

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2022.20.014

桐叶饮片质量标准提升研究*

申欣¹,唐勇¹,查娅妮¹,刘译¹,丁野²

(1. 湖南省怀化市食品药品检验所,湖南 怀化 418000; 2. 湖南省食品药品检验研究院,湖南 长沙 410001)

摘要:目的 提升桐叶饮片的质量控制标准。方法 参照2020年版《中国药典(四部)》,对药材样品的显微特征、水分、总灰分、水溶性浸出物进行检测;采用薄层色谱(TLC)法对药材样品进行定性鉴别;采用高效液相色谱(HPLC)法测定药材样品中齐墩果酸和熊果酸的含量,色谱柱为Shim-pack VP-ODS柱(250 mm×4.6 mm,5 μm),流动相为乙腈-甲醇-0.1 mol/L乙酸铵溶液(67:10:23,V/V/V),流速为1.0 mL/min,检测波长为210 nm,柱温为30℃,进样量为20 μL。结果 药材样品粉末呈黄绿色,显微特征清晰,可见非腺毛、腺毛、簇晶、方晶、导管等结构。TLC图斑点清晰,且分离度好。齐墩果酸和熊果酸进样量分别在235.038~4 700.76 ng($r=0.9994$)和509.490~5 094.90 ng($r=0.9997$)范围内与峰面积积分值线性关系良好;精密性、稳定性、重复性试验结果的RSD均小于2.00%;平均加样回收率分别为99.03%和99.17%,RSD分别为3.55%和3.14%($n=6$)。3批药材样品的平均水分、总灰分含量分别为8.85%和5.59%,水溶性浸出物含量均大于20%;齐墩果酸、熊果酸平均含量分别为0.28%、0.83%。结论 所建标准可用于桐叶饮片的质量控制。
关键词:桐叶饮片;齐墩果酸;熊果酸;薄层色谱法;高效液相色谱法;显微鉴别;含量测定

中图分类号:R917;R927

文献标志码:A

文章编号:1006-4931(2022)20-0053-04

Improvement of Quality Standard of Decoction Slices of Paulowniae Folium

SHEN Xin¹,TANG Yong¹,ZHA Yanni¹,LIU Yi¹,DING Ye²

(1. Huaihua Institute for Food and Drug Control, Huaihua, Hunan, China 418000; 2. Hunan Institute of Food and Drug Control, Changsha, Hunan, China 410001)

Abstract: Objective To improve the quality control standard of decoction slices of Paulowniae Folium. **Methods** The microscopic characteristics, moisture content, total ash and water-soluble extracts of the Paulowniae Folium were determined according to the Chinese Pharmacopoeia (2020 Edition, Volume IV). Thin-layer chromatography (TLC) was used to qualitatively identify Paulowniae Folium. High-performance liquid chromatography (HPLC) method was used to determine the content of oleanolic acid and ursolic acid in Paulowniae Folium. The chromatographic column was Shim-pack VP-ODS column (250 mm×4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was acetonitrile-methanol-0.1 mol/L ammonium acetate solution (67:10:23, V/V/V), the flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelength was 210 nm, the column temperature was 30℃, and the injection volume was 20 μL. **Results** The sample powder was yellow-green, with clear microscopic characteristics, including nonglandular hair, glandular hair, cluster crystal, square crystal and duct structure. The TLC spots were clear with good separation. The linear ranges of oleanolic acid and ursolic acid were 235.038-4 700.76 ng ($r=0.9994$) and 509.490-5 094.90 ng ($r=0.9997$), respectively. The RSDs of precision, stability and repeatability tests were less than 2.00%. The average recoveries of oleanolic acid and ursolic acid were 99.03% and 99.17% with RSDs of 3.55% and 3.14% ($n=6$), respectively. The average content of moisture and total ash of the three batches of samples was 8.85% and 5.59% respectively, and their water-soluble extract contents were more than 20%. The average content of oleanolic acid and ursolic acid was 0.28% and 0.83%, respectively. **Conclusion** The established standard can be used for the quality control of decoction slices of Paulowniae Folium.

