

铜钻药材质量标准

樊溪源, 王硕, 周小雷, 龚小妹, 陈硕, 缪剑华, 刘凡*

(广西药用植物园, 广西药用资源保护与遗传改良重点实验室, 南宁 530023)

[摘要] **目的:**制定瑶族药铜钻药材质量标准,为瑶族药铜钻的开发利用提供技术支持。**方法:**分别对铜钻药材的药材性状、显微特征进行观察;按照《中国药典》方法对11个不同产地药材中浸出物、灰分和水分进行测定;以蒲公英赛酮及蒲公英赛醇为对照品,采用薄层色谱法对其进行定性鉴别;采用高效液相色谱法测定药材中香草酸和香草醛的含量。**结果:**对铜钻药材的性状、显微特征进行了描述。暂定铜钻药材中总灰分不得过8%,不溶性灰分不得过3%,水浸出物不得少于4%,醇浸出物不得少于3%,水分不得过11%。TLC中蒲公英赛酮和蒲公英赛醇斑点清晰、分离度好。香草醛和香草酸的精密性、稳定性、重复性试验的RSD均<2%。**结论:**所建标准可用于铜钻药材的质量控制。

[关键词] 铜钻; 药材质量标准; 薄层色谱; 高效液相色谱法

[中图分类号] R284.1; R282.7 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)04-0048-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015040048

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20141229.1031.003.html>

[网络出版时间] 2014-12-29 10:31

Quality Specification of Vines of *Mappianthus iodoides* FAN Xi-yuan, WANG Shuo, ZHOU Xiao-lei, GONG Xiao-mei, CHEN Shuo, MIAO Jian-hua, LIU Fan* (*Guangxi Botanical Garden of Medicinal Plants, Guangxi Key Laboratory of Medicinal Resources Protection and Genetic Improvement, Nanning 530023, China*)

[Abstract] **Objective:** To provide scientific basis for the utilization and development of vines of *Mappianthus iodoides* by setting up the quality standards. **Method:** The pharmacognostical methods were applied. The morphological and histological characters of vines of *M. iodoides* were observed. The extracts, moisture, total ash, and acid-insoluble ash were determined, and the bioactive constituents were analyzed by TLC and HPLC. **Result:** The quality specification of vines of *M. iodoides* were as follows: total ash was not more than 8%; acid-insoluble ash was not more than 3%; moisture was not more than 11%, water extracts not less than 4% and alcohol extracts not less than 3%. The qualitative analysis of taraxerone and taraxerol were performed by TLC and quantitative analysis of vanillin and vanillic acid were performed by HPLC, respectively. **Conclusion:** The established method can be used for the quality control of vines *M. iodoides*.

[Key words] vines of *Mappianthus iodoides*; quality specification; TLC; HPLC

铜钻别名甜果藤、买撇花藤、藤蛇总管、黄马胎、黄麻骨风、黄九牛、假丁公藤等,性平,味甘、淡^[1],主要生长于海拔800~1800m的疏林、灌丛及沟谷林内,分布于广西、云南、贵州、广东、海南和湖南等省区,广西产于金秀、贺州、恭城、那坡等地。同属其他相近种主要分布于印度、孟加拉、印度尼西亚等地区^[2]。铜钻是广西瑶医常用药材“十八钻之一”,果肉味甜可食,根或老藤可传经走脉、祛风除湿、调经活血、清热解毒、消肿止痛。用于治疗黄疸型肝炎、

风湿痹痛、月经不调、痛经、闭经、产后风痛、心慌心跳、尿频尿急,外用于毒蛇咬伤、跌打损伤^[3-4]。铜钻质量标准研究较少,仅对此药材的性状、显微组织及理化鉴别做了部分研究^[5],参考相关文献[6-7]基础上,本实验对其药材质量标准进行系统研究,为铜钻的合理开发利用和保证安全、合理、有效临床应用提供科学依据。

1 仪器与试剂

LEICA型生物显微镜(德国LaiLa),CP2250D

[收稿日期] 20140928(007)

[基金项目] 广西生物医药创业服务平台建设项目(桂科能10100024-4);广西壮族自治区中医药管理局科技项目(GZMZ1214)

