

芒毛苣苔药材质量标准

何小英^{1*}, 黄艳萍², 唐丽丽³, 庞斌¹

(1. 翁源县人民医院, 广东 翁源 512600; 2. 广东食品药品职业学院, 广州 510520;
3. 韶关市食品药品检验所, 广东 韶关 512028)

[摘要] **目的:**建立芒毛苣苔药材的质量标准,为该药材质量控制提供依据。**方法:**参照《中国药典》(2015年版)方法对芒毛苣苔药材性状、显微、水分、灰分及醇溶性浸出物进行检测;以5,7-二羟基-6,4'-二甲氧基黄酮为对照品,分别采用TLC和HPLC进行定性鉴别和含量测定。**结果:**性状、显微鉴别和TLC法鉴别具有专属性;芒毛苣苔药材的水分为8.9%~11.0%,总灰分为3.9%~7.4%,醇溶性提取物为11.0%~15.9%;HPLC含量测定方法学结果表明5,7-二羟基-6,4'-二甲氧基黄酮进样量在0.108 2~1.082 μg具有良好的线性关系, $r=0.999 9$,平均回收率为99.7%,RSD 1.1%,6批样品含5,7-二羟基-6,4'-二甲氧基黄酮在0.62%~0.88%。**结论:**建立的方法可用于芒毛苣苔药材的质量控制。

[关键词] 芒毛苣苔; 质量标准; 薄层色谱法; 高效液相色谱法; 5,7-二羟基-6,4'-二甲氧基黄酮

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)15-0073-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016150073

Quality Spectificationg of *Aeschynanthus bracteatus*

HE Xiao-ying^{1*}, HUANG Yan-ping², TANG Li-li³, PANG Bin¹

(1. Wengyuan People's Hospital, Wengyuan 512600, China;
2. Guangdong Food and Drug Vocational College, Guangzhou 510520, China;
3. Shaoguan Institute for Food and Drug Control, Shaoguan 512028, China)

[Abstract] **Objective:** To establish the quality standard of *Aeschynanthus bracteatus*, and provide scientific basis for its quality control. **Method:** Empirical and microscopic identification methods were adopted to observe morphological characteristics, microscopic characteristics, moisture content, ash content and ethanol-soluble extracts were determined by empirical method and referring to the method in *Chinese Pharmacopoeia* (2015). TLC and HPLC were used for qualitative identification and quantitative analysis of 5, 7-dihydroxy-6, 4'-methoxyflavone in *A. bracteatus*. **Result:** The macroscopic identification, microscopic identification and TLC method had the specificity. The sample size of 5, 7-dihydroxy-6, 4'-methoxyflavone was between 0.108 2 μg to 1.082 μg ($r=0.999 9$) with an average recovery rate of 99.7% (RSD 1.1%). The content of 5, 7-dihydroxy-6, 4'-methoxyflavone in 6 batches of samples was between 0.62% to 0.88%. Moisture content in *A. bracteatus* was between 8.9% to 11.0%; total ash was between 3.9% to 7.4%; ethanol-soluble extracts content was between 11.0% to 15.9%. **Conclusion:** The established method can be used for quality control of *Aeschynanthus bracteatus*.

[Key words] *Aeschynanthus bracteatus*; quality standard; TLC; HPLC; 5, 7-dihydroxy-6, 4'-methoxyflavone

芒毛苣苔又名石榕、大叶榕藤、石壁风、牛奶树, 性平,味甘、淡^[1-2]。产于西藏、云南、广西、广东、台

[收稿日期] 20151102(001)

[基金项目] 广东省科技计划项目(2013B020311013);韶关市科技计划项目(2014CX/K288)

