

牡荆子和黄荆子的定性与定量鉴别研究

罗国良¹, 汪 洋¹, 李华强², 舒志恒², 秦路平², 郑承剑^{2*}

1. 浙江英特集团股份有限公司, 浙江 杭州 310015

2. 第二军医大学药学院, 上海 200433

摘要: 目的 对牡荆 *Vitex negundo* var. *cannabifolia* 子及黄荆 *Vitex negundo* 子进行比较研究, 为其鉴别提供实验依据。方法 采用原植物外观、性状、显微、薄层和 HPLC 鉴别方法, 对黄荆子与牡荆子进行定性定量研究。结果 黄荆子与牡荆子在原植物形态、药材性状上相似, 通过原植物和性状进行鉴别存在一定困难; 显微鉴别中石细胞特征可为两者的有效鉴别提供实验依据; 薄层鉴别中以黄荆子素为对照品, 黄荆子中黄荆子素丰度明显高于牡荆子; HPLC 测定中, 黄荆子中所含黄荆子素的量高于牡荆子。结论 可采用显微、薄层和 HPLC 方法, 结合药材粉末的石细胞特征和黄荆子素量差异对黄荆子与牡荆子进行有效地鉴别。

关键词: 黄荆; 牡荆; 生药学; 显微鉴定; 薄层色谱; HPLC

中图分类号: R286.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2017)17-3624-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.17.027

Qualitative and quantitative identification of *Vitex negundo* var. *cannabifolia* fruits and *Vitex negundo* fruits

LUO Guo-liang¹, WANG Yang¹, LI Hua-qiang², SHU Zhi-heng², Qin Lu-ping², ZHENG Cheng-jian²

1. Zhejiang Intec Group Company Limited, Hangzhou 310015, China

2. Department of Pharmacognosy, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

Abstract: Objective To provide experimental basis for the identification of *Vitex negundo* var. *cannabifolia* fruits and *V. negundo* fruits by comparative study. **Methods** The original plant identification, morphological identification, microscopic identification, TLC and HPLC identification were adopted to distinguish the two kinds of materials. **Results** It is difficult to tell the difference of these two medicinal fruits in term of original plant identification and morphological identification to their similarity, while microscopic identification, TLC and HPLC identification revealed that the characteristics of sclereid could be used to distinguish these two fruits. **Conclusion** Microscopic identification on the sclereid characteristics of fruits powder, combined with TLC and HPLC identification can be the feasible method that used to distinguish *V. negundo* fruits and *V. negundo* var. *cannabifolia* fruits.

Key words: *Vitex negundo* L.; *Vitex negundo* L. var. *cannabifolia* (Sieb. et Zucc.) Hand. -Mazz.; pharmacognosy; microscopic identification; thin-layer chromatography; HPLC

牡荆子为马鞭草科植物牡荆 *Vitex negundo* L. var. *cannabifolia* (Sieb. et Zucc.) Hand. -Mazz. 的果实, 味苦、辛, 性温, 归肺、大肠经, 具有化湿祛痰、止咳平喘、理气止痛的功效, 主治咳嗽气喘、胃痛、泄泻、痢疾、疝气痛、脚气肿胀、白带、白浊。黄荆子为马鞭草科植物黄荆 *Vitex negundo* L. 的果实, 味辛、苦, 性温, 归肺、胃、肝经, 具有祛风解表、止咳平喘、理气消食止痛的功效, 主治伤风感冒、咳嗽、哮喘、胃痛吞酸、消化不良、食积泻痢、胆囊炎、胆结石、疝气^[1]。牡荆为黄荆的变

种, 两者果实牡荆子和黄荆子极为相似。为保证药品质量, 确保临床疗效, 本实验从原植物外观、药材性状鉴别、显微鉴别、薄层鉴别和 HPLC 测定 5 种方法对这 2 种药材进行了鉴别比较研究。

