

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2022.11.017

黄牛木叶质量标准提升研究*

刘特津¹, 辛晓芳¹, 曾繁伟²

(1. 广东省中山市中医院, 广东 中山 528401; 2. 广东药科大学, 广东 中山 528401)

摘要:目的 建立定性鉴别黄牛木叶和测定其总黄酮及芒果苷含量的方法。方法 采用薄层色谱法对黄牛木叶进行定性鉴别;以芦丁为对照品,采用紫外分光光度计于510 nm波长处测定黄牛木叶中总黄酮含量;采用高效液相色谱法测定黄牛木叶中芒果苷含量,色谱柱为Agilent C₁₈柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为乙腈-0.1%冰醋酸水溶液(15:85, V/V),流速为1.0 mL/min,检测波长为258 nm,柱温为25℃,进样量为10 μL。结果 薄层色谱斑点清晰,分离度良好。紫外分光光度法中,芦丁的质量浓度在0.020 4~0.102 0 mg/mL范围内与吸光度线性关系良好($r=0.999\ 0, n=5$),平均加样回收率为102.88%,RSD为1.11%($n=6$);高效液相色谱法中,芒果苷的质量浓度在13.00~130.00 μg/mL范围内与峰面积线性关系良好($r=0.999\ 4, n=6$),平均加样回收率为101.10%,RSD为2.55%($n=9$)。2种方法精密度和重复性试验的RSD均小于5.0%($n=6$)。结论 所建立的方法简便、准确、重复性好,可用于黄牛木叶的质量控制。

关键词:黄牛木叶;总黄酮;芒果苷;高效液相色谱法;薄层色谱法;紫外分光光度法

中图分类号:R932;R284.1;R286.0

文献标志码:A

文章编号:1006-4931(2022)11-0066-04

Improvement of Quality Standard of Leaves of *Cratoxylum Cochinchinense*

LIU Tejin¹, XIN Xiaofang¹, ZENG Fanwei²

(1. Zhongshan Hospital of Traditional Chinese Medicine, Zhongshan, Guangdong, China 528401; 2. Guangdong Pharmaceutical University, Zhongshan, Guangdong, China 528401)

Abstract: Objective To establish methods for the qualitative identification of leaves of *Cratoxylum cochinchinense* and the content determination of total flavonoids and mangiferin in the leaves of *Cratoxylum cochinchinense*. **Methods** Leaves of *Cratoxylum cochinchinense* were identified qualitatively by the thin-layer chromatography (TLC) method. The content of total flavonoids in the leaves of *Cratoxylum cochinchinense* was determined by the ultraviolet (UV) spectrophotometer at 510 nm with rutin as the reference substance. The content of mangiferin in the leaves of *Cratoxylum cochinchinense* was determined by the high-performance liquid chromatography (HPLC) method. The chromatographic column was Agilent C₁₈ column (250 mm×4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was acetonitrile-0.1% glacial acetic acid aqueous solution (15:85, V/V), the flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelength was 258 nm, the column temperature was 25℃ and the injection volume was 10 μL. **Results** The TLC chromatograms had clear spots and good separation. In the UV spectrophotometry method, the mass concentration of rutin had a good linear relationship with the absorbance in the range of 0.020 4-0.102 0 mg/mL ($r=0.999\ 0, n=5$), and the average recovery of rutin was 102.88% with an RSD of 1.11% ($n=6$). In the HPLC method, the mass concentration of mangiferin had a good linear relationship with the peak area in the range of 13.00-130.00 μg/mL ($r=0.999\ 4, n=6$), and the average recovery of mangiferin was 101.10% with an RSD of 2.55% ($n=9$). The RSDs of the precision and repeatability tests of the UV spectrophotometry and HPLC methods were less than 5.0% ($n=6$). **Conclusion** The established methods are simple, accurate and reproducible, which can be used for the quality control of leaves of *Cratoxylum cochinchinense*.

