性试验: 取 12 号产地为河北的五灵脂药材粉末 6 份, 精密称定, 依法制备供试品溶液, 按拟订色谱条件进样测定。结果穗花杉双黄酮含量的 RSD 为 0.65% ($n = 6$), 表明方法的重复性良好。

稳定性试验: 取适量样品(批号为 190301), 依法制备供试品溶液, 按拟订色谱条件分别于 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 时进样测定。结果穗花杉双黄酮含量的 RSD 为 0.70% ($n = 6$), 表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

加样回收试验: 取已知含量的药材粉末 0.5 g, 精密称定, 分别加入适量穗花杉双黄酮对照品溶液, 依法制备供试品溶液, 按拟订色谱条件进样测定, 计算加样回收率。结果见表 2。

2.5.4 样品含量测定

取 12 批样品粉末各 1 g, 精密称定, 依法制备供试品溶液, 按拟订色谱条件进样测定, 计算含量。结果见表 3。



1. 穗花杉双黄酮

A. 穗花杉双黄酮对照品溶液 B. 五灵脂供试品溶液 C. 空白溶剂

图3 高效液相色谱图及紫外吸收光谱图

表2 穗花杉双黄酮加样回收试验($n=6$)

取样量(g)	样品含量(μg)	加入量(μg)	测得量(μg)	回收率(%)	$\bar{X}$ (%)	RSD(%)
0.5558	187.74	182.34	368.43	99.10	100.97	1.73
0.5575	188.31	182.34	373.78	101.72		
0.5562	187.87	182.34	376.02	103.19		
0.5568	188.07	182.34	369.55	99.53		
0.5592	188.88	182.34	370.67	99.70		
0.5517	186.35	182.34	373.41	102.59		

表3 不同产地五灵脂药材穗花杉双黄酮含量测定结果(%)

产地	含量	产地	含量
内蒙古	0.039	山西	0.036
吉林	0.036	陕西	0.050
湖北	0.040	陕西	0.036
广东	0.039	新疆	-
广东	0.035	河北	0.038
山西	0.041	河北	0.038

注:“-”为未检出。

3 讨论

本研究中样品来自各地方药店及中药饮片厂,可较真实全面地反映临床实际应用中五灵脂的质量。12批五灵脂中2批产自广东,2批产自山西,2批产自陕西,2批产自河北,其余分别产自内蒙古、吉林、湖北、新疆,合计8个产地,包括灵脂米与灵脂块2种类别。中药材中含水量超出一定范围就会直接影响药材的质量,易出现虫害、霉变、潮解等变质现象;浸出物含量是反映药材的内在质量,确保其疗效确切、质量可靠的重要指标,故本研究中对不同产地五灵脂药材的水分及浸出物含量进行了测定。

本研究中对五灵脂中穗花杉双黄酮的薄层色谱鉴别进行了改进,多数文献中对五灵脂中穗花杉双黄酮的薄层鉴别均使用聚酰胺薄膜及二氯甲烷-甲醇展开剂系统,聚酰胺薄膜不易操作,斑点拖尾,展开效果较差,重复性不好。本研究中考察了硅胶G、硅胶GF、聚酰胺薄膜等,确定了硅胶G板为首选;考察了二氯甲烷-甲醇、乙醇-水、正丁醇-醋酸-水系统及异丙醇-浓氨-水展开系统,通过比较发现,异丙醇-浓氨-水展开系统的展开效果较好。该方法操作简便,斑点清晰,且高效、快速、简便,较其他方法更合理。

本研究中考察了冷浸、超声及回流的提取方式,以及不同的提取溶剂(乙醇、甲醇、90%甲醇和80%甲醇),不同提取时间及提取次数,最终确定了90%甲醇加热回流30 min为最佳提取方法。分别考察了不同流速(0.8, 1.0, 1.2 mL/min)及不同柱温(20, 25, 30℃),结果在上述色谱条件下,供试品溶液与对照品溶液相同时间出峰一致,综合分离度及峰形等因素最终选定

流动相为甲醇-0.1%磷酸(60:40, V/V),流速为1.0 mL/min,柱温为25℃。此外,在测定穗花杉双黄酮对照品的紫外吸收光谱图时发现,在330 nm波长处有最大吸收,故以此为检测波长。

通过对12批样品薄层鉴别及含量测定发现,除产地为新疆的五灵脂块外,其他批次药材均含有穗花杉双黄酮,含量在0.035%~0.050%。考虑灵脂块是复齿鼯鼠粪便与尿液的混合物夹以少量砂石干燥凝结而成,成分较灵脂米有差异,有待深入研究。市售临床常用五灵脂饮片均为灵脂米,故穗花杉双黄酮的测定有利于五灵脂药材的质量控制,可为其进一步开发利用提供参考。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 1990:50.
- [2] 邱清华, 邓绍云. 五灵脂化学成分与药用研究进展[J]. 江苏科技信息, 2015(11):76-78.
- [3] 陈雪琴, 贾文江, 周仔莉, 等. 五灵脂的质量标准研究[J]. 西北药学杂志, 2019, 34(4):469-473.
- [4] 陈莹, 聂晶, 龙小艳, 等. 五灵脂炮制前后指纹图谱及含量测定比较[J]. 世界中医药, 2018, 13(12):3182-3185.
- [5] 吕金朋, 阿斯亚·巴拉提, 帕热依哈·巴合提汗, 等. 哈萨克族医药学发展及其代表性动物药材研究进展[J]. 吉林中医药, 2018, 38(12):1415-1417.
- [6] 额尔灯毕力格, 马·额尔敦. 蒙医不同文献中记载五灵脂九味的差异[J]. 中国民族医药杂志, 2018, 24(11):44-45.
- [7] 朱家红, 杨勇, 周永, 等. 五灵脂中两个黄酮成分的提取分离与薄层色谱鉴别[J]. 临床医药文献电子杂志, 2019, 6(39):178.
- [8] 玛依努尔·叶尔肯别克, 阿热艾·哈里木哈克, 江阿古丽·艾山, 等. 哈萨克药炮制现代化探讨[J]. 中华中医药杂志, 2018, 33(7):3162-3165.
- [9] 李沐森, 郭文场, 刘佳贺. 复齿鼯鼠的分布、形态及五灵脂的采收方法和药理作用[J]. 特种经济动植物, 2017, 20(2):4-7.
- [10] 王秋月, 王菊勇, 贾方, 等. 深绿卷柏提取物穗花杉双黄酮抗癌活性研究进展[J]. 中南药学, 2019, 17(10):1734-1737.
- [11] 陈燕, 李倩, 李晨阳, 等. 不同产地、不同采收期新疆圆柏叶中穗花杉双黄酮的含量测定[J]. 新疆医科大学学报, 2017, 40(3):369-371.
- [12] 谭晓亮, 李瑞海. HPLC法同时测定侧柏叶、侧柏炭中的7种成分[J]. 中成药, 2015, 37(12):2715-2718.
- [13] 王彦志, 张萌, 刘阳, 等. 穗花杉双黄酮在大鼠体内的药动学研究[J]. 中成药, 2015, 37(11):2397-2401.
- [14] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015:300.
- [15] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(四部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015:202-203.

(收稿日期:2019-12-20)