

白花蛇舌草质量标准

范崇庆^{1,2}, 李尧尧^{2*}, 金艳³, 李海霞^{1*}, 冯学锋²

(1. 郑州大学药学院, 郑州 450003; 2. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100007;
3. 中国中医科学院中药资源中心, 北京 100007)

[摘要] **目的:**制定白花蛇舌草药材质量标准,为药用植物资源的开发利用提供科学依据。**方法:**采集或收集22批白花蛇舌草药材,对这些样品的性状、检查、鉴别、指标成分含量进行了研究;采用薄层色谱(TLC)法进行定性鉴别;采用高效液相法测定去乙酰车叶草酸甲酯的含量。**结果:**对白花蛇舌草药材的性状、显微特征进行了描述;根据22个不同产地白花蛇舌草测定结果,确定白花蛇舌草水分不得超过6%,总灰分不得超过13%,酸不溶性灰分不得超过5%,浸出物以水为溶剂,热浸法测定,不得低于10%;TLC斑点清晰,分离度好;去乙酰车叶草酸甲酯的进样量在0.019~2.44 μg($r=1.0000$)与峰面积积分值呈良好线性关系,平均回收率为98.28%,RSD 2.73%,去乙酰车叶草酸甲酯含量不得少于0.1 mg·g⁻¹。**结论:**该标准可用于白花蛇舌草药材的质量控制。

[关键词] 白花蛇舌草;质量标准;去乙酰车叶草酸甲酯

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)17-0098-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.2014170098

Quality Standard of *Hedyotidis diffusa*

FAN Chong-qing^{1,2}, LI Rao-rao^{2*}, JIN Yan³, LI Hai-xia^{1*}, FENG Xue-feng²

(1. College of Pharmacy, Zhengzhou University, Zhengzhou 450003, China;

2. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100007, China;

3. National Resource Center for Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100007, China)

[Abstract] **Objective:** To establishing the quality control standard and provide scientific basis for the utilization and development of *Hedyotidis diffusa*. **Method:** Twentytwo batches of *H. diffusa* were collected. The morphology, inspection, identification and the content of target components in these crude drugs were studied. TLC method was used to identify this crude drug. The contents of deacetyl asperulosidic acid methyl ester in these samples were determined by HPLC. **Result:** Macroscopic and microscopic characteristics of *H. diffusa* were described. According to the measurement results, moisture in the crude drug was equal or below 6%, the content of total ash was equal or below 13%, the content of acid-insolubal ash was equal or below 5%. The extractum by hot water was above 10%. The spot of TLC were clear and well-aparated. The linear range of deacetyl asperulosidic acid methyl ester were 0.019-2.44 μg ($r=1.0000$); the average recoveries were 98.28% and RSD of them were 2.73 ($n=6$); the content of deacetyl asperulosidic acid methyl ester were above 0.1 mg·g⁻¹. **Conclusion:** The quality is suitable for *H. diffusa*.

[Key words] *Hedyotidis diffusa*; quality standard; deacetyl asperulosidic acid methyl ester

[收稿日期] 20140707(006)

[基金项目] 《中国药典》一部2015年版项目;北京自然科学基金项目(7112097);中国中医科学院自主选题项目(ZZ2014016)

[第一作者] 范崇庆,在读硕士,从事中药饮片质量标准研究,Tel:010-64014411-2975,E-mail:feichongqing@163.com

[通讯作者] *李尧尧,博士,副研究员,从事中药饮片质量标准研究,Tel:010-64014411-2975,E-mail:leeraorao@163.com;

*李海霞,博士,副教授,从事天然产物活性成分及其制剂研究,Tel:0371-67781111,E-mail:lihx1024@126.com

白花蛇舌草为茜草科白花蛇舌草一年生草本植物,全草入药^[1-2]。始载于《广西中药志》,主产于我国东南沿海,浙江、江西、湖北、湖南等地,四川南部及云南、贵州亦有大量分布。主要为野生,近年在河南等地也有栽培。

