

壮族药旱田草质量标准

黎理, 唐玉荣, 颜萍花, 蔡毅*
(广西中医药大学, 南宁 530001)

[摘要] **目的:**建立旱田草药材的质量控制标准,为其药用植物资源的开发利用提供科学依据。**方法:**对旱田草药材进行性状及显微鉴别研究;以毛蕊花糖苷为对照品,采用薄层色谱法对旱田草进行定性鉴别;按2015年版《中国药典》附录方法对各产地药材进行水分、总灰分、酸不溶性灰分、浸出物测定;采用高效液相色谱法测定旱田草中毛蕊花糖苷的含量。**结果:**对旱田草药材的性状、显微特征进行了描述,且薄层色谱图中各斑点分离度好、清晰,鉴别特征稳定可靠;拟订旱田草药材中水分不得过13.00%,总灰分不得过21.00%,酸不溶性灰分不得过10.00%,醇溶性浸出物不得少于15.00%;毛蕊花糖苷的质量分数不得少于0.20%。**结论:**所建立的方法操作简便、准确可靠,重复性好,制订的标准限度合理,可用于旱田草药材的质量控制。

[关键词] 旱田草;显微鉴别;毛蕊花糖苷;质量标准

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)21-0036-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016210036

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20160906.0902.008.html>

[网络出版时间] 2016-09-06 9:02

Quality Standards of Zhuang Medicine *Lindernia ruellioides*

LI Li, TANG Yu-rong, YAN Ping-hua, CAI Yi*

(Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530001, China)

[Abstract] **Objective:** To provide the scientific basis for the utilization and development of *Lindernia ruellioides* by formulating the quality control standards for it. **Method:** The characteristics and microscopic identification of *L. ruellioides* were studied. With verbascoside as the reference substance, TLC was applied in the qualitative identification of it. Moisture, total ash, acid insoluble ash and extractives in *L. ruellioides* was determined based on the approaches in the appendix of *Chinese Pharmacopoeia* published in 2015, and the content of verbascoside was analyzed by HPLC. **Result:** The characteristics and microscopic identification of *L. ruellioides* were described, with stable and reliable identification characteristics. The spots in TLC were clear, with a good separation. The limits for moisture, total ash and acid insoluble ash in *L. ruellioides* shall be less than 13.00%, 21.00% and 10.00%, respectively, and the limits for the extractives and the content of verbascoside shall be more than 15.00% and 0.20%. **Conclusion:** The method established is simple, accurate and reliable, and the standard limit is reasonable, which can be used to control the quality of *L. ruellioides*.

[Key words] *Lindernia ruellioides*; microscopic identification; verbascoside; quality standard

[收稿日期] 20151121(010)

[基金项目] 《广西壮药质量标准(第三卷)》质量评价与标准研究项目(MZY 2013022);广西自然科学基金项目(2011GXNSFF018006);广西“2011协同创新中心”-壮瑶药协同创新中心项目(桂教科研[2013]20号);广西壮瑶药重点实验室项目(桂科基字[2014]32号);广西重点学科(壮药学)项目(桂教科研[2013]16号);“八桂学者”工程专项

[第一作者] 黎理, 硕士, 助教, 从事中药鉴定及质量控制研究, Tel:0771-3137585, E-mail:136067251@qq.com

[通讯作者] *蔡毅, 教授, 从事中药及民族药生药学研究, Tel:0771-3137585, E-mail: caiyi118@163.com

旱田草^[1], 异名鸭嘴癩、调经草、锯镰草、八十缺、锯齿草、耳环草等, 具有理气活血、解毒消肿的功效, 主治月经不调、痛经、闭经、乳痈、瘰疬、跌打损伤、蛇犬咬伤。主要分布于我国西南地区, 生于草地、平原、山谷、林下, 为壮族民间常用药^[2-3], 多分布于广西南宁、柳州、融水、灵川、岑溪、西林、田林、乐业、东兰、南丹、金秀等地^[4], 在民间有较长的使用历史, 但《中国药典》及《广西中药材标准》尚无收载。通过查阅文献, 发现对旱田草的研究较少, 主要是对其进行了显微^[5]及理化定性^[6-7]方面的研究, 暂未见质量标准研究方面的报道。在本课题前期的研究中发现, 旱田草中含有毛蕊花糖苷成分, 依据相关文献^[8-10], 确定了毛蕊花糖苷的含量测定方法。为确保其临床用药的安全有效, 本文通过鉴别研究、常规检查、浸出物及毛蕊花糖苷含量测定, 为其质量标准的建立提供实验依据。

