

瑶族药七爪风药材质量标准

赵以民, 王硕, 龚小妹, 樊溪源, 韦范, 唐炳兰, 莫单丹, 周小雷*
(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:**制定瑶族药七爪风药材质量标准,为药用植物资源的开发利用提供科学依据。**方法:**分别对瑶族药七爪风药材的性状、显微特征进行观察,按照 2010 年版《中国药典》方法对 10 个不同产地药材中浸出物、灰分、水分进行测定,采用薄层色谱法对其定性研究以及 HPLC 色谱法对其进行含量测定。**结果:**对药材的性状、显微特征进行了描述;暂定七爪风药材总灰分不得过 7%,酸不溶性灰分不得过 4%,水分不得大于 11%;TLC 中蔷薇酸的斑点清晰、无拖尾,含量测定中蔷薇酸的稳定性、重复试验中 RSD 均 < 2%,瑶族药七爪风 10 个产地药材蔷薇酸的含量在 0.093 1% ~ 0.244 3%,因此暂定每克七爪风药材蔷薇酸不 < 0.08%。**结论:**通过研究初步制定了瑶族药七爪风药材的质量控制标准。

[关键词] 七爪风; 药材质量标准; 薄层色谱; 高效液相;

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)10-0067-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.2016100067

Quality Standards of Radix of *Rubus reflexus* var. *lanceolobus*

ZHAO Yi-min, WANG Shuo, GONG Xiao-mei, FAN Xi-yuan, WEI Fan,
TANG Bing-lan, MO Dan-dan, ZHOU Xiao-lei*

(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 radix of *Rubus reflexus* var. *lanceolobus* by setting up the quality standards of radix of *R. reflexus* var. *lanceolobus*. **Method:** The properties and microscopic characteristics of radix of *R. reflexus* var. *lanceolobus* were observed. Extract, moisture and ash of the herbs from 10 different origins were determined according to the methods in *Chinese Pharmacopoeia*; qualitative research was done with TLC and their contents were determined by HPLC method. **Result:** The properties and microscopic characteristics of radix of *R. reflexus* var. *lanceolobus* were described; total ash was not more than 7%, acid-insoluble ash was not more than 4%, and moisture was not more than 11% for radix of *R. reflexus* var. *lanceolobus*. The spots of euscaphic acid were clear with no trailing in TLC; RSD was < 2% in the stability and repeatability tests of euscaphic acid in content determination, and the content of euscaphic acid from 10 origins was 0.093 1% - 0.244 3%, so it was temporarily determined that the euscaphic acid was not less than 0.08% in per gram of radix of *R. reflexus* var. *lanceolobus*. **Conclusion:** The established method can be used for the quality control of radix of *R. reflexus* var. *lanceolobus*.

[Key words] radix of *Rubus reflexus* var. *lanceolobus*; quality standards; TLC; HPLC

瑶族药七爪风又名深裂锈毛莓、老虎爪、红泡刺、拦路蛇等。《广西中药资源名录》^[1],《中华本草》^[2],《广西植物名录》^[3],《全国中草药名鉴》^[4],《药用植物辞典》^[5],《中国现代瑶药》^[6]等辞书中对

[收稿日期] 20150401(002)

[基金项目] 广西科技厅资助项目(桂科合 14123001-2);广西自然科学基金面上项目(2013GXNSFAA019217);广西中医药管理局民族医药重大攻关项目(GZKZ-G1106);广西中医药管理局中医药科技专项(GZMZ1214)