[第一作者] 樊溪源,实习研究员,从事新药研发工作, Tel:0771-2443136, E-mail:85woshixiaofan@163.com

[通讯作者] *刘凡,硕士,实习研究员,从事新药研发工作, Tel:0771-2443136, E-mail:306734476@qq.com

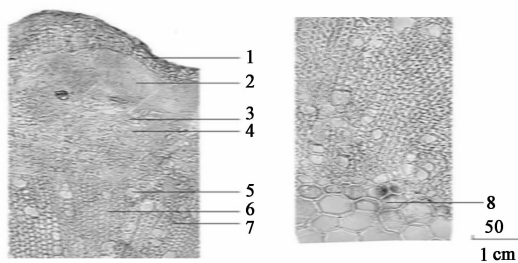
型电子分析天平 (Sartorius), 210 型高效色谱仪 (包括 UV325 型检测器, 410 型自动进样器, 美国瓦里安公司), Milli-Q Academic 型超纯水仪 (美国 Millipore)。香草醛 (批号 110721-201303, 纯度 98%)、香草酸 (批号 101211-201206, 纯度 98%) 对照品购自上海同田生物有限公司。

铜钴采于广西不同产地, 经广西药用植物园赵以民博士鉴定为茶茱萸科植物定心藤 *Mappianthus iodoides* 的藤茎, 标本存于广西药用植物园。甲醇、乙腈为色谱纯, 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 鉴别

2.1.1 横切面显微 最外层为 5~12 列木栓层细胞, 皮层为 10 多列类圆形或椭圆形细胞, 壁略增厚微弯曲, 含淡黄棕色物质, 外侧近表皮层处有石细胞 2~3 列断续列成环带, 内有石细胞单个散在或 2~5 个相聚。韧皮外部纤维 2~10 余个成群断续列成环状, 淡黄色, 壁较厚, 层纹明显, 微木化, 周围有石细胞群相伴, 石细胞壁稍薄, 孔沟明显, 木化。中柱为髓射线分割成的 10 余个外韧型维管束, 韧皮部有纤维束及少数石细胞散在。形成层细胞为 2~3 列切向长方形细胞。木质部由导管、木纤维及少数木薄壁细胞组成, 并做多单个作径向排列。木射线 1~2 列, 含棕黄色物质。髓射线 2~10 余列, 有石细胞单个散在或 2~10 余个相聚, 髓部薄壁细胞具单纹孔。薄壁细胞含有草酸钙方晶。见图 1。



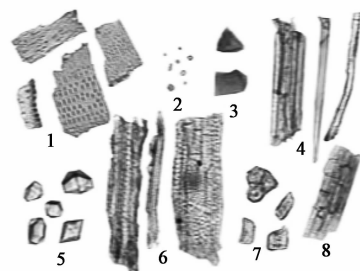
1. 木栓层; 2. 皮层; 3. 纤维及石细胞; 4. 韧皮部; 5. 木质部; 6. 木射线; 7. 导管; 8. 髓部

图 1 铜钴藤茎横切面显微

Fig. 1 Stem section microscopic of vines of *Mappianthus iodoides*

2.1.2 粉末显微 本品粉末为淡黄色。表皮细胞表面观呈类方形或类多边形, 细胞壁稍平直, 无色。木栓细胞呈类圆形或多角形, 壁略增厚而稍弯曲, 淡棕色, 微木化。石细胞众多, 单个或多个相聚, 呈类圆形、类方形、钝三角形或不规则形, 长 12~125 μm , 宽 12~56 μm , 细胞壁较厚 5~15 μm , 孔沟及层纹明显; 或壁稍薄 4~6 μm , 胞腔较大。中柱鞘纤

维末端长尖, 壁较厚 5~8 μm 且较平直, 层纹明显且胞腔狭小, 直径 10~25 μm , 微木化; 韧皮纤维末端斜尖或钝圆, 壁较薄 2.5~5.0 μm 且稍扭曲, 胞腔较大, 不木化; 木纤维末端钝尖, 壁孔明显, 具斜纹孔或具缘纹孔, 木化。导管多为具缘纹孔, 纹孔口呈裂隙状, 直径 35~300 μm , 亦有网纹或螺旋导管。木射线细胞呈方形或长方形, 具单纹孔。木薄壁细胞呈类圆形或类方形, 直径 15~30 μm , 具网纹孔。草酸钙结晶呈方形、长方形、棱形或多面体, 长 12~43 μm , 宽 12~30 μm 。淀粉粒多为单数, 呈圆球形、半圆球形或钝三角形, 直径 6~9 μm , 脐点呈点状。见图 2。