1 材料与仪器

1.1 药材

牡荆子采于浙江建德、黄荆子采于江苏南京, 经第二军医大学药学院郑承剑副教授鉴定, 分别为马鞭草科植物牡荆 *Vitex negundo* L. var. *cannabifolia* (Sieb. et Zucc.) Hand. -Mazz. 的果实及马鞭草科植

收稿日期: 2017-03-28

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81473328); 上海市科委科技创新行动计划 (14401902500, 16401901500)

作者简介: 罗国良, 男, 主管药师。Tel: 18958091858 E-mail: lgl@intmedic.com

*通信作者 郑承剑, 男, 博士, 副教授。Tel: 02181871305 E-mail: zhengchengjian1984@126.com

物黄荆 *Vitex negundo* L. 的果实; 对照品黄荆子素 (第二军医大学药学院药学教研室自制, 经 HPLC 检测质量分数 >98%)^[2]; 乙醇、甲酸为分析醇; 乙腈、甲醇为色谱醇 (国药集团化学试剂有限公司), 水为娃哈哈纯净水 (杭州娃哈哈集团有限公司)。

1.2 仪器

BX41 型 Olympus 生物显微镜、USC-702 超声波清洗器 (上海波龙电子设备有限公司); Anke TGL-16G 型离心机 (上海安亭科学仪器厂); Mettler

AE 分析天平 [梅特勒-托利多仪器 (上海) 有限公司]; Agilent 1260 高效液相色谱仪 (美国 Agilent 公司); HHS 型电热恒温水浴锅 (上海博讯实业有限公司医疗设备厂); 103 高速中药粉碎机 (瑞安市永历制药机械有限公司)。

2 方法与结果

2.1 原植物鉴别

从基原、拉丁学名、叶、花、果实等方面, 对原植物特征进行鉴定。结果见表 1。

表 1 牡荆和黄荆原植物特征

Table 1 Characteristics of *V. negundo* var. *cannabifolia* and *V. negundo*

鉴别项	牡荆	黄荆
基原	马鞭草科植物牡荆	马鞭草科植物黄荆
学名	<i>Vitex negundo</i> L. var. <i>cannabifolia</i> (Sieb. et Zucc.) Hand. -Mazz.	<i>Vitex negundo</i> L.
叶	叶对生, 掌状复叶, 小叶 5, 少有 3; 掌状复叶, 小叶 5, 少有 3; 小叶片长圆状披针形至披针形, 顶端渐尖, 小叶片披针形或椭圆状披针形, 顶端渐尖, 基部楔形, 边缘有担堡堕, 表面绿色, 背面淡绿色, 通常被柔毛	基部楔形, 全缘或每边有少数塑堡鲞, 表面绿色, 背面密生灰白色柔毛; 中间小叶片长 4~15 cm, 宽 1~4 cm, 两侧小叶依次递小, 若具 5 小叶时, 中间 3 片小叶有柄, 最外侧的 2 片小叶片无柄或近于无柄
花	圆锥花序顶生, 长 10~20 cm, 花冠淡紫色, 花期 6~7 月	伞形花序排列成圆锥花序式, 顶生, 长 10~27 cm, 花序梗密被灰白色绒毛; 花萼钟状, 顶端有 5 裂齿, 外被灰白色绒毛, 花冠淡紫色, 外有微绒毛, 顶端 5 裂, 二唇形; 雄蕊伸出花冠管外; 子房近无毛, 花期 4~6 月
果实	果实近球形, 黑色, 果期 8~11 月	核果近球形, 径约 2 mm, 宿萼接近果实的长度, 果期 7~10 月