[第一作者] 赵以民,从事药用植物资源学研究,Tel:0771-2443136,E-mail:zh_ym2009@126.com

[通讯作者] *周小雷,从事新药研发工作,Tel:0771-2443136,E-mail:zhouxiaolei123@163.com

其药用价值、原植物、地理分布等有简要记述。主要生于低海拔的山谷或水沟边疏林中。分布于福建、湖南、广西、广东等地。主要用于小儿疳积, 月经不调, 崩漏, 痢疮肿毒^[1]。主治风湿痹痛, 四肢麻木不遂^[2]。用于风湿关节炎疼痛, 四肢麻痹瘫痪, 痢疾等^[4]。周小雷等^[7]对七爪风的化学成分进行了预试验研究, 结果表明其根及茎中可能含有三萜、甾体、糖类、苷类和有机酸等化学成分。黄艳等^[8]采用硅胶柱色谱和重结晶方法对七爪风药材三氯甲烷部位进行系统化学成分分离纯化, 得到 5 个化合物, 根据化合物的理化性质和波谱数据鉴定其结构分别为 2 α , 3 β , 19 α -三羟基乌苏-12-烯-23-羧酸-28-O- β -D-吡喃葡萄糖酯 (1), 2 α , 3 β , 19 α -三羟基乌苏-12-烯-28-酸 (2), 2 α , 3 β , 19 α -三羟基乌苏-12-烯-23, 28-二酸 (3), pseudosanguidiogenin A (4), β -谷甾醇 (5)。瑶族药七爪风药材目前未见质量控制指标的含量测定, 为此笔者对其化学成分进行研究, 结果发现七爪风根中主要以三萜类为其主要成分, 而蔷薇酸的含量相对较高, 稳定性好, 在液相分析中与其他组分能够达到基线分离, 与相邻的色谱峰分离度好。因此, 我们以此为指标对其药材进行定量研究, 并参考相关文献^[9-10]对其药材质量标准进行系统研究, 为该药材质量标准提供实验数据。

1 材料

Leica 型生物显微镜 (德国 LaiLa), CP225D 型电子分析天平 (Sartorius), SX2-4JOA 型箱式电阻炉 (上海比尔得仪器实业有限公司), 210 型高效色谱仪 (UV325 检测器, 410 自动进样器, 美国瓦里安公司), Milli-Q Academic 超纯水仪 (美国 Millipore)。

蔷薇酸对照品自制, 经结构鉴定为 2 α , 3 α , 19 α -三羟基乌苏-12-烯-28-酸, LC-MS m/z 489 [M + H]⁺, 511 [M + Na]⁺, ¹H-NMR (600 MHz) δ : 0.78 (3H, s), 0.86 (3H, s), 0.93 (3H, d, $J = 7.2$ Hz), 0.98 (3H, s), 0.99 (3H, s), 1.19 (3H, s), 1.34 (3H, s), 5.29 (1H, t, $J = 3.0, 6.6$ Hz, H-12), 3.93 (1H, m, H-2), 3.33 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-3); ¹³C-NMR (CD₃OD, 150 MHz) δ : 42.6 (C-1), 65.9 (C-2), 79.2 (C-3), 38.7 (C-4), 48.6 (C-5), 18.5 (C-6), 33.4 (C-7), 40.2 (C-8), 47.6 (C-9), 38.5 (C-10), 24.5 (C-11), 127.5 (C-12), 139.4 (C-13), 41.9 (C-14), 29.4 (C-15), 26.2 (C-16), 48.1 (C-17), 54.4 (C-18), 72.4 (C-19), 42.2 (C-20), 26.8 (C-21), 38.4 (C-22), 29.1 (C-23), 22.1 (C-24), 16.9 (C-25), 17.1 (C-26), 24.9 (C-27), 180.0 (C-28), 26.9 (C-29),

16.6 (C-30)。以上数据与蔷薇酸相关文献^[11-13]报道一致, 化合物纯度为 98.9% (HPLC 面积-归一化法测定)。

七爪风药材经赵以民博士鉴定为蔷薇科植物深裂悬钩子 *Rubus reflexus* var. *lanceolobus* 的干燥根, 样品收集情况, 见表 1。甲醇, 乙腈色谱纯, 其他试剂均为分析纯。

表 1 七爪风样品信息一览表

编号	产地/采集地点/批号
QZF-1	广西容县/六王镇/13020104
QZF-2	广西罗城/宝坛乡/109
QZF-3	广西岑溪市/坡塘镇/13020201
QZF-4	广西苍梧县/龙圩镇/13011901
QZF-5	广西北流市/民乐镇/13013101
QZF-6	广西桂平市/紫荆镇/13012301
QZF-7	广西梧州市/夏郢镇/13011801
QZF-8	广西藤县/天平镇/13012001
QZF-9	广西金秀县/罗香乡/13012201
QZF-10	广西金秀县/忠良乡/1951

