

## 藏药风毛菊质量标准研究\*

谭 荣<sup>1</sup>, 王毓杰<sup>1\*\*</sup>, 张 艺<sup>1</sup>, 王 宇<sup>1</sup>, 蔡 霞<sup>1</sup>, 阿 萍<sup>2</sup>

(1. 成都中医药大学民族医药学院 成都 611137; 2. 西藏自治区食品药品检验所 拉萨 850000)

**摘 要:**目的:建立藏药风毛菊的质量标准。方法:按 2010 年版《中国药典》附录相关要求,采用生药鉴别、检查项、TLC 法及 HPLC 法进行研究。结果:藏药风毛菊显微鉴别特征明显。测得水分、总灰分、酸不溶性灰分、浸出物平均值分别为 10.46%、9.45%、1.33%、21.17%。TLC 法鉴别特征明显,分离度好。HPLC 法定量分析中,茵芋苷、东莨菪苷、伞形花内酯线性范围分别为 0.185 0~5.551 2  $\mu\text{g}$  ( $r = 1.000\ 0$ )、0.060 54~1.816 2  $\mu\text{g}$  ( $r = 0.999\ 9$ )、0.032 51~0.975 2  $\mu\text{g}$  ( $r = 0.999\ 8$ ),平均加样回收率分别为 99.16%(RSD = 0.41%)、100.26%(RSD = 0.77%)、102.22%(RSD = 0.87%)。结论:该标准方法简便可行,重现性好,可用于藏药风毛菊的质量控制。

**关键词:**藏药 风毛菊 质量标准 显微鉴别 TLC 法 HPLC 法

doi: 10.11842/wst.2014.01.026 中图分类号:R291.4 文献标识码:A

藏药风毛菊为菊科植物长毛风毛菊 *Saussurea hieracioides* Hook. F. 或美丽风毛菊 *S. pulchra* Lipsch. 的干燥全草。藏语名称为“俄吉秀”或“贝治牙扎”,始载于藏医名著《月王药诊》<sup>[1]</sup>,其味苦、涩、寒,具有引泻腹水的功效,用于治疗各种水肿病<sup>[2,3]</sup>。藏药风毛菊为 1995 年版《中华人民共和国卫生部药品标准》(藏药第一册)收载品种<sup>[4]</sup>,但该标准仅包含显微和理化鉴别,缺乏相应的 TLC 法定性鉴别和 HPLC 法定量分析。此外,调查发现,全国混作藏药风毛菊使用的植物品种多达 7 个,较为混乱<sup>[5-9]</sup>。因此,为了更好地规范和控制藏药风毛菊的质量,本文对不同产地藏药风毛菊进行鉴别和含量测定研究,为藏药风毛菊的质量控制提供科学依据。

## 1 仪器与材料

Agilent 1260 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司);CQ-250 超声波清洗器(上海必能信超声有限

公司);BP211D 电子天平(十万分之一,德国 Sartorius 公司);CX 41 型光学显微镜(日本 OLYMPUS);ZF-90 型紫外透射仪(上海顾村电光仪器厂);硅胶 G 薄层板(青岛海洋化工厂);伞形花内酯、东莨菪内酯对照品(批号分别为:111739-200501、110768-200504,纯度 $\geq 98\%$ ,中国食品药品检定研究院);茵芋苷、东莨菪苷对照品(批号分别为:Y-174-120823、D-062-120831,纯度 $\geq 98\%$ ,成都瑞芬思生物科技有限公司);色谱级甲醇(美国 Fisher 公司),水为超纯水,其他试剂均为分析纯。

采集西藏、四川、青海及甘肃的藏药风毛菊药材共 15 批,经成都中医药大学民族医药学院张艺研究员鉴定均为菊科植物长毛风毛菊 *S. hieracioides* Hook. F. 的干燥全草,样品信息见表 1。