2.2 药材性状鉴别

从形状、纵横径、宿萼、颜色、质地、子房及种子等方面, 对药材性状特征进行鉴定。牡荆子和黄荆子性状鉴别比较, 结果见表 2。牡荆果实呈圆锥形或卵形, 上端略大而平圆, 有花柱脱落的凹痕, 下端稍尖。长约 3 mm, 直径 2.0~2.5 mm。宿萼灰褐色, 密被灰白色细绒毛, 包被整个果实的 2/3 或更多, 萼筒先端 5 齿裂, 外面有 5~10 条脉纹, 果实表面棕褐色, 坚硬, 不易破碎。

断面果皮较厚, 棕黄色, 4 室, 每室有黄白色种子 1 枚或不育。黄荆果实连同宿萼及短果柄呈倒卵形或近梨形, 长 3.0~4.0 mm, 直径 2.0~2.5 mm。宿萼灰褐色, 密被棕黄色或灰白色绒毛, 包被整个果实的 2/3 或更多, 萼筒先端 5 齿裂, 外面具 5~10 条脉纹。果实近球形, 上端稍大略平圆, 有花柱脱落的凹痕, 基部稍狭尖, 棕褐色。质坚硬, 不易破碎, 断面黄棕色, 4 室, 每室有黄白色种子 1 枚或不育。

表 2 牡荆子和黄荆子的性状特征

Table 2 Characteristics of *V. negundo* var. *cannabifolia* fruits and *V. negundo* fruits

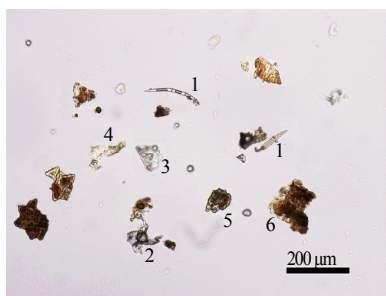
项目	牡荆子	黄荆子
形状	圆锥形或卵形, 上端略大而平圆	倒卵形或近梨形
长	2.5~4.0 mm	3.0~4.0 mm
直径	2.0~2.5 mm	2.0~2.5 mm
宿萼	密被白色细绒毛, 包被果实 2/3 或更多	密被白色绒毛, 包被果实 2/3 或更多
颜色	棕褐色	棕褐色
质地	坚硬	坚硬
子房	4 室	4 室
种子	每室 1 枚或不育, 黄白色	每室 1 枚或不育, 黄白色

2.3 粉末显微鉴定

用粉碎机将药材粉碎,过80目筛,制作临时切片观察,部分直接用蒸馏水制作,部分用水合氯醛-稀甘油加热透化处理后制作。在 $\times 40$ 、 $\times 100$ 、 $\times 200$ 、 $\times 400$ 倍下观察拍照,并选择 $\times 200$ 视野下的图像作粉末特征图。

2.3.1 牡荆子显微鉴定 非腺毛长约400 μm ,由多细胞构成,梯纹导管,直径约为100 μm ,可见径约20 μm 的具缘种皮细胞,中果皮细胞团清晰可见,石细胞多呈椭圆形、三角形、椭圆形,石细胞横径为50 μm ,纵径为70~80 μm ,纵横径比为1.5:1,石细胞壁厚10 μm (图1)。

2.3.2 黄荆子显微鉴定 非腺毛约长400 μm ,梯纹导管直径约为100 μm ,中果皮细胞,具缘种皮细胞,石细胞多为楔形,横径约为30 μm ,纵径为100~120 μm ,纵横径比为3:1~4:1,壁厚为15~20 μm (图2)。



1-非腺毛 2-导管 3-中果皮 4-具缘种皮细胞 5-石细胞
6-胚乳细胞,图2同
1-non-glandular hairs 2-catheter 3-mesocarp 4-marginal cell
5-stone cell 6-endosperm cell, same as Fig. 2

图1 牡荆子粉末显微图($\times 200$)

Fig. 1 Micrograph of power of *V. negundo* var. *cannabifolia* fruits ($\times 200$)