2 方法与结果

2.1 药材性状 本品呈圆柱形, 常扭曲, 直径 0.1 ~ 2 cm, 具多数须根。表面浅红色、棕色。质硬, 不易折断。断面黄白色, 有裂隙。气微, 味淡。见图 1。



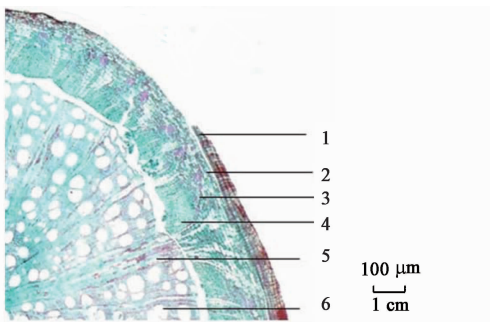
图 1 七爪风药材

Fig. 1 Traditional Chinese medicine of radix of *Rubus reflexus* var. *lanceolobus*

2.2 鉴别

2.2.1 根横切面 木栓层为 3 ~ 6 层扁平细胞组成。皮层较薄, 中柱鞘纤维 1 ~ 4 列断续排列成环, 韧皮部窄。木质部较宽, 由导管和木纤维组成, 导管多单个作径向排列, 类圆形, 木射线宽 3 ~ 7 列细胞。见图 2。

2.2.2 药材粉末显微特征 本品粉末黄棕色到棕色。石细胞众多, 类方形, 单个散在或多个成群, 直径 12 ~ 50 μ m。木纤维单个或多个成束, 长 70 ~ 400 μ m。具缘纹孔导管类圆形, 孔沟明显, 直径 15 ~ 60 μ m。草酸钙簇晶众多, 散在或存在薄壁细胞中, 直径 8 ~ 25 μ m。可见草酸钙方晶, 散在, 直径 6 ~ 10



1. 木栓层; 2. 皮层; 3. 中柱鞘纤维; 4. 韧皮部; 5. 木射线; 6. 导管

图 2 七爪风根横切面显微

Fig. 2 Root transverse section of radix of *Rubus reflexus* var. *lanceolobus*

μm。木栓细胞类方形, 直径 15 ~ 25 μm。淀粉粒偶见, 单粒或复粒, 单粒直径 6 ~ 15 μm。见图 3。

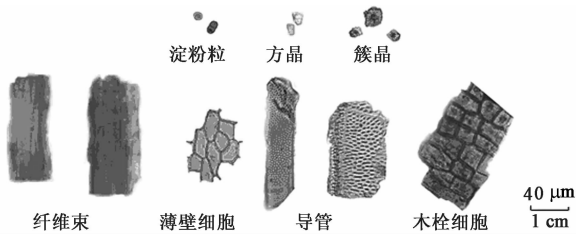


图 3 七爪风粉末显微

Fig. 3 Powder micrographs of radix of *Rubus reflexus* var. *lanceolobus*

2.2.3 薄层鉴别 取七爪风药材粉末(过 65 目筛) 5 g, 超声提取 2 次, 每次加入 80% 乙醇 50 mL, 超声提取 30 min, 合并滤液, 滤液蒸干, 残渣加甲醇充分溶解, 转溶于 5 mL 量瓶中, 定容, 作为供试品溶液。另精密称取蔷薇酸对照品 5 mg, 加甲醇定容于 5 mL 量瓶中, 作为对照品溶液。照薄层色谱法(2010 年版《中国药典》一部附录 VIB) 试验, 吸取供试品溶液和对照品溶液各 5 ~ 10 μL, 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 以三氯甲烷-乙酸乙酯-甲酸(5:3:0.1) 为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 喷以 5% 磷钼酸乙醇液, 在 105 °C 加热至斑点显色清晰。供试品色谱中, 在与对照品色谱相应的位置上, 显相同颜色的斑点。

2.3 浸出物、总灰分、酸不溶性灰分和水分的测定

2.3.1 测定方法 浸出物测定参照 2010 年版《中国药典》一部附录 XA 浸出物测定法, 采用冷浸法测定醇溶性浸出物(95% 乙醇); 总灰分、酸不溶性灰分测定参照 2010 年版《中国药典》一部附录 IX K 灰分测定法; 水分测定参照 2010 年版《中国药典》一部附录 IX H 水分测定法(烘干法)。

