

中图分类号: R932; R284.1 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2023)06-0088-05
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2023.06.022



网络鸡血藤根药材质量标准研究

张赞赞¹, 巫凯¹, 严赞^{2△}, 郭雯雯², 黄莉³, 王彩玉³

(1. 广西中医药研究院, 广西南宁 530022; 2. 广西食品药品检验所, 广西南宁 530021; 3. 桂林医学院, 广西桂林 541004)

摘要:目的 建立网络鸡血藤根药材的质量标准。方法 对药材样品进行性状鉴别, 对其横切面和粉末进行显微鉴别; 按2020年版《中国药典(四部)》方法测定药材样品水分、总灰分、酸不溶性灰分、浸出物的含量; 采用薄层色谱(TLC)法对药材样品进行定性鉴别; 采用高效液相色谱法测定药材中芒柄花素含量, 色谱柱为RP-18 Endcapped柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-0.4%磷酸水溶液(32:68, V/V), 流速为1.0 mL/min, 检测波长为249 nm, 柱温为30℃, 进样量为20 μL。结果 药材样品粉末显微特征明显, 专属性好。水分、总灰分、酸不溶性灰分、浸出物平均含量分别为7.01%, 3.39%, 0.31%, 16.45%。TLC图斑点清晰, 分离度和专属性好。芒柄花素质量浓度在4.94~98.70 μg/mL范围内与峰面积线性关系良好; 精密度、稳定性、重复性试验结果的RSD均小于2.0%; 平均加样回收率为99.46%, RSD为1.51%(n=6)。结论 建立的标准可用于网络鸡血藤根药材的质量控制。

关键词: 网络鸡血藤根; 薄层色谱法; 高效液相色谱法; 芒柄花素; 性状鉴别; 显微鉴别; 含量测定

Quality Standard of Millettiae Reticulatae Radix

ZHANG Yunyun¹, WU Kai¹, YAN Yun², GUO Wenwen², HUANG Li³, WANG Caiyu³

(1. Guangxi Institute of Traditional Medical and Pharmaceutical Sciences, Nanning, Guangxi, China 530022; 2. Guangxi Institute for Food and Drug Control, Nanning, Guangxi, China 530021; 3. Guilin Medical University, Guilin, Guangxi, China 541004)

Abstract: Objective To establish the quality standard of Millettiae Reticulatae Radix. **Methods** The characteristics of the samples were identified, and the cross section and powder of the samples were identified by microscopy. The contents of moisture, total ash, acid-insoluble ash and extract of the medicinal material samples were determined according to the method of the Chinese Pharmacopoeia (2020 Edition, Volume IV). Thin-layer chromatography (TLC) method was used for the qualitative identification of the medicinal material samples. High-performance liquid chromatography (HPLC) method was used for the content determination of formononetin in medicinal material materials, the chromatographic column was RP-18 Endcapped column (250 mm×4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was acetonitrile-0.4% phosphoric acid aqueous solution (32:68, V/V), the flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelength was 249 nm, the column temperature was 30℃, and the injection volume was 20 μL. **Results** The microscopic characteristics of the powder were obvious and the specificity was good. The average content of moisture, total ash, acid-insoluble ash and extract was 7.01%, 3.39%, 0.31% and 16.45%, respectively. TLC chromatograms had clear spots, good resolution