## 2 方法与结果

### 2.1 显微鉴别

#### 2.1.1 叶横切面

取 15 批藏药风毛菊药材完好叶片,经切片、染

收稿日期:2014-01-02

修回日期:2014-01-18

\* 国家药典委员会藏药标准提高项目(896):藏药风毛菊质量标准研究,负责人:阿萍;四川省教育厅省属高校科研创新团队建设计划(11TD004)中藏药资源保护与利用,负责人:张艺。

\*\* 通讯作者:王毓杰,博士,讲师,主要研究方向:中药及民族药药效物质基础研究。

色处理后,按照2010年版《中国药典》(一部)附录ⅡC显微鉴别法,置显微镜下观察药材叶横切面显微特征。本品叶栅栏组织由两列柱状细胞组成,海绵组织为4~5列类圆形细胞,主脉明显外凸,维管束外韧形,3~5个,形成层不明显。草酸钙方晶散在于叶肉细胞中。主脉有毛的残基,腺鳞呈淡黄色或棕黄色,散在或位于表皮下陷处。表皮细胞呈不规则形,上表皮细胞多弯曲,下表皮多非腺毛,内有草酸钙晶体分布。见图1。

### 2.1.2 粉末

取15批藏药风毛菊药材,分别粉碎,按照2010年版《中国药典》(一部)附录ⅡC显微鉴别法,观察药材粉末的显微特征。本品粉末黄绿色。非腺毛众多,多碎断,细长,由4~7个细胞分3叠排列,顶端单细胞细长,胞腔明显。导管以螺纹导管为主,并可见环纹和网纹导管,直径10~40 μm。花粉粒直径50~60 μm,具3个萌发孔。冠毛多断裂,直径20~150 μm。气孔不定式或不等式,类圆形,直径25~30 μm,长28~40 μm,副卫细胞4~5个。草酸钙方晶散在或分布于叶肉细胞中,直径5~14 μm。见图2。

### 2.2 检查项及浸出物测定

按照2010年版《中国药典》附录检查项及浸出物进行试验。其中水分测定按附录ⅨH水分测定法第一法测定,总灰分和酸不溶性灰分测定按附录ⅨK灰分测定法测定,浸出物测定按附录ⅨA浸出物测定法测定。结果各批藏药风毛菊药材的水分含量为8.49%~12.35%(均值10.46%),总灰分含量为7.33%~11.86%(均值9.45%),酸不溶性灰分含量为0.43%~2.91%(均值1.33%)。75%乙醇浸出物含量为12.54%~28.10%(均值21.17%)。

### 2.3 TLC法鉴别

取本品粉末1 g,置100 mL具塞锥形瓶中,精密加入80%甲醇50 mL,置80℃水浴加热回流40 min,滤过,滤液挥干,残渣加甲醇5 mL使溶解,作为供试品溶液。另取伞形花内酯对照品、东莨菪内酯对照品,加甲醇制成浓度分别为0.10、0.05 mg·mL<sup>-1</sup>的对照品溶液。按照2010年版《中国药典》(一部)附录ⅥB薄层色谱法,吸取上述3种溶液各3 μL,分别点于同一硅胶G薄层板上,以正己烷-乙酸乙酯-甲酸(9:6:1)为展开剂展开,取出,晾干,置紫外光灯(365 nm)下检视。供试品色谱中,在与对照品色谱相应的位置上,显相同的蓝色荧光斑点。见图3。

## 2.4 含量测定

### 2.4.1 色谱条件

采用Wondasil C<sub>18</sub>-WR色谱柱(250 mm×4.6 mm,5 μm),以甲醇(A)-0.1%磷酸水溶液(B)为流动相进行梯度洗脱,0~40 min,20%~30% A;40~45 min,30%~100% A;45~55 min,100% A,流速1.0 mL·min<sup>-1</sup>,检测波长325 nm,进样量10 μL,柱温35℃。在上述色谱条件下3种成分与相邻色谱峰之间得到很好的分离,分离度均大于1.5,理论塔板数按茴苣苷色谱峰计算均大于3 000。色谱图见图4。

