

水马桑质量标准的研究

汪鋆植^{1,2}, 荀保灵^{1,2}, 张宏岐^{1,2,3*}, 余海立^{1,2}, 王爱玲^{1,2}, 吕慧芳^{1,2}, 邹坤^{1,2}

(1. 三峡大学天然产物研究与利用湖北省重点实验室, 湖北 宜昌 443002; 2. 湖北省土家族药物研究所, 湖北 宜昌 443002; 3. 三峡大学医学院, 湖北 宜昌 443002)

摘要: 目的 建立水马桑 *Weigela japonica* Thunb. var. *sinica* (Rehd.) Bailey 的质量标准。方法 对该药材进行性状、显微鉴定后, 采用 TLC 法作定性鉴别; 根据《中国药典》方法, 检测水分、总灰分、酸不溶性灰分、浸出物含有量; 通过 HPLC、UV 法, 分别测定东莨菪内酯、总香豆素含有量。结果 水马桑性状和显微特征可与同属其他植物区分开。TLC 斑点清晰, 分离度良好。水分、总灰分、酸不溶性灰分、水溶性浸出物、醇溶性浸出物含有量分别为不超过 12.0%、不超过 2.0%、不超过 0.5%、不低于 5.0%、不低于 4.5%。东莨菪内酯、总香豆素分别在 1.25~40.0 μg/mL ($r=0.9997$)、2.0~64.0 μg/mL ($r=0.9999$) 范围内线性关系良好, 平均加样回收率分别为 98.19% (RSD=0.90%)、99.21% (RSD=2.5%)。结论 该方法准确可靠, 可用于水马桑的质量控制。

关键词: 水马桑; 东莨菪内酯; 总香豆素; TLC; HPLC; UV

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1528(2017)12-2529-05

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2017.12.017

Quality standard for *Weigela japonica* var. *sinica*

WANG Jun-zhi^{1,2}, GOU Bao-ling^{1,2}, ZHANG Hong-qi^{1,2,3*}, YU Hai-li^{1,2}, WANG Ai-ling^{1,2}, LÜ Hui-fang^{1,2}, ZOU Kun^{1,2}

(1. Hubei Provincial Key Laboratory for Natural Products Research and Development, China Three Gorges University, Yichang 443002, China; 2. Hubei Provincial Tujia Minority Drug Research Institute, Yichang 443002, China; 3. Medical College of China Three Gorges University, Yichang 443002, China)

ABSTRACT: AIM To establish the quality standard for *Weigela japonica* Thunb. var. *sinica* (Rehd.) Bailey (*W. j.*). **METHODS** TLC was adopted in this medicinal material's qualitative identification after morphological identification and microscopic identification. The contents of water, total ash, acid-insoluble ash and extracts were detected according to Chinese Pharmacopoeia methods. Then the contents of scopoletin and total coumarins were determined by HPLC and UV, respectively. **RESULTS** The morphologies and microscopic characters of *W. j.* could be distinguished from other same generic plants. The clear TLC spot displayed good resolution. The contents of water, total ash, acid-insoluble ash, water-soluble extract and acid-soluble extract were no more than 12.0%, no more than 2.0%, no more than 0.5%, no less than 5.0% and no less than 4.5%, respectively. Scopoletin and total coumarins showed good linear relationships within the ranges of 1.25~40.0 μg/mL ($r=0.9997$) and 2.0~64.0 μg/mL ($r=0.9999$), whose average recoveries were 98.19% (RSD=0.90%) and 99.21% (RSD=2.5%), respectively. **CONCLUSION** This accurate and reliable method can be used for the quality control of *W. j.*.

KEY WORDS: *Weigela japonica* Thunb. var. *sinica* (Rehd.) Bailey (*W. j.*); scopoletin; total coumarins; TLC; HPLC; UV

收稿日期: 2017-05-05

基金项目: 国家自然科学基金 (31370373); 2016 年三峡大学研究生科研创新基金 (SDYC2016123)

作者简介: 汪鋆植 (1966—), 男 (土家族), 博士, 教授, 从事三峡地区中药、民族药活性评价和质量控制研究。Tel: (0717) 639747, E-mail: wangjunzhi@ctgu.edu.cn

* 通信作者: 张宏岐 (1983—), 男, 从事三峡区域民族民间中草药及其内生菌代谢产物活性成分研究。Tel: (0717) 6396818, E-mail: zhq6396549@163.com

