

林下仿生态种植金线莲的质量标准研究

沈廷明¹, 黄春情¹, 刘知远², 黄慧梅², 吴军军¹

1. 福建省宁德市中医院, 福建 宁德 352100

2. 福建省宁德市食品药品检验检测中心, 福建 宁德 352100

摘要: 目的 对林下仿生态种植金线莲的质量标准进行研究。方法 建立林下仿生态种植金线莲的性状、显微特征、薄层鉴别及含量测定方法, 并按《中国药典》2015 年版有关规定对水分、灰分和酸不溶性灰分等项目进行了测定。结果 林下仿生态种植金线莲在性状、显微特征和薄层色谱方面均具有专属性特征, 经测定 5 个基地的金线莲水分平均为 8.69%, 总灰分平均为 11.93%, 酸不溶性成分平均为 3.27%; 含量测定结果槲皮素平均质量分数为 0.021 0%, 异鼠李素平均质量分数为 0.024 7%, 山柰素平均质量分数为 0.027 3%。结论 上述方法简便、专属性好, 重现性好, 可为林下仿生态种植金线莲质量标准的制定提供依据。

关键词: 林下仿生态种植; 金线莲; 薄层色谱; 质量标准; 槲皮素; 异槲皮素; 山柰素

中图分类号: R282.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)02-0450-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.02.028

Study on quality standard of imitation ecological planting *Anoectochilus roxburghii* under forest covering

SHEN Ting-ming¹, HUANG Chun-qing¹, LIU Zhi-yuan², HUANG Hui-mei², WU Jun-jun¹

1. Fujian Province Ningde Hospital of Traditional Chinese Medicine, Ningde 352100, China

2. Fujian Province Ningde Institute for Food and Drug Control, Ningde 352100, China

Abstract: **Objective** To study the quality standard of the imitation ecological planting *Anoectochilus roxburghii* under forest covering. **Methods** The identification of medicinal properties, microscopic characteristics, thin-layer chromatography (TLC) and content determination of *A. roxburghii* cultivated under forest were carried out in this study, and the moisture content, ash and acid-insoluble ash were determined according to Chinese Pharmacopoeia of 2015 edition. **Results** *A. roxburghii* cultivated under forest exhibits specific properties in characteristics, microscopic features and TLC results. The average moisture content of *A. roxburghii* cultivated under forest from five planting bases was 8.69%, the average ash was 11.93%, and the average acid-insoluble ash was 3.27%. Content determination results of the average quality score of quercetin, isorhamnetin and kaempferide were at 0.021 0%, 0.024 7%, and 0.027 3%, respectively. **Conclusion** The above method is simple, specific and reproducible, which will provide the basis for the quality standard of the imitation ecological planting *A. roxburghii* under forest covering.

Key words: imitation ecological planting under forest covering; *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl.; thin-layer chromatography; quality standard; quercetin; isorhamnetin; kaempferide

金线莲为兰科植物花叶开唇兰 *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl. 的新鲜或干燥全草^[1], 别名金线兰、金丝草、金不换, 具有较高的药用价值和经济价值。金线莲在民间有“药王”“金草”的美誉, 味甘、微苦, 性平, 能清热凉血、祛风利湿、强心利尿、固肾、平肝, 主治咯血、支气管炎、肾炎、膀胱炎、肺炎、糖尿病、小儿急惊风、百日咳、毒蛇咬伤等症^[2]。金线莲主要分布于福建、广东、广西、浙江、江西、海南、云南、四川、贵州以及西

藏南部等省。目前金线莲产业发展迅速, 市场需求量大, 价格昂贵, 伪品、混淆品较多, 因此, 制定金线莲的质量标准刻不容缓。近年来, 有关金线莲的研究多集中在药材鉴定、化学成分、药理作用等方面, 对金线莲的水分、总灰分、酸不溶性成分等研究少之又少, 因此本实验将从林下仿生态种植金线莲的原植物形态及药材性状、显微鉴别、薄层鉴别、水分、总灰分、酸不溶性成分及含量测定等方面进行较为全面及系统地研究, 为林下仿生态种植

收稿日期: 2017-08-03

作者简介: 沈廷明 (1975—), 男, 福建宁德人, 副主任中药师, 主要从事医院药学研究。Tel: 15160187288 E-mail: yjk2827300@163.com

