

· 标准研究 ·

## 壮药金钮扣定性定量方法研究

蒋秋香, 吴柳春 (广西柳州食品药品检验所, 柳州 545006)

**摘要** 目的: 建立金钮扣药材的定性定量质量控制方法, 考察广西不同产地、不同采收时节金钮扣的药材质量。方法: 以乙酸丁酯-乙酸乙酯-甲酸-水 (11:3:1.5:1.5) 为展开剂, 采用TLC法对金钮扣进行定性鉴别。用C18色谱柱 (4.6 mm×250 mm, 5 μm), 柱温30℃, 以乙腈-0.4%磷酸溶液 (10:90) 为流动相, 流速1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 检测波长为327 nm, 采用HPLC法对金钮扣中的绿原酸进行含量测定。结果: 薄层板上斑点清晰, 分离度好; 绿原酸在2.032~25.40 μg·mL<sup>-1</sup> (r=0.9995) 线性关系良好; 加样回收率 (n=6) 为100.9%, RSD为1.2%, 所测得的13批样品含量在0.042~0.741 mg·g<sup>-1</sup>之间。结论: 该方法简便、准确, 重复性好, 可用于壮药金钮扣药材的质量控制。

**关键词:** 民族药; 壮药; 金钮扣; 绿原酸; TLC; HPLC

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 1002-7777(2017)03-0290-05

doi:10.16153/j.1002-7777.2017.03.010

### On the Qualitative and Quantitative Method for Quality Control of Zhuang Medicine *Spilanthes paniculata* Wall. ex DC.

Jiang Qiuxiang, Wu Liuchun (Guangxi Liuzhou Institute for Food and Drug Control, Liuzhou 545006, China)

**Abstract Objective:** To establish a qualitative and quantitative method for quality control of *Spilanthes paniculata* Wall. ex DC., and investigate the quality of this medicine in Guangxi at different habitats and harvest time. **Methods:** The TLC method was used for qualitative identification with butyl acetate-ethyl acetate-formic acid-water (11:3:1.5:1.5) being developing agent. The content determination of chlorogenic acid was conducted by HPLC by using a C18 column (4.6 mm×250 mm, 5 μm), the mobile phase was acetonitrile-0.4% phosphoric acid (10:90) at a flow rate of 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, the detection wavelength was 327 nm, and the column temperature was 30℃. **Results:** The spot of chlorogenic acid could be well identified by TLC. In the system of HPLC, chlorogenic acid showed good linear relationship in the range of 2.032-25.40 μg·mL<sup>-1</sup> (r=0.9995). The recovery rate was 100.9% (n=6), RSD=1.2%. The contents of the 13 batches of samples were between 0.042 and 0.741 mg·g<sup>-1</sup>. **Conclusion:** The method is simple, accurate, reliable and can be used for the quality control of *Spilanthes paniculata* Wall. ex DC.

**Keywords:** national medicine; Zhuang medicine; *spilanthes paniculata*; chlorogenic acid; TLC; HPLC

壮药金钮扣 *Spilanthes paniculata* Wall. ex DC. (曾用名: *Spilanthes acmella* auct. non L.) 系菊科植物金钮扣的全草, 别名雨伞草、散血草、山天文

草、大黄花、苦草等。味辛、苦, 性微温, 小毒, 具有止咳平喘, 解毒利湿, 消肿止痛的功效, 用于治疗感冒咳嗽、哮喘、百日咳、肺结核、痢疾、肠

炎、疟疾、疮疖肿毒、风湿性关节炎、牙痛、跌打损伤、毒蛇咬伤等<sup>[1]</sup>。主产于广西、福建、台湾、广东等地，是广西瑶、壮族人民常用的中草药。颜萍花等<sup>[2]</sup>对金钮扣的质量标准进行了初步探讨，但无含量测定方面的研究。本文采用HPLC法对金钮扣中的绿原酸进行含量测定，发现在不同产地、不同采收时节中绿原酸的含量差异较大。绿原酸具有抗炎、抗肿瘤、抗菌、抗心血管疾病、抗氧化、降血糖、免疫调节等药理作用<sup>[3-4]</sup>，故本文首次采用薄层色谱法进行定性鉴别、高效液相色谱法进行含量测定，为其建立质量标准提供参考。