[通讯作者] *何小英,主管药师,从事医院药学工作,Tel:0751-2823976,E-mail:hexiaoying1007@163.com

湾、四川等地。生于山谷林中树上或溪边石上,海拔 300 ~ 1 300 米。在广东、广西民间广泛应用,治疗风湿骨痛、跌打损伤、肾虚、慢性肝炎等^[3]。芒毛苣苔也是翁源县人民医院成方制剂骨脉康胶囊的主要药材^[4,6]。芒毛苣苔作为地方常用药材目前缺少质量标准,难以控制其质量,为保证用药的有效性和安全性,因此,有必要建立芒毛苣苔的质量标准,以期对该药材进行质量控制。笔者对芒毛苣苔化学成分进行预试验,表明含有黄酮类、三萜类等成分,并从中分离鉴定出含量高的黄酮类成分 5,7-二羟基-6,4'-二甲氧基黄酮。本研究建立芒毛苣苔药材的质量标准,为芒毛苣苔药材的质量控制和进一步深度开发药用资源提供依据。

1 材料

BT25s 型电子天平(北京赛多利斯仪器有限公司),1100Series 型高效液相色谱仪(美国 Agilent,自动进样器,四元泵,DAD 检测器),AS5150BD-1 型超声波清洗仪(天津奥特赛思斯仪器有限公司),WFH-20B 型三用紫外分析仪(上海精科实业有限公司),DHG-9240A 型电热恒温鼓风干燥箱(上海一恒科技有限公司),SX-4-10 型马弗炉(上海光学仪器厂),BH2 型系统生物显微镜,PD-2 型显微摄影数码系统(日本 Olympus 公司)。

6 批芒毛苣苔药材采集于不同产地,经中国科学院华南植物园叶华谷研究员鉴定为苦苣苔科植物芒毛苣苔 *Aeschynanthus bracteatus* 的地上部分,样品收集信息见表 1;硅胶 GF₂₅₄ 预制板(青岛谱科);5,7-二羟基-6,4'-二甲氧基黄酮对照品(自制,纯度 > 99.0%);甲醇为色谱纯,水为超纯水,其他试剂均为分析纯。

表 1 芒毛苣苔药材样品信息

Table 1 Specific information of *Aeschynanthus bracteatus*

No.	来源	收集时间	No.	来源	收集时间
1	广东翁源	2013-09	4	广东阳山	2014-07
2	广东新丰	2014-08	5	广东连州	2014-11
3	广西桂林	2015-07	6	广东翁源(市售)	2015-01

2 方法与结果

2.1 形状 本品茎呈圆柱形,有分枝,长短不一,直径 0.2 ~ 0.8 cm。表面灰棕色,栓皮脱落处为棕褐色,具纵皱纹,常具细小须根。质硬。断面中空,纤维性,浅黄棕色。叶多皱缩,破碎,完整者展开后椭圆形或狭倒披针形,边缘全缘,基部楔形,顶端渐尖,

侧脉纤细,不太明显。叶面暗绿色,叶背黄棕色。气微,味微涩,见图 1。

2.2 鉴别

2.2.1 显微鉴别 本品粉末棕色。草酸钙方晶、簇晶存在于薄壁细胞中。导管为网纹导管,薄壁细胞中含有淀粉粒。石细胞类圆形、长方形、分枝形和不规则形,壁较厚或极厚,纹孔及孔沟明显,有的一面菲薄,直径 22 ~ 52 μm 。纤维浅黄色,长条形,壁薄,散乱或成群,长 20 ~ 140 μm ,直径 2.0 ~ 5.0 μm 。导管主要为网纹导管,多成群,直径 10 ~ 20 μm 。气孔为不定式。花粉粒淡黄色,呈球形或近球形,直径约 20 μm ,外壁表面,内含少量颗粒状物质。

