

斑点信息相似,斑点较少,且颜色较浅,与其他贝母信息斑点差距较大,伊犁贝母同时具有a、b、c、d 4个信息斑点,且颜色较深;企业A提供的川贝母药材与该企业样品10~12与伊犁贝母信息斑点相似,初步判定该企业投料存在质量问题。将图谱导入ChemPatern软件,对川贝母药材(h)、伊犁贝母药材(d)、企业A样品(a、b、c)及企业B样品(e、f、g)进行聚类分析,结果企业A样品(a、b、c)与伊犁贝母聚成一类,进一步说明企业投料存在质量问题。

中国药典2020年版人工牛黄含量测定胆红素采用紫外分光光度法,该法干扰较大,专属性较差,故本研究参照牛黄含量测定胆红素含量测定方法。同时考察供试品超声、回流两种不同的处理方法,结果一致,从操作简捷的角度考虑,最终选择了回流的供试品处理方法。含量测定结果显示,各样品之间含量差异较小,质量较为稳定。

(本文图1~3见插图6-3)

参考文献

- [1] 姚长良,张建青,毕启瑞,等. 中药质量标准和检测技术研究及应用[J]. 中国食品药品监管, 2021(9): 106-115.
- [2] XIE DS, PENG W, CHEN JC, et al. A novel method for the discrimination of hawthorn and its processed products using an intelligent sensory system and artificial neural networks [J]. Food Sci

Biotechnol, 2016, 25(6): 1545-1550.

- [3] 邓哲,荆文光,刘安. 薄层色谱法在当前中药质量标准中的应用探讨[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(7): 201-206.
- [4] 赵宝颖. 浅析中药牛黄质量问题及鉴别[J]. 消费导刊, 2021(20): 1, 3.
- [5] 赵丽娜,籍学伟,王玉华. 蒙成药小儿清肺八味丸的质量控制方法研究[J]. 中国民族民间医药, 2020, 29(3): 27-32.
- [6] 胡晓茹,刘晶晶,戴忠,等. 含牛黄中成药的质量控制现状[J]. 中国药理学杂志, 2019, 54(17): 1374-1379.
- [7] 霍会霞,孙慧,张云封,等. 中药沉香药理作用和质量控制研究进展[J]. 中国医院用药评价与分析, 2018, 18(2): 152-155, 159.
- [8] 彭德乾,王灿红,刘洋洋,等. 沉香的化学成分及其药理活性的研究进展[J]. 中国现代应用药学, 2021, 38(3): 358-365.
- [9] 刘薇,张文娟,程显隆,等. 中药川贝母质量控制方法研究[J]. 亚太传统医药, 2015, 11(2): 41-46.
- [10] 兰青阔,赵新,陈锐,等. 基于LAMP的中药材川贝母真伪鉴别方法的建立[J]. 药物分析杂志, 2019, 39(3): 551-556.
- [11] 张志勇,杨洁,齐泽民. 川贝母的研究进展[J]. 江苏农业科学, 2017, 45(24): 9-13.
- [12] 黄漠然,赵文靖,李晋生,等. 牛黄及其代用品化学成分、分析方法和药理作用研究进展[J]. 药物分析杂志, 2018, 38(7): 1116-1123.
- [13] 李美芳,刘敏,肖丽和,等. 氨金黄敏颗粒中人工牛黄的胆红素含量测定[J]. 中国药品标准, 2021, 22(4): 367-374.
- [14] 石岩,魏锋,吕宝俊,等. 培植牛黄中胆红素的测定及含量考察研究[J]. 中国中药杂志, 2021, 46(11): 2852-2856.

(收稿日期:2021-11-03,修回日期:2022-02-08)

引用本文:金凤华,程庆兵,刘业飞,等. 中药材蛇莓标准关键控制指标研究[J]. 安徽医药, 2022, 26(6): 1098-1101.

DOI: 10.3969/j.issn.1009-6469.2022.06.008.