## 1 仪器与试剂

### 1.1 仪器

Waters 2695-2487型高效液相色谱仪，Empower Pro工作站（美国Waters公司）；AS7240BT超声波清洗器（天津奥特赛恩斯仪器有

限公司）；METTLER XS205电子分析天平（瑞士梅特勒公司）。色谱柱为Waters公司SunFire C18柱（4.6 mm × 250 mm，5 μm）。

### 1.2 试剂

对照品绿原酸(批号：110753-201314)，购自中国食品药品检定研究院，供含量测定用，含量96.6%。薄层层析硅胶G板购自青岛海洋化工有限公司（粘合剂：CMC-Na；规格：20cm × 20cm；厚度：500 μm）。乙腈为色谱纯，水为超纯水，其他试剂均为分析纯。

### 1.3 药材

采集金钮扣药材13批，经广西中医药大学中药鉴定教研室蔡毅教授鉴定为金钮扣 *Spilanthes paniculata* Wall.ex DC.，以采自玉林市兴业县批号为20131007的样品为对照药材。详细信息见表1。

表1 金钮扣详细信息

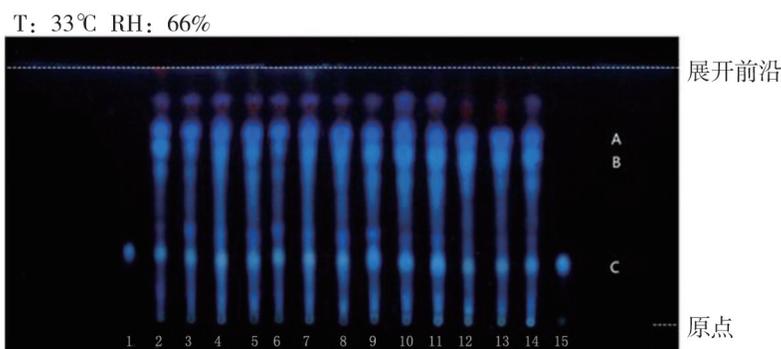
编号	采集时间	采集地点	样品状态
JNK-1	20131016	岑溪市岑城镇	全草
JNK-2	20131114	岑溪市三堡镇	全草
JNK-3	20140528	岑溪市归义镇	全草
JNK-4	20131007 (对照药材)	玉林市兴业县 1	全草
JNK-5	20131130	玉林市兴业县 2	全草
JNK-6	20140602	玉林市兴业县 3	全草
JNK-7	20140404	玉林市博白县	全草
JNK-8	20131225	上林县那良镇	全草
JNK-9	20131223	南宁市高峰林场	全草
JNK-10	20131220	桂平市江口镇	全草
JNK-11	20140427	上林县西燕镇	全草
JNK-12	20131118	上思县在妙乡	全草
JNK-13	20131008	来宾市金秀县	全草

## 2 方法与结果

### 2.1 金钮扣药材的TLC鉴别

取本品粉末（过二号筛）1 g，加70%甲醇20 mL，超声提取30 min，滤过，取滤液浓缩至1 mL，作为供试品溶液。另取金钮扣对照药材（JNK-4）1 g，同法制成对照药材溶液。另取绿原酸对照品，用甲醇溶解，制成对照品溶液。照薄层色谱法（《中

国药典》2015年版四部通则0502）试验，吸取对照品溶液、对照药材溶液及供试品溶液各3 μL，分别点于同一硅胶G薄层板上，以乙酸丁酯-乙酸乙酯-甲酸-水（11:3:1.5:1.5）为展开剂，展开，取出，晾干，置紫外光（365 nm）灯下检视。供试品色谱中，在与对照药材和对照品色谱相应的位置上，显相同颜色的荧光斑点。色谱图见图1。