Key words: leaves of *Cratoxylum cochinchinense*; total flavonoids; mangiferin; HPLC; TLC; UV spectrophotometry

*基金项目:国家中医药管理局中药特色技术传承人才培养项目[国中医药人教函[2018]204号];广东省中医药管理局面上科研项目[20211421];广东省中山市科学技术局社会公益与基础研究项目[2020B1109]。

第一作者:刘特津,大学本科,副主任中药师,研究方向为中药鉴定与中药质量控制,(电子信箱)358979819@qq.com。

- 196-198.
- [10] 范书军,朱显峰,余晨晨,等. 分光光度法测定蜜环菌菌粉中甘露醇的含量[J]. 食品科技,2011,36(7):283-284.
- [11] 刘杰,周玲玲,王胜,等. HPLC法测定甘露醇及甘露醇注射液的有关物质[J]. 药学研究,2018,37(10):580-582.
- [12] 许丽卫,陈闻,耿梅梅,等. 气相色谱-质谱联用法测定山羊血浆中甘露醇和乳果糖含量[J]. 动物营养学报,2020,32(6):2824-2830.
- [13] 陈伟珠,晋文慧,张怡评,等. 离子色谱法测定海带中甘露醇的含量[J]. 食品安全质量检测学报,2021,12(3):914-918.
- [14] 于飞,郭建亭. 液相色谱检测仪器示差折光率检测器不确定度评定及影响因素[J]. 现代商贸工业,2020,41(23):158-159.
- [15] 冯鑫,程睿,王珮玥,等. 电喷雾检测器、蒸发光散射检测器与示差折光检测器测定食品中5种糖成分的方法比较[J]. 食品安全质量检测学报,2021,12(4):1513-1518.
- [16] 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,2020:61.
- [17] 施磊,马宇佳,金燕. 电雾式检测器的应用进展[J]. 国际药学研究杂志,2020,47(7):514-521.
- [18] 梁慧敏,欧妮. 高效液相色谱-电喷雾检测器测定贞芪扶正颗粒中黄芪甲苷含量[J]. 中国药业,2016,25(5):55-57.

(收稿日期:2021-08-12;修回日期:2021-11-23)

黄牛木来源于藤黄科黄牛木属的黄牛木 *Cratoxylum cochinchinense* (Lour.) Blume, 以根、茎皮或叶入药, 为岭南地区特色中草药, 多见于广东、广西、海南等地^[1]。黄牛木具有清热解表、消滞化湿、消肿、止血、去毒等功效, 主要用于治疗泄泻、腹痛、感冒发热、咳嗽嘶嘶、肝著、黄疸病等症^[2-4]。《广西壮族自治区壮药质量标准: 第二卷(2011年版)》^[5]仅对黄牛木叶的性状鉴别、浸出物等项进行了规定, 标准简单, 不能满足对黄牛木叶质量控制的要求。黄牛木叶含有多种黄酮类成分, 具有抗菌、抗氧化自由基、保肝护肝等活性^[6-8]。本研究中采用薄层色谱法对黄牛木叶进行定性鉴别, 采用紫外分光光度法测定黄牛木叶中总黄酮含量^[9-11], 采用高效液相色谱法测定黄牛木叶中芒果苷含量^[12]。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(美国安捷伦公司); UV-2550 型紫外分光光度计(日本岛津公司); JJ200 型电子天平(常熟市双杰测试仪器厂, 精度为百分之一); BS224S 型电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司, 精度为万分之一); CH1006 型电热恒温槽(上海衡平仪表厂); KQ5200E 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司, 功率为 200 W, 频率为 40 kHz)。

1.2 试药

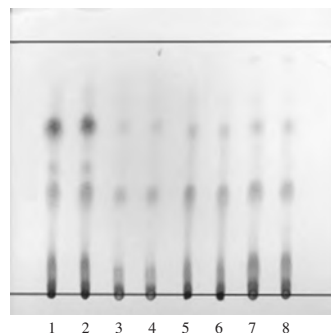
黄牛木叶(样品 1, 中山市同心药业有限公司, 批号为 20210201; 样品 2, 国药集团冯了性 < 佛山 > 药材饮片有限公司, 批号为 20201106; 样品 3, 广州康圣药业有限公司, 批号为 20201101); 黄牛木叶对照药材(上海鸿永生物科技有限公司, 批号为 280102-202006); 芦丁对照品(批号为 100080-201811, 纯度为 92.4%), 芒果苷对照品(批号为 111607-201704, 纯度为 98.1%), 均购自中国食品药品检定研究院; 甲醇、乙腈(色谱纯, 德国默克公司); 其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 薄层色谱鉴别