忍冬科锦带花属植物水马桑 *Weigela japonica*

Thunb. var. *sinica* (Rehd.) Bailey (*W. j.*) 又名白马桑，以根、茎入药^[1-2]，具有活血镇痛，除湿解毒功效，主治风湿筋骨疼痛、腰肌劳损、跌打损伤、湿疹、皮肤瘙痒、痈肿疮毒等症^[3]，为土家族药^[1-2, 4-5]，在我国安徽、浙江、江西、福建、湖北、湖南、广东、广西、四川、贵州等地均有分布，主要生长于海拔 400 ~ 1 800 m 的山坡林下、山顶灌丛、沟边等地^[6]。目前，国家及地方药材标准均未收载水马桑，影响了其临床用药的安全控制，为了适应中药材质量监督管理要求，加强对该药材质量的控制，本实验建立了相关质量标准，为其规范使用提供依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器 Waters 2690 高效液相色谱仪（美国 Waters 公司）；Ultimate 3000 高效液相色谱仪，配置 DAD 紫外检测器（美国 Dionex 公司）；AL204-IC 电子分析天平（梅特勒-托利多仪器上海有限公司）；Nikon D-Fil 显微镜（配成像系统）；ZF-1 三用紫外线分析仪（上海嘉鹏科技有限公司）；KQ-500DB 数控超声波清洗器（昆山市超声仪器有限公司）；DZG-6050SA 真空干燥箱（上海森信实验仪器有限公司）；UV-2500PC 紫外-可见分光光度计（上海美谱达仪器有限公司）；硅胶薄层板（烟台市化学工业研究所、青岛海洋化工厂）。

1.2 材料 水马桑共 10 批（具体信息见表 1），由三峡大学王玉兵博士鉴定为忍冬科锦带花属植物水马桑 *Weigela japonica* Thunb. var. *sinica* (Rehd.) Bailey 的根。东莨菪内酯对照品为自制，含有量 99.9%。甲醇为色谱纯；水为超纯水；其他试剂均

为分析纯。

表 1 样品信息

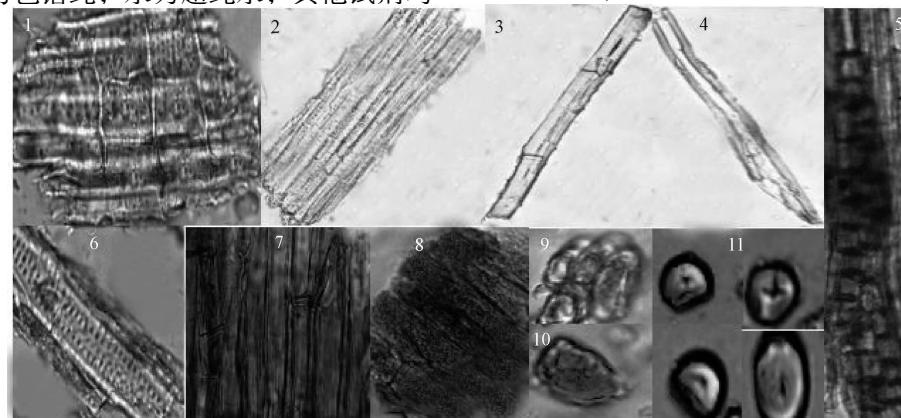
Tab. 1 Information of samples

编号	产地
1	常德市石门县
2	恩施土家族苗族自治州利川市
3	宜昌长阳土家族自治县
4	宜昌市秭归县
5	恩施土家族苗族自治州巴东县
6	恩施土家族苗族自治州咸丰县
7	恩施土家族苗族自治州建始县
8	恩施土家族苗族自治州鹤峰县
9	宜昌五峰土家族自治县
10	神农架林区

2 方法与结果

2.1 性状鉴别 本品为不规则长条状或片状，直径 0.5 ~ 20 cm，表面多光滑，淡黄色至黄褐色，有皱纹和沟纹。可见瘤状突起和须根痕。残留茎表面多粗糙，黄褐色至黑褐色，皮部易片状脱落，髓中空，表面光滑，黄褐色至黑褐色。木质部淡黄色至黄色，质坚硬，断面纤维状。质轻气微。味淡，略苦。

