

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw201605002

引文格式: 张珍, 李正文, 黄瑞松. 不同产地不同部位壮药大罗伞树定性和定量分析 [J]. 广西植物, 2017, 37(2):260-264

ZHANG Z, LI ZW, HUANG RS. Qualitative and quantitative analysis in Zhuang medicine *Ardisia quinquegona* from different habitats and parts [J]. *Guihaia*, 2017, 37(2):260-264

不同产地不同部位壮药大罗伞树定性和定量分析

张 珍¹, 李正文¹, 黄瑞松^{2*}

(1. 广西大学 农学院, 南宁 530004; 2. 广西民族医药研究院, 南宁 530001)

摘 要: 该研究采用 TLC 方法, 对不同产地大罗伞树进行定性鉴别, 并采用 HPLC 方法对大罗伞树不同产地和不同部位的岩白菜素进行了含量测定。其中, 色谱柱为 SinoChrom ODS-BP C18 (250 mm × 4.6, 5 μm), 流动相为甲醇-水 (23 : 77), 流速为 1.0 mL · min⁻¹, 检测波长为 275 nm。结果表明: 10 批不同产地大罗伞树药材的 TLC 均可检出岩白菜素斑点; 10 批不同产地大罗伞树药材中岩白菜素平均含量为 1.67%, 但产地间含量差异较大, 最高含量可达 2.58%, 最低含量 0.95%; 大罗伞树不同部位中岩白菜素含量有所差异, 地下部分(根及根茎)含量较高, 平均值为 4.05%, 地上部分(茎枝和叶)含量较低, 平均值为 1.21%。所建立的大罗伞树药材 TLC 鉴别和岩白菜素含量测定方法操作简便、专属性强、重现性好、结果准确。该研究结果能准确鉴别大罗伞树药材真伪, 并测定药材中岩白菜素的含量, 为大罗伞树药材质量标准的建立提供了依据, 对于控制壮药大罗伞树药材质量具有重要意义。

关键词: 大罗伞树, 岩白菜素, TLC, HPLC

中图分类号: Q946 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2016)02-0260-05

Qualitative and quantitative analysis in Zhuang medicine *Ardisia quinquegona* from different habitats and parts

ZHANG Zhen¹, LI Zheng-Wen¹, HUANG Rui-Song^{2*}

(1. College of Agriculture, Guangxi University, Nanning 530004, China; 2. Guangxi Academy of Minority Nationality Medicine and Pharmacology, Nanning 530001, China)

Abstract: We identified with TLC and analyzed the contents of Bergenin through different regions and parts of the *Ardisia quinquegona* to provide experimental basis for the Zhuang medicine quality evaluation and standard. The different habitats of *A. quinquegona* were identified by TLC. The contents of Bergenin in different habitats and parts of *A. quinquegona* were determined by HPLC. Using SinoChrom ODS-BP C18 chromatographic column (250 mm × 4.6, 5 μm) with the detection wavelength of 275 nm, methanol-water (23 : 77) as mobile phase with the flow rate of 1.0 mL · min⁻¹. The results showed that ten batches different eares of *A. quinquegona* which contained Bergenin by TLC. And the average content of bergenin was 1.67%, but there were significant differences among them, the highest content up to 2.58%, the lowest content 0.95%. The contents of *A. quinquegona* of different parts were different, the underground part (root and

收稿日期: 2016-06-24 修回日期: 2016-08-17

基金项目: 广西科技厅重大专项(桂科重 1355001-4-2); 广西壮药质量标准(第三卷)质量评价与标准研究项目(GXZC2014-G3-1577-YLZB-B-2); 广西卫生计生中医药民族医药科研课题(CZZC13-13) [Supported by the Key Program of Guangxi Scientific and Technological Office (1355001-4-2); Quality Standards of Guangxi Zhuang Medicine (Vol. III) Quality Evaluation and Standards Research Program (GXZC2014-G3-1577-YLZB-B-2); Traditional Chinese Medicine Research Program of Guangxi Health Department (CZZC13-13)]。

作者简介: 张珍(1988-), 女, 河南原阳人, 硕士研究生, 从事中草药化学分析及质量标准研究, (E-mail) 1443965159@qq.com。

*通信作者: 黄瑞松, 主任药师, 从事中草药化学分析和新药研究, (E-mail) hrs.3130064@163.com。

rhizome) contents higher with an average of 4.05%, the ground parts (stems and leaves) were lower with an average of 1.21%. TLC identification method and determination of Bergenin in *A. quinquegona* were simple, reproductive and accurate. The chemical method could accurately identify the authenticity of *A. quinquegona* and determination in Bergenin. This study provides experimental basis for the establishment of *A. quinquegona* medicinal Zhuang medicine quality standards for the control of its quality is of great significance.