Key words: decoction slices of Paulowniae Folium; oleanolic acid; ursolic acid; TLC; HPLC; microscopic identification; content determination

桐叶为玄参科植物白花泡桐 *Paulownia fortunei* (Seem.) Hemsl. 的干燥叶,具有清热解毒、止血消肿功效,用于治疗痈疽、疔疮、烧烫伤、创伤出血。此前,该饮片质量标准仅有性状项与鉴别项,为有效提升桐叶饮片质量标准,参考《湖南省中药材标准(2009年版)》^[1]中桐叶药材的检验项目进行了桐叶饮片质量标准的修订。本研究中建立了定性鉴别齐墩果酸、熊果酸的薄层色谱(TLC)法,以及同时测定齐墩果酸、熊果酸含量的

高效液相色谱(HPLC)法^[2-3],同时对饮片常用的检查项和浸出物项进行分析,为完善桐叶饮片质量标准提供依据。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

LC-20ATVP型高效液相色谱仪,包括LC-20AT型四元泵、SPD-M20A型检测器、SIL-20A型自动进样器、LCsolution色谱工作站(日本Shimadzu公司);

*基金项目:湖南省自然科学基金[2021JJ80030]。

第一作者:申欣,女,大学本科,副主任药师,研究方向为药品检验及中药质量标准,(电子信箱)29956654@qq.com。

SK3300H型超声波清洗器(上海科导超声仪器有限公司);BX61型光学显微镜(日本Olympus公司);202-1A型恒温干燥箱(上海一恒科学仪器有限公司);XSE105DU型电子天平(瑞士Mettler Toledo公司);硅胶G薄层板(青岛海洋化工有限公司)。

1.2 试药

熊果酸对照品(批号为110742-201823,含量99.9%)、齐墩果酸对照品(批号为110709-201808,含量91.1%),均购自中国食品药品检定研究院;桐叶对照药材(湖南怀化龙成中药饮片有限责任公司,批号为20201112),桐叶饮片(湘西宏成制药有限责任公司,批号分别为20190823,20190801,20200828),均经湖南省怀化市食品药品检验所唐勇主任中药师鉴定为正品;甲醇、乙腈为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 显微鉴别

饮片粉末呈黄绿色。非腺毛有2种:一种为星状毛,体部4~15个细胞,呈辐射状排列成一轮或上、下两轮,长120~300 μm ;柄部1~3个细胞。一种为单细胞,壁薄,长120~150 μm 。腺毛有2种:一种为单细胞头和多细胞柄,一种为单细胞头和多细胞柄,头部直径均为20~25 μm ,柄部长40~80 μm 。草酸钙簇晶呈星芒状,存在于叶肉组织中,直径5~10 μm 。草酸钙方晶存在于