2.2.2 薄层色谱鉴别 分别称取不同产地的药材粉末各 0.5 g 置锥形瓶中,加甲醇 15 mL,超声处理 30 min,滤过,滤液蒸干,残渣加甲醇 1 mL 使溶解,作为供试品溶液。精密称取 5,7-二羟基-6,4'-二甲氧基黄酮对照品各适量,加甲醇制成每 1 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的溶液,作为对照品溶液。照薄层色谱法(2015 年版《中国药典》一部)试验,分别吸取 5,7-二羟基-6,4'-二甲氧基黄酮对照品溶液及上述供试品溶液各 1 μL ,点于同一硅胶 GF₂₅₄ 薄层板上,以三氯甲烷-甲醇(10:1)为展开剂,预饱和 15 min,展开,取出,晾干后置紫外灯下(254 nm)检视。供试品色谱中在与 5,7-二羟基-6,4'-二甲氧基黄酮对照品色谱相应位置上,显相同颜色的斑点,见图 3。

2.3 检查

2.3.1 水分的测定 取各产地芒毛苣苔粉末约 2 g,精密称定,按照 2015 年版《中国药典》(一部附录 0832)水分测定法第一法进行测定,每批平行测定 3 份,结果分别为 8.9%, 8.9%, 9.9%, 9.8%, 10.9%, 11.0%。

2.3.2 总灰分的测定 取各产地芒毛苣苔粉末约(过二号筛)2 g,精密称定,按照 2015 年版《中国药典》(一部附录 2302)总灰分测定法测定,每批平行测定 3 份,结果分别为 7.0%, 7.4%, 4.4%, 4.7%, 3.9%, 4.0%。

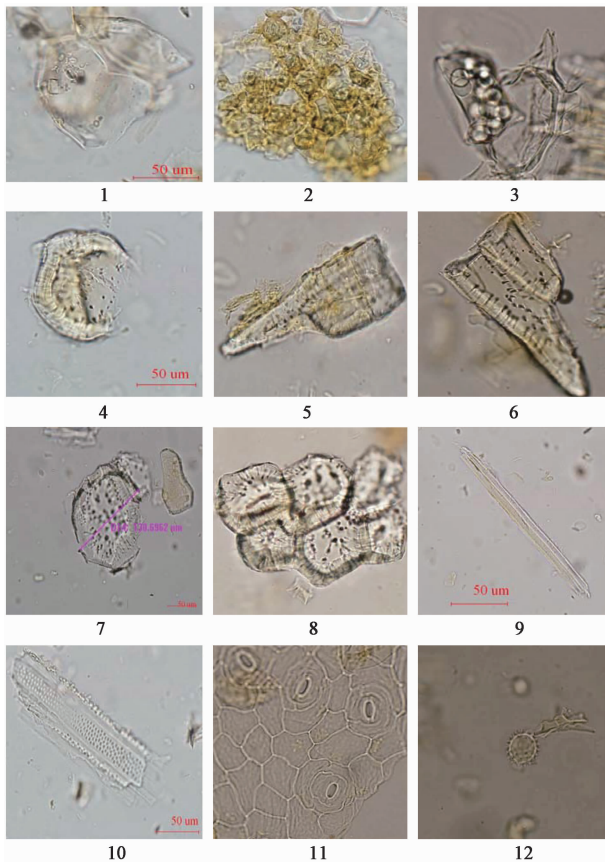
2.4 浸出物的测定 取各产地芒毛苣苔粉末约 4 g,精密称定,以稀乙醇作溶剂,按照 2015 年版《中国药典》(一部附录 2202)醇溶性浸出物测定法项下的冷浸法测定,每批平行测定 3 份,结果分别为 11.0%, 12.6%, 18.4%, 16.3%, 14.5%, 15.9%。

2.5 含量测定

2.5.1 供试品溶液的制备 取不同产地芒毛苣苔药材粉末约 0.5 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,加甲