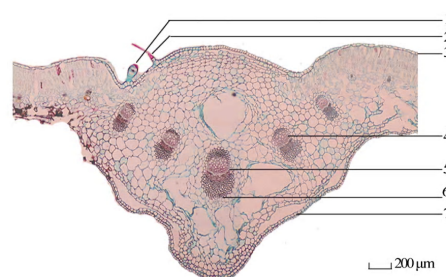


图1 藏药风毛菊叶横切面图

注 1.毛残基 2.非腺毛 3.上表皮 4.木质部 5.韧皮部, 6.维管束鞘纤维 7.下表皮。

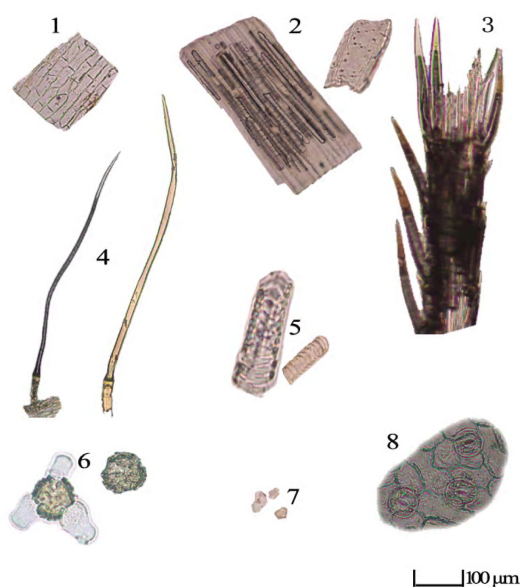


图2 藏药风毛菊粉末显微特征图

注 1.木栅细胞 2.纤维 3.冠毛 4.非腺毛 5.导管 6.花粉粒, 7.草酸钙方晶 8.叶表皮细胞。

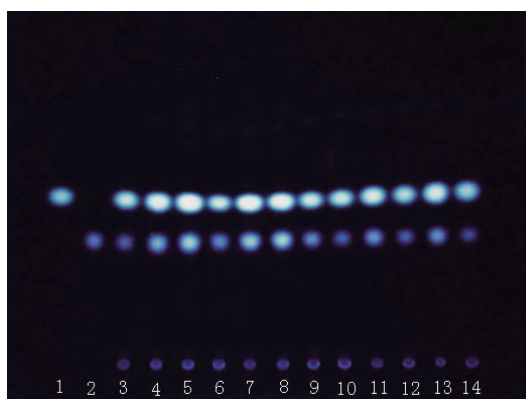


图3 藏药风毛菊 TLC 图  
注:1.伞形花内酯 2.东莨菪内酯 3~14.样品。

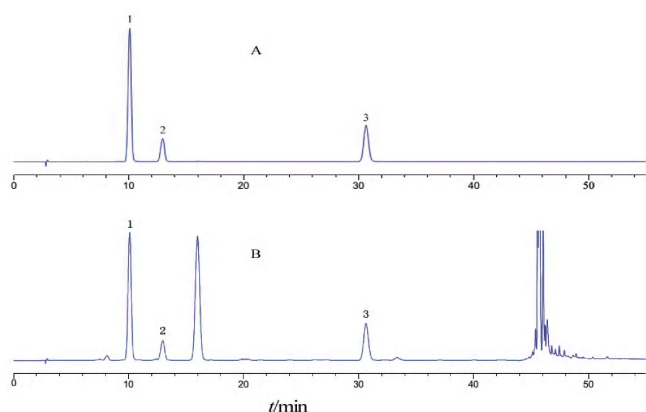


图4 风毛菊对照品(A)及样品(B)HPLC 图  
注:1.茵芋苷 2.东莨菪苷 3.伞形花内酯。

#### 2.4.2 对照品溶液的制备

精密称取茵芋苷对照品、东莨菪苷对照品、伞形花内酯对照品适量,加 80%甲醇制成浓度分别为 0.18、0.06、0.03  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  的混合溶液,摇匀,即得。