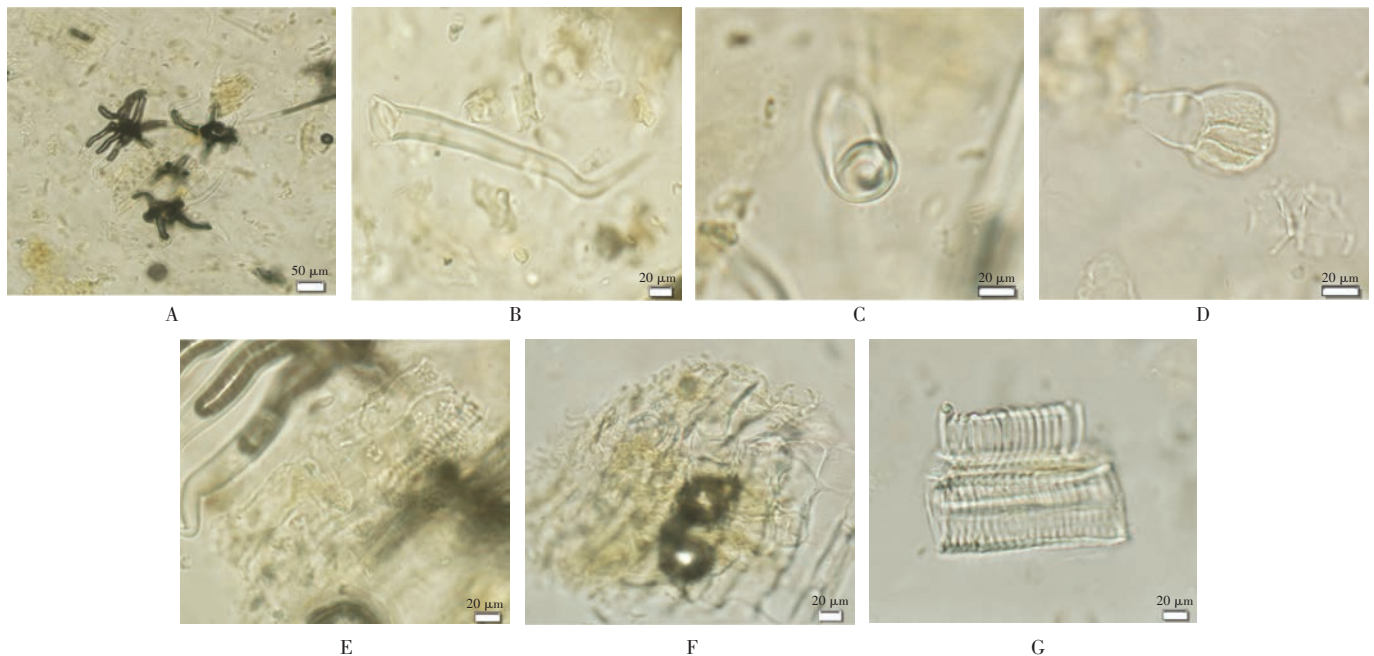
叶脉薄壁细胞内,直径10~20 μm 。螺纹导管多见,直径10~20 μm 。详见图1。

2.2 水分、总灰分、浸出物检查

按2020年版《中国药典(四部)》通则对3批药材样品进行水分、总灰分、浸出物测定。结果3批药材样品的平均水分含量为8.85%,总灰分含量为5.59%,水溶性溶出物含量为32.52%。

2.3 TLC鉴别

取药材样品粉末2 g,加乙醚30 mL,超声(功率250 W,频率50 kHz,下同)处理30 min,滤过,滤液挥干,残渣加无水乙醇1 mL溶解,作为供试品溶液。取熊果酸对照品、齐墩果酸对照品各适量,加乙酸乙酯制成每1 mL含2种对照品各1 mg的混合对照品溶液。取桐叶对照药材2 g,同供试品溶液制备方法制成对照药材溶液。精密吸取上述溶液各5 μL ,分别点于同一硅胶G薄层板上,将点样一端浸入1%碘-二氯甲烷溶液中12~15 mm,浸过后迅速取出,立即覆以玻璃板,30 min后取下玻璃板,热风吹2~3 min,挥去薄层板上残留的溶液。以环己烷-二氯甲烷-乙酸乙酯-冰醋酸(22:2:8:0.5, V/V/V/V)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以10%硫酸乙醇溶液,110 $^{\circ}\text{C}$ 加热至斑点显色清晰,分别置日光灯和紫外光灯(365 nm)下检视。供试品溶液色谱中,在与对照药材溶液色谱和对照品溶液色谱相应位置上,分别显相同颜色的斑点或荧光斑点。详见图2。