本品性寒,味苦,甘,归胃、大肠、小肠经。其干燥或新鲜全草具有清热解毒、利尿消肿、活血止痛、抗菌消炎和抗肿瘤等功效,主要治疗恶性肿瘤、胃肠炎、阑尾炎、泌尿系感染等,外用治疗毒蛇咬伤、疮肿热痛等。研究表明白花蛇舌草中主要含有萜类、黄酮类、蒽醌类、苯丙素和香豆素类、挥发油类、含酸化合物、多糖类及其他类。现代药理研究表明白花蛇舌草具有抗炎、抗氧化、抗恶性肿瘤等作用,在临床广泛运用于恶性肿瘤的中药治疗^[3-6]。2010年版《中国药典》正文中并未收录此药材,仅在附录里列出了药材来源。该品种质量标准的缺失,难以确保其临床用药的安全性和有效性。因此,我们采集或购买22批不同产地的白花蛇舌草药材,对这些样品的性状、检查、鉴别以及指标性成分含量进行了研究,制定了白花蛇舌草药材的质量标准,为该药材的质量控制标准提供了研究数据。

1 材料

1.1 仪器 CH20型生物显微镜(日本奥林巴斯公司),LC-20AT型高效液相色谱仪(日本岛津),CPA225D型电子分析天平(赛多利斯仪器有限公司)。

1.2 试剂 对照品去乙酰车叶草酸甲酯(购自中国食品药品检定研究院,批号111786-200801),甲醇、乙腈(美国Fisher公司,色谱纯),水(娃哈哈纯净水),其他试剂均为分析纯。白花蛇舌草药材采自不同产地,由中国中医科学院中药研究所冯学锋研究员鉴定为茜草科植物白花蛇舌草 *Hedyotis diffusa* Willd. 的全草。

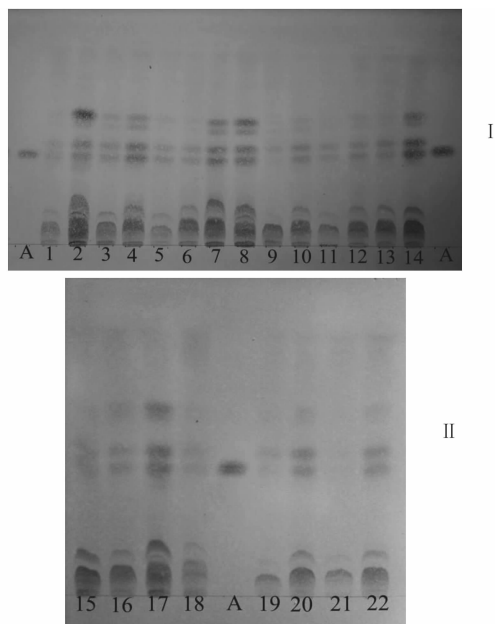
2 方法与结果

2.1 性状 全草交错缠绕成团,全长10~20 cm,表面灰绿色或灰棕色。主根单一,直径1~3 mm,须根纤细。茎细,直径约1 mm,圆柱形,略扁,具细纵棱,基部多分枝。质脆,易折断,中心髓部白色。叶对生,常脱离,皱缩破碎,完整叶呈条状或条状披针形,长1~4 cm,宽1~4 mm,先端渐尖,边缘略反卷。花、果单生或双生于叶腋,具柄或不明显。花偶见,细小。蒴果扁球形,直径2~3 mm,两侧各有一条纵沟,室背开裂,宿存萼顶端4齿裂,边缘具短刺毛。气微,味微苦。

2.2 鉴别

2.2.1 显微鉴别 粉末浅灰棕色至浅绿棕色。木纤维多成束,末端渐尖,平截或倾斜,直径10~20 μm,可见稀疏纹孔。果皮纤维常上下层纵横交错排列,完整者呈细长条形,末端钝或稍尖,壁增厚,可见纹孔。种皮表皮细胞淡红棕色,表面观为多边形,壁上布满细小疣点。导管为螺纹、梯纹或具缘纹孔,直径5~44 μm。草酸钙针晶散离或成束存在于薄壁细胞中,长至104 μm。叶片表皮细胞绿黄色,多破碎,上表皮细胞较易见到,为多边形,可见角质增厚纹理,有时可见乳突状单细胞非腺毛。