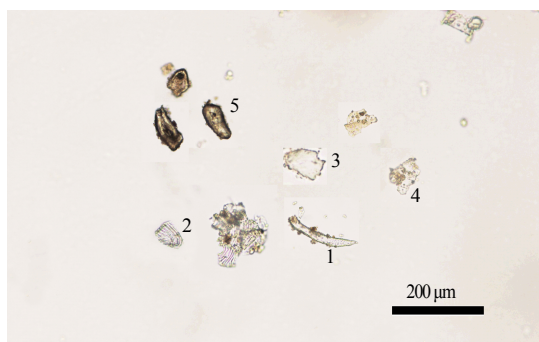


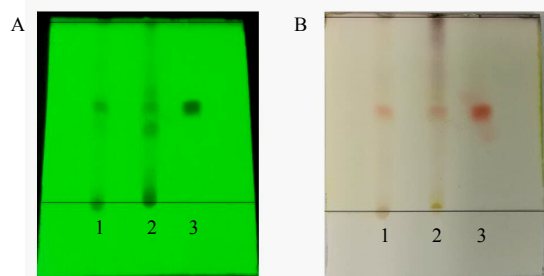
图2 黄荆子粉末显微图($\times 200$)

Fig. 2 Micrograph of power of *V. negundo* fruits ($\times 200$)

2.4 薄层鉴别

2.4.1 对照品溶液的制备 精密称取黄荆子素5 mg,溶于5 mL二氯甲烷中,制成含1 mg/mL黄荆子素的对照品溶液。

2.4.2 供试品溶液的制备 取黄荆子、牡荆子粉末各4 g,80%甲醇100 mL,超声提取1 h,浓缩后,残渣用10 mL溶解。分别精密吸取3 μL 供试品溶液和1 μL 对照品溶液,点于同一薄层板上,用氯仿-甲醇(10:1)为展开剂展开,取出,晾干,置于紫外灯254 nm下检视或用10% H_2SO_4 香兰素自然光显色。结果表明,以黄荆子素为对照品溶液,黄荆子药材中与对照品在相同位置所显示的斑点较为清晰,提示黄荆子中黄荆子素量丰度高于牡荆子(图3)。



1-黄荆子供试品 2-牡荆子供试品 3-黄荆子素

1-*V. negundo* fruits 2-*V. negundo* var. *cannabifolia* fruits 3-vitexdoin

图3 样品在254 nm (A) 和自然光 (B) 下薄层色谱图
Fig. 3 TLC identification of *V. negundo* fruits and *V. negundo* var. *cannabifolia* fruits under 254 nm light (A) and natural light (B)

2.5 HPLC 测定

2.5.1 色谱条件 Eclipse XDB- C_{18} 柱(150 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm);以0.1%甲酸溶液-乙腈为流动相,梯度洗脱:0~18 min,14.4%乙腈;18~30 min,14.4%~17.0%乙腈;30~45 min,17.0%乙腈;45~75 min,17.0%~43.0%乙腈;体积流量为1.0 mL/min;检测波长为254 nm;柱温25 $^{\circ}\text{C}$;进样量5 μL 。

2.5.2 对照品溶液制备 精密称取黄荆子素对照品适量,用甲醇溶解,摇匀,定容至10 mL量瓶中,得到质量浓度为338.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的对照品溶液。

2.5.3 供试品溶液制备 分别取黄荆子和牡荆子粉末(过2号筛)3 g,精密称定,加入10倍量70%乙醇,称定质量,于75 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中加热回流1 h,放冷,用70%乙醇补足减失质量,摇匀、滤过,续滤液定容至50 mL量瓶中,摇匀、滤过,取续滤液作为供试品溶液。

2.5.4 线性关系考察 将对照品溶液稀释,0.45

μm 微孔滤膜滤过, 按“2.5.1”项下条件, 以对照品的质量浓度为横坐标(X), 峰面积为纵坐标(Y)进行线性回归, 得回归方程为 $Y=13.38X+26.87$, $r=0.999$ ($n=5$)。结果表明黄荆子素在 $21.13\sim 338.00\ \mu\text{g/mL}$ 峰面积线性关系良好。