Key words: *Ardisia quinquegona*, Bergenin, TLC, HPLC

大罗伞树系紫金牛科紫金牛属植物海南罗伞树 (*Ardisia quinquegona*), 又名铁凉伞、大铁凉山、高脚凉伞、筷子根。我国主要分布于广西、云南、海南、福建、台湾等省区, 广西主要分布于桂南和桂西南等地区。本品为壮医常用药材, 以全株入药, 壮医认为本品有调火路, 清热毒, 消肿痛的作用, 用于咽喉疼痛、牙痛和跌打损伤(黄瑞松等, 2015)。文献记载, 该属植物中主要含苯醌类、苯酚类和香豆精类化合物(江香梅等, 2003), 现已从该属 6 种植物中获得了岩白菜素(矮地茶素 Bergenin), 含量在 0.52% ~ 1.80%之间(刘姝等, 1993)。

岩白菜素具有明显的止咳、抗炎、抗心律失常、抗病毒、护肝等作用(夏从龙等, 2006; 王刚等, 2002)。目前有关大罗伞树药材质量评价方法及该植物不同产地、不同部位药材岩白菜素含量的研究未见有报道, 致使该药材质量控制欠缺, 给临床用药和大罗伞树植物资源的开发利用造成技术“瓶颈”。为此, 本文采集了广西 10 批不同产地大罗伞树样品, 采用 TLC 对不同产地大罗伞树进行鉴别实验, 采用 HPLC 对不同产地全株和同一植株的地下部分(根及根茎)、地上部分(茎枝及叶)样品进行岩白菜素含量测定, 并进行质量分析评价, 为壮药大罗伞树质量标准的制订、临床用药和植物资源开发利用提供技术支撑。

1 仪器与材料

1.1 仪器

LC-20AT 高效液相色谱仪(二极管阵列检测器, 日本岛津公司), LC Solution 色谱工作站; SG2200HDT 型超声波清洗器(功率 190 W, 频率 39 kHz, 上海冠特超声仪器有限公司); XS205 1/10⁵ 电子天平(瑞士梅特勒公司); EASYPURE II 超纯水器(美国热电公司)。

1.2 材料

共采集 10 批不同产地的大罗伞树样品, 详见表

1。药材采收后除去杂质, 洗净, 切段, 晒干。其中, 1 号、2 号和 5 号的腊叶标本分别经广西中医药研究院赖茂祥研究员、广西中医药大学韦松基教授鉴定, 均为紫金牛科植物海南罗伞树 (*Ardisia quinquegona*)。岩白菜素对照品, 批号为 111532(中国食品药品检定研究院, 供含量测定用, 含量 94.4%); 硅胶 G 薄层板(青岛海洋化工厂分厂, 批号为 20120812; 烟台市化工研究所, 批号为 20120524); TLC 展开系统所用甲醇、乙醇、三氯甲烷、二氯甲烷、乙酸乙酯、甲酸均为分析纯; HPLC 流动相所用甲醇为色谱纯(默克股份两合公司); 水为自制超纯水。

表 1 大罗伞树样品来源
Table 1 Origin of *A. quinquegona*

编号 No.	采集地点 Collecting site	采集时间 Collecting time
1	融水县融水镇 1 Rongshui Town, Rongshui County 1	2014-01
2	宾阳县露圩镇 Luxu Town, Binyang County	2014-08
3	融水县融水镇 2 Rongshui Town, Rongshui County 2	2014-10
4	岑溪县波塘镇 Botang Town, Qinxi County	2014-09
5	南宁市兴宁区 Xingning District, Nanning City	2014-12
6	钦州市钦北区 Qinbei District, Qinzhou City	2015-01
7	上思县十万大山森林公园, Shangsi Town	2015-01
8	横县灵竹镇 Lingzhu Town, Heng County	2015-03
9	武鸣县两江镇 Liangjiang Town, Wuming County	2015-06
10	上林县大丰镇 Dafeng Town, Shanglin County	2015-08