1. 导管; 2. 淀粉粒; 3. 棕色块; 4. 纤维; 5. 方晶; 6. 管胞; 7. 石细胞; 8. 薄壁细胞

图 2 铜钴粉末显微

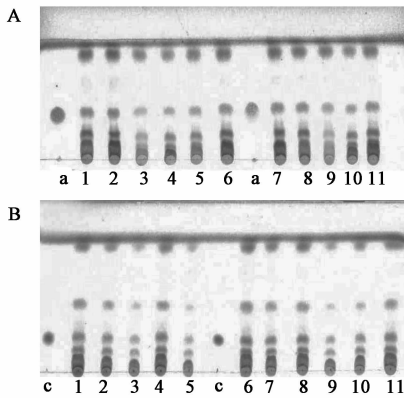
Fig. 2 Powder microscopic of vines of *Mappianthus iodoides*

2.1.3 对照药材薄层鉴别 分别称取 11 个不同产地铜钴药材粉末 (65 目) 各 3 g 至锥形瓶中, 加入 95% 乙醇 50 mL 超声提取 2 h, 过滤, 蒸干滤液, 残渣用甲醇 2 mL 溶解, 作为供试品溶液; 再取铜钴对照药材 (采于广西金秀), 同法制得对照药材溶液。

2.1.3.1 蒲公英赛酮的薄层鉴别 取蒲公英赛酮对照品适量, 加三氯甲烷制成每 1 mL 含 1 mg 的对照品溶液。照薄层色谱法 (《中国药典》附录 VI B) 试验, 吸取不同产地供试品、对照药材及对照品溶液各 5 μL , 分别点于同一硅胶 GF254 薄层板上, 以石油醚 (60~90 $^{\circ}\text{C}$)-三氯甲烷 (3:7) 为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 喷 5% 磷钼酸, 在 105 $^{\circ}\text{C}$ 加热至斑点显色清晰。供试品色谱中在与蒲公英赛酮对照品及对照药材色谱相应的位置上, 显相同颜色的斑点。见图 3。

2.1.3.2 蒲公英赛醇的薄层鉴别 取蒲公英赛醇对照品适量, 加三氯甲烷制成每 1 mL 含 1 mg 的对照品溶液。照 2.1.3.1 方法进行薄层点样, 以石油醚 (60~90 $^{\circ}\text{C}$)-三氯甲烷 (3:11) 为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 喷 5% 磷钼酸, 在 105 $^{\circ}\text{C}$ 加热至斑点显色

清晰。供试品色谱中,在与蒲公英赛醇对照品及对照药材色谱相应的位置上,显相同颜色的斑点。见图 3。



1. 广西金秀;2. 广西全州;3. 广西平乐;4. 广西兴安;5. 广西大新;
6. 广西龙胜;7. 广西荔浦;8. 广西融水;9. 广西鹿寨;10. 广西柳州;
11. 广西梧州;a. 蒲公英赛醇;c. 蒲公英赛醇;A, B. 供试品薄层色谱
图 3 铜钻药材的 TLC

Fig. 3 TLC chromatogram of vines of *Mappianthus iodoides* 1-11 samples of different habitats *Mappianthus iodoides*

2.2 检查

2.2.1 水分 以烘干法测定,结果见表 1。

2.2.2 灰分 测定方法参照《中国药典》2010 年版一部附录 IX K 灰分测定法,结果见表 1。

2.2.3 浸出物 采用冷浸法测定醇溶性浸出物,乙醇为 95%,结果见表 1。

检查结果显示,12 个不同产地铜钻样品中总灰分平均值为 5.0%,酸不溶性灰分平均值为 1.4%,水分平均值为 9.6%,水溶性浸出物平均值为 6.0%,醇溶性浸出物平均值为 5.5%。暂定总灰分不得过 8%,酸不溶性灰分不得过 3%,水分不得大于 11%,水溶性浸出物不得少于 4%,醇溶性浸出物不得少于 3%。