*基金项目: 广西壮族自治区食品药品监督管理局项目[MZY2017002]。

第一作者: 张赞赞, 女, 硕士研究生, 副主任药师, 研究方向为药物分析和中药化学, (电子信箱) melody0707@163.com。

△通信作者: 严赞, 男, 大学本科, 副主任药师, 研究方向为药品质量检测与分析评价, (电子信箱) yanyun1144@163.com。

- [6] ZHAO YL, GARRISON SL, GONIALEZ C, et al. N-Nitrosation of Amines by NO₂ and NO: a Theoretical Study[J]. J Phys Chem A, 2007, 111(11): 2200-2205.
- [7] OHSHIMA H, KAWABATA T. Mechanism of N-nitrosodimethylamine formation from trimethylamine and trimethylamine oxide[J]. IARC Sci Publ, 1978(19): 143-153.
- [8] SUN Z, LIU YD, ZHONG RG. Theretical Investigation of N-Nitrosodimethylamine Formation from Nitrosation of Trimethylamine[J]. Phys Chem, 2010, 114(1): 455-465.
- [9] 吴兴兴, 唐力, 朱怡君, 等. 分光光度法测定药用辅料中亚硝酸盐的含量[J]. 生物化工, 2021, 7(2): 83-85.
- [10] 黄丽华, 许泮彬. 高效液相色谱法测定常见药物中的亚硝酸盐含量[J]. 中国医药导报, 2011, 8(14): 58-59.
- [11] 王晓姝, 杨娅, 达情, 等. 顶空气相色谱法测定尿液中亚硝酸盐研究[J]. 南通大学学报(医学版), 2014, 34(5): 355-358.
- [12] 田珩, 吴纯敏, 贝琦华. 离子色谱法测定雷尼替丁原料药及制剂中亚硝酸根含量[J]. 中国药业, 2021, 30(15): 74-77.
- [13] 许春莹, 黄克靖, 谢宛珍. 荧光探针8-(3',4'-二氨基苯)-二氟化硼-二吡咯甲烷用于光度法灵敏测定食品中亚硝酸根和硝酸根[J]. 化学学报, 2009, 67(10): 1075-1080.
- [14] 韩春霞, 梁立娜, 范慧红, 等. 离子色谱法测定达肝素钠中的亚硝酸根[J]. 药物分析杂志, 2011, 31(11): 2171-2172.
- [15] 张磊, 刘肖, 赵云峰, 等. 离子色谱法测定食品中硝酸盐和亚硝酸盐[J]. 中国食品卫生杂志, 2011, 20(4): 294-295.
- [16] 于维森. 溴酸钾氧化亮绿SF催化光度法测定纯净水中微量亚硝酸盐[J]. 预防医学论坛, 2005, 6(11): 15-18.

(收稿日期: 2022-05-31; 修回日期: 2022-09-13)

and specificity. The linear range of formononetin was 4.94 – 98.70 $\mu\text{g/mL}$. The *RSDs* of precision, stability and repeatability tests were lower than 2.0%. The average recovery of formononetin was 99.46% with an *RSD* of 1.51% ($n = 6$). **Conclusion** The established standard can be used for the quality control of *Millettieae Reticulatae Radix*.

Key words: *Millettieae Reticulatae Radix*; TLC; HPLC; formononetin; character identification; microscopic identification; content determination

网络鸡血藤根是豆科植物网络崖豆藤 *Millettia reticulata* Benth 的干燥根, 味苦, 有毒, 分布于我国西南、华东、华中、华南等地区, 具有祛风除湿、通经活络、强筋骨、镇静功效。该药材为广西瑶族传统习用药材, 多用于外治风湿筋骨痛、四肢麻木、腰膝酸痛、瘫痪、跌打损伤等病症^[1-2]。瑶药由于无科学、系统、规范的法定质量标准, 很多具有民族医药特色的药材及药方不能直接进行成药、制剂开发, 导致临床应用受限。近年来, 地方政府多次组织了广西常用民族药、瑶族民间用药、瑶药资源普查及开发利用研究等大量基础性工作, 初步制定了瑶药的范畴和质量标准体系。本研究中拟建立网络鸡血藤根的质量控制标准。现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

2695 – 2489 型高效液相色谱仪(美国 Waters 公司); BX41 型高分辨生物显微镜(日本 Olympus 公司); SM2010R 型平推式切片机(德国 Leica 公司); LT9 / 11 型马弗炉(德国 Nabertherm 公司); ED240 型干燥箱(德国 Binder 公司); HEIZBAD HRT – VAP 型旋转蒸发仪(德国 Heidolph 公司); IQ7000 型超纯水仪(美国 Millipore 公司); XS205DU 型电子天平(瑞士 Mettler Toledo 公司, 精度为十万分之一); S120H 型超声波清洗仪(瑞士 Elma 公司)。