图 1 芒毛苣苔药材
Fig. 1 Grude drug material *Aeschynanthus bracteatus*

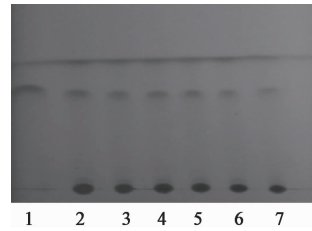


1. 草酸钙方晶; 2. 草酸钙簇晶; 3. 薄壁细胞; 4~8. 石细胞; 9. 纤维; 10. 导管; 11. 气孔; 12. 花粉粒

图 2 芒毛苣苔粉末显微
Fig. 2 Micrograph of *Aeschynanthus bracteatus*

醇 30 mL, 称定质量, 超声处理(功率 250 W, 频率 33 kHz) 30 min, 放冷, 再次称定质量, 用甲醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.5.2 对照品溶液的制备 取 5,7-二羟基-6,4'-二甲氧基黄酮对照品适量, 精密称定, 置 100 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 得质量浓度 54.1

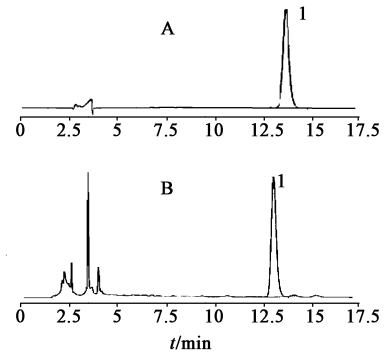


1. 5,7-二羟基-6,4'-二甲氧基黄酮对照品; 2~7. 样品药材
图 3 芒毛苣苔药材薄层色谱 (254 nm 紫外)

Fig. 3 TLC chromatogram of *Aeschynanthus bracteatus* (by ultraviolet light 254 nm)

$g \cdot L^{-1}$ 的 5,7-二羟基-6,4'-二甲氧基黄酮对照品溶液。

2.5.3 色谱条件及系统适用性试验 采用 Kromasil C_{18} 色谱柱 (4.6 mm \times 250 mm, 5 μ m); 以甲醇-0.1% 乙酸 (75:25) 为流动相, 检测波长 287 nm, 流速 1.0 mL \cdot min $^{-1}$, 进样量 10 μ L, 精密吸取 5,7-二羟基-6,4'-二甲氧基黄酮对照品溶液、供试品溶液按上述色谱条件进行测定, 结果分离度均 > 1.5 , 其他成分不干扰, 按 5,7-二羟基-6,4'-二甲氧基黄酮峰计算理论塔板数不低于 6 000。见图 4。



A. 对照品; B. 供试品; 1. 5,7-二羟基-6,4'-二甲氧基黄酮

图 4 芒毛苣苔药材 HPLC

Fig. 4 HPLC chromatograms of *Aeschynanthus bracteatus*

2.5.4 线性关系考察 分别自动进样对照品溶液 2, 5, 10, 15, 20 μ L, 按 2.1 项下色谱条件测定, 以峰面积 (Y) 为对进样量 (X) 进行回归, 得标准曲线方程为 $Y = 65\ 324.2X + 31.6$ ($r = 0.999\ 8$)。结果表明 5,7-二羟基-6,4'-二甲氧基黄酮进样量在 0.108 2 ~ 1.082 μ g 与峰面积成良好线性关系。

2.5.5 精密度试验 取 5,7-二羟基-6,4'-二甲氧基黄酮对照品溶液适量, 按上述色谱条件重复进样 6 次, 测定峰面积。结果峰面积的 RSD 0.4%, 表明仪器精密度良好。

2.5.6 稳定性考察 取同一份供试品 (样品 1) 溶液适量, 在室温下放置 0, 2, 4, 6, 8, 10 h, 按上述色谱

条件测定,记录色谱图。结果峰面积的 RSD 0.6%,表明供试品溶液在 10 h 内稳定。

2.5.7 重复性试验 取同一批号的芒毛苣苔样品 0.5 g,共 6 份,精密称定,分别按 2.3.1 项下方法制成供试品溶液,按上述色谱条件测定。结果 5,7-二羟基-6,4'-二甲氧基黄酮质量分数的 RSD 0.6%,表明方法重复性良好。