金线莲质量标准的建立提供参考。

1 仪器、材料和试剂

1.1 仪器

CX23 型光学显微镜 (奥林巴斯公司); FY135 型中药粉碎机 (天津市泰斯特仪器有限公司); DK-90-IIA 型电热恒温水浴锅 (天津市泰斯特仪器有限公司); DHG-9031 电热恒温干燥箱 (上海精宏实验设备有限公司); SXZ-2.5-10 箱式电阻炉 (上海锦屏仪器仪表有限公司); LC-2010AHT 高效液相色谱仪 (日本岛津公司); 美国 Lanbo-Kromasil-C-18 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); KQ5200DB 型数控超声波清洗器 (江苏昆山市超声仪器有限公司); SIMS50000 超纯净水器 (美国 MILLIPORE 公司); BP211D 电子分析天平 (北京赛多利斯仪器有限公司, 十万分之一); BS224S 电子分析天平 (北京赛多利斯仪器有限公司, 万分之一)。

1.2 材料和试剂

林下仿生态种植金线莲 (收集自福建闽东地区林下仿生态金线莲种植基地, 具体信息见表 1, 作供试品用); 金线莲生药饮片 (批号 15111801, 购自福建回春中药饮片有限公司; 目前该品种药典未收载, 故中国食品药品检定研究院没有对照药材, 本实验采用经过专家鉴定的样品作为药材对照); 以上品种经宁德市食品药品检验检测中心刘知远主任中药师鉴定为兰科植物花叶开唇兰属金线莲 *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl.; 对照品槲皮素 (批号 100081-200406)、异鼠李素 (批号 110860-200205)、山柰素 (批号 0861-200002) 购于中国食品药品检定研究院, 质量分数均大于 98%; 甲醇为色谱纯 (美国迪马公司), 无水乙醇、三氯甲烷、水合氯醛、盐酸、磷酸等其他试剂均为分析纯; 水为超纯水。

2 方法

2.1 林下仿生态种植金线莲的原植物及性状鉴定

取林下仿生态种植金线莲全草, 对其根、茎与叶的大小、形状、色泽、质地及表面特征等性状进

行描述, 并用数码相机拍摄记录。

2.2 显微鉴别

2.2.1 叶的横切面鉴别 取鲜林下仿生态种植金线莲叶, 切割成 2~3 cm 的小段, 用左手食指指尖压住叶片一端, 右手捏紧并排的 2 个刀片, 从另一端沿主叶脉垂直方向多次切割叶片, 每切 1 次刀片沾水 1 次, 将切下的叶片薄片放入盛有清水的培养皿中, 用镊子从水中选取最薄的叶片切片, 放在洁净的载玻片上, 制成临时切片, 并应用自带摄像功能的光学显微镜拍摄显微图像, 同步存入计算机中。

2.2.2 叶的表皮鉴别 取林下仿生态种植金线莲叶片 1 小片, 左手挟持叶片, 右手持镊子, 用尖部在叶片适当部位插入, 撕取表皮 1 小块, 浸入盛水的培养皿中。左手持洁净载玻片, 将载玻片 1 端斜向浸入水中, 靠近撕下的叶表皮, 右手持解剖针, 将叶表皮移至载玻片上, 擦尽载玻片两面的水渍, 加装置液 1 滴, 加盖玻片, 并应用自带摄像功能的光学显微镜拍摄显微图像, 同步存入计算机中。

2.2.3 粉末显微特征鉴别 取林下仿生态种植金线莲干品粉碎并过 60 目筛, 取粉末少许, 置载片中央, 加水合氯醛液 1 滴, 用解剖针拨匀并使其浸润粉末, 置酒精灯上加热, 沸即离火, 再加水合氯醛液 1 滴, 用解剖针拨匀, 再加热, 如此反复 3 次。离火, 加稀甘油 2 滴, 拌匀, 盖片, 并应用自带摄像功能的光学显微镜拍摄显微图像, 同步存入计算机中。

2.3 薄层色谱鉴别

2.3.1 供试品溶液的制备 取林下仿生态种植金线莲, 干燥, 粉碎, 过 60 目筛, 取 2 g, 加三氯甲烷 50 mL, 水浴回流 2 h, 冷却, 滤过, 弃去三氯甲烷液, 残渣挥干溶剂, 加甲醇 40 mL, 水浴回流 2 h, 放冷, 滤过, 滤液蒸干, 加甲醇 2 mL 溶解, 作为供试品溶液。