2.2 显微鉴别 根粉末呈浅棕褐色。薄壁细胞类方形，具多数大小不一的网状纹孔，集成纹孔群，连珠状细胞壁木化。纤维束或散离，先端梭形或截顿，直径 5 ~ 50 μm；纤维束周围细胞中含草酸钙方晶，形成晶纤维。具缘纹孔导管多见，具缘纹孔排列紧密。木栓细胞棕黄色，表面观纺锤形。分泌细胞多见，胞腔内含颗粒状物或油滴。偶见单个散在或数个成群石细胞，呈圆形、类圆形，壁较厚。此外，还有黄棕色油细胞及淀粉粒，单粒类圆形、椭圆形或半圆形，脐点点状、裂缝状、一字形或十字形，层纹不明显。具体见图 1。



1. 薄壁细胞 2~4. 纤维 5. 晶纤维 6. 具缘纹孔导管 7. 木栓细胞 8. 分泌细胞 9. 石细胞 10. 油细胞 11. 淀粉粒
1. thin-wall cells 2~4. fibers 5. crystal fibers 6. bordered pit catheters 7. cork cells 8. secretory cells 9. stone cells 10. oil cells
11. starch grains

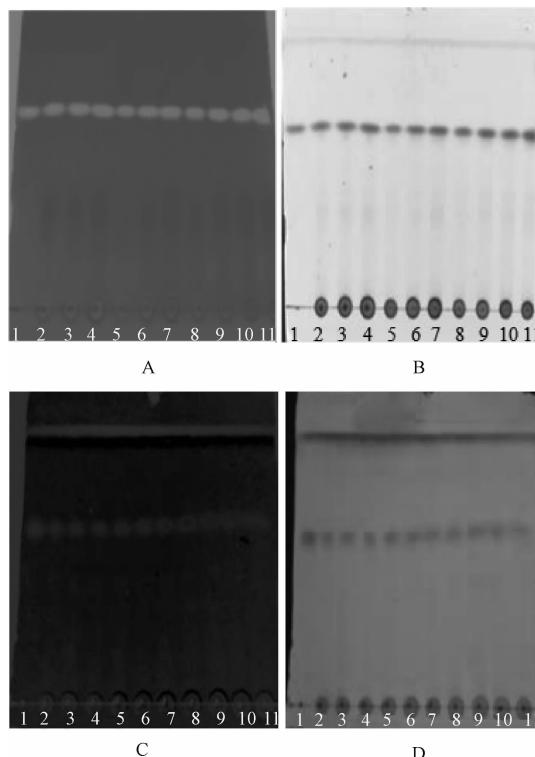
图 1 水马桑显微特征 (10×40)

Fig. 1 Microscopic characters of *W. j.* (10×40)

2.3 TLC 鉴别

2.3.1 供试品、对照品溶液制备 精密称取水马桑粉末约1.0 g，置于具塞锥形瓶中，精密加入20 mL甲醇，25 ℃超声（500 W、40 kHz）30 min，过滤，取续滤液，作为供试品溶液。另取东莨菪内酯对照品适量，加甲醇制成0.5 mg/mL对照品溶液。

2.3.2 方法 按照薄层色谱法（2015年版《中国药典》四部通则0502）^[7]，吸取“2.3.1”项下供试品、对照品溶液各5 μL，点于普通型GF254、高效型HF254硅胶薄层板上，以三氯甲烷-乙酸乙酯-冰乙酸溶液（5:3:0.1）为展开剂展开，取出，晾干，置于365 nm紫外光灯下检视，然后放入碘缸显色直至斑点清晰。结果，供试品在与对照品相同位置上显相同颜色斑点，分离效果与重复性良好，具体见图2。



注：A、B为GF254硅胶薄层板，C、D为HF254硅胶薄层板

1. 东莨菪内酯 2~11. 样品
1. scopoletin 2~11. samples

图2 水马桑 TLC 色谱图

Fig. 2 TLC chromatograms of *W. j.*

2.4 检查与浸出物 水分、总灰分、酸不溶性灰分、浸出物含有量的测定分别参照2015年版《中国药典》四部通则0832水分测定法（烘干法）、2302灰分测定法（总灰分和酸不溶性灰分测定法，