2.5.5 精密度试验 精密吸取黄荆子素对照品溶液 $5\ \mu\text{L}$, 连续进样6次, 测得黄荆子素质量分数的RSD为0.55%, 结果表明仪器具有良好的精密度。

2.5.6 稳定性试验 精密吸取黄荆子和牡荆子供试品溶液 $5\ \mu\text{L}$, 分别于放置0、2、4、8、12、16、24 h后进样, 测得黄荆子素质量分数的RSD分别为0.79%、0.92%, 结果表明供试品溶液在24 h内稳定。

2.5.7 重复性试验 取黄荆子和牡荆子样品, 按“2.5.3”项下方法分别制备6份供试品溶液, 测其中黄荆子素质量分数的RSD分别为0.96%、1.35%, 表明本方法具有良好的重复性。

2.5.8 加样回收率试验 精密称取已测定黄荆子素量的黄荆子 ($1.552\ \text{mg/g}$) 和牡荆子 ($0.993\ \text{mg/g}$) 6份, 每份 $1.00\ \text{g}$, 精密加入黄荆子素对照品适量, 按“2.5.3”项下方法制备供试品溶液, 测定并计算加样回收率, 结果黄荆子和牡荆子样品中的黄荆子素回收率分别为 $(96.72\pm 1.65)\%$ 、 $(96.68\pm 1.49)\%$, RSD分别为1.03%、1.38%。

2.5.9 黄荆子素的测定 取“2.5.3”项下供试品溶液, 按“2.5.1”项下条件测定黄荆子和牡荆子中黄荆子素的峰面积, 结果见图4。根据回归方程计算质量分数, 结果表明, 黄荆子中所含的黄荆子素质量分数为 $1.552\ \text{mg/g}$ ($n=3$), 牡荆子中所含的黄荆子素质量分数为 $0.993\ \text{mg/g}$ ($n=3$)。

3 讨论

牡荆与黄荆来源于同属植物, 且为黄荆的1个变种, 两者在形态上没有太大的区别, 部分地区使用中经常不加以区分。植物基原鉴别中, 两者主要区别在于叶片锯齿的有无, 黄荆多为全缘, 而牡荆叶片多具有浅裂锯齿, 但两者常常存在过渡型, 很难准确区分。牡荆子和黄荆子在性状上也极为相似, 有必要借助其他鉴定方法对两者进行鉴别。牡荆子和黄荆子粉末中组织结构大体一致, 导管都为梯纹导管, 非腺毛、具缘种皮、中果皮细胞、外果皮细胞基本相同。牡荆子和黄荆子石细胞区别大, 具体体现在: 牡荆石细胞多为卵圆形或椭圆形, 次生壁薄, 胞腔呈椭圆形且大; 黄荆石细胞多为披针形或楔形, 次生壁较厚, 胞腔狭长。牡荆和黄荆果实的