2.3 含量测定

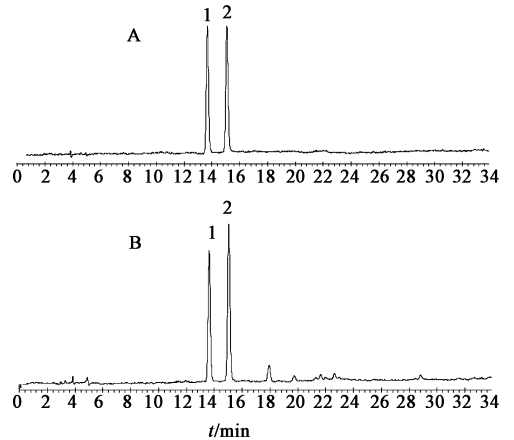
2.3.1 色谱条件 Diamonsil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相 A 相为甲醇-乙腈(6:1),B 相为 0.1% 磷酸水,梯度洗脱(0 ~ 30 min, 20% ~ 40% A);检测波长 260 nm,柱温 30 °C,流速 0.8 mL·min⁻¹。见图 4。

2.3.2 供试品样溶液的制备 取铜钻药材粉末 2 g,精密称定,置 100 mL 具塞磨口锥形瓶中,分别精密加入 80% 乙醇 50 mL,超声提取 2 次,每次提取 30 min,过滤,弃去滤渣,滤液减压蒸干并用 30 mL 水溶解,乙酸乙酯萃取 3 次(每次 30 mL),取乙酸乙酯层,萃取液蒸干用甲醇溶解后定容至 10 mL 量瓶中,

表 1 不同产地铜钻水分、灰分及浸出物测定

Table 1 Results of moisture, ash and extract in vines of *Mappianthus iodoides* %

来源	水分	总灰分	酸不溶灰分	水浸出物	乙醇浸出物
广西金秀	9.52	3.21	0.26	7.59	5.25
广西全州	10.78	8.04	2.7	5.42	5.38
广西平乐	10.56	6.02	1.87	6.37	6.22
广西兴安	10.14	5.21	1.66	7.43	7.05
广西大新	11.12	7.02	2.01	5.48	5.37
广西龙胜	10.12	4.48	1.02	4.77	4.36
广西荔浦	11.05	5.56	1.21	5.89	5.43
广西融水	8.15	3.23	0.97	5.19	4.95
广西鹿寨	10.09	5.30	1.38	6.93	6.59
广西柳州	7.65	4.51	1.11	4.37	3.91
广西梧州	8.59	3.69	1.16	7.66	7.25
广西蒙山	7.87	3.44	1.09	4.73	4.55
平均值	9.60	5.00	1.40	6.00	5.50



1. 香草醛;2. 香草酸;A. 混合对照品;B. 铜钻药材

图 4 铜钻药材供试品的 HPLC 色谱

Fig. 4 HPLC Chromatograms of vines of *Mappianthus iodoides*

过 0.45 μm 的微孔滤膜,即得。

2.3.3 线性关系的考察 取香草酸和香草醛混和对照品溶液(其中香草酸 0.101 2 g·L⁻¹、香草醛 0.104 3 g·L⁻¹),进样 2, 4, 8, 12, 16, 20 μL,测定,以峰面积(Y)对进样量(X)进行回归,得标准曲线方程为 $Y_{\text{香草酸}} = 102.04X - 3.58 (r = 0.999 8)$, $Y_{\text{香草醛}} = 83.08X - 0.33 (r = 0.999 2)$ 。香草酸在 0.202 4 ~ 2.024 0 μg 和香草醛在 0.208 6 ~ 2.086 0 μg 与峰面积之间有良好的线性关系。

2.3.4 精密度考察 取香草酸、香草醛混和对照品溶液,按 2.3.1 项下条件测定,重复进样 6 次,测定峰面积,结果香草酸和香草醛 RSD 分别是 1.2%,

1.4%,表明仪器精密度良好。

2.3.5 稳定性考察 取铜钻样品3药材粉末2g,于制备后0,2,4,6,8,12h进样10μL,按上述色谱条件测定峰面积,香草酸和香草醛的RSD分别为0.3%,0.1%,结果表明,供试品溶液在12h内稳定。

2.3.6 重复性考察 取铜钻样品3药材粉末6份,各2g精密称定,按2.3.2项下方法制备供试品溶液,按上述色谱条件测定,香草酸和香草醛的质量分数分别为0.0422%,0.0455%,RSD分别为1.3%,1.1%。

2.3.7 加样回收率考察 取已测定的铜钻样品3药材粉末6份,各1g,精密称定,精密加入香草酸对照品0.428mg、香草醛对照品0.459mg,按照2.3.2项下方法操作,得供试品样液,按2.3.1项下色谱条件测定,计算加样回收率。结果见表2。