1 材料

DM2500 型光学生物显微镜, DFC500 型图像分析系统(德国徕卡仪器公司); 1260 系列高效液相色谱仪(包括 G-1322A 在线真空脱气机, G-1313A 高压四元泵, 二极管阵列检测器, 1260 series 色谱工作站, 美国安捷伦科技公司)。

毛蕊花糖苷对照品(中国食品药品检定研究院, 批号 111530-201310); 旱田草药材分别采于广西壮族自治区内不同产地, 共 12 个批次, 经广西中医药大学中药鉴定教研室蔡毅教授鉴定其为玄参科植物旱田草 *Lindernia ruellioides* 的全草, 来源见表 1。所用试剂均为分析纯。

表 1 旱田草来源信息

Table 1 Information of *Lindernia ruellioides*

编号	采集时间	采集地点
HTC-1	2014-05-29	大化县那卖屯
HTC-2	2014-04-02	上林县
HTC-3	2014-04-21	上林县西燕
HTC-4	2014-05-03	桂平市紫荆镇
HTC-5	2014-05-16	桂平市
HTC-6	2014-05-27	岑溪市南渡镇
HTC-7	2014-07-06	大化县岩滩
HTC-8	2014-07-15	桂平市紫荆镇
HTC-9	2014-09-09	桂平市紫荆镇
HTC-10	2014-10-02	金秀县金秀乡
HTC-11	2015-06-25	河池市大化县岩滩
HTC-12	2015-07-31	桂平市紫荆镇

2 方法与结果

2.1 鉴别

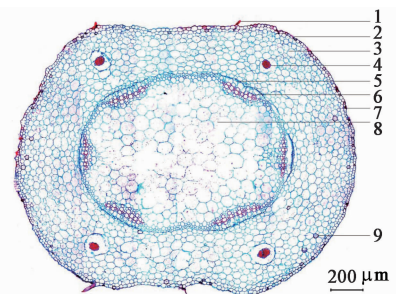
2.1.1 药材性状特征 本品多皱缩成团, 体轻。须根细长, 有分枝, 土黄色。茎纤细, 直径 0.8 ~ 2.0 mm, 长 8 ~ 12 cm, 有细纵纹, 黄绿色。叶对生, 皱缩卷曲, 边缘有明显的细锯齿, 表面黄绿色、灰绿色或淡紫色, 两面近无毛, 纸质。蒴果长圆柱形, 长 1.5 ~ 2.0 cm, 向顶端渐尖, 比宿萼长约 2 倍, 黄绿色。气微, 味甘、淡。见图 1。



图 1 旱田草药材

Fig. 1 Herbs figure of *Lindernia ruellioides*

2.1.2 茎横切面显微鉴别 类多角形。表皮细胞 1 列, 类方形, 排列紧密, 外被角质层; 可见扁球形腺鳞和非腺毛。皮层较宽, 由 8 ~ 12 列薄壁细胞组成; 分泌细胞散在, 内含分泌物; 在四角处有明显的 4 个纤维束。外韧型维管束常为 6 束, 环状排列; 韧皮部狭窄, 外侧可见中柱鞘纤维; 木质部明显, 由导管、木薄壁细胞及木纤维组成; 导管 3 ~ 5 个成行排列。髓部宽广, 由较大的薄壁细胞组成, 排列疏松。见图 2。