以10%稀盐酸测定酸不溶性灰分）、2201浸出物测定法（热浸法测定水溶性浸出物；热浸法测定醇溶性浸出物，以95%乙醇为溶剂）测定^[7]，结果见表2。

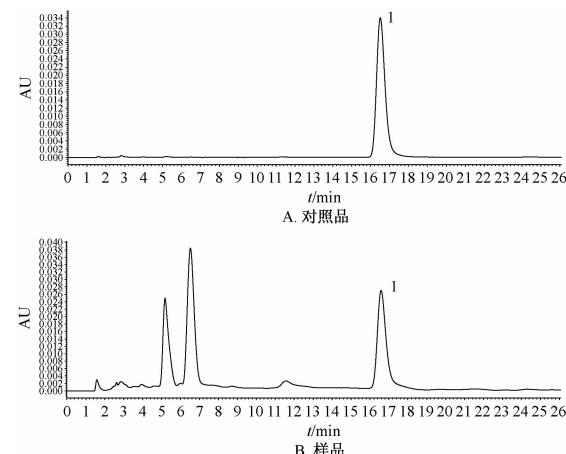
表2 样品水分、总灰分、酸不溶性灰分和浸出物含有量测定结果（%，n=3）

Tab. 2 Results of content determination of water, total ash, acid-insoluble ash and extracts in samples (%, n=3)

编号	水分	总灰分	酸不溶性灰分	水溶性浸出物	醇溶性浸出物
1	11.38	1.55	0.43	5.04	4.49
2	10.75	1.53	0.42	5.37	5.04
3	10.32	1.59	0.53	6.94	5.37
4	10.35	1.56	0.57	5.53	5.45
5	10.32	1.62	0.61	6.32	4.23
6	11.01	1.59	0.54	6.06	4.54
7	10.98	1.32	0.32	5.89	4.87
8	10.56	1.40	0.21	6.26	4.36
9	10.48	1.17	0.11	5.84	5.12
10	10.46	1.30	0.21	6.24	5.09

2.5 东莨菪内酯含有量测定

2.5.1 色谱条件 Eclipse XDB-C₁₈色谱柱（250 mm×4.6 mm, 5 μm）；流动相甲醇-0.01%冰乙酸（30:70）；检测波长344 nm；柱温30 ℃；体积流量1.0 mL/min；进样量10 μL。色谱图见图3。



1. 东莨菪内酯

1. scopoletin

图3 东莨菪内酯HPLC色谱图

Fig. 3 HPLC chromatograms of scopoletin

2.5.2 供试品溶液制备 精密称取水马桑粉末（过4号筛）3份，每份约0.5 g，置于具塞锥形瓶中，精密加入25 mL甲醇，称定质量，室温放置1 h并不时摇动锥形瓶，超声（500 W、40 kHz）1 h，甲醇补足减失的质量，摇匀，过滤，取续滤液，0.45 μm微孔滤膜过滤，即得。

2.5.3 线性关系考察 精密称取东莨菪内酯对照品适量, 加甲醇制成40 μg/mL溶液, 稀释成6个质量浓度(1.25、2.5、5.0、10.0、20.0、40.0 μg/mL), 各精密吸取10 μL, 平行3次, 在“2.5.1”项色谱条件下测定。以质量浓度为横坐标(X), 相应峰面积积分值为纵坐标(Y)进行回归, 得回归方程为 $Y = 24.652X + 21.893$ ($r = 0.9997$), 在1.25~40.0 μg/mL范围内线性关系良好。

2.5.4 精密度试验 精密吸取同一供试品溶液10 μL注入色谱仪中, 连续测定6次, 测得东莨菪内酯峰面积RSD为0.16%, 表明仪器精密度良好。

2.5.5 重复性试验 取同一批水马桑粉末6份, 按“2.5.2”项下方法制备供试品溶液, 注入色谱仪中测定, 测得东莨菪内酯含有量RSD为1.7%, 表明该方法重复性良好。

2.5.6 稳定性试验 取同一批“2.5.2”项下供试品溶液, 于0、2、4、6、8、12、24 h在“2.5.1”项色谱条件下测定, 测得东莨菪内酯峰面积RSD为0.75%, 表明溶液在室温下24 h内稳定性良好。

2.5.7 加样回收率试验 精密称取同一批水马桑细粉6份, 每份约0.25 g, 每2份分别精密加入2.5、8、10 mL东莨菪内酯对照品溶液(0.046 mg/mL), 补加甲醇至25 mL, 按“2.5.3”项下方法制备供试品溶液, 进样10 μL测定, 计算回收率, 结果见表3。