1.2 试药

芒柄花素对照品(中国食品药品检定研究院, 批号为 111703 – 200501, 含量 99.1%); 硅胶 G 薄层板(青岛海洋化工有限公司); 乙腈为色谱纯, 其余试剂均为分析纯, 水为高纯水。10 批网络鸡血藤根药材样品, 均产自广西(见表 1), 经广西中医药研究院黄云峰副研究员鉴定为正品。部分 2 号药材样品被制成腊叶标本, 经广西中医药大学中药教研室韦松基教授及广西中医药研究院中药室赖茂祥研究员和黄云峰副研究员鉴定为正品, 以其作为网络鸡血藤根对照药材。

2 方法与结果

2.1 性状鉴别

药材样品呈圆柱形, 表面灰褐色, 具细皱纹及栓皮脱落痕, 直径 0.5 ~ 5.0 cm。质硬, 难折断, 断面颗粒状, 皮部薄、灰褐色, 木部黄白色, 有细密的放射状纹理, 无

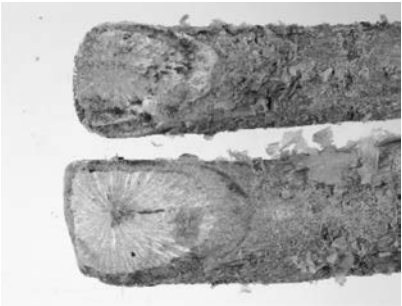
表 1 药材样品信息

Tab. 1 Information of medicinal material samples

编号	采集日期	采集地点
1	2019 – 08 – 07	来宾市金秀县桐木镇古池村
2	2019 – 08 – 21	柳州市鹿寨县四排镇甲凤村
3	2019 – 09 – 05	桂林市荔浦县茶城乡过村土围屯乡
4	2019 – 09 – 08	来宾市象州县水晶乡朝阳屯
5	2019 – 09 – 09	河池市宜州区庆远镇矮山
6	2019 – 09 – 16	柳州市柳南区洛满镇洛满村
7	2019 – 10 – 16	桂林市阳朔县高田镇
8	2019 – 10 – 17	桂林市平乐县龙窝镇江口桥头
9	2019 – 10 – 18	柳州市柳江区穿山镇
10	2019 – 10 – 28	来宾市武宣县金鸡乡新村



A



B

A. 整体 B. 横切面

图 1 网络鸡血藤根药材外观图

A. Overall picture B. Cross section

Fig. 1 Appearance of *Millettieae Reticulatae Radix*

髓。商品常切成斜片(厚约 0.5 cm), 气微, 味淡。详见图 1。

2.2 显微鉴别

横切面: 木栓层为数列排列整齐的扁方形或方形细胞。皮层窄, 细胞圆形或类圆形, 石细胞为数个一群且呈断续环状分布, 细胞壁较厚, 孔沟明显。韧皮部

较宽,细胞类圆形或不规则形,韧皮纤维为数个一群且呈散在分布,纤维壁较薄,非木化或微木化,周围的薄壁细胞有的含有草酸钙方晶且形成晶纤维,有的含淀粉粒。木质部较宽,由导管、木纤维和木薄壁细胞组成,木纤维和木薄壁细胞相间排列,导管单个或多个相连,呈放射状分布,直径 $30 \sim 185 \mu\text{m}$,木射线细胞 $2 \sim 8$ 列。详见图2。

粉末:棕黄色。纤维成束或分离,先端圆钝或折断,部分纤维周围的薄壁细胞含有草酸钙方晶形成晶纤维,纤维直径 $12 \sim 33 \mu\text{m}$ 。石细胞为单个或多个相连,细胞壁较厚,孔沟明显,直径 $20 \sim 55 \mu\text{m}$ 。草酸钙方晶呈方形或不规则形,直径 $9 \sim 35 \mu\text{m}$ 。淀粉粒为散在或存在于薄壁细胞中,单粒或复粒,圆形、半圆形或鸡嘴形,脐点点状或裂缝状,直径 $5 \sim 15 \mu\text{m}$ 。导管为具缘纹孔导管,直径 $22 \sim 118 \mu\text{m}$ 。木栓细胞呈类方形或多角形,棕黄色或灰白色,细胞壁较厚。详见图3。