取不同批号(批号分别为 20210201 < 样品 1 >, 20201106 < 样品 2 >, 20201101 < 样品 3 >) 的黄牛木叶粉末各 2 g, 加甲醇 30 mL, 浸泡 0.5 h, 水浴加热回流 30 min, 用滤纸滤过, 滤液在通风橱内水浴蒸干, 再加蒸馏水 15 mL 使充分溶解, 滤过, 滤液加 15 mL 乙酸乙酯提取 2 次, 蒸干乙酸乙酯, 残渣加 2 mL 甲醇溶解, 作为供试品溶液, 分别贴上标签, 备用^[13]; 取黄牛木叶对照药材 2 g, 按供试品溶液制备方法制备对照药材溶液。在温度为 25℃、相对湿度为 68% 的环境下, 分别吸取样品 1、样品 2、样品 3 供试品溶液和对照药材溶液各 10 μ L, 点于同一硅胶 G 薄层板上, 以异辛烷-乙酸乙酯-甲酸

(2.5:7.5:0.2, V/V/V) 为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 在薄层板上喷以 5% FeCl_3 溶液至斑点显色清晰。供试品溶液色谱中, 在与对照药材溶液色谱相应位置显相同颜色的斑点。色谱图见图 1。



1, 2. 供试品溶液(样品 1) 3, 4. 对照药材溶液 5, 6. 供试品溶液(样品 2) 7, 8. 供试品溶液(样品 3)

图 1 薄层色谱图

1, 2. Test solution (sample 1) 3, 4. Reference medicinal material solution 5, 6. Test solution (sample 2) 7, 8. Test solution (sample 3)

Fig. 1 TLC chromatograms

2.2 总黄酮含量测定

2.2.1 检测波长选择

采用紫外分光光度计分别对芦丁对照品溶液、供试品溶液进行光谱扫描。结果供试品溶液与芦丁对照品溶液的紫外吸收光谱一致, 且均于 510 nm 波长处有最大吸收, 故选择 510 nm 作为检测波长。

2.2.2 溶液制备

对照品溶液: 取芦丁对照品 10.200 mg, 精密称定, 置 10 mL 容量瓶中, 加甲醇适量, 超声使溶解, 摇匀; 精密量取 5 mL, 置 25 mL 容量瓶中, 用甲醇定容, 摇匀, 得质量浓度为 0.204 mg/mL 的对照品溶液, 备用。

供试品溶液: 取黄牛木叶(批号为 20201101)粗粉 4.943 g, 置锥形瓶中, 加石油醚适量, 加热回流 20 min, 弃去石油醚。加入 100 mL 甲醇, 称定质量, 再加热回流提取 20 min, 称定质量, 补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液 25.0 mL, 置 50 mL 容量瓶中, 加蒸馏水定容, 摇匀, 即得。

2.2.3 方法学考察

线性关系考察: 分别取 2.2.2 项下对照品溶液 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 mL, 置 10 mL 容量瓶, 加入 5% NaNO_2 溶液 0.2 mL, 混匀, 反应 6 min 后加入 10% $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 溶液 0.2 mL, 混匀, 反应 6 min 后加入 4% NaOH 溶液 2 mL^[14], 加入 50% 甲醇 10 mL, 摇匀, 制成质量浓度分别为 0.020 4, 0.040 8, 0.061 2, 0.081 6, 0.102 0 mg/mL 的标准溶液。以 50% 甲醇加显色剂为空白溶液, 用紫外分光光度计于 510 nm 波长处测定吸光度, 以对照品溶液质量浓度(X, mg/mL)为横坐标、吸光度(Y)为纵坐标进行线性

回归,得回归方程 $Y = 10.39X + 0.0518$ ($r = 0.9990$, $n = 5$)。结果表明,芦丁对照品溶液质量浓度在 $0.0204 \sim 0.1020 \text{ mg/mL}$ 范围内与吸光度线性关系良好。