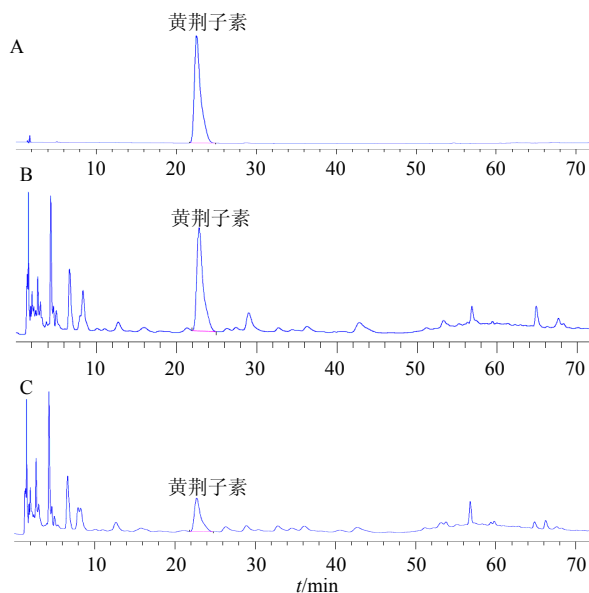


图4 对照品 (A)、黄荆子 (B)、牡荆子 (C) 供试品溶液高效液相色谱图

Fig. 4 HPLC identification of reference substance (A), *V. negundo* fruits (B) and *V. negundo* var. *cannabifolia* fruits (C)

粉末显微特征提示, 可以借助石细胞的形状和胞腔进行区别, 因此石细胞显微特征或可作为鉴别牡荆子和黄荆子的有效依据。牡荆和黄荆果实的薄层鉴别表明, 以黄荆子素为对照品, 黄荆子药材中与对照品在相同位置所显示的斑点较为清晰, 提示黄荆子中黄荆子素的量丰度高于牡荆子。HPLC测定结果表明, 黄荆子中所含的黄荆子素量确实高于牡荆子, 与薄层鉴别结果一致。本实验与之前本课题组采用HPLC对4种牡荆属植物果实中黄荆子素测定的结果也相一致^[3], 但其量存在一定差异, 可能是不同产地、不同季节采收样品所致。黄荆子素为苯代萜型木脂素类化合物^[2], 该类成分是黄荆子发挥抗炎^[4]、镇痛^[5]、抗肿瘤^[6]以及抗氧化^[7-8]等药理作用的主要活性物质基础。因此, 通过研究发现, 黄荆子素可作为黄荆子药材质量控制的指标性成分。

牡荆子和黄荆子在原植物形态、性状上都存在着较高的相似度, 因此民间多把黄荆子和牡荆子混用, 但两者是否应该合并使用, 尚缺乏系统的药理学研究证据。本实验通过原植物鉴别、性状鉴别、显微鉴别、薄层鉴别、HPLC测定5种方法对牡荆和黄荆果实进行生药学比较研究, 发现药材粉末的显微鉴别中石细胞特征、薄层鉴别中黄荆子素的色谱特征、液相鉴别中黄荆子素的图谱特征等可为两

者的有效鉴别提供实验依据,也为其他牡荆属药用植物的鉴别提供一定参考。

参考文献

- [1] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1997.
- [2] Zheng C J, Huang B K, Han T, *et al.* Nitric oxide scavenging lignans from *Vitex negundo* seeds [J]. *J Nat Prod*, 2009, 72, 1627-1630.
- [3] 舒志恒, 李华强, 李 清, 等. 用 HPLC 法测定 4 种牡荆属植物中黄荆子素的含量 [J]. *药学服务与研究*, 2015, 15(4): 277-280.
- [4] Chawla A S, Sharma A K, Handa S S. A lignan from *Vitex negundo* seeds [J]. *Phytochemistry*, 1992, 31(12): 4378-4379.
- [5] Zheng C J, Tang W Z, Huang B K, *et al.* Bioactivity-guided fractionation for analgesic properties and constituents of *Vitex negundo* L. seeds [J]. *Phytomedicine*, 2009, 16: 560-567.
- [6] Zhou Y J, Liu Y E, Cao J G, *et al.* Vitexins, nature-derived lignan compounds, induce apoptosis and suppress tumor growth [J]. *Clin Cancer Res*, 2009, 15(16): 5161-5169.
- [7] 郑公铭, 罗宗铭, 陈达美. 黄荆籽抗氧化成分研究 [J]. *广东工业大学学报*, 1999, 16(2): 41-46.
- [8] Ono M, Nishida Y, Masuoka C, *et al.* Lignan derivatives and a norditerpene from the seeds of *Vitex negundo* [J]. *J Nat Prod*, 2004, 67(12): 2073-2075.