2.3.2 药材对照溶液的制备 取金线莲生药饮片, 干燥, 粉碎, 过 60 目筛, 取 2 g, 同“2.3.1”项下方法制成对照药材溶液。

2.3.3 对照品溶液的制备^[3] 另取槲皮素对照品、异鼠李素对照品, 分别加甲醇溶解成含 1 mg/mL 槲皮素、异鼠李素的对照品溶液。

2.3.4 薄层条件 吸取上述 4 种溶液各 10 μL, 点于同一硅胶 G 薄层板上, 以三氯甲烷-甲醇-醋酸 (85:13:2) 为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 喷以 2% 的 3,5-二硝基苯甲酸乙醇溶液, 再喷以氢氧化钾乙醇溶液 (1 mol/L), 日光下检视。

表 1 样品信息

Table 1 Samples of information

编号	产地
JXL-1	宁德福安
JXL-2	宁德周宁
JXL-3	宁德屏南
JXL-4	宁德寿宁
JXL-5	宁德柘荣

2.4 水分测定

根据《中国药典》2015 版四部通则 0832 水分测定法第二法^[4]，烘干法测定：取供试品 2 g，平铺于干燥至恒定质量的扁形称量瓶中，厚度不超过 5 mm，疏松供试品不超过 10 mm，精密称定，打开瓶盖，在 100~105 °C 干燥 5 h，将瓶盖盖好，移至干燥器中，冷却 30 min，精密称定，再在上述温度下干燥 1 h，冷却，称定质量，至连续 2 次称质量的差异不超过 5 mg 为止。根据减失的质量，计算供试品中含水量。

2.5 总灰分测定

根据《中国药典》2015 版四部通则 2302 灰分测定法项下总灰分测定法测定^[4]：供试品粉碎过二号筛，混合均匀后，取供试品 3 g，置炽灼至恒定质量的坩埚中，称定质量（准确至 0.01 g），缓缓炽热，注意避免燃烧，至完全炭化时，逐渐升高温度至 500~600 °C，使完全灰化并至恒定质量。根据残渣质量，计算供试品中总灰分的含量。

2.6 酸不溶性灰分测定

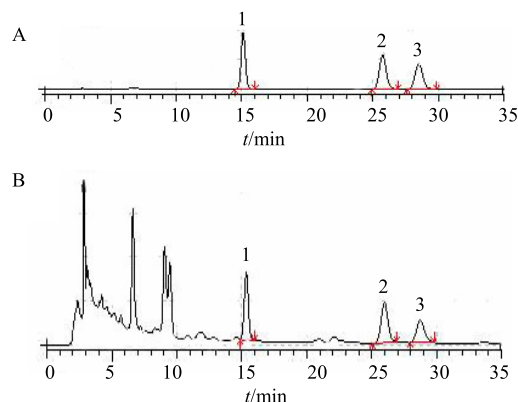
根据《中国药典》2015 版四部通则 2302 灰分测定法项下酸不溶性灰分测定法测定^[4]：将前一步得到的总灰分，在坩埚中小心加入稀盐酸约 10 mL，用表面皿覆盖坩埚，置水浴上加热 10 min，表面皿用热水 5 mL 冲洗，洗液并入坩埚中，用无灰滤纸滤过，坩埚内的残渣用水洗于滤纸上，并洗涤至洗液不显氯化物反应为止。滤渣连同滤纸移至同一坩埚中。根据残渣质量，计算供试品中酸不溶性灰分的含量。

2.7 槲皮素、山柰素、异鼠李素的含量测定^[3]

2.7.1 色谱条件 色谱柱为 Lanbo-Kromasil-C₁₈ (250 mm×406 mm, 5 μm)；流动相为甲醇-0.2% 磷酸溶液 (50:50)；体积流量为 1 mL/min；检测波长为 360 nm；进样量 10 μL；柱温为 30 °C。理论板数按槲皮素峰计算应不低于 5 000。色谱图见图 1。