1. 非腺毛; 2. 表皮; 3. 皮层; 4. 皮层纤维束; 5. 韧皮部; 6. 木质部; 7. 腺鳞; 8. 髓部; 9. 分泌细胞

图 2 旱田草茎横切面

Fig. 2 Stem transverse section of *Lindernia ruellioides*

2.1.3 粉末显微鉴别 淡黄色。腺鳞呈圆球形、扁圆球形, 头部多由 4 个细胞组成, 直径 15 ~ 23 μm , 腺柄极短。分泌细胞类圆形或椭圆形, 直径 22 ~ 45 μm , 棕黄色, 内含分泌物。非腺毛多见, 长 50 ~ 130 μm , 直径 18 ~ 32 μm , 壁具疣状突起。纤维散在, 壁厚, 孔沟明显。导管多为螺旋型。淀粉粒细小, 常为单粒, 类圆形, 直径 2 ~ 4 μm 。见图 3。

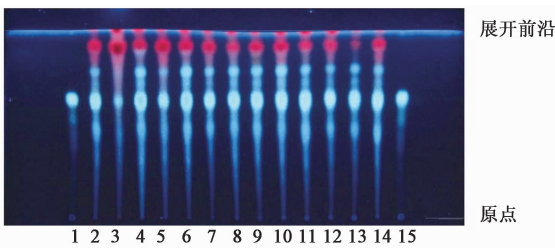


1. 腺鳞; 2. 导管; 3. 纤维; 4. 非腺毛; 5. 淀粉粒; 6. 分泌细胞

图 3 旱田草粉末

Fig. 3 Microscopic characteristics of *Lindernia ruellioides*

2.1.4 薄层鉴别 取本品粉末 1 g, 加乙醇 20 mL, 超声处理 30 min, 滤过, 滤液蒸干, 残渣加乙醇 1 mL 使溶解, 作为供试品溶液。另取旱田草对照药材 (编号 HTC-1 为对照药材) 1 g, 同法制成对照药材溶液。再取毛蕊花糖苷对照品适量, 加乙醇制成每 1 mL 含 1 mg 的溶液, 作为对照品溶液。照薄层色谱法 (通则 0502) 试验, 吸取上述 3 种溶液各 2 μ L, 点于同一以羧甲基纤维素钠为黏合剂的硅胶 G 薄层板上, 以乙酸丁酯-甲醇-甲酸-水 (6: 1.5: 1.5: 1) 为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 喷以 3% 三氯化铝乙醇溶液, 晾干, 置紫外光灯 (365 nm) 下检视, 供试品色谱中, 在与对照药材和对照品色谱相应的位置上, 显相同颜色的荧光斑点。见图 4。



1, 15. 毛蕊花糖苷; 2, 14. 对照药材; 3 ~ 13, 11 批旱田草样品

图 4 旱田草药材 TLC

Fig. 4 TLC chromatogram of *Lindernia ruellioides*

2.2 检查

2.2.1 水分 参照 2015 年版《中国药典》一部水分测定法 (通则 0832 第二法) 测定, 12 批旱田草水分测定结果为 9.50% ~ 11.76%, 见表 2, 均在 12.00% 以下, 从实际应用的角度考虑, 将本品水分拟订为不得过 13.00%。

表 2 旱田草水分、总灰分、酸不溶性灰分和浸出物测定 (n=3)

Table 2 Results of moisture, total, acid insoluble content and extract determination of *Lindernia ruellioides* (n=3) %

编号	水分	总灰分	酸不溶性灰分	醇浸出物
HTC-1	10.16	15.22	6.27	27.02
HTC-2	11.50	17.62	8.44	13.85
HTC-3	10.73	17.36	8.28	17.81
HTC-4	11.76	11.62	1.67	28.83
HTC-5	11.48	12.58	4.05	25.58
HTC-6	11.14	14.01	2.63	19.28
HTC-7	9.94	16.72	7.16	20.08
HTC-8	11.43	11.96	1.55	26.99
HTC-9	10.14	13.36	1.89	24.00
HTC-10	9.50	15.50	6.34	21.94
HTC-11	10.81	15.36	6.55	17.27
HTC-12	9.69	12.98	2.05	21.74

2.2.2 总灰分 参照 2015 年版《中国药典》一部灰分测定法 (通则 2302) 测定, 12 批旱田草总灰分测定结果为 11.62% ~ 17.62%, 见表 2, 从实际应用的角度考虑, 将本品总灰分放宽至不得过 21.00%。