#### 2.4.3 供试品溶液的制备

取本品粉末(过四号筛)约 0.5 g,精密称定,置 100 mL 具塞锥形瓶中,精密加入 80%甲醇 50 mL,置 80℃水浴加热回流 40 min,冷却后称重,补足失重,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

#### 2.4.4 线性关系考察

分别精密吸取混合对照品溶液 1、5、10、15、20、25、30  $\mu\text{L}$ ,注入高效液相色谱仪,按“2.4.1”项下测定茵芋苷、东莨菪苷、伞形花内酯峰面积,以各成分色谱峰面积值为纵坐标( $Y$ ),进样量为横坐标( $X$ ),

绘制 3 个成分的标准曲线,得回归方程  $Y_{\text{茵芋苷}} = 2120.3X + 13.168$ ,  $r = 1.0000$ ,线性范围 0.185 0~5.551 2  $\mu\text{g}$ ;  $Y_{\text{东莨菪苷}} = 1350X + 2.569$ ,  $r = 0.9999$ ,线性范围 0.060 54~1.816 2  $\mu\text{g}$ ;  $Y_{\text{伞形花内酯}} = 5047.8X - 25.546$ ,  $r = 0.9998$ ,线性范围 0.032 51~0.975 2  $\mu\text{g}$ 。

#### 2.4.5 精密度试验

精密吸取同一混合对照品溶液 10  $\mu\text{L}$ ,按“2.4.1”项下连续进样 6 次,测得茵芋苷、东莨菪苷、伞形花内酯峰面积的 RSD 分别为 0.63%、0.65%、0.51%,表明本法有良好的精密度。

#### 2.4.6 稳定性试验

取供试品溶液,分别于 0、2、4、8、12、24 h 按“2.4.1”项下进行测定,进样量 10  $\mu\text{L}$ ,记录峰面积,计算茵芋苷、东莨菪苷、伞形花内酯的峰面积的 RSD 分别为 0.59%、0.51%、0.47%。结果表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

#### 2.4.7 重复性试验

取同一批样品,按“2.4.3”项下方法制备供试品溶液 5 份,分别进样 10  $\mu\text{L}$ ,按“2.4.1”项下测定 3 种成分的峰面积,计算茵芋苷、东莨菪苷、伞形花内酯含量的 RSD 分别为 0.55%、1.10%、0.61%,表明方法重复性良好。

#### 2.4.8 加样回收率试验

取四川省阿坝县求吉玛乡的样品粉末 9 份,每份 0.25 g,精密称定,分别加入茵芋苷、东莨菪苷、伞形花内酯对照品的量相当于样品中各成分含量的 80%、100%、120%。按“2.4.3”项下方法制备供试品溶液,按“2.4.1”项下依次测定,计算各对照品的平均加样回收率,结果茵芋苷、东莨菪苷、伞形花内酯的回收率分别为 99.16%(RSD=0.41%)、100.26%(RSD=0.77%)、102.22%(RSD=0.87%)。

#### 2.4.9 样品含量测定

取各批次样品粉末,各 0.5 g,精密称定,按“2.4.3”项下方法制备供试品溶液,按“2.4.1”项下进样分析,按干燥品计算茵芋苷、东莨菪苷、伞形花内酯含量,结果见表 1。

### 3 讨论

研究表明,藏药风毛菊主要含有香豆素类、黄酮类以及木脂素类化合物<sup>[10]</sup>,其中香豆素类成分为藏药风毛菊治疗水肿类疾病的主要活性成分<sup>[11~13]</sup>。