2.7.2 对照品溶液的制备 精密称取槲皮素、山柰素、异鼠李素对照品各适量，置 50 mL 量瓶中，加甲醇溶解并稀释至刻度，溶解摇匀；精密吸取 1 mL，置 50 mL 量瓶，加甲醇至刻度，摇匀，制成含槲皮素 5.52 μg/mL，山柰素 5.68 μg/mL，异鼠李素 5.20 μg/mL 的溶液，过 0.45 μm 的微孔滤膜，即得。

2.7.3 供试品溶液的制备 取供试品粉碎，过 3 号筛备用。精密称取 0.5 g，精密加入甲醇-盐酸 (10:



1-槲皮素 2-山柰素 3-异鼠李素
1-quercetin 2-kaempferide 3-isorhamnetin

图 1 对照品 (A) 和样品 (B) 色谱图

Fig. 1 HPLC of reference substance (A) and samples (B)

1) 混合溶液 25 mL，称定质量，静置 30 min。置 60 °C 水浴中超声 (200 W, 40 kHz) 1 h，放置至室温，补足损失的质量，滤纸滤过，再过 0.45 μm 的微孔滤膜，即得。

3 结果与分析

3.1 林下仿生态种植金线莲的原植物及性状鉴定

3.1.1 原植物形态 草本，高 10~18 cm，茎基部匍匐，淡褐色，稍肉质，被柔毛。下部基生 2~4 片叶。叶互生，宽卵形，长 1.5~3.5 cm，宽 1~3 cm，顶端急尖，基部近截形或圆形，叶上面为暗的天鹅绒绿色而具金黄色的网状细脉，下面淡紫红色；叶柄长 9~10 mm，基部为阔而短的鞘。总状花序具 2~6 朵疏散的花；花苞片淡红色，卵状披针形，长 6~9 mm，萼片淡红色，被短柔毛，中萼片卵形，舟状，顶端钝，侧萼片近长圆形，稍偏斜，较长而稍狭；花瓣白色，近镰刀形，与中萼片靠合而兜状；唇瓣 2 裂，裂片舌状条形，长约 6 mm，宽约 1.5 mm，中部收狭而颈，颈长约 6 mm，2 侧各具 5~6 条长 4~6 mm 的流苏；距圆锥状，指向唇瓣。花期 10~11 月^[5]。见图 2。

3.1.2 药材性状 本品干燥全草常缠结成团，深褐色。展开后完整的植株 4~24 cm，茎细，约 0.5~1 mm，具纵皱纹，断面棕褐色，叶互生，呈卵形，长 2~5 cm，宽 1~3 cm，先端急尖，叶脉为橙红色，叶柄短，基部鞘状，气微香，味淡微甘^[6]。药材性状图见图 2。

3.2 显微鉴别

3.2.1 叶的横切片鉴别 上表面细胞平周壁呈乳状突

起, 叶肉组织有的分化^[7], 由平滑质层所覆盖, 表皮细胞为三角状椭圆形或椭圆形。栅栏组织不典型, 维管束外韧型。薄壁细胞含草酸钙针晶束, 见图 3。

3.2.2 叶表皮 上表皮细胞为类方形或类圆形。下表皮细胞多为类方形, 气孔不定式, 位于下表皮, 上表面则无。见图 4。

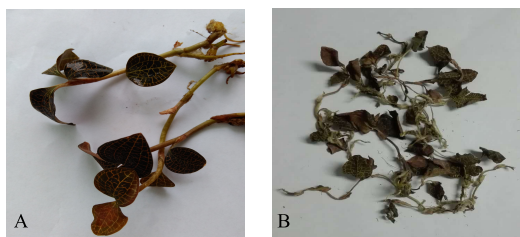
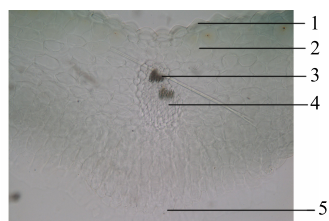


图 2 原植物 (A) 和药材 (B) 性状

Fig. 2 Properties of original plants (A) and medicinal materials (B)



1-上表皮 2-栅栏组织 3-木质部 4-韧皮部 5-下表皮
1-upper epidermis 2-barrier tissues 3-xylem 4-phloem 5-lower epidermis