2.3.2 测定结果 10 个不同产地七爪风样品的醇浸出物在 4.38% ~ 13.74%, 暂定醇浸出物不得少

于 4%。10 个不同产地的样品的总灰分在 3.47% ~ 6.95%, 酸不溶性灰分在 0.14% ~ 3.92%。水分在 8.05% ~ 10.43%, 暂定为总灰分不得过 7%, 酸不溶性灰分不得过 4%, 水分不得大于 11%。结果见表 2。

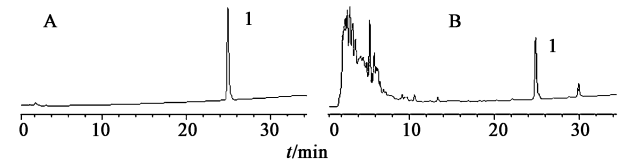
表 2 各产地七爪风水分、灰分及浸出物测定

Table 2 Results of moisture, ash and extract in radix of *Rubus reflexus* var. *lanceolobus*

No.	水分	总灰分	酸不溶灰分	95% 乙醇浸出物
1	9.36	6.55	0.25	11.81
2	9.57	6.45	3.92	6.10
3	8.37	6.03	1.10	6.80
4	8.05	4.28	0.59	11.65
5	9.94	5.20	0.14	7.27
6	8.66	4.32	0.73	6.09
7	10.43	3.64	0.49	11.19
8	9.28	6.95	1.05	4.38
9	9.16	3.47	0.69	13.74
10	9.19	4.67	0.87	8.85

2.4 含量测定

2.4.1 色谱条件 Diamonsil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈(A)-0.1% 磷酸水(B) 梯度洗脱(0 ~ 30 min, 60% ~ 80% A), 检测波长 210 nm, 柱温 25 °C, 流速 0.8 mL·min⁻¹。样品中蔷薇酸与其他组分能够达到基线分离, 与相邻的色谱峰分离度 > 1.5。结果见图 4。



A. 对照品; B. 供试品; 1. 蔷薇酸

图 4 七爪风药材 HPLC

Fig. 4 HPLC Chromatogram of radix of *Rubus reflexus* var. *lanceolobus*

2.4.2 供试品溶液的制备 取七爪风药材粉末(过 65 目筛) 1 g, 精密称定, 加入 80% 乙醇 30 mL, 提取 2 次, 每次超声提取 30 min, 过滤, 弃去滤渣, 滤液减压蒸干, 甲醇溶解并定容至 10 mL 量瓶中, 摇匀, 以 0.45 μm 的微孔滤膜过滤即得。

2.4.3 线性关系的考察 精密称定蔷薇酸对照品 0.010 68 g, 加甲醇定容至 50 mL, 制得对照品溶液(质量浓度 0.213 6 g·L⁻¹), 0.45 μm 的微孔滤膜过滤, 进样 4, 8, 12, 16, 20, 24 μL, 按 2.4.1 项下色谱条件测定, 以峰面积(Y) 对进样量(X) 进行回归, 得标准曲线方程为 Y = 12.063X + 17.865 (r = 0.999 1)。蔷薇酸对照品进样量在 0.854 ~ 5.264 μg 与峰面积

有良好的线性关系。

2.4.4 精密度考察 取蔷薇酸对照品(质量浓度为 $0.2136 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)溶液,连续进样 6 次,进样量 $15 \mu\text{L}$,按 2.4.1 项下色谱条件测定峰面积,结果蔷薇酸峰面积 RSD 0.2%,表明仪器精密度良好。

2.4.5 稳定性考察 取七爪风 1 号供试品液,于 0,2,4,6,8,12 h 进样 $10 \mu\text{L}$,按 2.4.1 项下色谱条件测定峰面积,结果蔷薇酸峰面积的 RSD 0.3%,表明供试品溶液在 12 h 内稳定。

2.4.6 重复性考察 取七爪风 1 号药材粉末(过 65 目筛)1 g,共 6 份,精密称定,按 2.4.2 项下方法制备供试品溶液,进样 $10 \mu\text{L}$,按 2.4.1 项下色谱条件测定,结果蔷薇酸含量的 RSD 1.8%,表明方法重复性良好。