1、15. 绿原酸对照品；5. 金钮扣对照药材 (JNK-4)；2~4. 金钮扣供试品 (编号JNK-1~JNK-3)；  
6~14. 金钮扣供试品 (编号JNK-5~JNK-13)。

图1 金钮扣药材薄层色谱图

## 2.2 金钮扣药材中绿原酸的含量测定

### 2.2.1 色谱条件

色谱柱: Waters SunFire C18 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 柱温30°C; 流动相乙腈-0.4%磷酸溶液 (10:90), 流速1.0 mL · min<sup>-1</sup>; 检测波长: 327 nm; 进样量为10 μL<sup>[5]</sup>。

### 2.2.2 系统适用性试验

按上述实验条件进行测定, 结果理论板数按绿原酸峰计均不低于5000, 且与杂质达到基线分离, 分离度大于2.0。色谱图见图2。

### 2.2.3 对照品溶液制备

精密称取绿原酸对照品10.52 mg置20 mL量瓶中, 加70%甲醇溶解并定容, 摇匀, 作为对照品储备液; 精密吸取储备液1 mL于50 mL量瓶中, 加70%甲醇至刻度, 摇匀, 即得 (10.16 μg · mL<sup>-1</sup>)。

### 2.2.4 供试品溶液制备

取本品药材 (JNK-1) 粉末 (过三号筛) 1.0 g, 精密称定, 置100 mL锥形瓶中, 精密加入70%甲醇溶液25 mL, 称定重量, 超声处理30分钟, 取出, 放冷, 用70%甲醇溶液补足减失的重量, 摇匀, 过0.45 μm滤膜, 即得。