表 1 藏药风毛菊中 3 个化合物的测定结果( $n=2$ )

| 编号 | 产地         | 茵芋苷/% | 东莨菪苷/% | 伞形花内酯/% |
|----|------------|-------|--------|---------|
| 1  | 西藏日喀则地区藏医院 | 2.05  | 0.46   | 0.93    |
| 2  | 西藏拉萨市藏药店   | 5.27  | 1.36   | 0.63    |
| 3  | 西藏拉萨市墨竹工卡县 | 4.39  | 1.16   | 0.54    |
| 4  | 四川省阿坝县求吉玛乡 | 1.60  | 0.48   | 0.96    |
| 5  | 四川省阿坝县甲尔多乡 | 2.10  | 0.65   | 0.38    |
| 6  | 四川省阿坝县德格乡  | 2.26  | 0.71   | 0.34    |
| 7  | 四川省阿坝县麦尔玛乡 | 0.89  | 0.32   | 0.54    |
| 8  | 四川省阿坝县龙藏乡  | 1.63  | 0.54   | 0.27    |
| 9  | 四川省阿坝县热沃塘  | 1.20  | 0.39   | 0.55    |
| 10 | 四川省若尔盖县阿西乡 | 0.90  | 0.28   | 0.48    |
| 11 | 四川省若尔盖县红星乡 | 1.16  | 0.35   | 0.74    |
| 12 | 四川省若尔盖县班佑乡 | 0.96  | 0.23   | 0.90    |
| 13 | 四川省壤塘县壤阿镇  | 0.80  | 0.23   | 0.57    |
| 14 | 青海省久治县康赛乡  | 2.21  | 0.72   | 0.36    |
| 15 | 甘肃省玛曲县尼玛镇  | 0.69  | 0.26   | 0.33    |

但目前对藏药风毛菊中含量研究仅限于黄酮类成分木犀草素和异鼠李素<sup>[14]</sup>,因此,本文选择将香豆素类成分作为定性定量的指标。

通过结构分析可以发现,伞形花内酯、东莨菪内酯在 7 位具有羟基,能显强烈的蓝色荧光,而茵芋苷、东莨菪苷的 7 位羟基被糖基取代导致荧光减弱<sup>[15]</sup>。在薄层色谱展开剂条件筛选时也发现茵芋苷、东莨菪苷与伞形花内酯、东莨菪内酯的极性差异较大,在同一薄层色谱条件中难以同时分离。因此,本研究选择伞形花内酯、东莨菪内酯作为对照品进行薄层鉴别。同时考虑到茵芋苷、东莨菪苷、伞形花内酯在风毛菊中含量较高。本研究在 1995 年版《中华人民共和国卫生部药品标准》(藏药第一册)基础上,增加 HPLC 法进行茵芋苷、东莨菪苷、伞形花内酯的含量测定。

TLC 法考察了 3 个不同展开系统:正己烷-乙

酸乙酯-甲酸、甲苯-乙酸乙酯-甲酸、乙酸乙酯-甲酸-水,在此基础上进行优化,结果表明正己烷-乙酸乙酯-甲酸(9:6:1)为展开剂时斑点相对位置和重现性好。同时也对色谱条件进行了方法学考察(不同薄层板、湿度及湿度),均表现良好的耐用性。在选择 HPLC 流动相时,分别考察了乙腈-水、乙腈-0.1%磷酸、甲醇-水、甲醇-0.1%磷酸及四氢呋喃-甲醇-水系统,结果表明,甲醇-0.1%磷酸作流动相时色谱峰峰形尖锐,基线稳定,分离度好。对提取溶剂(甲醇、80%甲醇、70%甲醇、60%甲醇、50%甲醇)、提取方法(超声和回流)、提取时间(20、40、60 min)、提取溶剂用量(20、30、50、60 mL)进行考察,最终确定提取方法为:0.5 g 药材加 80%甲醇 50 mL 于 80℃回流提取 40 min。此外,还对色谱条件耐用性(温度、流速、仪器及色谱柱)进行考察,结果茵芋苷、东莨菪苷、伞形花内酯均得到较好的分离效果。