表2 铜钻药材中香草酸、香草醛加样回收率试验

Table 2 Add sample recovery test of vanillic acid and vanillin

成分	称样量 /g	样品中量 /μg	加入量 /μg	测得量 /μg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
香草酸	1.0076	0.340	0.342	0.680	99.30	99.47	0.8
	1.0002	0.338	0.342	0.675	98.60		
	1.0048	0.339	0.342	0.685	100.96		
	1.0097	0.341	0.342	0.681	99.27		
	1.0004	0.338	0.342	0.678	99.45		
	1.0058	0.334	0.342	0.679	99.24		
香草醛	1.0076	0.367	0.367	0.732	99.48	99.11	0.9
	1.0002	0.364	0.367	0.722	97.41		
	1.0048	0.366	0.367	0.728	98.77		
	1.0097	0.368	0.367	0.733	99.62		
	1.0004	0.364	0.367	0.731	99.95		
	1.0058	0.366	0.367	0.731	99.43		

2.3.8 样品测定 取不同产地铜钻药材供试品溶液,按上述色谱条件进行测定。结果表明,铜钻中含香草酸0.0206%~0.0738%,含香草醛0.0236%~0.0814%,暂拟定每克药材香草酸和香草醛≥0.02%。结果见表3。

3 讨论

在前期的铜钻化学成分研究中,发现铜钻主要成分为萜类和酚类,尤其香草酸和香草醛是一类特征性成分,且具有多种生物活性。因此本研究选用了3种不同的提取溶剂乙醇、丙酮和乙酸乙酯对样品进行提取,结果表明乙醇做提取剂对铜钻香草酸和香草醛的提取效果最好。对于供试品的制备过程

表3 不同产地铜钻中香草酸和香草醛含量的测定

Table 3 Contents of vanillic acid and vanillin in vines of *Mappianthus iodoides* in different area %

样品编号	来源	香草酸	香草醛
1	广西全州	0.0211	0.0219
2	广西平乐	0.0206	0.0236
3	广西兴安	0.0422	0.0455
4	广西大新	0.0617	0.0678
5	广西龙胜	0.0738	0.0814
6	广西荔浦	0.0592	0.0601
7	广西融水	0.0344	0.0367
8	广西鹿寨	0.0613	0.0634
9	广西柳州	0.0578	0.0589
10	广西梧州	0.0446	0.0469
11	广西蒙山	0.0703	0.0779

中,对不同体积分数的乙醇、提取次数、超声时间3种提取方式进行比较,结果以80%的乙醇,超声提取30min,提取2次的效果最好。

曾经采用甲醇-水为流动相,梯度洗脱,但是所测得的铜钻香草酸和香草醛保留时间长,峰型前沿且与前面的干扰峰达不到基线分离,选择乙腈-0.1%磷酸水作为流动相,梯度洗脱,但所测保留时间过短,经过甲醇与乙腈比例的调整,有机相和水相梯度的调整,最终采用A相甲醇-乙腈(6:1),B相为0.1%磷酸水,梯度洗脱(20~40%A,0~30min)。达到干扰峰与铜钻香草酸和香草醛达到基线分离,分离度大于1.5,且峰型对称,理论塔板数高。

[参考文献]

- [1] 谢宗万. 全国中草药汇编[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2000: 302.
- [2] 中国植物志编委会. 中国植物志. 第46卷[M]. 北京: 科学出版社, 1981.
- [3] 戴斌. 中国现代瑶药学[M]. 南宁: 广西科学技术出版社, 2009: 90-92.
- [4] 卞理, 周小雷, 王硕, 等. 瑶药“十八”钻的化学成分及药理作用概述[J]. 中国民族民间医药, 2013, 22(14): 1-4.
- [5] 周丽娜, 戴斌. 瑶药铜钻(定心藤)的生药鉴定[J]. 广西中医药, 2002, (25)2: 48-50.
- [6] 周小雷, 王硕, 樊溪源, 等. 瑶药落懂紧(金樱子)根药材质量标准研究[J]. 中成药, 2012, 34(12): 2403-2407.
- [7] 王硕, 袁经权, 周小雷, 等. 瑶药地钻(蔓性千斤拔)药材质量标准研究[J]. 中成药, 2011, 33(10): 1767-1770.

[责任编辑 顾雪竹]