

## 方药纵横

药用地衣金刷把的质量标准研究<sup>\*</sup>尚姣 赵洁 王启林 勾怡娜 王慧 房敏峰<sup>\*\*</sup>

(西部资源生物与现代生物技术教育部重点实验室,西北大学生命科学学院,陕西 西安 710069)

**摘要:** **目的** 从形态结构及有效成分定性定量等方面对金刷把进行系统研究。 **方法** 通过观察和切片获得金刷把形态结构特征;以松萝酸为对照,分别用薄层色谱法和高效液相色谱法对样品中的松萝酸进行定性定量;采用硫酸-苯酚法测定总多糖和水溶性多糖含量。 **结果** 金刷把枝状体呈灌丛状,其结构为藻层分散于髓层,中央为菌丝纵向排列形成的致密中轴;6批样品总多糖平均含量为 26.94%,水溶性多糖平均含量为 12.51%,松萝酸平均含量为 0.47%。 **结论** 研究建立的分析方法可用于金刷把药材的质量控制和评价,为规范草药市场和制定陕西地方药材标准提供参考。

**关键词:** 金刷把;松萝酸;多糖

中图分类号: R286.0 文献标识码: A 文章编号: 1002-168X(2014)04-0092-05

## Studies on quality control of *Lethariella cladonioides* (Nyl.) Krog in medicine lichens

Shang Jiao Zhao Jie Wang Qilin Gou Yina Wang Hui Fang Minfeng

(Key Laboratory of Resource Biology and Biotechnology in Western China, Ministry of Education,  
The College of Life Sciences, Northwest University, Xi'an Shaanxi, 710069)

**Abstract:** **Objective** To research *Lethariella cladonioides* (Nyl.) Krog Systematically based on resource, morphological characteristics and contents of active ingredients. **Methods** Acquiring the resource distribution and morphological characteristics of *Lethariella cladonioides* (Nyl.) Krog by investigation, identification and paraffin section. Usnic acid was the standard matter to establish TLC identification method and be used to establish HPLC method. The colorimetric method of phenol and sulfuric acid was used to determine the content of polysaccharides. Glucose was the standard matter to determine the content of usnic acid and polysaccharides of 6 batches of *Lethariella cladonioides* (Nyl.) Krog. **Results** *Lethariella cladonioides* (Nyl.) Krog was born to the conifers dead branches on Taibai mountain at an altitude of about 3000m, branch shape body like thickets shape, the algae layer dispersed pulp layer, the density of the central axis in the centre formatted by hyphae arrange for longitudinal. 6 batches samples for the average total polysaccharide 26.94%, water-soluble polysaccharide contents, the average level 12.51%, the average level of usnic acid 0.47%. **Conclusion** The method used quality control and evaluation of *Lethariella cladonioides* (Nyl.) Krog, and to provide reference for herbal medicine market and made local medicine standard of Shaanxi.

**Keywords:** *Lethariella cladonioides* (Nyl.) Krog; Usnic acid; Polysaccharides

<sup>\*</sup> 基金项目: 国家自然科学基金项目(J1210063); 中医药公共卫生专项[2011]76号; 中医药行业科研专项(201207002); 陕西省食品药品监督管理局药材标准起草项目(2009-11)

<sup>\*\*</sup> 通讯作者: 房敏峰, 教授, 从事中药资源与炮制研究, E-mail: fff885@126.com

金刷把为松萝科植物金丝刷 *Lethariella claudonioides* (Nyl.) Krog. 的干燥枝状体<sup>[1]</sup>。性平、味苦,具有镇静、消炎、止痛等功效,主治精神分裂、癫痫、神经衰弱、头晕目眩、跌打损伤等症。陕西民间习用于治疗癫痫、精神分裂等<sup>[2]</sup>。为“太白七药”之一。本品含有松萝酸和多糖等成分<sup>[3,4]</sup>,其中松萝酸具有广谱抗菌作用,还具有明显的抗癌、抗滴虫、抗原虫、抗病毒和解痉等活性<sup>[5-7]</sup>。因此,本文在资源调查和形态结构观察的基础上,对药用地衣金刷把进行了多糖和松萝酸定性定量研究,为制定陕西省中药材标准提供依据。

## 1 仪器与试剂

**1.1 仪器** 日本岛津 LC-10AT vp 高效液相色谱仪,SPD-10A vp 紫外检测器,SHIMADZU CBM-102 色谱工作站;U-3310 紫外-可见分光光度计;Leica-RM2135 型切片机;Leica-DMLB 显微镜;FA2004 万分之一电子天平;KQ-300DE 超声波清洗机(300W 40KHZ 昆山市超声仪器有限公司);电子分析天平(FA2004 220V 50HZ 上海良平仪器仪表有限公司)。