## 参考文献

- 1 马世林,毛继祖译.月王药诊.上海:上海科学技术出版社,2012:130~131.
- 2 帝玛尔·丹增彭措,毛继祖等译.晶珠本草.上海:上海科学技术出版社,2012:154.
- 3 青海省药品检验所、青海省藏医药研究所主编.中国藏药.上海:上海科学技术出版社,1996:200~203.
- 4 中华人民共和国卫生部药典委员会.中华人民共和国卫生部药品标准,藏药第一册,1995:18.
- 5 蒋序,罗艳秋,徐士奎.风毛菊属藏药的品种研究.中国民族民间医药,2010(6):3~4.
- 6 郭鹏举.青海地道地产药材.西安:陕西科学技术出版社,1996:412.
- 7 青海省生物研究所,同仁县隆务诊所主编.青藏高原药物图鉴.西宁:青海人民出版社,1978:90.
- 8 宇妥·元丹贡布,马世林译.四部医典.上海:上海科学技术出版社,1987:42.
- 9 王红兵,泰国伟.风毛菊属植物的化学成分和生物活性.国外医药·植物药分册,2005,20(2):47~52.
- 10 刘自民,贾忠建,朱子清.长毛风毛菊化学成分研究.高等学校化学学报,1989,10(11):1090~1094.
- 11 Shailendra K. The anti-neoplastic effects of coumarin: an emerging concept. *Cytotechnology*, 2013, 65(5):787~788.
- 12 Zhang S, Yang J Z, Li H Y, *et al.* Skimmin, a coumarin, suppresses the streptozotocin-induced diabetic nephropathy in wistar rats. *Eur J Pharmacology*, 2012, 692(1-3):78~83.
- 13 Farinola N, Piller N. Pharmacogenomics: its role in re-establishing coumarin as treatment for lymphedema. *Lymphat Res Biol*, 2005, 3(2):81~86.
- 14 陈晓红,陈元涛,钱蔚,等.藏药长毛风毛菊中木犀草素和异鼠李素含量快速测定法的建立.青海师范大学学报(自然科学版),2012,28(3):65~67.
- 15 匡海学.中药化学.北京:中国中医药出版社,2003:108.

Study on Quality Standard of Tibetan Medicine *Saussurea hieracioides* Hook. F.

Tan Rong<sup>1</sup>, Wang Yujie<sup>1</sup>, Zhang Yi<sup>1</sup>, Wang Yu<sup>1</sup>, Cai Xia<sup>1</sup>, A Ping<sup>2</sup>

(1. College of Ethnic Medicine, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China;

2 Tibet Autonomous Region Institute for Food and Drug Control, Lhasa 850000, China)

**Abstract:** This study was aimed to set up the quality standard of *Saussurea hieracioides* Hook. F. According to the *Chinese Pharmacopoeia* (2010 edition), this study was made on pharmacognostic identification, detection items, TLC method, and HPLC method. The results showed that the microscopical identification of Tibetan medicine *S. hieracioides* was obvious. The detected average values of moisture, total ash, acid-insoluble ash and water-soluble extracts were 10.46%, 9.45%, 1.33%, and 21.17%, respectively. The TLC identification had an identified specification with good resolution. In the quantitative analysis with HPLC method, the linear ranges of skimmin, scopolin and umbelliferone were 0.185 0~5.551 2  $\mu\text{g}$  ( $r = 1.000\ 0$ ), 0.060 54~1.816 2  $\mu\text{g}$  ( $r = 0.999\ 9$ ), and 0.032 51~0.975 2  $\mu\text{g}$  ( $r = 0.999\ 8$ ), respectively. The average recovery rates were 99.16% (RSD = 0.41%), 100.26% (RSD = 0.77%), and 102.22% (RSD = 0.87%), respectively. It was concluded that this method was simple and reproducible, which can be used for the quality control of Tibetan medicine *S. hieracioides*.

**Keywords:** Tibetan medicine, *S. hieracioides* Hook.F, quality standard, microscopical identification, TLC method, HPLC method

(责任编辑 叶丽萍 张志华,责任译审 王 晶)