2.2.2 薄层鉴别^[3,7] 取本品粉末1 g,加水50 mL,回流提取60 min,滤过,滤液蒸干,残渣加甲醇2 mL使溶解,作为供试品溶液;取去乙酰车叶草酸甲酯适量,加甲醇制成每1 mL含1 mg的溶液,作为对照品溶液。照薄层色谱法(2010年版《中华人民共和国药典》(一部)附录VIB)试验,吸取不同产地白花蛇舌草药材的供试液液各2 μL,分别点于同一硅胶G薄层板上。以三氯甲烷-甲醇-水(5:1.5:0.1)为展开剂,饱和30 min,展开,取出,晾干,喷以10%硫酸乙醇溶液。供试品溶液色谱中,与对照品色谱相应的位置上,显相同蓝色斑点,见图1。



A. 去乙酰车叶草酸甲酯;1~14. 样品1~14
15~22. 样品15~22

图1 白花蛇舌草条药材 TLC

2.3 检查项和浸出物项

2.3.1 测定方法 水分测定参照《中国药典》2010年版一部附录 IXH 水分测定法(烘干法);总灰分、

酸不溶性灰分测定参照《中国药典》2010 年版一部附录灰分测定法;浸出物测定参照《中国药典》2010 年版一部附录浸出物测定法,采用热浸法测定水溶性浸出物。

2.3.2 测定结果 22 批白花蛇舌草的水分、总灰分、酸不溶性灰分及浸出物的测定平均值分别为水分 3.71%,总灰分 9.82%,酸不溶性灰分 1.89%,水热浸出物 19.09%。综合考虑各因素影响,建议白花蛇舌草水分不得超过 6%,总灰分不得超过 13%,酸不溶性灰分不得超过 5%,水溶性浸出物不得低于 10%。结果见表 1。

表 1 各地白花蛇舌草样品的检查项测定 %

No. 产地	水分	总灰分	酸不溶性灰分	水溶性浸出物
1 河南驻马店	5.00	9.69	2.26	13.08
2 浙江衢州	4.26	10.70	2.72	20.89
3 江西	2.90	8.58	0.55	23.48
4 江西	3.76	8.76	1.08	18.67
5 河南	3.45	10.59	3.14	19.84
6 江西	3.21	10.83	2.06	25.24
7 江西	3.27	8.76	0.21	22.79
8 大别山	2.89	12.15	3.75	23.37
9 江西	4.05	7.66	1.41	22.13
10 广西	4.29	9.02	1.63	16.49
11 河南	3.34	9.70	1.57	21.39
12 河南	5.00	9.88	1.59	21.07
13 湖南	4.11	12.13	2.06	19.62
14 江苏	3.16	9.56	0.48	19.45
15 湖南	3.81	8.71	1.53	16.75
16 -	3.74	8.96	1.02	19.89
17 -	3.13	8.58	2.43	18.58
18 四川	3.76	11.14	2.98	14.55
19 广西	3.56	10.18	1.00	18.66
20 -	3.59	10.75	4.64	11.46
21 广西	3.64	10.74	2.46	14.81
22 湖南	2.90	8.45	1.07	20.07

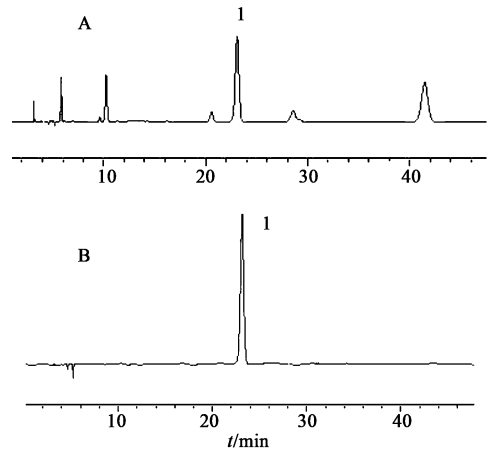
2.4 含量测定^[8-9]