**1.2 试剂** 松萝酸对照品(购于成都普思生物科技有限公司,批号:08082901,经面积归一化法,测得含量为 98.64%)。金刷把药材共 6 批,2010 年 7~9 月采自太白山海拔 3100 m~3700 m 的冷杉树干或枯木上,经西北大学生命科学学院王玛丽教授鉴定为松萝科植物金丝刷 *Lethariella claudonioides* (Nyl.) Krog. 的干燥枝状体。乙腈为色谱纯,水为纯化水,氯仿等试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

### 2.1 方法

**2.1.1 形态观察** 观察 6 批样品的形状,大小,表面特征,质地,折断面,颜色,气,味,水试(溶液颜色,吸水率等,漂浮或沉水状态等),火试(烟气,颜色,声音等)等形态特征,结合文献进行描述。

**2.1.2 解剖学方法** 药材用清水浸泡 24 h,将浸泡好的材料切割成 2 cm~3 cm 长段。石蜡切片材料用 FAA 固定,经酒精系列脱水、透蜡、包埋,横切片厚度均为 7  $\mu\text{m}$ ,番红—固绿染色,中性树胶封片,Leica-DMLB 显微镜观察并照相。

**2.1.3 薄层鉴别方法** 取金刷把干燥药材粉末

1 g,加入氯仿 25 mL,水浴回流提取 60 min,取出,放冷,过滤,滤液挥干。残渣用甲醇 1 mL 溶解,为供试品溶液。另取松萝酸对照品适量,加少量氯仿至完全溶解后加甲醇稀释制成 1.5  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  的对照品溶液。吸取以上供试品溶液及对照品溶液各 5  $\mu\text{L}$ ,分别点于同一硅胶 G 薄层板上。以氯仿:苯:甲醇(4:4:1)为展开剂,展开,取出,晾干,在 254 nm 下观察。

**2.1.4 水分和灰分检查** 按照中国药典(2010 年版一部)附录 IXH 第一法和附录 IXK,对金刷把样品的水分、总灰分和酸不溶灰分进行测定。

**2.1.5 多糖含量测定方法** 采用苯酚-硫酸法测定 6 批金刷把样品中总多糖和水溶性多糖含量,样品处理方法参照中华人民共和国国家标准(GB/T15672-2009)“食用菌中总糖含量的测定”及 2010 年中国药典(一部)“灵芝”项下多糖(即水溶性多糖)的含量测定。

**2.1.6 松萝酸含量测定方法**<sup>[8,9]</sup>

**2.1.6.1 对照品溶液的配制** 取松萝酸对照品适量,精密称定,先加少量氯仿使其溶解,再补加甲醇制成每 1 mL 含 50  $\mu\text{g}$  松萝酸的对照品溶液,即得。

**2.1.6.2 供试品溶液的制备** 取药材干燥粉末约 1 g,精密称定,加入氯仿 25 mL,水浴回流提取 60 min,取出,放冷,滤过,挥干滤液。残渣用 1 mL 甲醇溶解,并转移至 10 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,即得。

**2.1.6.3 色谱条件** 色谱柱: Sino Chrom ODS-BP  $\text{C}_{18}$  (150 mm  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ),流动相: 甲醇-0.3% 三乙胺-0.9% 冰醋酸-水(70:30),检测波长: 285 nm。柱温: 25  $^{\circ}\text{C}$ ,流速: 0.8  $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ,进样量: 20  $\mu\text{L}$ 。该条件下松萝酸对照品和样品(批号 4)的液相色谱图。见图 1。

**2.1.6.4 质谱条件** 电喷雾离子源;负离子模式;喷雾电压: 3.5 kV,干燥气流速: 0.8  $\text{mL}/\text{min}$ ,干燥气温度: 350  $^{\circ}\text{C}$ ;雾化气压力: 241.3 kPa;质量扫描: 50~1 000  $\text{a.m.u.}$ ;流动相: 乙腈-水-甲酸-氨水(80:20:0.003:0.001)。此条件下,松萝酸对照品离子图见图 2。