2.2.3 酸不溶性灰分 参照 2015 年版《中国药典》一部酸不溶性灰分测定法 (通则 2302) 测定, 12 批旱田草酸不溶性灰分测定结果为 1.55% ~ 8.44%, 见表 2, 从实际应用的角度考虑, 初步拟定旱田草酸不溶性灰分含量不得超过 10.00%。

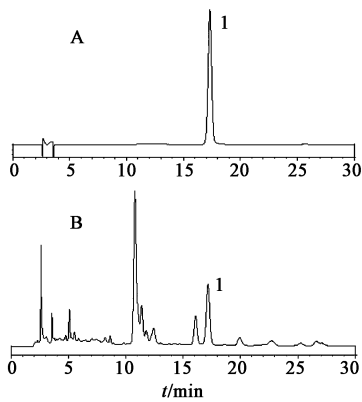
2.2.4 浸出物 参照 2015 年版《中国药典》一部醇溶性浸出物测定法项下的热浸法 (通则 2201) 测定, 用 50% 乙醇作溶剂, 12 批旱田草醇溶性浸出物测定结果为 13.85% ~ 27.02%, 见表 2, 而绝大多数在 17.00% 以上, 其中南宁市上林县 (HTC-2, 春季) 所测得含量较少, 可能与其生长时间短, 未完全长成有关。从实际应用的角度考虑, 将本品浸出物含量放宽至不少于 15.00%。

2.3 含量测定

2.3.1 色谱条件 Phenomenex C₁₈ ODS2 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μ m), 以乙腈-0.2% 冰乙酸 (17: 83) 为流动相, 进样量 10 μ L, 检测波长 344 nm, 柱温 30 $^{\circ}$ C, 流速 1.0 mL · min⁻¹。见图 5。

2.3.2 对照品溶液制备 精密称取毛蕊花糖苷对照品适量, 加甲醇制成每 1 mL 含 0.384 mg 的溶液, 取上清液即得。

2.3.3 供试品溶液制备 称取本品粉末 (HTC-9, 过 24 目筛) 约 0.4 g, 精密称定, 置锥形瓶中, 精密加



A. 对照品; B. 供试品; 1. 毛蕊花糖苷

图 5 旱田草 HPLC

Fig. 5 HPLC of *Lindernia ruellioides*

入 70% 甲醇 20 mL, 称定质量, 超声处理 (功率 250 W, 频率 40 kHz) 30 min, 放至室温, 再称定质量, 用 70% 甲醇补足减失的质量, 滤过, 再精密加入 70% 甲醇 20 mL, 称定质量, 超声处理 30 min, 放至室温, 再称定质量, 用 70% 甲醇补足减失的质量, 滤过, 合并 2 次滤液, 摇匀, 精密量取续滤液约 2 mL, 离心 10 min (13 000 r·min⁻¹), 即得。

2.3.4 标准曲线制备 分别精密吸取上述毛蕊花糖苷对照品溶液 (0.384 g·L⁻¹) 0.025, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0, 1.5, 5 mL 置于 5 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 配成系列毛蕊花糖苷对照品溶液。分别吸取上述 7 个浓度的溶液 10 μL, 按选定的色谱条件测定峰面积, 以峰面积为纵坐标, 对照品溶液质量浓度 (g·L⁻¹) 为横坐标, 绘制标准曲线, 得回归方程 $Y = 1\,549.987\,55X - 0.786\,038\,6$ ($r = 0.999\,99$)。表明毛蕊花糖苷在 0.019 2 ~ 3.84 μg 与峰面积间呈良好线性关系。

2.3.5 精密度试验 取同一毛蕊花糖苷对照品溶液 (0.384 g·L⁻¹), 重复进样 6 次, 结果毛蕊花糖苷峰面积的 RSD 0.1%, 表明仪器精密度良好。

2.3.6 稳定性试验 取旱田草供试品溶液 (HTC-9), 于制备后 0, 2, 4, 8, 16, 24 h 分别进样 10 μL 测定, 结果毛蕊花糖苷峰面积 RSD 2.7%, 结果表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.3.7 重复性试验 称取旱田草药材干燥粗粉 (HTC-9) 0.4 g, 各 6 份, 精密称定, 按 2.3.1 项下色谱条件进行测定, 结果毛蕊花糖苷质量分数为 0.325 8%, RSD 1.3%, 结果表明方法重复性好。