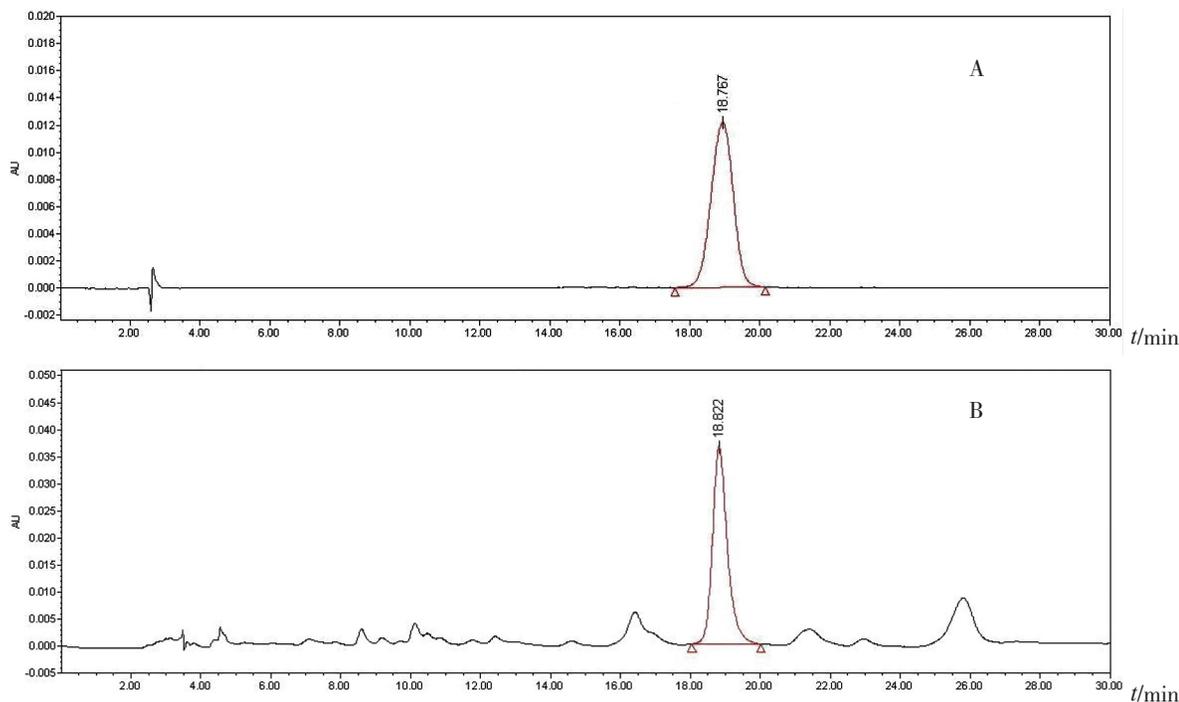


图2 绿原酸对照品 (A)、金钮扣样品 (B) HPLC色谱图

2.2.5 线性关系考察

精密量取“2.2.3”节对照品储备液5 mL于50 mL量瓶中，加70%甲醇至刻度，摇匀，精密吸取1.0、2.5、5.0、7.5、10.0、12.5 mL分别置25 mL量瓶中，用70%甲醇稀释至刻度（约相当于绿原酸2.032、5.081、10.16、15.24、20.32、25.40  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ），摇匀，进样10  $\mu\text{L}$ 进行分析，记录峰面积。以对照品浓度 $C$ （ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ）为横坐标，以色谱峰峰面积 $Y$ 为纵坐标，制作标准曲线，求得标准曲线的回归方程：

$$Y=3.59 \times 10^4 X + 9.16 \times 10^3 \quad r=0.9995$$

结果表明绿原酸在2.032 ~ 25.40  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 线性关系良好。

2.2.6 精密度试验

精密吸取对照品溶液，连续进样6次，每次10  $\mu\text{L}$ ，以峰面积计，RSD为0.4%。表明该方法精密度良好。

2.2.7 稳定性试验

取同一供试品溶液，分别于0、2、8、12、20、24 h进样测定，以峰面积进行计算，结果RSD为2.1%。表明供试品溶液中绿原酸在24 h内稳定性良好。

2.2.8 重复性试验

取同一样品（JNK-1）各6份，分别按“2.2.4”节方法制备供试品溶液，进样10  $\mu\text{L}$ ，测定。结果样品中绿原酸平均含量（ $n=6$ ）为0.1165  $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ；RSD为1.1%。表明该方法重复性良好。

2.2.9 加样回收率试验

精密称取同一批（JNK-1）已知绿原酸含量为0.1165  $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 的样品0.5 g，共6份，分别精密加入“2.2.5”节下对照品溶液（浓度20.32  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ）2.0 mL，按“2.2.4”节方法操作，制备供试溶液，测定，计算回收率。结果见表2。

表2 绿原酸加样回收率试验结果（ $n=6$ ）

称样量 / g	样品含量 / $\mu\text{g}$	加入量 / $\mu\text{g}$	测得量 / $\mu\text{g}$	回收率 / %	平均值 / %	RSD / %
0.4962	57.81	40.64	98.24	99.48	100.9	1.2
0.5216	60.77	40.64	101.58	100.42		
0.5238	61.02	40.64	101.64	99.95		
0.5129	59.75	40.64	100.79	100.98		
0.5018	58.46	40.64	99.96	102.12		
0.5187	60.43	40.64	102.05	102.41		

2.2.10 样品测定

按“2.2.4”节制备供试品溶液及检测方法，

测定13批金纽扣药材中绿原酸的含量，其含量在0.042 ~ 0.741  $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 范围内，结果见表3。

表3 金纽扣药材中绿原酸的含量测定结果（ $n=3$ ）

编号	含量 / ( $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ )	编号	含量 / ( $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ )
JNK-1	0.116	JNK-8	0.623
JNK-2	0.157	JNK-9	0.741
JNK-3	0.084	JNK-10	0.704
JNK-4	0.699	JNK-11	0.144
JNK-5	0.199	JNK-12	0.120
JNK-6	0.082	JNK-13	0.042
JNK-7	0.057		