2.5.8 加样回收率试验 精密称取芒毛苣苔药材样品 1 (含 5,7-二羟基-6,4'-二甲氧基黄酮为 0.62%) 0.25 g 共 9 份,分别置具塞锥形瓶中,精密加入上述对照品溶液适量,按 2.5.1 项下方法制备供试品溶液,按上述 2.5.3 项下色谱条件测定,计回收率。结果,5,7-二羟基-6,4'-二甲氧基黄酮加样回收率为 99.7%,RSD 1.1%,见表 1。

表 2 5,7-二羟基-6,4'-二甲氧基黄酮的加样回收率
Table 2 Results of add sample recovery test of 5,7-dihydroxy-6,4'-methoxyflavone

称样量 /g	样品中量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
0.250 6	1.554	3.067	99.86		
0.250 1	1.551	3.061	99.72		
0.251 1	1.557	3.072	100.01		
0.250 2	1.551	3.055	99.27		
0.251 4	1.559	3.032	98.86	99.7	1.1
0.251 6	1.560	3.071	99.74		
0.251 8	1.561	3.077	100.07		
0.250 9	1.556	3.062	99.61		
0.250 7	1.554	3.058	99.27		

注:加入量均为 1.515 mg。

2.5.9 样品的含量测定 取 6 批不同产地的芒毛苣苔药材粉末,按 2.5.1 项下的方法制备供试品溶液,按 2.5.3 项下色谱条件测定,按外标法计算 5,7-二羟基-6,4'-二甲氧基黄酮质量分数在 0.62% ~ 0.88%,暂拟定本品 5,4'-二羟基-7-甲氧基二氢黄酮不得少于 0.50%。结果见表 3。

表 3 不同产地芒毛苣苔中 5,7-二羟基-6,4'-二甲氧基黄酮质量分数
Table 3 Contents of 5,7-dihydroxy-6,4'-methoxyflavone in *Aeschynanthus bracteatus* in different area %

No.	来源	5,7-二羟基-6,4'-二甲氧基黄酮	No.	来源	5,7-二羟基-6,4'-二甲氧基黄酮
1	广东翁源	0.62	4	广东阳山	0.88
2	广东新丰	0.71	5	广东连州	0.79
3	广西桂林	0.78	6	广东翁源(市售)	0.65

3 讨论

芒毛苣苔作为民族药材和广东、广西地区的习用药材已经有悠久的历史了,目前只有《全国中草药汇编》记载来源为 *Aeschynanthus bracteatus* 全株或根、茎、叶入药,鉴于目前尚无芒毛苣苔的化学成分和药理、药效等生物活性的报道,有必要建立其质量标准以保证临床用药安全、有效。

测定 6 批样品水分,结果为 8.9% ~ 11.0%,最高值为 11.0%,以最高测定值的 120% 设限,为 13.2%,暂规定本品水分不得过 14.0%。测定 6 批样品总灰分,结果为 3.9% ~ 7.4%,最高测定值为 7.4%,以最高测定值的 120% 设限,为 8.9%,暂规定本品总灰分不得过 9.0%。6 批样品醇溶性浸出物 11.0% ~ 18.4%,平均值 13.1%,暂规定本品浸出物含量不少于 10%。

在文献报道^[7-9]和笔者在前期对芒毛苣苔化学成分研究中发现该药材主要化学成分为黄酮类和三萜类,以 5,7-二羟基-6,4'-二甲氧基黄酮成分含量较高,其结构特征与芹菜素和木犀草素相近。研究表明,木犀草素有抗氧化、抗菌、抗癌等活性^[10-12],芹菜素具抗菌、抗癌、神经元保护作用、衰老等活性^[13],与芒毛苣苔抗菌、消炎与止血、治疗神经衰弱等方面的传统功效具有相关性在。因此,选取 5,7-二羟基-6,4'-二甲氧基黄酮合适作为芒毛苣苔定性定量指标性成分。