2 方法与结果

2.1 TLC 鉴别

2.1.1 对照品和供试品溶液制备 (1) 对照品溶液制备: 取岩白菜素对照品, 加甲醇溶液制成每 1 mL 含

0.5 mg 的溶液,摇匀即得。(2)供试品溶液制备:取大罗伞树样品粉末 0.3 g 于具塞锥形瓶中,加入甲醇 5 mL,超声处理 30 min,放冷,滤过,取滤液,即得。

2.1.2 TLC 试验 参照 2015 年版中国药典通则 0502 薄层色谱法方法进行试验,薄层板为硅胶 G,点样量供试品溶液 1~2 μL 、对照品溶液 1 μL ,展开剂为二氯甲烷-乙酸乙酯-甲醇-甲酸(4:1:0.7:0.5),展距 8 cm,显色剂为 2%三氯化铁乙醇溶液-1%铁氰化钾溶液(1:1)混合溶液,在可见光下检视。结果显示,10 批大罗伞树供试品薄层色谱中,在与对照品色谱相应的位置上均显示灰蓝色斑点,且 R_f 值适中,斑点集中清晰,重现性好(图 1)。

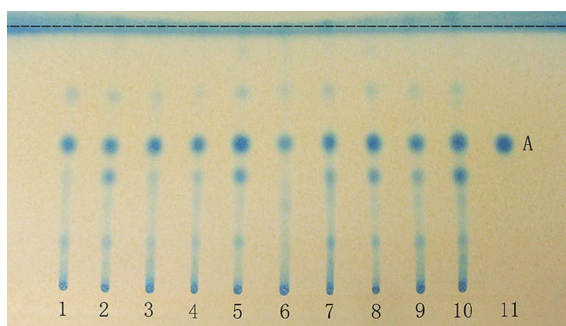


图 1 大罗伞树 TLC 图 1-10. 大罗伞树药材; 11. 岩白菜素对照品。A. 特征斑点:蓝色。

Fig. 1 TLC diagram of *A. quinquegona* 1-10. *A. quinquegona* medicinal material; 11. Bergenin reference sample. A. Characteristic spots: blue.

2.1.3 耐用性实验考察 (1)薄层板的考察:分别对青岛海洋化工厂(批号 20120812)和烟台市化工研究所(批号 20120524)两个厂家生产的预制板进行层析效果考察。(2)展开温度的考察:分别对 8 $^{\circ}\text{C}$ 和 25 $^{\circ}\text{C}$ 两种不同展开温度进行层析效果考察。(3)展开相对湿度的考察:分别对 65% 和 80% 两种不同展开相对湿度进行层析效果考察。(4)不同点样方式的考察:分别对点状点样和条带状点样进行层析效果考察。

以上结果显示,在上述各试验条件下大罗伞树的 TLC 效果均较好,表明本试验建立的大罗伞树 TLC 鉴别方法的耐用性良好。

2.2 含量测定

2.2.1 色谱条件 色谱柱为 SinoChrom ODS-BP C_{18} (250 mm \times 4.6, 5 μm),流动相为甲醇-水(23:77),流速 1.0 mL \cdot min $^{-1}$,柱温 25 $^{\circ}\text{C}$,进样量为对照品和供试品溶液均为 10 μL ,检测波长为 275 nm。

2.2.2 对照品、供试品和阴性溶液制备 (1)对照品溶液制备:精密称定岩白菜素对照品适量,加入甲醇溶液制成浓度约为 100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液,即得。

(2)供试品溶液制备:取本样品粉末(过 4 号筛)约 0.2 g,精密称定,置 50 mL 具塞锥形瓶中,精密加入 50%乙醇溶液 25 mL,称定重量,超声处理 30 min,放冷,再称定重量,用 50%乙醇补足减失的重量,摇匀,滤过,取滤液,即得。

阴性对照溶液:50%乙醇溶液。

2.2.3 专属性试验 精密吸取 2.2.2 项下的对照品、供试品和阴性对照溶液各 10 μL ,按 2.2.1 项下的色谱条件进样测定。结果发现,供试品溶液色谱图中有岩白菜素对照品吸收峰,阴性对照溶液则无此吸收峰。说明本方法测定大罗伞树中岩白菜素含量专属性强,无阴性干扰(图 2)。

2.2.4 仪器最低检测限和定量限 分别取岩白菜素甲醇溶液(约 0.5 $\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$)进行稀释,以 $S/N=3$ 时注入液相色谱仪的浓度作为检测限,以 $S/N=10$ 时注入仪器的浓度作为定量限。结果发现,岩白菜素的检测限为 1.6 ng,定量限为 11.2 ng。