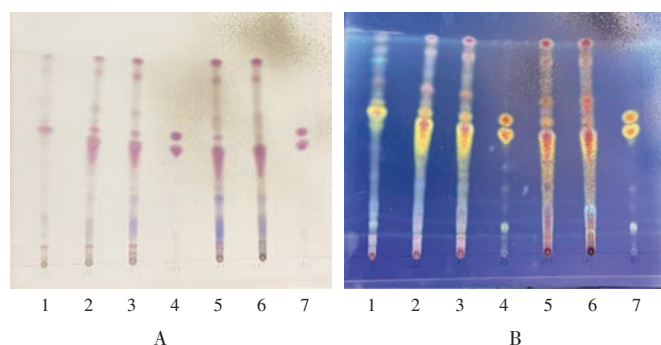


A. 非腺毛-星状毛 B. 非腺毛-单细胞 C. 腺毛-单细胞柄 D. 腺毛-多细胞柄 E. 草酸钙簇晶 F. 草酸钙方晶 G. 螺纹导管

图1 显微特征图

A. Nonglandular - stellate hair B. Nonglandular hairs - unicellular C. Glandular hairs - unicellular stalk D. Glandular hairs - multicellular stalks
E. Calcium oxalate clusters F. Calcium oxalate square crystal G. Catheter - thread

Fig. 1 Microscopic characteristics



1-3. 供试品溶液(批号分别为20190823,20190801,20200828)
4,7. 混合对照品溶液 5-6. 对照药材溶液
A. 日光灯 B. 紫外光灯(365 nm)

图2 薄层色谱图

1-3. Test solution (batch numbers:20190823,20190801,20200828)
4,7. Mixed reference solution 5-6. Reference medicinal materials solution
A. Fluorescent lamp B. Ultraviolet lamp (365 nm)

Fig. 2 TLC chromatograms

2.4 含量测定

2.4.1 色谱条件

色谱柱:Shim-pack VP-ODS柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈-甲醇-0.1 mol/L乙酸铵溶液(67:10:23, V/V/V);流速:1.0 mL/min;检测波长:210 nm;柱温:30℃;进样量:20 μL。

2.4.2 溶液制备

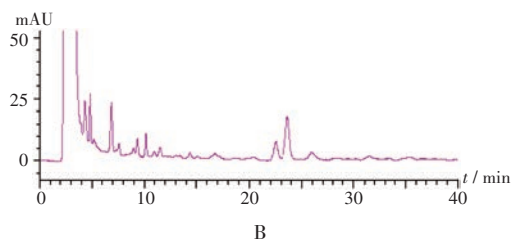
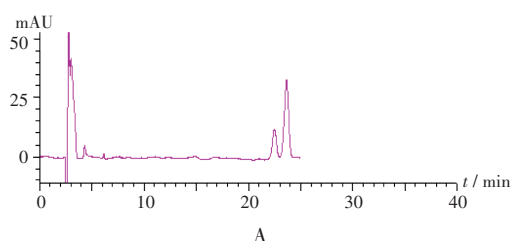
混合对照品溶液:取齐墩果酸对照品10.32 mg、熊果酸对照品10.20 mg,精密称定,分别置20 mL容量瓶中,加无水乙醇溶解并定容,摇匀,即得单一对照品贮备液。分别精密量取上述熊果酸、齐墩果酸单一对照品贮备液3 mL、1 mL,置同一10 mL容量瓶中,加无水乙醇溶解并定容,摇匀,即得。

供试品溶液:取药材样品粗粉0.8 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入乙醇50 mL,称定质量,超声处理30 min,放冷,再次称定质量,用乙醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.4.3 方法学考察

系统适用性试验:分别取上述混合对照品溶液和供试品溶液各20 μL,按2.4.1项下色谱条件进样测定,记录色谱图,详见图3。供试品溶液色谱中,在与混合对照品溶液相应位置有吸收峰,各组分之间分离(分离度>1.5)良好。

线性关系考察:分别吸取齐墩果酸对照品贮备液0.25,0.5,1.0,2.0,3.0,5.0 mL,熊果酸对照品贮备液0.5,1.0,2.0,3.0,4.0,5.0 mL,分别置10 mL容量瓶中,加无水乙醇溶解并定容,摇匀,制成系列混合对照品溶液。精密吸取20 μL,分别按2.4.1项下色谱条件进样测定。以进样量(X , ng)为横坐标、峰面积积分值(Y)为纵坐标进行线性回归。回归方程分别为 $Y_1 =$