表3 东莨菪内酯加样回收率试验结果(n=6)**Tab. 3 Results of recovery tests for scopoletin (n=6)**

称样量/ g	原有量/ mg	加入量/ mg	测得量/ mg	回收率/ %	平均回收 率/%	RSD/ %
0.252 1	0.327 7	0.12	0.443 1	96.17		
0.252 3	0.328 0	0.12	0.446 8	99.00		
0.251 6	0.327 1	0.37	0.688 9	97.78		
0.251 8	0.327 3	0.37	0.690 6	98.19	98.08	1.06
0.250 9	0.326 2	0.46	0.780 9	98.85		
0.252 6	0.328 4	0.46	0.781 5	98.50		

2.5.8 样品含有量测定 按“2.5.3”项下方法制备10批供试品溶液, 每批3份, 在“2.5.1”项色谱条件下进样10 μL测定, 结果见表4。

2.6 总香豆素含有量测定

2.6.1 对照品溶液制备 精密称取东莨菪内酯对照品64 mg, 置于100 mL量瓶中, 甲醇溶解并稀释至刻度, 摆匀, 得每1 mL含640 μg该成分的溶液, 将其稀释10倍, 即得。

表4 东莨菪内酯含有量测定结果(n=3)**Tab. 4 Results of content determination of scopoletin (n=3)**

编号	样品量/g	东莨菪内酯/%
1	0.499 9	0.12
2	0.500 8	0.13
3	0.500 7	0.13
4	0.500 3	0.08
5	0.500 2	0.09
6	0.500 6	0.10
7	0.500 1	0.11
8	0.500 7	0.10
9	0.502 3	0.12
10	0.501 4	0.12

2.6.2 供试品溶液制备 精密称取水马桑粉末约0.5 g, 置于10 mL具塞试管中, 加入5 mL甲醇, 室温放置过夜, 60 ℃水浴提取2 h, 1500 r/min离心30 min, 取上清液, 药渣加5 mL甲醇重复提取2次, 合并3次上清液, 转移至25 mL量瓶中, 甲醇定容并摇匀^[8], 将其稀释20倍, 即得。

2.6.3 检测波长选择 取对照品、供试品溶液, 在200~500 nm波长范围内进行扫描, 发现两者在344 nm波长处均有最大吸收, 故确定检测波长为344 nm。

2.6.4 线性关系考察 精密吸取“2.6.1”项下对照品溶液, 配制成不同质量浓度梯度, 以甲醇为参比, 在344 nm波长处测定吸光度。以东莨菪内酯质量浓度为横坐标(X), 吸光度为纵坐标(A)进行回归, 得回归方程为 $A = 0.0291X + 0.0133$ ($r = 0.9999$), 在2.0~64.0 μg/mL范围内线性关系良好。

2.6.5 精密度试验 精密吸取“2.6.4”项下对照品溶液2 mL, 连续测定5次吸光度, 测得吸光度RSD为0.97%, 表明仪器精密度良好。

2.6.6 稳定性试验 取“2.6.2”项下供试品溶液2 mL, 每隔2 h测定1次吸光度, 持续12 h, 测得吸光度RSD为0.87%, 表明溶液在12 h内稳定性良好。

2.6.7 重复性试验 精密称取水马桑粉末6份, 每份约0.5 g, 按“2.6.2”项下方法制备供试品溶液, 测得总香豆素含有量RSD为2.5%, 表明该方法重复性良好。

2.6.8 加样回收率试验 精密称取总香豆素含有量已知的样品6份, 每份约0.25 g, 置于量瓶中, 加入东莨菪内酯溶液(0.64 mg/mL)2、4、6 mL各2份, 按“2.6.2”项下方法制备供试品溶液6

份，每份吸取3 mL，按“2.6.4”项下方法测定吸光度，计算回收率，结果见表5。

表5 总香豆素加样回收率试验结果($n=6$)Tab. 5 Results of recovery tests for total coumarins($n=6$)

称样量/ g	原有量/ mg	加入量/ mg	测得量/ mg	回收率/ %	平均回收 率/%	RSD/%
0.250 6	2.380 7	1.28	3.643 2	98.63		
0.251 3	2.387 4	1.28	3.638 9	97.77		
0.252 5	2.398 8	2.56	4.933 8	99.02		
0.251 8	2.392 1	2.56	4.934 3	99.31	98.50	0.6
0.252 3	2.396 9	3.84	6.168 5	98.22		
0.251 6	2.390 2	3.84	6.155 6	98.06		