2.2.5 方法学验证

2.2.5.1 岩白菜素线性关系考察 精密称取岩白菜素对照品适量,加甲醇制备成 0.531 mg \cdot mL $^{-1}$ 的溶液,备用。分别精密吸取上述对照品溶液 0.2、1.0、2.0、3.0、4.0 mL,各以甲醇定容至 5 mL,摇匀。

分别精密吸取上述对照品溶液各 10 μL 进样测定,纵坐标(Y)为峰面积积分值,横坐标(X)为进样量(μg),进行标准曲线绘制,计算回归方程。回归方程为 $Y=1\ 324\ 645.67X+4\ 961.78$, $r=0.999\ 9$ 。说明岩白菜素在 0.212 2~5.305 3 μg 范围内与峰面积呈良好线性关系(图 3)。

2.2.5.2 精密度试验 (1)重复性试验:取同一供试品溶液(8 号样品),重复进样测定 5 次,测定峰面积值。结果发现,5 次测定岩白菜素峰面积的平均值为 1 916 498, RSD 为 0.12%。(2)重现性试验:照 2.2.2 项方法,平行制备 6 份同一批样品(8 号样品)供试品溶液,分别进样测定。结果发现,6 份供试品溶液岩白菜素平均含量为 1.98%, RSD 为 1.19%。

2.2.5.3 稳定性试验 取同一供试品溶液(8 号样品),分别于 0、2、4、6、8 和 24 h 时进样测定。结果发现,24 h 内 6 次测得的岩白菜素峰面积的平均值为 1 975 312, RSD 为 0.60%。

2.2.5.4 准确度试验 采用加样回收试验方法进行,

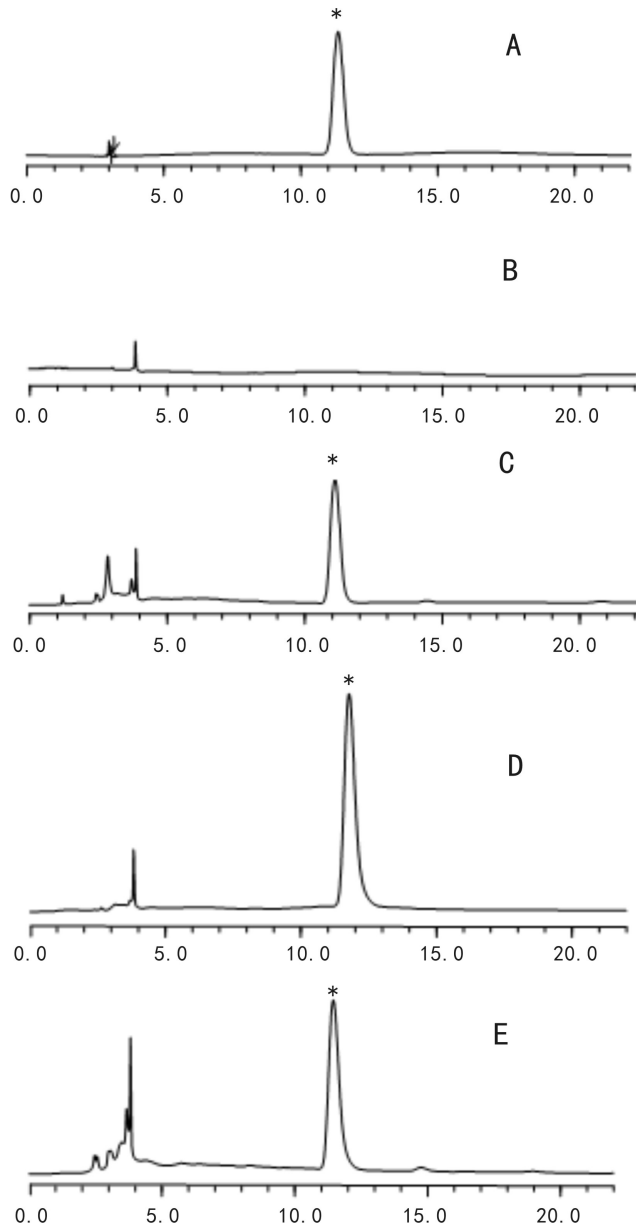


图2 岩白菜素对照品(A)、阴性对照液(B)、全株供试品(C)、地下部分供试品(D)和地上部分供试品(E)色谱图

Fig. 2 Chromatogram of Bergenin reference sample(A), negative control(B), substance(C), underground part substance(D) and above ground part substance(E)