◇ 药学研究 ◇



中药材蛇莓标准关键控制指标研究

金凤华¹,程庆兵¹,刘业飞¹,叶红兵¹,叶玲²

作者单位:¹合肥市食品药品检验中心,安徽 合肥230088;

²复旦大学附属肿瘤医院闵行分院,上海200240

通信作者:刘业飞,男,主任中药师,研究方向为中药质量分析,Email:Liuyf2088@163.com

摘要: 目的 建立中药材蛇莓的薄层色谱鉴定与含量测定方法,对其质量控制的关键性指标进行定性定量研究。方法 该研究于2020年11月至2021年8月,采用薄层色谱法定性鉴别蛇莓中的熊果酸;用高效液相色谱法(HPLC)对蛇莓中的鞣花酸含量进行测定。结果 不同产地批次蛇莓药材的薄层色谱斑点清晰,且供试品色谱中,在与对照品色谱相应的位置上,显示相同颜色斑点;鞣花酸在进样量2.0~20.0 μg 范围内有良好的线性关系($r=1.0$),平均加样回收率为99.21%,相对标准差(RSD)=1.8%($n=10$)。结论 该定性定量方法简单、可行,重复性好、专属性强,可用于中药材蛇莓的质量控制。

关键词: 蛇莓; 薄层色谱; 色谱法,高压液相; 熊果酸; 鞣花酸

Study on the key control index of *Duchesneae Indicae* Herba standard

JIN Fenghua¹, CHENG Qingbing¹, LIU Yefei¹, YE Hongbing¹, YE Ling²

Author Affiliations:¹Hefei Food and Drug Inspection Center, Hefei, Anhui 230088, China; ²Minhang Branch, Fudan University Shanghai Cancer Center, Shanghai 200240, China

Abstract: Objective To establish a thin-layer chromatographic (TLC) method for the identification and content determination of the Chinese herbal medicine *Duchesneae Indicae* Herba, and to study its key quality control indexes qualitatively and quantitatively. **Methods** The study was conducted from November 2020 to August 2021, the qualitative identification of ursolic acid in *Duchesneae Indicae* Herba by TLC and the determination of ellagic acid in *Duchesneae Indicae* Herba by HPLC method were applied. **Results** The TLC of different origins of *Duchesneae Indicae* Herba showed clear spots, and the same color spots were shown on the corresponding positions of the chromatograms of the test article and the control article; ellagic acid showed good linearity in the range of 2.0-20.0 μg of the injection volume ($r=1.0$), and the average spiked recovery was 99.21% with RSD=1.8% ($n=10$). **Conclusion** The qualitative and quantitative methods were simple, feasible, specific and reproducible, which could be used for the quality control of *Duchesneae Indicae* Herba.

Key words: Herba *duchesneae indicae*; Thin-layer chromatographic; Chromatography, high pressure liquid; Ursolic acid; Ellagic acid

中药蛇莓为蔷薇科(Rosaceae)蛇莓属(*Duchesnea*)植物蛇莓 *Duchesnea indica* (Andr.) Focke 的干燥全草。蛇莓始载于《名医别录》,为民间常用中草药,《中国药典》2020年版四部“成方制剂中本版药典未收载的药材和饮片”中有蛇莓的来源和名称描述^[1]。研究表明,蛇莓的主要化学成分为甾醇类、糖苷类、萜类、黄酮类等,主要应用于降血糖、抗氧化、抗肿瘤、抗炎、抗病毒等药理作用^[2-7]。三萜类化合物齐墩果酸和熊果酸结构相似,性质相近,试验表明在一般薄层色谱方法中难以分离。该研究在前期对蛇莓三萜类成分做了大量试验研究,结合相关文献^[8-10],采用相应的薄层分离条件,对蛇莓中的三萜类成分进行了薄层色谱鉴别研究。文献^[11-19]报道,鞣花酸是蛇莓药材中含量较高的成分之一,且鞣花酸具有增强免疫、抗肿瘤、抗动脉粥样硬化等药理作用。课题组查阅《中国植物志》《中华本草》《中药大辞典》及近现代药材标准,均有收载蛇莓,但检验项目单一、检验内容简单,均未收载蛇莓质量控制关键性指标的检验项目,为提升蛇莓的质量控制标准,课题组收集10批蛇莓中药材(由安徽省食品药品检验研究院提供),于2020年11月至2021年8月对中药材蛇莓质量控制的关键性指标分别用薄层色谱法进行定性考察及高效液相色谱法进行定量分析,为完善和提升蛇莓药材的质量控制标准提供科学有力的研究依据。