2.3.8 加样回收率试验 精密称定已知毛蕊花糖苷含量的旱田草药材干燥粗粉 (HTC-9) 0.2 g, 分别精密加入毛蕊花糖苷对照品溶液 (0.384 0 g·L⁻¹) 2

mL, 按 2.3.3 项下方法制备供试品溶液, 按 2.3.1 项下色谱条件测定, 计算得平均加样回收率为 103.59%, RSD 2.9%。结果见表 3。

表 3 旱田草中毛蕊花糖苷的加样回收试验

Table 3 Results of recovery test of *Lindernia ruellioides*

称样量 /g	样品中量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
0.201 0	0.654 8	1.467 0	105.76		
0.204 4	0.665 8	1.489 2	107.21		
0.201 6	0.656 8	1.431 8	100.91	103.59	2.9
0.204 2	0.665 2	1.468 0	104.53		
0.201 4	0.656 0	1.453 6	103.85		
0.207 4	0.675 6	1.438 0	99.27		

注: 加入量均为 0.768 0 mg。

2.3.9 样品测定 分别称取不同批次旱田草干燥粗粉约 0.4 g, 精密称定, 按 2.3.3 项下方法制备供试品溶液, 按 2.3.1 项下色谱条件, 测定毛蕊花糖苷含量, 结果见表 4。

表 4 不同批次旱田草中毛蕊花糖苷的质量分数 (n=3)

Table 4 Content of verbascoside in *Lindernia ruellioides* of different batches (n=3)

编号	毛蕊花糖苷	编号	毛蕊花糖苷
HTC-1	0.565 9	HTC-7	0.945 7
HTC-2	0.015 0	HTC-8	0.520 3
HTC-3	0.382 7	HTC-9	0.328 2
HTC-4	0.234 8	HTC-10	0.387 1
HTC-5	0.725 6	HTC-11	0.341 7
HTC-6	0.453 7	HTC-12	0.326 0

3 讨论

通过对多产地的样品进行观察, 壮族药旱田草药材性状特征茎纤细, 有细纵纹。叶对生, 边缘有明显的细锯齿, 两面近无毛。蒴果长圆柱形。显微鉴别特征为茎横切面表皮可见腺鳞和非腺毛, 皮层有分泌细胞散在, 并在四角处有明显的 4 个纤维束, 外韧型维管束常为 6 束; 粉末中可见头部多由 4 个细胞组成的腺鳞、类圆形的分泌细胞及细胞壁具疣状突起的非腺毛。薄层鉴别以乙酸丁酯-甲醇-甲酸-水 (6:1.5:1.5:1) 为展开剂, 展开, 喷以 3% 三氯化铝乙醇溶液, 置紫外光灯 (365 nm) 下检视, 供试品色谱中, 在与对照药材色谱和对照品色谱相应的位置上, 显相同颜色的荧光斑点。以上特征明显, 专属性强, 可作为旱田草鉴别的参考依据。

研究过程中, 对薄层色谱条件摸索如下: ①对甲醇, 70% 甲醇, 95% 乙醇, 乙酸乙酯, 水 5 种不同极性

的溶剂进行考察,最终以 70% 甲醇提取液所得薄层色谱图斑点最明显。②对冷浸 12 h,超声提取 30 min,水浴回流 30 min 3 种不同提取方法进行比较,结果表明 3 种方法所得薄层色谱图基本一致,以超声提取 30 min 最为省时简便。还对不同展开系统、药材取样量、不同显色剂及温湿度进行了考察,得出稳定的薄层鉴别方法。

本课题前期研究中,从本品中检出毛蕊花糖苷($C_{29}H_{36}O_{15}$)化学成分。毛蕊花糖苷具有植物激素活性^[11],对肺保护^[12]、肝保护^[13]、神经系统^[14]、免疫系统^[15-16]具有明显的作用,这与早田草的功效主治具有一定相关性,故薄层鉴别中以毛蕊花糖苷为对照品,并且以毛蕊花糖苷作为指标性成分进行含量测定。