2.4.1 色谱条件 Kromasil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈-水-冰乙酸(4:96:0.2),流速 0.8 mL·min⁻¹,检测波长 237 nm,柱温 35 ℃。在此色谱条件下,去乙酰车叶草酸甲酯色谱峰能与其他色谱峰达到基线分离,理论板数按去乙酰车叶草酸甲酯峰计算不低于 3 000。

2.4.2 对照品溶液的制备 取对照品适量,精密称定,用 4% 乙腈配制成每 1 mL 中含去乙酰车叶草酸甲酯 0.046 mg,即得。

2.4.3 供试品溶液的制备 取白花蛇舌草(二号筛)约 1.0 g,精密称定,置 250 mL 圆底烧瓶中,精密

加水 50 mL,称定质量,电热套加热回流 1 h,放冷,再称定质量,用水补足失重,摇匀,抽滤,精密量取滤液 10 mL,通过 HP-20 大孔树脂柱(内径为 1.5 cm,柱高为 20 cm),用水 200 mL 洗脱,弃去洗脱液,继用 50% 甲醇 200 mL 洗脱,收集洗脱液,蒸干,残渣加水适量,超声使溶解,并转移至 5 mL 量瓶中,4% 乙腈稀释至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,即得,将上述两种溶液分别进样 10 μL,测定,见图 2。



A. 白花蛇舌草药材; B 对照品; 1. 去乙酰车叶草酸甲酯
图 2 白花蛇舌草药材中去乙酰车叶草酸甲酯 HPLC

2.4.4 线性关系考察 取去乙酰车叶草酸甲酯对照品适量,精密称定,加 4% 乙腈逐级稀释,分别得到质量浓度为 244, 122, 60.9, 30.4, 15.2, 7.61, 3.81, 1.90, 0.952, 0.476 mg·L⁻¹ 的对照品溶液,进样 10 μL。以进样量(X)为横坐标,峰面积(Y)为纵坐标计算回归方程为 $Y = 1.6 \times 10^6 X - 5.7 \times 10^3$ ($r = 1.0000$)。结果表明,去乙酰车叶草酸甲酯在 0.019 ~ 2.44 μg 与峰面积的线性关系良好,其中检测限为 0.019 μg。

2.4.5 精密度考察 取同一样品,制备供试品溶液,精密吸取 10 μL,连续进样 6 次,测定,去乙酰车叶草酸甲酯峰面积 RSD 为 1.13%,表明仪器性能良好。

2.4.6 稳定性考察 取同一样品,制备供试品溶液,测定,分别于制备后 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24 h 进样 10 μL,测定,去乙酰车叶草酸甲酯峰面积 RSD 为 1.17%,表明供试品溶液在 24 h 内基本稳定。

2.4.7 重复性考察 取同一样品 6 份,制备供试品溶液,测定并计算去乙酰车叶草酸甲酯的含量,结果 RSD 为 2.28%,表明方法重复性良好。

2.4.8 加样回收率考察 精密称取同一样品(去

乙酰车叶草酸甲酯含量为 $2.953 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$)6份,每份 0.5 g,精密加入适量的对照品,同法制备供试品溶液,测定去乙酰车叶草酸甲酯的含量,计算回收率,结果见表 2。

表 2 白花蛇舌草中去乙酰车叶草酸甲酯的加样回收率试验

No.	样品中量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
1	1.476	2.983	101.59	98.28	2.73
2	1.476	2.975	101.10		
3	1.477	2.897	95.81		
4	1.477	2.913	96.86		
5	1.476	2.943	98.98		
6	1.476	2.890	95.34		