1 仪器与试药

1.1 仪器 XPE205型电子天平(Mettler-Toledo), TUBE MILL C S025型粉碎机(IKA), TLCVISUALIZER2型薄层成像系统(瑞士CAMAG公司), CAMAG-Linomat-5型半自动点样仪(瑞士CAMAG公司), ADC-2自动展开仪(瑞士CAMAG公司), S120H型超声波清洗器(德国ELMA公司), Milli-Q Advantage A10型超纯水机(MILLIPORE); U-3000型高效液相色谱仪,二极管阵列检测器(美国Thermo Fisher Scientific公司)。

1.2 试药 齐墩果酸对照品(批号110709-201808,纯度91.1%),熊果酸对照品(批号110742-201421,纯度93.8%),鞣花酸对照品(批号111959-201903,纯度88.8%),均由中国食品药品检定研究院提供;乙腈(色谱纯),水(超纯水),其他试剂均为分析纯。

1.3 样品 蛇莓药材分别从福建、广东、安徽等药材市场收集共10批(安徽省食品药品检验研究院提供,样品编号Y1~Y10),经合肥市食品药品检验中心主任中药师刘业飞鉴定为蔷薇科(*Rosaceae*)植物蛇莓 *Duchesnea indica* (Andr.) Focke 的干燥全草。

2 方法与结果

2.1 薄层色谱分析

2.1.1 对照品溶液的配制 取齐墩果酸、熊果酸对照品,分别加无水乙醇制成0.2 g/L的溶液。

2.1.2 供试品溶液的制备 精密称取不同产地蛇莓粉末2 g于50 mL锥形瓶中,加三氯甲烷20 mL。超声提取30 min,滤过,滤液挥干,残渣加甲醇-三氯甲烷(1:3)的混合溶液1 mL使溶解,作为供试品溶液。

2.1.3 蛇莓药材薄层色谱分析 (1)点样:取蛇莓供试品溶液、齐墩果酸对照品溶液、熊果酸对照品溶液各2 μL ,点样于同一硅胶G薄层板上。(2)展开:点样后浸入1%碘-二氯甲烷溶液^[5]中,至过起始线迅速取出,立即用玻璃板覆盖,30 min后取下玻璃板,挥去薄层板上残留的溶液。以环己烷-丙酮-醋酸乙酯-甲酸(9:2:3:0.2)为展开剂,展开。(3)显色:取出,晾干,喷以10%硫酸乙醇溶液,105 $^{\circ}\text{C}$ 加热至斑点显色清晰。观察:分别置紫外光灯光(365 nm)和日光下检视。(4)图谱分析:薄层色谱图见图1。由图可知,蛇莓供试品色谱与熊果酸对照品色谱在对应位置显示相同的颜色斑点,在与齐墩果酸对照品色谱对应的位置上,无明显的相同颜色斑点。

2.1.4 薄层色谱方法学验证

2.1.4.1 溶剂优化试验 分别考察三氯甲烷、甲醇、无水乙醇3种溶剂的超声提取效率。取蛇莓药材

Y4供试品溶液、齐墩果酸对照品溶液、熊果酸对照品溶液各2 μL ,分别点于同一硅胶G薄层板上(经1%碘—二氯甲烷溶液预处理),以环己烷-丙酮-乙酸乙酯-甲酸(9:2:3:0.2)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以10%硫酸乙醇溶液,在105 $^{\circ}\text{C}$ 加热至斑点显色清晰。置紫外光灯(365 nm)下检视。可知,采用溶剂三氯甲烷超声提取效果更佳。