含量测定试验中对提取溶剂进行了考察,分别以 30% 甲醇,50% 甲醇,70% 甲醇,甲醇,30% 乙醇,50% 乙醇,70% 乙醇,无水乙醇作为溶剂对早田草药材进行提取,结果表明 70% 甲醇提取率最高,故选用 70% 甲醇作为提取溶剂。同时考察了冷浸 24 h 提取法、回流提取法、超声提取法对早田草药材毛蕊花糖苷含量的影响,结果显示超声提取法提取率较高且操作简便。最后根据预试验进行正交试验,确定考察甲醇浓度、甲醇用量、超声时间、提取次数 4 个因素,每个因素设 3 个水平,得出最佳提取工艺(即本实验确定的供试品溶液制备方法)。早田草中毛蕊花糖苷的质量分数在 0.015 0% ~ 0.945 7%,大多数在 0.20% 以上,其中南宁市上林县(HTC-2,春季)所测得含量甚少,可能与其生长时间短,未完全长成有关;考虑到不同产地、不同采收时间的药材毛蕊花糖苷含量不一,建议本品按干燥品计算,将本品毛蕊花糖苷($C_{29}H_{36}O_{15}$)含量放宽至不少于 0.20%。

[参考文献]

[1] 广西区中医药研究所. 广西药用植物名录[M]. 南宁:广西人民出版社,1986:467-468.

[2] 梁启成,钟鸣. 中国壮药学[M]. 南宁:广西民族出版社,2005:397.

[3] 林春蕊,许为斌,刘演,等. 广西靖西县端午药市常见药用植物[M]. 南宁:广西科学出版社,2012:265.

[4] 覃海宁,刘演. 广西植物名录[M]. 北京:科学出版社,2010:378-379.

[5] 唐玉荣,颜萍花,曾祥燕,等. 早田草显微鉴别研究[J]. 时珍国医国药,2015,26(8):1938-1939.

[6] 曹雨虹,武尉杰,谭睿,等. HPLC 测定母草属药用植物中的齐墩果酸和绿原酸[J]. 华西药学杂志,2015,30(4):514-516.

[7] 蒋秋香. 瑶药早田草的定性定量法研究[J]. 药物分析杂志,2015,35(12):2143-2147.

[8] 陈天朝,翟来超. HPLC 同时测定地黄中梓醇与毛蕊花糖苷的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(5):105-107.

[9] 边宝林,王宏浩,杨健. 5 种不同药材中毛蕊花糖苷的含量比较[J]. 中国中药杂志,2010,35(6):739-740.

[10] 莫迎. 裸花紫珠制剂中毛蕊花糖苷含量测定[J]. 医药导报,2012,31(2):245-247.

[11] 王琳琳,李薇,宋新波,等. 肉苁蓉中松果菊苷和毛蕊花糖苷的植物雌激素活性研究[J]. 天然产物研究与开发,2015,26(3):377-380.

[12] 张慧,于澎,张楠,等. 毛蕊花糖苷对内毒素诱导的急性肺损伤的保护作用[J]. 中药药理与临床,2015,31(3):41-43.

[13] 宋志宏,雷丽,屠鹏飞. 肉苁蓉属植物的药理活性研究进展[J]. 中草药,2003,34(9):113-115.

[14] 邓敏,鞠晓东,樊东升,等. 毛蕊花苷对 MPP⁺ 诱导的 SHSY5Y 细胞凋亡的保护作用[J]. 中国药理学通报,2008,24(10):1297-1302.

[15] 李媛,宋媛媛,张洪泉. 肉苁蓉的化学成分及药理作用研究进展[J]. 中国野生植物资源,2010,29(1):7-11.

[16] 张洪泉,翁晓静,陈莉莉,等. 管花肉苁蓉麦角甾苷对衰老小鼠端粒酶活性和免疫功能的影响[J]. 中国药理学与毒理学杂志,2008,22(4):270-273.

[责任编辑 顾雪竹]