### 3 讨论

#### 3.1 薄层色谱鉴别方法的考察

曾参照《中国药典》<sup>[5]</sup>中金银花的鉴别方法,将药材粉末加甲醇5 mL放置12 h提取,以乙酸丁酯-甲酸-水(7:2.5:2.5)的上层溶液为展开剂,结果对照品和样品的Rf值非常小,且斑点不清晰。参考相关文献<sup>[6-8]</sup>,且经过不断试验,最后以70%甲醇超声30 min提取供试液,以乙酸丁酯-乙酸乙酯-甲酸-水(11:3:1.5:1.5)为展开剂,节约了提取时间,且Rf值适中,供试品色谱中,在与对照品色谱相应的位置上,显相同颜色的荧光斑点,可作为金纽扣药材中绿原酸的薄层色谱鉴别方法。

#### 3.2 含量测定方法的考察

为了选定最佳的含量测定供试液制备方法,本文分别用乙醇(超声、回流)、甲醇(超声、回流)提取30 min,发现用甲醇超声提取为较佳条件;之后分别用10%、30%、50%、70%、90%甲醇超声提取30 min,结果发现用70%甲醇为溶剂最佳;在提取时间的选择上,用70%甲醇为溶剂,分别提取10、30、45、60 min,结果发现提取30 min时,样品中绿原酸含量最高,且杂质峰相对较少,故本文选择用70%甲醇提取30 min为含量测定中供试液的制备方法。

将绿原酸作为金纽扣的指标成分进行定性定量方法测定,从本实验方法学结果可知,定性鉴别中,其Rf值适中,斑点清晰;含量测定中,其线性、重现性、重复性、稳定性等结果良好,可为金纽扣质量标准的建立提供参考。

### 4 结论

本文以绿原酸作为指标成分,对13批金纽扣进行薄层色谱定性鉴别和含量测定,结果TLC斑点清晰,与杂质斑点能较好地分离,在取样量和点样

量一致的情况下,同一薄层板上的绿原酸斑点大小与含量测定结果相符,如JNK-13斑点较小,其含量也相应低,而JNK-9、JNK-10斑点大,其含量相对较高,说明所选的定性定量方法能较好的反应金纽扣的指标成分绿原酸的内在质量。金纽扣为一年生草本<sup>[1]</sup>,本文的13批金纽扣均于4到12月份采自广西各地,从绿原酸的含量可知,不同产地、不同采收时节,金纽扣中绿原酸的含量差异较大,如JNK-13与JNK-9的含量相差了18倍之多。地域的差别、采收时节的不同对其含量有何影响、其影响的规律如何,是笔者下一步讨论的课题。

#### 参考文献:

- [1] 国家中医药管理局. 中华本草[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999: 987
- [2] 颜萍花, 唐玉荣, 曾祥燕, 等. 壮药金纽扣质量标准初步研究[J]. 广西中医药, 2015, 38(3): 78-80.
- [3] 王丽萍, 郭栋, 王果, 等. 中药绿原酸的研究进展[J]. 时珍国医国药, 2011, 22(4): 961-96.
- [4] 吴卫华, 康楨, 欧阳冬生, 等. 绿原酸的药理学研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2006, 18(4): 691-694.
- [5] 中国药典: 一部[S]. 2015: 221.
- [6] 钟方晓. 金银花有效成分标准物质的研究[J]. 时珍国医国药, 2004, 15(7): 394-395.
- [7] 黄瑞松, 陆峥琳, 覃冬杰, 等. 壮药水银花质量标准研究[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(5): 762-767.
- [8] 陈东鸿, 江芳, 陈航, 等. 肿节风对照药材标定标准的研究[J]. 药物分析杂志, 2013, 33(4): 695-700.

(收稿日期 2016年5月23日 编辑 倪明月)