2.1.4.2 专属性试验 取齐墩果酸和熊果酸对照品溶液,按(1:1)比例混合,加无水乙醇制成含齐墩果酸0.1 g/L、熊果酸0.1 g/L的混合溶液。取蛇莓Y4供试品溶液、齐墩果酸对照品溶液、熊果酸对照品溶液、齐墩果酸熊果酸混合对照品溶液各2 μL ,分别点于同一硅胶G薄层板上(未经1%碘—二氯甲烷溶液预处理);另同法操作,点于同一硅胶G薄层板上(经1%碘—二氯甲烷溶液预处理),以环己烷-丙酮-醋酸乙酯-甲酸(9:2:3:0.2)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以10%硫酸乙醇溶液,在105 $^{\circ}\text{C}$ 加热至斑点显色清晰。分别置日光和紫外光灯光(365 nm)下检视,可知,未经1%碘—二氯甲烷溶液预处理的薄层板,齐墩果酸、熊果酸为混合斑点,不能得到有效分离。经1%碘—二氯甲烷溶液预处理,齐墩果酸对照品和熊果酸对照品能得到有效分离,斑点清晰可辨。

2.1.4.3 稳定性试验 将“2.1.1”和“2.1.2”项下的熊果酸对照品溶液和供试品溶液放置24 h,按2.1.3操作,分别点样于三个生厂商(默克化工技术有限公司,青岛海洋化工厂分厂,青岛邦凯高新技术材料有限公司)的硅胶G薄层板。实验结果表明,该方法在24 h内稳定性良好,在不同厂家生产的硅胶G薄层板上色谱斑点重现性良好。

2.2 鞣花酸含量测定

2.2.1 对照品溶液的制备 精密称取鞣花酸对照品约13 mg,置100 mL量瓶中,加甲醇超声溶解并稀释至刻度,摇匀;精密量取上述溶液5 mL,置50 mL量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,即得。

2.2.2 供试品溶液的制备 精密称取不同产地蛇莓药材粉末(过四号筛)0.2 g,置100 mL锥形瓶中,精密加入甲醇50 mL,称重,回流提取60 min,取出放置室温时,再次称重,补足甲醇重量,摇匀,用0.45 μm 微孔有机滤膜过滤,取续滤液作为供试品溶液。

2.2.3 色谱条件与系统适用性实验 色谱柱:依利特C₁₈柱(250 mm $\times$ 4.6 mm,5 μm);流动相:以乙腈为流动相A,以0.1%磷酸为流动相B,进行梯度洗脱,洗脱程序如下:0~5 min,10%~17%A;5~15 min,17%A;15~35 min,17%~25%A;35~40 min,10%A;

流速:1.0 mL/min;柱温:30 $^{\circ}\text{C}$;检测波长:254 nm;进样量:10 μL 。理论板数按鞣花酸计不小于6 000。

2.2.4 方法学试验

2.2.4.1 线性范围考察 分别精密吸取“2.2.1”项下对照品溶液2.0、5.0、8.0、10.0、15.0、20.0 μL 注入液相色谱仪,按上述色谱条件依法测定峰面积积分值,分别为2.880 7、6.950 8、11.035 5、13.799 0、20.631 6、27.387 6,以峰面积积分值为纵坐标,进样量为横坐标,绘制标准曲线,回归方程为: $A=1.363V+0.149$, $r=1.0$ ($n=6$)。实验表明:浓度为12.289 9 mg/L的鞣花酸,在所试进样体积2.0~20.0 μL 范围内与峰面积积分值具有良好的线性关系。

2.2.4.2 精密度试验 精密吸取上述对照品溶液,重复进样5次,按照上述色谱条件测定其峰面积积分值,其相对标准差(RSD)=0.3%,表明仪器精密度较好。

2.2.4.3 重复性试验 精密称取同一蛇莓样品(Y2)供试品溶液5份,每份0.2 g,按“2.2.2”项下制备供试品溶液,按“2.2.3”项下色谱条件测定鞣花酸含量,其峰面积测量值的RSD=0.3%(应 $\leq 2.0\%$),表明方法重复性较好。