2.6.9 样品含有量测定 精密称取水马桑粉末各3份，每份约0.5 g，按“2.6.2”项下方法制备供试品溶液，以甲醇为空白，在344 nm波长下测定吸光度，计算含有量，结果见表6。

表6 总香豆素含有量测定结果($n=3$)Tab. 6 Results of content determination of total coumarins($n=3$)

编号	样品量/g	总香豆素/%
1	0.506 5	1.362 2
2	0.507 2	2.343 1
3	0.500 4	3.336 9
4	0.504 4	0.790 7
5	0.504 6	0.926 0
6	0.503 8	0.961 3
7	0.508 3	0.970 8
8	0.500 4	1.119 7
9	0.490 6	1.490 6
10	0.503 8	1.141 3

3 讨论

本实验分别从定性鉴别、定量测定两方面对水马桑进行了研究，发现其性状和显微特征能较好地与同属其他植物区分。同时，建议各指标含有量应为水溶性浸出物不低于5.0%、醇溶性浸出物不低于4.5%、总灰分不超过2.0%、酸不溶性灰分不超过0.5%、水分不超过12.0%。

水马桑主要活性成分为东莨菪内酯^[9-10]，又称东莨菪素、东莨菪苷元、莨菪亭、莨菪酚，是一种重要的香豆素类化合物，在临幊上具有抗肿瘤^[11-12]、防治高尿酸血症^[12]、降血压和血脂^[13]、解痉挛^[14]等多种作用，同时还具有良好的杀虫、杀菌、化感等农用生物活性^[15]，故选用总香豆素

和东莨菪内酯作为质量控制指标。

本实验考察了不同流动相（甲醇-水、乙腈-水），发现前者分离效果优于后者，故采用甲醇-0.01%冰乙酸（30:70）进行洗脱；考察了不同体积流量（0.90、0.95、1.00 mL/min）、柱温（25、30、35 °C），确定最佳条件为体积流量1.0 mL/min，柱温30 °C；紫外扫描显示，最大吸收波长位于344 nm，故以其为检测波长。

参考文献：

- [1] 万定荣,陈卫江,钱 赚,等.鄂西土家常用抗风湿类植物[J].中国中药杂志,1993,18(10):582.
- [2] 贺雅琴,李丹平,杨天鸣,等.鄂西医院民族药品种应用调查(一)[J].亚太传统医药,2015,11(21):16.
- [3] 方志先,廖朝林.湖北恩施药用植物志[M].武汉:湖北科学技术出版社,2006:446-447.
- [4] 贾敏如,李星炜.中国民族药志要[M].北京:中国医药科技出版社,2005.
- [5] 方志先,赵 晖,赵敬华.土家族药物志:上册[M].北京:中国医药科技出版社,2007:317.
- [6] 许 林,陈法志,杨守坤.山花烂漫的水马桑[J].花木盆景·花卉园艺,2011(12):26.
- [7] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:2015年版四部[S].北京:中国医药科技出版社,2015.
- [8] 张开臣,李 梅.蛇床子总香豆素组分的含量测定[J].中国中医药信息杂志,2010,17(5):45.
- [9] 陈 青,朱海燕,杨小生,等.黔产白刺花化学成分研究[J].中成药,2009,31(2):269-271.
- [10] 陈炳华,余 望,刘剑秋.山莓茎叶香豆素成分的初步研究[J].福建师范大学学报:自然科学版,2001,17(3):81-83.
- [11] Liu X L, Zhang L, Fu X L, et al. Effect of scopoletin on PC₃ cell proliferation and apoptosis[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2001, 22(10): 929-933.
- [12] Xia Y F, Dai Y, Wang Q, et al. Determination of scopoletin in rat plasma by high performance liquid chromatographic method with UV detection and its application to a pharmacokinetic study [J]. *J Chromatogr B*, 2007, 857(2): 332-336.
- [13] 李 媛,张东明,庾石山.山黄麻属植物的化学成分和药理活性研究[J].中药材,2003,26(11):833-838.
- [14] Oliveira E J, Romero M A, Silva M S, et al. Intracellular calcium mobilization as a target for the spasmolytic action of scopoletin[J]. *Planta Med*, 2001, 67(7): 605-608.
- [15] 侯秋莉,杨振国,丁 伟,等.东莨菪内酯的生物活性研究进展[J].天然产物研究与开发,2013,25:1461-1467.