精密度试验:精确吸取2.2.2项下供试品溶液5.0 mL,置50 mL容量瓶中,于510 nm波长处测定吸光度,重复测定6次,计算平均吸光度值。结果 RSD 为 0.35% ($n = 6$),表明仪器精密度良好。

重复性试验:取黄牛木叶药材4 g,平行6份,按2.2.2项下方法制备供试品溶液,以空白溶液作对照,分别测定其吸光度值。计算得黄牛木叶总黄酮平均含量为 32.73 mg/g , RSD 为 0.73% ($n = 6$),表明方法重复性良好。

加样回收试验:精密吸取2.2.2项下供试品溶液0.3 mL,共6份,分别置10 mL容量瓶中,再加入2.2.2项下对照品溶液1.0 mL,于510 nm波长处测定供试品溶液的吸光度,计算黄牛木叶样品的平均加样回收率。结果见表1。

表1 总黄酮加样回收试验结果 ($n = 6$)

Tab. 1 Results of the recovery test of total flavonoids ($n = 6$)						
取样量(mg)	样品含量(mg)	加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	$\bar{X}(\%)$	$RSD(\%)$
0.4298	0.2258	0.2040	0.4330	101.57	102.88	1.11
0.4298	0.2258	0.2040	0.4360	103.04		
0.4298	0.2258	0.2040	0.4390	104.51		
0.4298	0.2258	0.2040	0.4330	101.57		
0.4298	0.2258	0.2040	0.4370	103.53		
0.4298	0.2258	0.2040	0.4360	103.04		

2.2.4 样品含量测定

精密吸取2.2.2项下供试品溶液1.0 mL,置10 mL容量瓶中,于510 nm波长处测定黄牛木叶样品的吸光度,并按2.2.3项下线性关系考察项所得回归方程计算总黄酮含量。结果黄牛木叶总黄酮含量为 30.43 mg/g 。

2.3 芒果苷含量测定

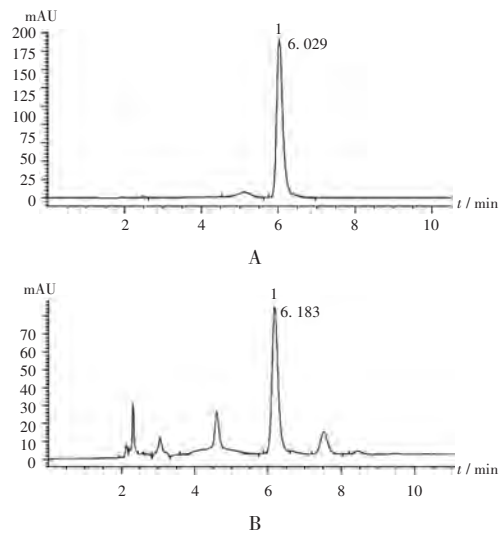
2.3.1 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱:Agilent C_{18} 柱($250 \text{ mm} \times 4.6 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$);流动相: 0.1% 冰醋酸水溶液-乙腈($85:15, V/V$);流速: 1.0 mL/min ;检测波长: 258 nm ;柱温: 25°C ;进样量: $10 \mu\text{L}$ 。取对照品溶液和供试品溶液各适量,按拟订色谱条件进样测定,色谱图见图2。

2.3.2 溶液制备

对照品溶液:取芒果苷对照品 13.0 mg ,精密称定,置10 mL容量瓶,加稀乙醇适量,超声处理10 min,使芒果苷完全溶解,再加稀乙醇定容。精密吸取 1.0 mL ,置10 mL容量瓶,加稀乙醇定容,制成质量浓度为 $130.0 \mu\text{g/mL}$ 的溶液,摇匀,滤过,即得^[10]。

供试品溶液:取样品 2.010 g ,精密称定,置锥形瓶,



1. 芒果苷

A. 对照品溶液 B. 供试品溶液

图2 高效液相色谱图

1. Mangiferin

A. Reference solution B. Test solution

Fig. 2 HPLC chromatograms

加稀乙醇20 mL,称定质量,超声20 min,冷却,再次称定质量,加稀乙醇补足减失的质量,摇匀,滤过,弃去初滤液,取续滤液5.0 mL,置25 mL容量瓶中,加稀乙醇定容,摇匀,即得。