分别取已知含量的同一批样品(8号)制备供试品溶液6份,制备方法参考2.2.2项中的“供试品溶液制备”,但样品取样量为0.1g,提取溶剂为含岩白菜素的50%乙醇溶液(岩白菜素浓度为 $72.2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$);测定方法参照2.2.1项。结果发现,岩白菜素平均回收率为101.08%,RSD为1.69%(表2)。

2.2.5.5 耐用性试验 (1) 色谱柱的考察: 在相同的

表2 加样回收率试验结果

Table 2 Results of recovery test ($n=6$)

原含量 Original content (mg)	加入量 Added content (mg)	测定量 Detected content (mg)	回收率 Recovery rate (%)	平均回收率 \bar{x} (%)	相对标准 偏差 RSD (%)
1.799 2	1.805 0	3.621 1	100.94	101.08	1.69
1.795 3	1.805 0	3.584 4	99.12		
1.791 3	1.805 0	3.581 7	99.19		
1.795 3	1.805 0	3.626 5	101.45		
1.809 2	1.805 0	3.659 0	102.48		
1.815 1	1.805 0	3.680 1	103.32		

注: 含量以药材干燥品计算。下同。

Note: Content was calculated by the dry medicinal products. The same below.

色谱条件下,分别采用赛芬 Sapphire C₁₈柱、菲罗门公司 Gemini C₁₈柱和依利特公司 SinoChrom ODS-BP C₁₈三根不同品牌的色谱柱(规格均为 $5 \mu\text{m}, 4.6 \text{mm} \times 250 \text{mm}$),测定同一供试品溶液(8号样品)岩白菜素含量。结果发现,三根色谱柱测定的岩白菜素含量平均值为1.99%,RSD=2.29%($n=3$)。

(2) 色谱仪的考察: 在相同的色谱条件下,分别采用岛津 LC-20AT 和 Waters 2695 两台不同品牌的色谱仪,测定同一供试品溶液(8号样品)岩白菜素含量。结果发现,两台色谱仪测定的岩白菜素含量平均值为1.93%,RSD=0.29%($n=2$)。

结果表明,本研究建立的 HPLC 测定大罗伞树中岩白菜素含量的方法对上述不同的色谱柱和仪器具有良好的耐用性。

2.2.6 样品测定 分别取岩白菜素对照品、10批样品的全株、地下部分和地上部分,照2.2.2项方法制备对照品和供试品溶液,照2.1项色谱条件测定岩白菜素含量。结果发现,10批样品以药材干燥品计算,岩白菜素含量全株为0.95%~2.58%,平均含量为1.67%;地下部分为2.23%~6.29%,平均含量为4.05%;地上部分为0.70%~2.44%,平均含量为1.21%(表3)。

3 讨论与结论

大罗伞树为壮族民间常用的壮药,来源于紫金牛科紫金牛属植物海南罗伞树。过去人们对紫金牛属药用植物的研究多集中在朱砂根、紫金牛、红凉伞、酸苔菜等药材上(李萍萍等,2009),对大罗伞树的研究则甚少,特别是对其药材的鉴别和有效成分的测定未见报道,致使该药材质量缺乏评价和控制

表3 不同产地和不同部位大罗伞树
中岩白菜素含量测定结果

Table 3 Bergenin content of *Ardisia quinquegona*
from different habitats and parts ($n=2$)

编号 No.	岩白菜素含量 Bergenin content (%)		
	全株 Whole plant	地下部分 Under ground part	地上部分 Above ground part
1	1.85	3.74	1.22
2	1.18	2.23	0.80
3	2.41	6.29	1.19
4	2.58	6.09	2.44
5	1.19	2.35	0.70
6	0.95	4.99	0.80
7	1.54	3.69	0.88
8	1.78	4.43	1.25
9	1.46	2.89	1.60
10	1.73	3.79	1.26
平均值 Average	1.67	4.05	1.21

的指标,严重影响了该药材临床用药的安全有效和开发利用。过去的研究表明,紫金牛属植物多含有岩白菜素,岩白菜素具有显著的药理活性,以其作为紫金牛属植物的有效成分或特征成分进行测定分析具有重要的意义。