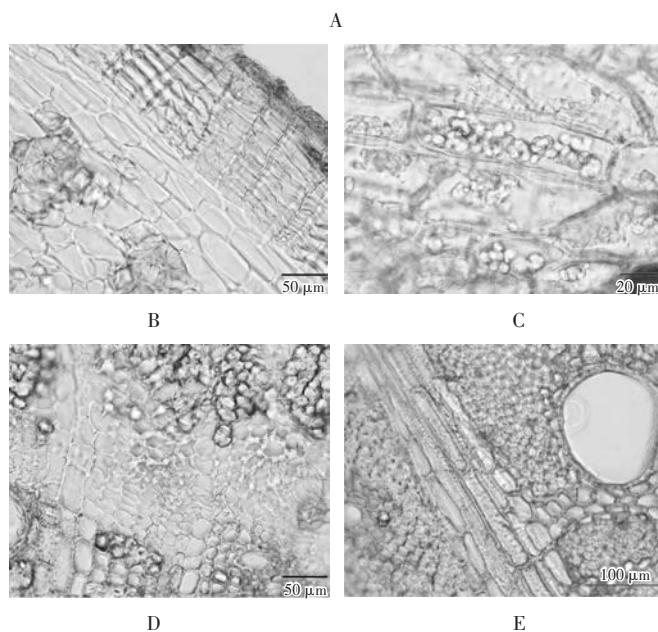
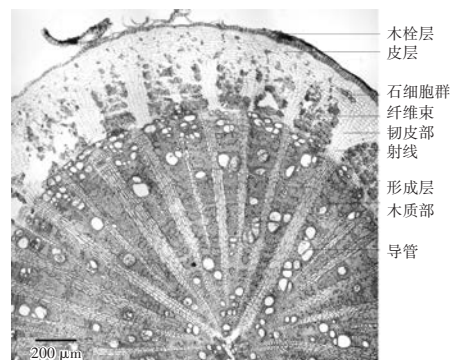
2.3 薄层色谱(TLC)鉴别

取药材样品粉末2 g,加甲醇30 mL,超声(功率200 W,频率37 kHz;下同)提取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。取对照药材粉末2 g,同法制成对照药材溶液。按2020年版《中国药典(四部)》通则0502 TLC法,吸取上述溶液各 $2 \mu\text{L}$,分别点于同一硅胶G薄层板上,以氯仿-丙酮-甲醇-氨($6:3:0.5:0.1, V/V/V/V$)为展开剂,展开,取出,晾干,置紫外光灯(254 nm)下检视。结果供试品溶液色谱中,在与对照药材溶液色谱相应位置显相同颜色斑点。详见图4。

2.4 水分、灰分、浸出物检查

水分:按2020年版《中国药典(四部)》通则0832第二法烘干法测定。结果药材样品含水量为 $3.07\% \sim 9.98\%$,平均 7.01% 。详见表2。

总灰分:按2020年版《中国药典(四部)》通则2302灰分项下总灰分测定法测定。结果药材样品中总灰分含量为 $2.47\% \sim 4.69\%$,平均 3.39% 。详见表2。



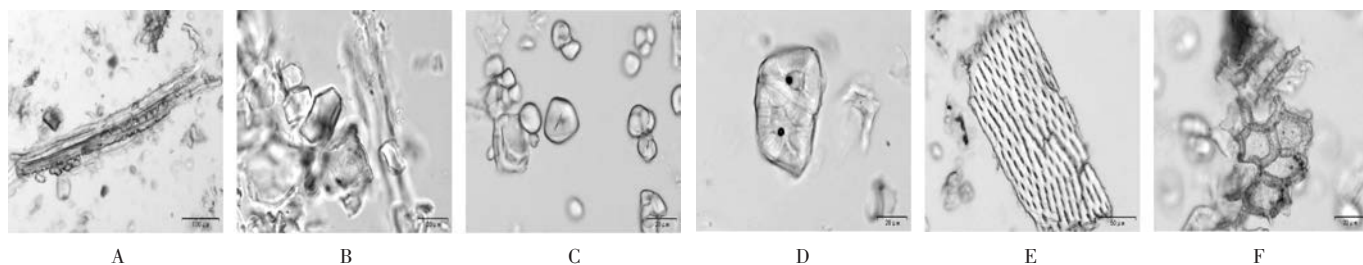
A. 横切面 B. 木栓层和石细胞 C. 木射线内淀粉粒 D. 韧皮部(木射线及晶纤维) E. 木质部(导管、木射线和木纤维束)