2.3.3 方法学考察

线性关系考察:精密吸取2.3.2项下对照品溶液1.0,1.5,2.5,5.0,7.5,10.0 mL,分别置10 mL容量瓶中,加稀乙醇定容,摇匀,用 $0.45 \mu\text{m}$ 微孔滤膜滤过,依次吸取 $10 \mu\text{L}$ 进样测定^[10],平行测定2次,以进样质量浓度($X, \mu\text{g/mL}$)为横坐标、峰面积平均值(Y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程 $Y = 20.202X + 39.532$ ($r = 0.9994, n = 6$)。结果表明,芒果苷对照品溶液质量浓度在 $13.00 \sim 130.00 \mu\text{g/mL}$ 范围内与峰面积线性关系良好。

精密度试验:精密吸取2.3.2项下芒果苷对照品溶液适量,按2.3.1项下色谱条件重复进样测定6次。结果峰面积的 RSD 为 0.40% ($n = 6$),表明仪器精密度良好。

重复性试验:取药材样品适量,共6份,按2.3.2项下方法制备供试品溶液,按2.3.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算含量。结果芒果苷平均含量为 $45.11 \mu\text{g/mL}$, RSD 为 4.44% ($n = 6$),表明方法重复性良好。

稳定性试验:取药材样品适量,按2.3.2项下方法制备供试品溶液,分别于室温下放置0,2,4,6,8,12 h时按2.3.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果峰面积的 RSD 为 1.35% ($n = 6$),表明供试品溶液在常

温下放置12 h内稳定性良好。

加样回收试验:取已知含量的黄牛木叶样品,平行9份,按2.3.2项下方法制备供试品溶液,各取1.0 mL,置5 mL容量瓶中,分为3组,分别加入芒果苷对照品溶液0.5,1.0,1.5 mL,加稀乙醇定容,每组各进样测定3次,取平均值,记录峰面积并计算回收率。结果见表2。

表2 芒果苷加样回收试验结果($n=9$)

Tab. 2 Results of the recovery test of mangiferin ($n=9$)

取样量(μg)	样品含量(μg)	加入量(μg)	测得量(μg)	回收率(%)	$\bar{X}$ (%)	RSD(%)
120.34	40.34	80.00	125.38	106.30		
120.34	40.34	80.00	122.52	102.72		
120.34	40.34	80.00	120.71	100.46		
200.34	40.34	160.00	195.53	96.99		
200.34	40.34	160.00	199.89	99.72	101.10	2.55
200.34	40.34	160.00	199.97	99.77		
280.34	40.34	240.00	281.53	100.50		
280.34	40.34	240.00	282.39	100.85		
280.34	40.34	240.00	286.64	102.62		

2.3.4 样品含量测定

取3批(批号分别为20210201,20201106,20201101)样品,依法制备供试品溶液,分别精密吸取10 μL ,按2.3.1项下色谱条件进样测定2次,测得黄牛木叶样品溶液的平均峰面积,计算得3批样品的芒果苷平均含量为2.19 mg/g。

3 讨论

黄牛木叶作为岭南地区的特色中药,在临床和民间应用广泛,使用量大,常配伍茯苓、广藿香、白术、佩兰、布渣叶等用于治疗湿热内蕴、脾虚泄泻、湿热下注、肝郁脾虚等证^[4],治疗肝病疗效显著,具有应用开发前景^[8]。黄酮类成分是黄牛木叶的主要成分,其中芒果苷能改善炎症因子水平和肝组织病理状态,从而改善肝功能^[13],故对黄牛木叶中总黄酮和芒果苷开展研究。

薄层色谱鉴别中考察了苯-乙酸乙酯(7:3, V/V)^[15]和乙醇-水(1:1, V/V)2种展开剂,结果分离效果均差,比移值较小,且拖尾现象较严重。参考文献^[6],采用异辛烷-乙酸乙酯-甲酸(2.5:7.5:0.2, $V/V/V$)为展开剂,并控制合适的进样量。新的展开剂极性在前2种展开剂的极性之间,且因黄牛木叶样品溶液呈酸性,加入甲酸后成功分离出2个清晰斑点,比移值分别为0.58和0.82,改进了拖尾现象,符合薄层色谱鉴别要求。