图 3 叶横切片

Fig. 3 Tissue structures of leaf transverse section

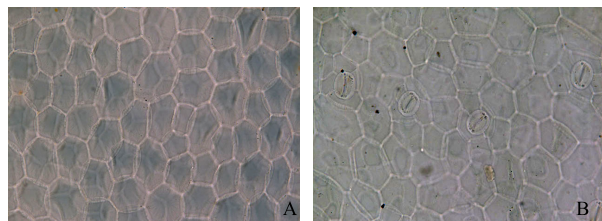
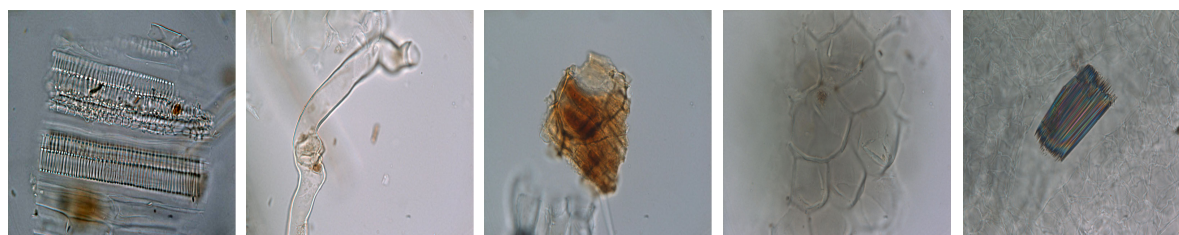


图 4 叶上 (A) 和叶下 (B) 表皮

Fig. 4 Upper (A) and lower (B) epidermis



1-导管 2-非腺毛 3-黄棕色内含物 4-叶上表皮细胞 5-针晶束
1-vessel 2-nonglandular hair 3-yellow brown inclusions 4-upper epidermis 5-acicular crystal

图 5 全草粉末显微特征

Fig. 5 Microscopic characteristics of the plant powders

3.2.3 粉末鉴别 粉末棕绿色。非腺毛为单细胞, 壁薄, 多破碎, 有的扭曲呈螺旋状, 有的平直; 草酸钙针晶束众多, 散在, 长 40~120 μm , 导管螺旋状, 叶上表皮碎片, 细胞呈方形或类圆形, 形成乳状凸起, 含黄棕色内含物。见图 5。

3.3 薄层色谱鉴别

林下仿生态种植金线莲供试液色谱中, 在与金线莲对照饮片色谱在相应的位置上显相同颜色的斑点, 重现性好。与槲皮素、异鼠李素对照品在相应的位置上, 显相同的黄色斑点。其中, 林下仿生态种植金线莲色谱与金线莲对照饮片色谱在相应的位置上均显紫红色特征斑点。见图 6。

3.4 水分、灰分、酸不溶性灰分测定

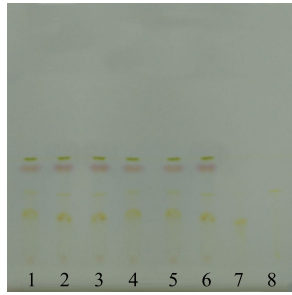
经测定, 林下仿生态种植金线莲水分含量最高的为屏南的 9.63%, 最低为寿宁的 7.63%, 平均为 8.69%, 总灰分最高的为寿宁的 13.26%, 最低为福安的 10.63%, 平均为 11.93%, 酸不溶性灰分最高的为柘荣的 3.68%, 最低的为寿宁的 2.68%, 平均为 3.27%。具体测定结果见表 2。

3.5 槲皮素、山柰素、异鼠李素的测定

取不同产地的样品照“2.7.3”项下方法制备供试液, 进样 10 μL , 分别测定峰面积, 计算槲皮素、山柰素、异鼠李素量, 结果见表 3。

4 讨论

综合林下仿生态种植金线莲在原植物形态、药材性状和显微特征方面的实验结果, 表明林下仿生态种植金线莲在该方面具有专属性特征。在原植物形态上, “叶上面为暗的天鹅绒绿色而具金黄色的网状细脉, 下面淡紫红色”为林下仿生态种植金线莲的专属性特征。在药材性状上, “叶脉为橙红色”为林下仿生态种植金线莲的专属性特征。在显微特征上, 林下仿生态种植金线莲叶横切面具有“上表面细胞平周壁