薄层鉴别方法中比较了样品用水提取,再用三氯甲烷萃取,合并三氯甲烷萃取液,置水浴中蒸干,残渣加乙醇溶解作为供试品溶液,以三氯甲烷-甲醇作为展开剂,展开后,用碘显色,发现该方法杂质干扰多,样品拖尾现象明显。改用本文方法色谱分离效果较好,斑点清晰集中。经对不同温度(20,4℃)湿度条件(32% ~ 90%)以及不同厂家薄层板(自制硅胶 GF₂₅₄薄层板,Merck 产硅胶预制薄层板和青岛谱科产硅胶 GF₂₅₄预制薄层板)的色谱效果进行了比较,结果表明,温度、湿度、不同厂家预制板对薄层色谱鉴别影响不大,本文建立的薄层条件重复性较好,色谱的结果稳定、成本低,其斑点清晰、结果一致。

含量测定试验中考察了提取溶剂(95%乙醇、75%乙醇、50%乙醇、甲醇和 50%甲醇)和回流提取及超声提取法,溶剂用量(25,30,50,80 mL)及超声时间(20,30,50 min)。结果表明本试验方法测定得 5,7-二羟基-6,4'-二甲氧基黄酮最高。

对甲醇-水和乙腈-水为流动相进行了筛选,以甲醇-0.1%乙酸(75:25)为流动相具有基线分离良

好,分离度 > 1.5,峰型对称理论塔板数高。考察了 Hypersil ODS C₁₈, Agilent Eclipse C₁₈ 和 Kromasil C₁₈ 色谱柱(规格均为 4.6 mm × 250 mm, 5 μm)对分离效果的影响,结果以 Kromasil C₁₈ 色谱柱分离效率高。

6 批样品 5,7-二羟基-6,4'-二甲氧基黄酮含量在 0.62% ~ 0.88%,考虑药材来源的差异,拟定本品含 5,7-二羟基-6,4'-二甲氧基黄酮不低于 0.50%。

[参考文献]

[1] 叶华谷,曾飞燕,叶育石,等. 华南药用植物[M]. 武汉:华中科技大学出版社,2013:357.
[2] 谢宗万. 全国中草药汇编[M]. 北京:人民卫生出版社,2000:180-181.
[3] 吕惠珍,余丽莹,黄宝优,等. 广西苦苣苔科药用植物资源[J]. 中国民族民间医药,2010,19(7):6-10.
[4] 庞斌,刘岳生,杨荣全. 骨脉康胶囊的实验研究与临床观察[J]. 实用医学杂志,2006,22(4):473-474.
[5] 杨荣全,张朗仪. 骨脉康胶囊的药效学研究与治疗膝关节骨性关节炎的临床观察[J]. 国际医药卫生导

报,2005(15):20-21.

[6] 庞斌,谭毓治. 骨脉康胶囊药效学研究[J]. 广东药学院学报,2005,21(5):48-50.
[7] 刘辉鑫. 红花苜蓿毛茛化学成分与抗氧化活性研究[D]. 杭州:浙江师范大学,2012.
[8] 田璞玉,王金梅,康文艺. 华丽苜蓿毛茛化学成分研究[J]. 中国药学杂志,2011,46(23):1795-1797.
[9] 陈林,康文艺. 长茎苜蓿毛茛化学成分研究[J]. 中国中药杂志,2009,34(21):2758-2760.
[10] 阎高峰,叶小利,袁吕江,等. 天然抗氧化剂木犀草素抗氧化活性的研究[J]. 食品与发酵工业,2005,31(8):27-29.
[11] 王倩,谢明杰. 木犀草素对金黄色葡萄球菌的抑菌活性及其机制[J]. 微生物学报,2010,50(9):1180-1184.
[12] 胡春萍,蔡雪婷,胡婷婷,等. 木犀草素诱导非小细胞肺癌细胞株 A549 凋亡和 G₂ 周期阻滞[J]. 中国中药杂志,2012,37(9):1259-1264.
[13] 黄佳颖,杨悦,李玉荣,等. 芹菜素的研究进展[J]. 江苏科技信息,2015(4):57-58.

[责任编辑 顾雪竹]