图2 网络鸡血藤根药材横切面显微图

A. Cross section B. Phellem and sclerotic cell C. Starch grain in xylem ray D. Phloem (xylem ray and crystal fiber) E. Xylem (vessel, xylem ray and wood fiber bundle)

Fig. 2 Cross-section micrograph of Millettiae Reticulatae Radix

酸不溶性灰分:按2020年版《中国药典(四部)》通则2302灰分项下酸不溶性灰分测定法测定。结果药材样品中酸不溶性灰分含量为 $0.16\% \sim 0.59\%$,平均 0.31% 。详见表2。

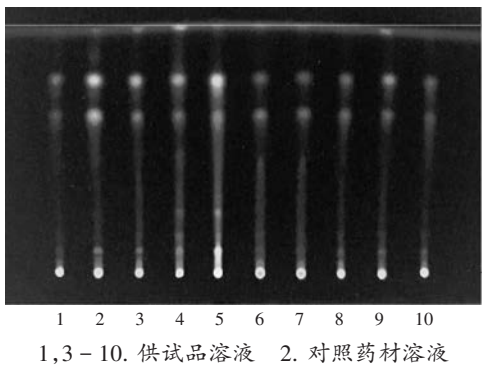


A. 晶纤维 B. 草酸钙方晶 C. 淀粉粒 D. 石细胞 E. 导管 F. 木栓细胞

图3 网络鸡血藤根药材粉末显微图

A. Crystal fiber B. Calcium oxalate square crystal C. Starch grain D. Sclerotic cells E. Duct F. Cork cells

Fig. 3 Micrograph of the powder of Millettiae Reticulatae Radix



1, 3-10. 供试品溶液 2. 对照药材溶液

图4 薄层色谱图

1, 3-10. Test solution 2. Reference medicinal materials solution

Fig. 4 TLC chromatograms

表2 药材样品水分、灰分、浸出物含量测定结果(%)

Tab. 2 Results of the content determination of moisture, ash and extract in medicinal material samples (%)

编号	水分	总灰分	酸不溶性灰分	浸出物
1	9.98	3.16	0.29	18.39
2	8.41	2.71	0.20	12.52
3	8.26	4.69	0.59	15.83
4	3.07	4.20	0.30	9.06
5	6.52	3.84	0.24	14.03
6	3.71	2.91	0.27	20.04
7	9.60	2.47	0.16	12.17
8	3.13	3.40	0.29	22.07
9	8.16	4.06	0.59	23.20
10	9.27	2.48	0.21	17.23

浸出物:按2020年版《中国药典(四部)》通则2201项下的热浸法(以水为溶剂)测定。结果药材样品中浸出物含量为9.06%~23.20%,平均16.45%。详见表2。

2.5 含量测定

2.5.1 色谱条件

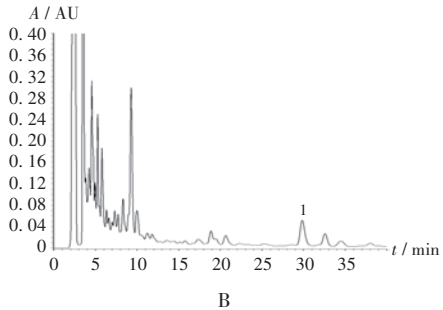
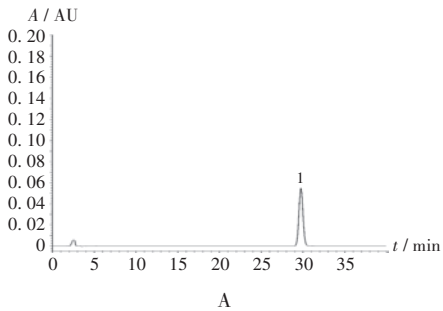
色谱柱:RP-18 Endcapped柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈-0.4%磷酸水溶液(32:68, V/V);流速:1.0 mL/min;检测波长:249 nm;柱温:30℃;进样量:20 μL。