2.2.4.4 稳定性试验 分别吸取上述Y2供试品溶液10 μL ,配置后立即注入液相色谱仪,分别于0、2、4、6、8、12、24 h进样,测定鞣花酸含量,考察其峰面积RSD为0.19%,表明供试品溶液在24 h内稳定。

2.2.4.5 准确度试验 精密称取同一蛇莓样品(Y2)6份,每份称取0.1 g,至100 mL具塞锥形瓶中,分别精密加入对照品溶液25 mL,精密加入甲醇25 mL,精密称定,回流提取60 min,取出放置室温时再次称重,补足甲醇重量,摇匀,用0.45 μm 微孔滤膜过滤,按“2.2.3”项下色谱条件测定鞣花酸含量,计算平均回收率为99.21%,RSD为1.8%。

2.2.4.6 样品测定结果 精密称取上述10批蛇莓样品各两份,每份0.2 g,按“2.2.2”项下制备供试品溶液,按“2.2.3”项下色谱条件测定鞣花酸含量,测定了10批样品中鞣花酸的含量,结果见表1。

参照《安徽省中药材标准》起草工作技术指引要求,设定含量测定限度公式如下:

$$\mu = \bar{x} + \frac{ts}{\sqrt{n}} + MU,$$

式中 μ 为含量测定限值, $\bar{x}$ 为蛇莓样本平均数, t 为置信水平为99%的检验值, s 为样本的标准偏差, n 为样本批数, MU 为不确定度。

从表1可以看出收集到的样品含量差异较大,为了保证药材质量,结合限度计算公式,拟定含量测定限值为2.0 mg/g。

表1 蛇莓样品中鞣花酸含量测定结果值

样品编号	含量/(mg/g)	样品编号	含量/(mg/g)
Y1	1.180 6	Y6	6.465 7
Y2	3.174 5	Y7	5.806 4
Y3	4.899 7	Y8	5.921 4
Y4	4.070 5	Y9	1.691 6
Y5	5.615 9	Y10	1.408 0

3 讨论

3.1 定性鉴别与分析 课题组在薄层色谱鉴别实验中,比较了三氯甲烷、无水乙醇、甲醇3种溶剂的提取效果,发现以三氯甲烷为溶剂,超声提取的样品成分多且相应薄层色谱的斑点清晰;采用了多种展开剂如二甲苯-丙酮-乙醇-氨水(50:50:10:1)氨水预饱和、环己烷-乙酸乙酯-冰醋酸(10:3:0.5)、环己烷-丙酮-乙酸乙酯-甲酸(9:2:1:0.2)等,经试验论证环己烷-丙酮-乙酸乙酯-甲酸(9:2:3:0.2)展开效果较好。因熊果酸和齐墩果酸为同分异构体,且常同存在于同一药材中,一般的薄层色谱方法不能将二者分离。有报道称蛇莓药材薄层色谱中,与齐墩果酸对照品相应的位置上,显示相同颜色的斑点,经课题组试验发现,蛇莓药材薄层色谱中,若不用1%碘—二氯甲烷溶液预处理,在与齐墩果酸对照品斑点相应的位置上,确实显示相同颜色的“斑点”,其实该“斑点”实为熊果酸与齐墩果酸的混合斑点,用1%碘—二氯甲烷溶液预处理后,熊果酸与齐墩果酸分离,从薄层色谱图中可见,蛇莓是与熊果酸对照品相应的位置上,显示相同颜色的斑点,而非齐墩果酸。该发现对鉴别蛇莓药材的真伪优劣意义重大。

3.2 含量测定探讨与研究 课题组在溶解鞣花酸对照品时,发现鞣花酸在乙醇、低浓度甲醇中的溶解度较低,可在甲醇中溶解。样品提取时选用了95%乙醇、三氯甲烷、甲醇3种溶剂进行比对,结果发现鞣花酸在甲醇中提取效果最佳;课题组查阅相关文献^[20],结合试验摸索,采用了两种提取方式—加热回流、超声,结果表明,回流提取效果较好;加热回流时间是经相同实验条件下分别采用0.5 h、1.0 h、1.5 h等多个时间点回流提取确定的,试验发现回流提取1.0 h效率最高。这10批蛇莓药材分别产于安徽、广东、辽宁等地,各地所产蛇莓中鞣花酸含量差别甚大,最大含量与最小含量约相差6倍,不同产地蛇莓主成分含量的研究,对蛇莓药材种植基地的选取有指导性意义。