在本研究的TLC鉴别方法中,我们对甲醇和乙醇两种不同溶剂准备的供试品溶液进行了比较,结果以甲醇作为溶剂较乙醇作为溶剂层析斑点清晰,因此选用甲醇为提取溶剂;曾对正丁醇-冰醋酸-水(3:1:1)、二氯甲烷-乙酸乙酯-甲醇-甲酸(4:1:0.7:0.5)和三氯甲烷-乙酸乙酯-甲醇-甲酸(4:1:1:1.5)等不同展开剂系统进行摸索,结果发现,前者展开效果欠佳,后两者展开效果较好,斑点集中,Rf值适中。但考虑到三氯甲烷毒性较大,故本试验选用二氯甲烷-乙酸乙酯-甲醇-甲酸(4:1:0.7:0.5)作为展开剂。

经方法学验证,表明本研究建立的大罗伞树药材岩白菜素含量测定方法,专属性强、重现性高、耐用性良好,且该方法操作简便,可作为壮药大罗伞树药材岩含量测定方法。

供试品溶液制备中,分别对不同溶剂(甲醇、50%甲醇、乙醇、50%乙醇)和不同提取方法(加热回流和超声处理)进行考察。结果发现以50%乙醇超声提取岩白菜素得率最高。故供试品溶液制备方法初步确定采用50%乙醇超声处理。为此,进一步采

用正交设计方法对提取方法条件进行优化,对药材取样量、破碎度和超声提取时间三因素三水平进行考察。根据结果最终确定本品供试品溶液制备方法的条件为药材取样量约0.2g,药材破碎度为过四号药典筛的粉末,超声提取时间为30min。

由表3可知,不同产地大罗伞树药材岩白菜素含量有一定差异,其中含量最高的是采集于岑溪县波塘镇的4号样品,岩白菜素含量达2.58%,含量最低的是采集于钦州市钦北区的6号样品,含量为0.95%;同一个地区不同区域采集的样品含量也有所不同,如采集于融水县的1号样品含量为1.85%,3号样品则为2.41%。因此,对大罗伞树药材进行岩白菜素含量测定,对于控制该药材质量显得尤为必要。建议有关部门尽早制订壮药大罗伞树质量标准,并将该药材岩白菜素含量测定项收入标准。

壮族民间使用大罗伞树常以全株入药用。本研究结果表明,该植物不同部位均含有岩白菜素,其中全部样品含量均是地下部分(根及根茎)显著高于地上部分(茎枝及叶),平均含量前者是4.05%,后者是1.21%,但从充分利用资源考虑,以全株入药具有一定的科学道理。

参考文献:

- HUANG RS, 2015. Zhuang medicine edition (Vol. I) [M]. Nanning: Guangxi Science and Technology Press: 289. [黄瑞松, 2015. 壮药选编(上册) [M]. 南宁: 广西科学技术出版社: 289.]
- JIANG XM, YE JS, XING WR, 2003. Introduction to medical and horticultural values and research progress of *Ardisia* species [J]. Jiangxi For Sci Technol, (5): 30-33. [江香梅, 叶金山, 幸伟荣, 2003. 紫金牛属植物的药用、观赏价值及其研究进展 [J]. 江西林业科技(5): 30-33.]
- LIU N, LI Y, GUO JX, et al, 1993. Studies on the taxonomy of the genus *Ardisia* (Myrsinaceae) form China and the occurrence and quantity of *Bergenin* in the genus [J]. Acta Acad Med Shanghai, 20(1): 49-53. [刘姝, 李颖, 郭济贤, 等, 1993. 中国紫金牛属的分类及其岩白菜素的含量 [J]. 上海医科大学学报, 20(1): 49-53.]
- LI PP, YANG CS, ZENG YH, 2009. Advances in studies on resources for medicinal source plants with *Bergenin* [J]. Chin Trad Herb Drugs, 40(9): 1500-1505. [李萍萍, 杨超生, 曾云恒, 2009. 岩白菜素药源植物资源研究进展 [J]. 中草药, 40(9): 1500-1505.]
- WANG G, MA BJ, 2002. The research situation of *Bergenin* [J]. J Anhui Trad Chin Med Coll, 21(6): 59-61. [王刚, 麻兵继, 2002. 岩白菜素的研究概况 [J]. 安徽中医学院学报, 21(6): 59-61.]
- XIA CL, LIU GM, MA XK, 2006. Research progress of *Bergenin* [J]. Lishizhen Med Mat Med, 17(3): 432-433. [夏从龙, 刘光明, 马晓匡, 2006. 岩白菜素的研究进展 [J]. 时珍国医国药, 17(3): 432-433.]