2.4.7 加样回收率考察 取已测定的七爪风 1 号药材粉末(过 65 目筛)9 份,各 0.5 g,精密称定,分成 3 组(3 份/组),每组分别精密加入蔷薇酸对照品溶液(质量浓度 $0.2136 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)3.0,3.8,4.5 mL,按 2.4.2 项下方法制备供试品溶液,进样 $10 \mu\text{L}$,按 2.4.1 项下色谱条件测定,计算加样回收率。结果见表 3。

表 3 七爪风中蔷薇酸的加样回收率试验

Table 3 Results of recovery test of euscaphic acid in radix of *Rubus reflexus* var. *lanceolobus*

样品中量 / μg	加入量 / μg	测得量 / μg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
0.837 0	0.640 8	1.438 1	93.80		
0.823 6	0.640 8	1.445 2	97.00		
0.872 1	0.640 8	1.482 3	95.22		
0.831 9	0.811 7	1.617 0	96.72		
0.836 5	0.811 7	1.596 2	93.59	95.60	1.7
0.857 0	0.811 7	1.646 6	97.28		
0.838 3	0.961 2	1.745 4	94.37		
0.829 5	0.961 2	1.759 5	96.72		
0.822 9	0.961 2	1.722 4	93.58		

2.4.8 样品测定结果 取供试样品溶液,自动进样,按 2.4.1 项下色谱条件进行测定。结果 10 批七爪风中蔷薇酸的质量分数分别为 0.163 6%,0.203 3%,0.224 6%,0.138 5%,0.104 9%,0.093 1%,0.117 9%,0.124 7%,0.202 0%,0.244 3%。暂拟定 每克药材七爪风药材不少于 0.08%。

3 讨论

在薄层定性研究中,曾以三氯甲烷-乙酸乙酯(5:1),三氯甲烷-甲醇(8:3),丙酮-乙酸乙酯

(3:1),三氯甲烷-乙酸乙酯(5:3)以及三氯甲烷-乙酸乙酯-甲酸(5:3:0.1)为展开剂,最后选择三氯甲烷-乙酸乙酯-甲酸(5:3:0.1)为展开条件,所得薄层斑点清晰,斑点分离无前沿和拖尾现象。

本试验经过多次筛选,最后采用 A 相乙腈,B 相 0.1% 磷酸水,梯度洗脱(60% ~ 80% A,0 ~ 30 min)。曾经采用甲醇-水为流动相,梯度洗脱,但是所测得的蔷薇酸保留时间长,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,达到基线分离,分离度 > 1.5,且峰型对称,理论塔板数高。

[参考文献]

[1] 方鼎. 广西中药资源名录[M]. 南宁:广西民族出版社,1993:114.

[2] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草. 第 4 卷[M]. 上海:上海科学技术出版社,1999:2880.

[3] 覃海宁,刘演. 广西植物名录[M]. 北京:科学出版社,2010:183.

[4] 谢宗万,余友琴. 全国中草药名鉴[M]. 北京:人民卫生出版社,1996:421.

[5] 江纪武. 药用植物辞典[M]. 天津:天津科学技术出版社,2005:701.

[6] 戴斌. 中国现代瑶药[M]. 南宁:广西科学技术出版社,2009:106.

[7] 周小雷,王硕,樊溪源,等. 瑶药七爪风的化学成分预实验研究[J]. 中国民族民间医药杂志,2012,21(2):2-3.

[8] 黄艳,梁冰,刘元,等. 深裂锈毛莓氯仿部位的化学成分研究[J]. 现代药物与临床,2013,28(3):282-284.

[9] 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.

[10] 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.

[11] 包海燕,苗青,沈阳,等. 小果蔷薇的化学成分研究[J]. 药学实践杂志,2009,27(2):101-103.

[12] 吕涵,陈剑,李维林,等. 枇杷叶中三萜类化学成分的研究[J]. 中药材,2008,31(9):1351-1354.

[13] Liang G Y, Alexander I G, Peter G W. Pentacyclic triterpenes from the fruits of *Rose sterilis* [J]. J Nat Prod,1989,52(1):162.

[责任编辑 顾雪竹]