(本文图1见插图6-4)

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2020年版 四部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 557.
- [2] 南京中医药大学. 中药大辞典: 下册[M]. 2版. 上海: 上海科学技术出版社, 2005: 2996.
- [3] 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, 2005: 137-138.
- [4] 张雪春, 刘江, 吴鑫, 等. 微波辅助提取蛇莓多酚及其体外抗氧化、抑制 α -葡萄糖苷酶和乙酰胆碱酯酶能力研究[J]. 西南农业学报, 2018, 31(6): 1171-1179.
- [5] 吴小磊, 钟晨, 史金铭. 鞣花酸的生物学效应[J]. 中国林副特产, 2019(1): 73-78.
- [6] SENDRI N, BHANDARI P. Polyphenolic composition and antioxidant potential of underutilized Himalayan wild edible berries by high performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry[J]. J Sep Sci, 2021, 44(23): 4237-4254.
- [7] 李森, 安红梅, 沈克平, 等. 蛇莓抗肿瘤作用及临床应用[J]. 世界中医药, 2019, 14(2): 505-509.
- [8] 程菁菁, 谢晓梅, 张圣龙, 等. 木瓜齐墩果酸和熊果酸等三萜酸类薄层色谱分离鉴别[J]. 安徽中医学院学报, 2012, 31(1): 68-70.
- [9] 杨德泉, 杨昌武, 韩湘云. 桐叶中齐墩果酸和熊果酸的薄层色谱鉴别[J]. 中国药物评价, 2015, 32(4): 193-194.
- [10] 李玲玲, 黄炎, 毕志明. 中药蛇莓的薄层色谱鉴别及含量测定研究[J]. 中国新药杂志, 2014, 23(18): 2203-2206.
- [11] 查孝柱, 谢晓梅, 吕美红, 等. 含齐墩果酸和熊果酸的10种果实类中药HPLC分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(18): 60-62.
- [12] LUO S, GUO L, SHENG C, et al. Rapid identification and isolation of neuraminidase inhibitors from mockstrawberry (*Duchesnea indica* Andr.) based on ligand fishing combined with HR-ESI-Q-TOF-MS[J]. Acta Pharm Sin B, 2020, 10(10): 1846-1855.
- [13] 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.
- [14] 张玲, 谢晓梅, 彭华胜, 等. 不同产地木瓜药材中齐墩果酸和熊果酸的比较研究[J]. 中药材, 2009, 32(5): 673-676.
- [15] XIANG B, YU X, LI B, et al. Characterization, antioxidant, and anticancer activities of a neutral polysaccharide from *Duchesnea indica* (Andr.) Focke [J/OL]. J Food Biochem, 2019, 43(7): e12899, DOI: 10.1111/jfb.12899.
- [16] 陈途, 陈明, 朱荣平, 等. 蛇莓的抗氧化活性研究[J]. 海峡药学, 2021, 33(3): 53-56.
- [17] 耿丽, 李聪, 李志浩. 高效液相色谱法同时测定蛇莓提取物中4种成分的含量[J]. 医药导报, 2020, 39(8): 1138-1141.
- [18] 金英今, 于畅, 苏楠楠, 等. 蛇莓中抗氧化活性成分的研究[J]. 中药材, 2019, 42(12): 2827-2829.
- [19] 李森, 安红梅, 沈克平, 等. 蛇莓抗肿瘤作用及临床应用[J]. 世界中医药, 2019, 14(2): 505-509.
- [20] 范高福, 刘寅, 梁延波, 等. RP-HPLC法测定石榴皮提取物没食子酸、鞣花酸含量研究[J]. 湖北民族大学学报(医学版), 2021, 38(4): 37-40, 44.

(收稿日期: 2021-12-30, 修回日期: 2022-02-07)