2.5.2 溶液制备

取芒柄花素对照品9.96 mg,精密称定,置100 mL容量瓶中,加甲醇超声溶解,定容,摇匀,即得质量浓度为0.098 7 mg/mL的对照品溶液。取药材样品粉末(过2号筛)约3 g,精密称定,置圆底烧瓶中,加入100 mL甲醇,加热回流30 min,放冷,摇匀,滤过,滤液减压浓缩至干,残渣加甲醇溶解并移至5 mL容量瓶,用甲醇定容,摇匀,经0.45 μm微孔滤膜滤过,取续滤液,即得供试品溶液。

2.5.3 方法学考察

适用性试验:取上述2种溶液各适量,按2.5.1项下色谱条件进样测定,记录色谱图。结果,理论板数按芒柄花素峰计应不低于13 500;分离度均大于1.5,基线分离良好。详见图5。



1. 芒柄花素

A. 对照品溶液 B. 供试品溶液

图5 高效液相色谱图

1. Formononetin

A. Reference solution B. Test solution

Fig. 5 HPLC chromatograms

线性关系考察:分别精密量取2.5.2项下对照品溶液0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 10 mL,置10 mL容量瓶中,加流动相定容,摇匀,制成系列对照品溶液。精密量取20 μL,按2.5.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以芒柄花素质量浓度(X, μg/mL)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程 $Y = 122\,430X - 50\,575.94$ ($r = 0.999\,8$)。结果表明,芒柄花素质量浓度在4.94~98.70 μg/mL范围内与峰面积线性关系良好。

精密度试验:取2.5.2项下对照品溶液(2号样品)适量,按2.5.1项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果,芒柄花素峰面积的RSD为0.16% ($n = 6$),表明仪器精密度良好。

稳定性试验:取2.5.2项下供试品溶液(1号样品)适量,分别于室温下放置0, 2, 4, 8, 14, 22 h时按2.5.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,芒柄花素峰面积的RSD为0.71% ($n = 6$),表明供试品溶液在室温放置22 h内基本稳定。

重复性试验:称取样品(1号样品)粉末适量,精密称定,各6份,按2.5.2项下方法制备供试品溶液,再按2.5.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算含量。结果,芒柄花素的平均含量为 $50.61\text{ }\mu\text{g/g}$, RSD 为 $1.27\%(n=6)$,表明方法重复性良好。

加样回收试验:取已知含量样品(1号样品)适量,共6份,分别加入一定质量浓度的芒柄花素对照品溶液,按2.5.2项下方法制备供试品溶液,再按2.5.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算加样回收率。结果见表3。

表3 加样回收试验结果($n=6$)
Tab.3 Results of the recovery test ($n=6$)

取样量(g)	样品含量(μg)	加入量(μg)	测得量(μg)	回收率(%)	$\bar{X}$ (%)	RSD (%)
1.5057	76.2065	74.025	151.3872	101.56	99.46	1.51
1.5036	76.1002	74.025	148.4154	97.69		
1.5092	76.3836	74.025	149.2368	98.42		
1.5102	76.4342	74.025	151.0118	100.75		
1.5045	76.1458	74.025	150.0489	99.84		
1.5075	76.2976	74.025	149.2368	98.53		

2.5.4 样品含量测定

取药材样品粉末各适量,分别按2.5.2项下方法制备供试品溶液,再按2.5.1项下色谱条件进样测定,平行测定3次,记录峰面积并计算样品含量。结果见表4。

表4 样品含量测定结果($\mu\text{g/g}$, $n=3$)

成分	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
芒柄花素	50.61	97.51	61.14	41.18	136.48	16.81	14.60	33.45	44.66	37.44

3 讨论

根据10批药材样品水分、总灰分、酸不溶性灰分、浸出物及芒柄花素含量测定结果,前四者以10批药材样品数据中的最(大,小)值调整20%为限度值,含量以10批药材样品数据的平均值下调20%为限度值。建议网络鸡血藤根药材水分含量不得过12.0%,总灰分含量不得过6.0%,酸不溶性灰分含量不得过1.0%,浸出物含量不得低于8.0%,芒柄花素含量不得少于 $42\text{ }\mu\text{g/g}$ 。