1-JXL-1 2-JXL-2 3-JXL-3 4-JXL-4 5-JXL-5 6-对照药材
7-槲皮素 8-异鼠李素
1-JXL-1 2-JXL-2 3-JXL-3 4-JXL-4 5-JXL-5 6-contrast
medicinal materials 7-quercetin 8-isorhamnetin reference substance

图 6 薄层色谱图

Fig. 6 TLC results

表 2 水分、总灰分、酸不溶性灰分测定结果 ($n=3$)

Table 2 Determination results of moisture content, total ash, and acid-insoluble ash ($n=3$)

样品	水分/%	总灰分/%	酸不溶性灰分/%
JXL-1	8.68	10.63	3.65
JXL-2	9.28	11.82	2.88
JXL-3	9.63	10.96	3.46
JXL-4	7.63	13.26	2.68
JXL-5	8.22	12.96	3.68

表 3 槲皮素、山柰素、异鼠李素测定结果 ($n=6$)

Table 3 Determination results of quercetin, kaempferide, and isorhamnetin ($n=6$)

样品	槲皮素/%	山柰素/%	异鼠李素/%
JXL-1	0.021 7	0.018 9	0.027 5
JXL-2	0.026 4	0.032 6	0.034 3
JXL-3	0.023 5	0.033 9	0.016 3
JXL-4	0.015 4	0.026 8	0.019 9
JXL-5	0.018 2	0.024 1	0.025 3

呈乳状状突起”和“气孔不定式，位于下表皮，上表面则无”的专属性特征；林下仿生态种植金线莲粉末具有“非腺毛为单细胞，有的扭曲呈螺旋状”和“叶上表皮碎片，细胞呈方形或类圆形，形成乳状凸起，含黄棕色内含物”等专属性特征。

在薄层色谱鉴别方面，林下仿生态种植金线莲及金线莲对照饮片供试品色谱能与槲皮素、异

鼠李素在相应的位置上显相同的黄色斑点，且林下仿生态种植金线莲供试液及金线莲对照液，均能在相应位置上显相同的紫红色特征斑点，可以作为林下仿生态种植金线莲薄层色谱检查的专属性特征斑点。

水分、总灰分、酸不溶性灰分这 3 项含量的高低直接影响到林下仿生态种植金线莲的质量。水分高则容易霉变；总灰分及酸不溶性灰分高则说明金线莲含有的矿物质或杂质高，这将直接影响林下仿生态种植金线莲的临床疗效，根据表 2 并结合《中国药典》2015 年版对药材水分的规定，建议将林下仿生态种植金线莲药材的水分拟定不得超过 10%，总灰分不得超过 14%，酸不溶性灰分不得超过 4%。

金线莲主要含有黄酮类、生物碱类、糖类、甾体类、和氨基酸类等成分，黄酮类是重要的有效成分之一，具有扩张冠状动脉、增加脑血流量、改善脑营养、抗菌、抗氧化、抗肿瘤、抗病毒等作用。经测定，5 个不同产地林下仿生态种植金线莲中槲皮素平均质量分数为 0.021 0%，异鼠李素平均质量分数为 0.024 7%，山柰素平均质量分数为 0.027 3%，由此可见，槲皮素、异鼠李素、山柰素 3 种成分在林下仿生态种植金线莲中的含量较高，可作为林下仿生态种植金线莲质量控制中的指标，同时，本实验建立了多种成分同时测定的科学方法，可为林下仿生态种植金线莲的质量标准建立提供参考。

参考文献

- [1] 黄有霖. 福建省中药材标准 [M]. 福州: 海风出版社, 2006.
- [2] 全国中草药汇编编写组. 全国中草药汇编 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1996.
- [3] 刘知远, 沈廷明, 吴仲玉. RP-HPLC 法同时测定福建产金线莲中槲皮素、山柰素、异鼠李素的量 [J]. 中草药, 2015, 46(3): 432-434.
- [4] 中国药典 [S]. 四部. 2015.
- [5] 吴长宝, 李丽卿. 金线莲的生药鉴定 [J]. 海峡药学, 1994(2): 8-9.
- [6] 林平, 华碧春, 黄智峰. 金线莲的质量标准探讨 [J]. 福建中医药大学学报, 2012, 10(5): 40-41.
- [7] 易骏, 吴建国, 张秀才, 等. 不同植物基原金线莲生药鉴别 [J]. 中草药, 2015, 46(23): 3570-3576.