注:对照品加入量均为 1.483 mg。

2.5 样品含量测定 精密称取各地样品适量,同法制备供试品溶液,进样 $10 \mu\text{L}$,注入液相色谱仪,进行测定,外标法计算,结果见表 3。

表 3 白花蛇舌草中去乙酰车叶草酸甲酯测定 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$

No.	产地	去乙酰车叶 草酸甲酯	以干燥品计去乙酰 车叶草酸甲酯
1	河南驻马店	0.03	0.03
2	浙江衢州	0.65	0.68
3	江西	1.77	1.82
4	江西	0.65	0.68
5	河南	0.39	0.40
6	江西	1.33	1.37
7	江西	2.95	3.05
8	大别山	3.24	3.34
9	江西	0.04	0.04
10	广西	0.12	0.13
11	河南	0.38	0.40
12	河南	0.27	0.29
13	湖南	1.90	1.99
14	江苏	0.66	0.68
15	湖南	0.67	0.70
16	-	1.42	1.48
17	-	0.15	0.15
18	四川	0.17	0.17
19	广西	0.19	0.19
20	-	0.10	0.11
21	广西	0.09	0.09
22	湖南	0.40	0.42

以干燥品计算,各地白花蛇舌草中去乙酰车叶草酸甲酯含量大部分均不低于 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。暂定以干燥品计,本品中去乙酰车叶草酸甲酯含量不得低于 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$,其中因 1,9,21 号样品去乙酰车叶草酸甲酯含量太低,暂定为不合格药材。

3 讨论

3.1 检测波长的选择 经 DAD 全波长扫描,确定 237 nm 为去乙酰车叶草酸甲酯的最大吸收波长,因此确定检测波长为 237 nm。

3.2 流动相的选择 比较甲醇-水、甲醇-水-冰乙酸、乙腈-水-冰乙酸,乙腈-水-冰乙酸色谱峰有很好的分离度且峰形较好,故选择乙腈-水-冰乙酸系统,并对各组成部分的不同比例进行考察,最终确定乙腈-水-冰乙酸(4:96:0.2)。

3.3 不同大孔树脂的考察 对 ADS-8 及 Diaion HP-20 大孔树脂进行了考察,发现通过 Diaion HP-20 大孔吸附树脂柱填料死吸附较少,洗脱液杂质较少,色谱峰形较好,且用 HP-20 大孔树脂收集的样品含量高,故选择 Diaion HP-20 大孔吸附树脂柱填料。

3.4 不同洗脱剂比例的考察 分别对 50%,60%,70%,80% 甲醇做洗脱剂进行考察,结果显示所收集样品含量接近,所以选择 50% 即可。

本文所确定方法,简便易操作,可重复性良好,适用于白花蛇舌草药材的质量控制。

[参考文献]

- [1] 广西壮族自治区卫生厅. 广西中药志[M]. 南宁:广西壮族自治区人民出版社,1963:275.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国科技医药出版社,2010:附录 23.
- [3] 宋明艳,李克. 白花蛇舌草的化学成分及功效研究综述[J]. 亚太传统医药,2012,8(4):198.
- [4] WANG Ying-feng, ZHENG Yi, KU Bao-shan, et al. Anti-tumor activity of *Hedyotis diffusa* Wild. in mice [J]. J Chinese Pharmaceutical Sci, 2013, 22(3):272.
- [5] 张创峰,杨友亮,刘普,等. 白花蛇舌草化学成分和药理研究进展[J]. 西北药学杂志,2012,27(4):379.
- [6] 钱爱军,放疗配合以白花蛇舌草为主的方剂治疗食管癌 30 例临床观察[J]. 中医药导报,2013,19(8):53.
- [7] 韦飞燕,张艳华,斯建勇,等. 花红胶囊质量标准研究[J]. 世界科学技术——中医药现代化,2008,10(4):73.
- [8] 石金敏,高家荣,贾陆,等. 清肾颗粒中白花蛇舌草的质量控制标准[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(1):63.
- [9] 范建伟,李艳芳,闫光,等. HPLC 同时测定茵栀黄颗粒中 4 个环烯醚萜苷类成分[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(20):46.

[责任编辑 顾雪竹]