1. 齐墩果酸 2. 熊果酸

A. 混合对照品溶液 B. 供试品溶液

图3 高效液相色谱图

1. Oleanolic acid 2. Ursolic acid

A. Mixed reference solution B. Test solution

Fig. 3 HPLC chromatograms

324.0785 $X_1 - 3.537.7847(r = 0.9994)$, $Y_2 = 283.9127X_2 - 20.322.9288(r = 0.9997)$ 。结果表明,齐墩果酸和熊果酸进样量分别在235.038~4 700.76 ng和509.490~5 094.90 ng范围内与峰面积积分值线性关系良好。

检测限和定量限考察:取2.4.2项下单一对照品贮备液适量,倍比稀释,按2.4.1项下色谱条件进样测定,以信噪比(S/N)为3:1和10:1时的进样量分别记作检测限和定量限。结果齐墩果酸的检测限和定量限分别为928.8 ng和1 393.2 ng,熊果酸分别为765.0 ng和1 224.0 ng。

精密度试验:取同一供试品溶液适量,按2.4.1项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果齐墩果酸和熊果酸峰面积的 RSD 分别为0.68%和0.18%($n = 6$),表明方法精密度良好。

稳定性试验:取同一供试品溶液适量,分别于室温下放置0,2,6,12,24 h后,按2.4.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果齐墩果酸和熊果酸峰面积的 RSD 分别为0.57%和0.28%($n = 5$),表明供试品溶液在室温下放置24 h内基本稳定。

重复性试验:取药材样品(批号为202008282)适量,按2.4.2项下方法制备供试品溶液,平行6份,按2.4.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算含量。结果齐墩果酸和熊果酸的平均含量分别为0.2879 mg/g和0.9096 mg/g, RSD 分别为1.99%和1.08%($n = 6$),表明方法重复性良好。

加样回收试验:取同一药材样品(批号为20200828)约0.4 g,精密称定,共6份,分别置锥形瓶中,均精密加

表1 加样回收试验结果($n=6$)
Tab.1 Results of the recovery test ($n=6$)

编号	取样量(g)		样品含量(mg)		加入量(mg)		测得量(mg)		回收率(%)		$\bar{X}(\%)$		RSD(%)	
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
1	0.415 3	0.415 3	1.195 65	3.777 57	1.197 96	3.953 04	2.346 44	7.558 46	96.06	95.65	99.03	97.19	3.55	3.14
2	0.437 2	0.437 2	1.258 70	3.976 77	1.197 96	3.953 04	2.413 34	7.830 25	96.38	97.48				
3	0.425 3	0.425 3	1.224 44	3.868 53	1.197 96	3.953 04	2.449 72	7.549 07	102.28	93.11				
4	0.400 7	0.400 7	1.153 62	3.644 77	1.197 96	3.953 04	2.396 18	7.585 25	103.72	99.68				
5	0.428 5	0.428 5	1.233 65	3.897 64	1.197 96	3.953 04	2.378 17	7.678 72	95.54	95.65				
6	0.401 3	0.401 3	1.155 34	3.650 22	1.197 96	3.953 04	2.355 63	7.664 83	100.19	101.56				

入混合对照品溶液1 mL,按2.4.2项下方法制备供试品溶液,按2.4.1项下色谱条件进样测定,并计算加样回收率。结果见表1(A为齐墩果酸,B为熊果酸)。

2.4.4 耐用性试验

取同一批药材样品适量,按2.4.2项下方法制备供试品溶液,分别使用两个不同的色谱柱[LC-20AT型 Shim-pack VP-ODS柱(日本Shimadzu公司,250 mm×4.6 mm,5 μm)和LC-20AT型 Luna C₁₈柱(天津博纳艾杰尔科技有限公司,250 mm×4.6 mm,5 μm)],按2.4.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果两种色谱柱测得齐墩果酸含量分别为0.29%和0.28%,相对偏差为1.75%;熊果酸含量分别为0.88%和0.87%,相对偏差为0.57%,表明色谱柱发生一定程度变化时,本方法能满足试验要求,耐用性良好。