采用紫外分光光度法测定总黄酮含量时,依据黄酮类化合物在中性或弱碱性及与 NaNO_2 共存时最大吸收波长红移,准确性和灵敏度均可提高,一定程度地消除了杂质的干扰,有利于含量测定。故本研究在测定时加入了 NaOH 溶液,选用 $\text{NaNO}_2-\text{Al}(\text{NO}_3)_3-\text{NaOH}$ 为黄酮显色剂。

采用高效液相色谱法测定含量时,由于芒果苷易

受其他成分干扰,出现了对应特征峰及与前峰部分重叠和较严重的拖尾现象,增加了检测难度,后通过更换柱效更高的 C_{18} 柱,流动相由0.1%冰醋酸水溶液(A)-乙腈(B)和梯度洗脱(0~10 min时8%B~12%B,10~40 min时12%B~35%B^[16])调整为乙腈-0.1%冰醋酸水溶液(15:85, V/V),增加了水相的比例,特征峰与其他杂质峰分离度良好,拖尾现象也得到良好改善。

综上所述,本研究中建立的方法简便、准确、重复性好,可用于黄牛木叶的质量控制,有利于进一步推动黄牛木叶资源的利用和复方制剂的开发。

参考文献

[1] 张紫山,谢秋兰. 岭南乡土植物黄牛木的综合利用价值评析[J]. 农业灾害研究,2020,10(5):31-32.
[2] 国家中医药管理局,中国本草编委会. 中华本草:第九卷[M]. 上海:上海科学技术出版社,2005:588-589.
[3] 王岸. 黄牛木治疗湿热蕴结型湿疹的临床疗效[J]. 黑龙江医学,2018,42(9):894-895.
[4] 刘特津,彭伟文,罗清,等. 358张含黄牛木叶饮片处方的用药分析[J]. 中国处方药,2021,19(7):148-150.
[5] 广西壮族自治区食品药品监督管理局. 广西壮族自治区壮药质量标准:第二卷(2011年版)[M]. 南宁:广西科学技术出版社,2011:252.
[6] 王建荣,王茂媛,赖富丽,等. 黄牛木叶脂溶性成分研究[J]. 热带农业科学,2009,29(12):31-33.
[7] 覃开羽,张蓓,王莹,等. 水杨梅黄酮类成分初步表征及水杨梅总黄酮抗氧化作用研究[J]. 中国药业,2021,30(16):53-58.
[8] 杪香,宫爱民,牛明,等. 海南黎药治疗肝病的综述与分析[J]. 中西医结合肝病杂志,2021,31(3):283-285.
[9] NATRSANGA P, JONGARAMRUONG J, RASSAMEE K, et al. Correction to: Two new xanthenes from the roots of *Cratoxylum cochinchinense* and their cytotoxicity [J]. Journal of Natural Medicines, 2020, 74(2):474-475.
[10] RAKSATA, SRIPISUTT, MANEERATW. Bioactive Xanthenes from *Cratoxylum cochinchinense* [J]. Natural Product Communications, 2015, 10(11):1969-1972.
[11] 刘子金,杨小波,苏凡,等. 七种藤黄科植物树皮抗氧化性及游离型总多酚、总黄酮含量的测定[J]. 分子植物育种, 2016, 14(12):3536-3543.
[12] 王海波,李杨. 抗病毒颗粒中芒果苷的高效液相色谱法的含量测定[J]. 抗感染药学,2020,17(2):165-167.
[13] 陈星,夏晓冬,童德银,等. 芒果苷改善肝损伤模型小鼠肝功能实验研究[J]. 中国药业,2019,28(10):17-20.
[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,2020:370.
[15] 张明,蒋三元,张健民,等. 几种常用中草药及制剂的薄层鉴别方法探讨[J]. 中国医药导报,2006,3(35):155-156.
[16] 丁爱存,王强,郎轶咏. 痛风饮中橙皮苷、儿茶素和芒果苷在大鼠体内药代动力学实验[J]. 解放军药学报, 2016, 32(4):314-317.

(收稿日期:2021-08-23;修回日期:2021-12-15)