TLC预试验中进行了耐用性试验考察,采用点状点样对自制板、预制板的展开效果,不同展开温度(5, 35℃),以及不同相对湿度(30%, 80%)进行考察。结果均表明本方法的耐用性良好。

由网络鸡血藤根指纹图谱前期研究可知其含有芒柄花素成分^[3]。现代药理学研究表明,芒柄花素能促进脊髓损伤修复,促进骨再生,对股骨头坏死有治疗作用^[4-5],且能预防绝经后女性和老年人骨质疏松^[6],

这与其功能主治中的通经活络、强筋骨相适应。有研究表明,芒柄花素具有调血脂、对多种肿瘤有抑制作用及抗炎抑菌等作用^[7-15],故芒柄花素用于网络鸡血藤根药材质量评价具有一定意义。

综上所述,本研究中建立的标准可用于网络鸡血藤根药材的质量控制。

参考文献

- [1] 王国强. 全国中草药汇编(卷一)[M]. 3版. 北京:人民卫生出版社,2014:336.
- [2] 覃迅云,罗金裕,高志刚. 中国瑶药学[M]. 北京:民族出版社,2002:481.
- [3] 严 赞,郭雯雯,林小娟,等. 高效液相色谱指纹图谱结合化学计量学方法评价瑶药材网络鸡血藤根的质量[J]. 中南药学,2022,20(8):1890-1894.
- [4] 张丽心,程 延,肖 雪,等. 刺芒柄花素对脊髓损伤大鼠运动功能恢复的作用[J]. 中药药理与临床,2015,31(4):20-24.
- [5] 洪一波,姜 宏,王建伟,等. 芒柄花素抑制 RANKL 诱导破骨细胞分化的实验研究[J]. 中国骨伤,2020,33(1):64-70.
- [6] 喻琴云,詹晓峰,黄 彦. 刺芒柄花素对去势骨质疏松大鼠 P38MAPK/MMP-9 信号通路的影响[J]. 中国临床药理学与治疗学,2017,22(12):1371-1376.
- [7] 赵 培,杨 媛,徐 扬,等. 刺芒柄花素调节血脂代谢及改善动脉粥样硬化病变的实验研究[J]. 中国新药杂志,2009,18(10):925-929.
- [8] 周瑞娟,陈红凤,叶媚娜,等. 芒柄花素对不同亚型乳腺癌细胞周期基因和蛋白表达的影响[J]. 药物评价研究,2016,39(3):362-366.
- [9] 贾绍华,金诗鹏,孙萌遥,等. 基于 EMT 的芒柄花素抑制人乳腺癌 MCF-7 细胞迁移、侵袭及其机制的研究[J]. 食品与药品,2022,24(2):101-105.
- [10] 李自全,孟祥娇. 芒柄花素对人非小细胞肺癌细胞增殖、凋亡的影响及相关机制探讨[J]. 中国实验方剂学杂志,2016,22(20):138-142.
- [11] 葛 新,李 林,王 芳,等. 芒柄花素抑制乳腺癌细胞 HIF-1 α /CXCR4 信号以及细胞增殖和迁移[J]. 河南医学研究,2016,25(9):1542-1545.
- [12] 张晶蕾. 芒柄花素对围绝经期女性的药用价值研究[J]. 中国现代应用药学,2022,39(7):989-995.
- [13] 焦文鹏,焦文静,张金艳. 刺芒柄花素通过 COX-2/cyclin D1 轴调控肝癌的发生和发展[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志,2021,28(9):877-884.
- [14] 牛永莉,贾晓波,王 艳. 芒柄花素调控 miR-19b-3p/TGF- β /Smad2 信号通路影响卵巢癌细胞的增殖、迁移、侵袭和凋亡[J]. 沈阳药科大学学报,2021,38(10):1068-1075.
- [15] 顾民华,洪 文,唐传其,等. 芒柄花素保护前脑缺血再灌注损伤中的血脑屏障并抑制神经炎症[J]. 暨南大学学报(自然科学与医学版),2015,36(1):34-39.

(收稿日期:2020-05-27;修回日期:2022-09-27)