2.4.5 样品含量测定

取3批药材样品适量,按2.4.2项下方法制备供试品溶液,再按2.4.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算含量。结果批号为20190823,20190801,20200828的药材样品中,齐墩果酸含量分别为0.19%,0.36%,0.29%(平均0.28%),熊果酸含量分别为0.54%,1.08%,0.88%(平均0.83%)。

3 讨论

3.1 TLC展开方法改进

通过预试验验证,原标准中样品与熊果酸对照品相应位置上所显斑点实际为熊果酸与齐墩果酸的混合斑点。参考文献[1,4],改用薄层原位预处理-TLC法,经1%碘-二氯甲烷溶液处理,并在3种展开剂[环己烷-乙酸乙酯-冰醋酸(10:3:0.5,V/V/V)、环己烷-三氯甲烷-乙酸乙酯-冰醋酸(20:5:8:0.1,V/V/V/V)、环己烷-三氯甲烷-乙酸乙酯-冰醋酸(22:2:8:0.5,V/V/V/V)之间进行选择,结果最后一种展开剂展开效果最好,齐墩果酸的比移(R_f)值为0.63,熊果酸的 R_f 值为0.56,实现了两者的有效分离。

3.2 含量测定条件探索

根据文献^[5-13]对药材样品中齐墩果酸、熊果酸的含量测定方法,选择乙醇为溶剂,对提取方法(回流和

超声方法)进行了对比,超声方法简单易行且提取率高,故选择超声提取,并且对超声时间进行了20,30,40 min的考察,30 min时提取率最高,此后提取含量不再增加,故超声提取时间定为30 min。

3.3 性状鉴别和其他检查项目

在性状鉴别中,发现饮片的“叶脉于下表面突出”这一鉴别特征非常明显,显微鉴别螺纹导管多见。这些特征一并纳入标准制订中。

参考文献

[1] 湖南省食品药品监督管理局. 湖南省中药材标准(2009年版)[M]. 长沙:湖南科学技术出版社,2009:283-284.
[2] 南京中医药大学. 中药大辞典[M]. 上海:上海科学技术出版社,2006:3081-3085.
[3] 王尊旺,蔡鸿新. 中药草本(第七册)[M]. 北京:中国科学技术出版社,1999:6363-6365.
[4] 崔田. 金毛耳草中熊果酸和齐墩果酸的含量测定[J]. 山西医科大学学报,2009,52(6):771-774.
[5] 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,2020:213.
[6] 徐正龙. HPLC法同时测定凌霄花中常春藤皂苷元、齐墩果酸和熊果酸的含量[J]. 中国处方药,2020,18(11):23-24.
[7] 杨新周,吴娜,邱晓雪. HPLC法测定云南不同产地白花蛇舌草中齐墩果酸和熊果酸含量[J]. 贵州农业科学,2019,47(10):115-118.
[8] 辛义周,聂金娥,马传江. 清炒法对木瓜中齐墩果酸和熊果酸的含量影响[J]. 中国现代中药,2018,20(3):238-331.
[9] 袁海英,叶利明. 强力枇杷露中齐墩果酸和熊果酸含量测定研究[J]. 中国测试,2018,44(5):63-66.
[10] 陈和,林方芬. 不同产地凌霄花中齐墩果酸和熊果酸含量比较研究[J]. 新中医,2019,51(2):1-3.
[11] 李敏,齐红,于姗姗,等. 市售白花蛇舌草正品及伪品中齐墩果酸和熊果酸的含量测定[J]. 中国药物经济学,2020,15(7):49-52.
[12] 单莉,陈莉,杨洁,等. 不同产地木瓜中齐墩果酸与熊果酸含量分析[J]. 安徽医药,2020,24(12):2352-2354.
[13] 向润清,黄宽,张艳娇,等. 夏枯草不同超声时间后熊果酸和齐墩果酸的含量变化[J]. 云南中医中药杂志,2019,40(11):74-77.

(收稿日期:2022-01-05;修回日期:2022-03-30)