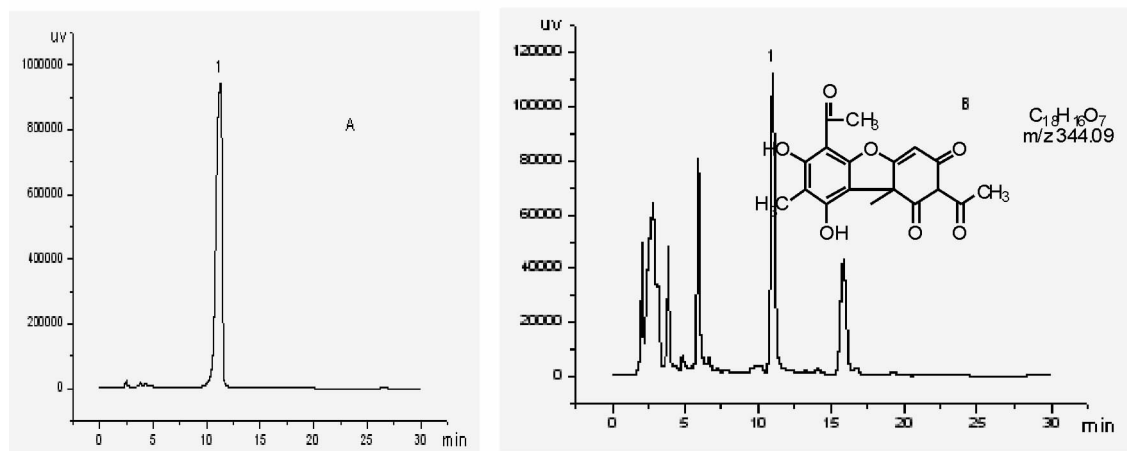


图 1 对照品溶液(A)和金刷把样品(B)的 HPLC 图(1:松萝酸)

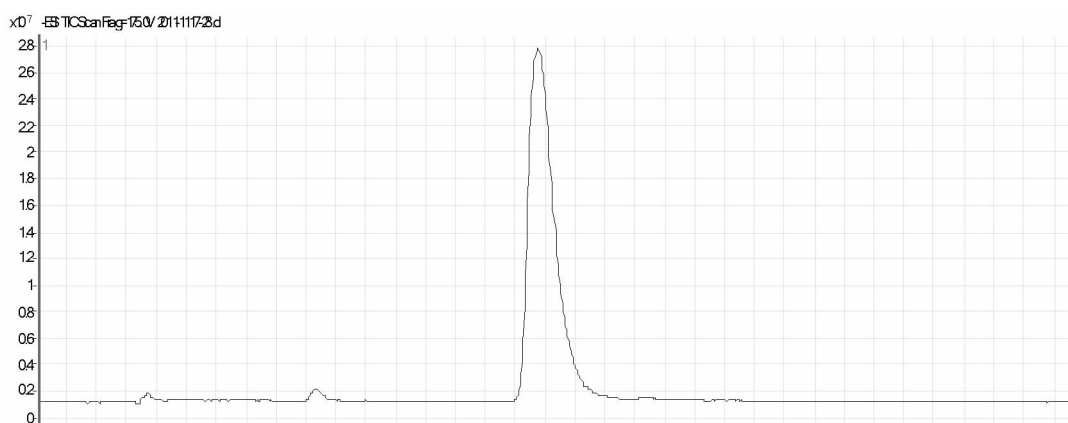


图 2 松萝酸对照品 LC-MS 总离子流图

**2.1.6.5 线性关系考察** 精密称取松萝酸对照品适量,加少量氯仿至完全溶解后加甲醇稀释制成  $1.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  的对照品储备液。精密吸取储备液适量,稀释成 75.00、37.50、18.75、4.68、2.34  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  系列溶液。将上述系列对照品溶液进样,以对照品的进样量对峰面积进行回归,得回归方程为  $Y = 48286X - 150.47$  ( $r = 0.9998$ ),松萝酸在 2.34 ~ 75.00  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  范围内呈良好的线性关系。

**2.1.6.6 精密度试验** 精密吸取 4 号样品溶液,重复进样 5 次,其峰面积 RSD 为 2.89 %。

**2.1.6.7 溶液稳定性试验** 精密吸取 4 号样品溶液,分别在 2、4、6、8、16、24 h 进样,测定松萝酸含量,其 RSD 为 1.98 %。

**2.1.6.8 重现性试验** 取 4 号样品,按拟定方法平行制备 5 份供试品溶液,测定松萝酸含量,其 RSD 为 1.16 %。

**2.1.6.9 加样回收率试验** 取 4 号样品粉末(松萝酸含量为 0.74 %),3 组 6 份,每份约 1 g,精密称定,分别按照 80 %、100 %、120 % 三个目标质量浓度精密加入不同量的松萝酸对照品溶液,按供试品溶液制备项下的方法制备,在拟定色谱条件下测定松萝酸含量,计算回收率。结果,80 %、100 %、120 % 三个目标质量浓度平均回收率分别为 97.6 %、98.3 %、99.2 %;其 RSD 分别为 1.94 %、1.86 %、1.32 %。

**2.1.6.10 样品测定** 取 6 批样品,每批 2 份,制备供试品溶液,在拟定色谱条件下进样测定,按外标法计算样品中松萝酸的含量(%)。

## 2.2 结果

**2.2.1 形态特征** 金刷把地衣体为枝状体,呈灌丛状,坚硬,直立或倾斜,高 5 cm ~ 7 cm,以基部固着于基物上(图 3);分枝二叉状,稠密丛生;主枝长 0.4 cm ~ 1 cm,粗约 1.5 mm;次生分枝长 1 mm ~

1.5 mm,粗约 1 毫米,枝顶端渐细,呈尖头或钩状,生有橘黄色粉芽堆或无粉芽;表面呈橙黄色或暗土黄色,基部渐变成污灰色,无光泽,平滑或有网状皱褶和小疣突<sup>[1]</sup>(图 4)。



图 3 金刷把生境图

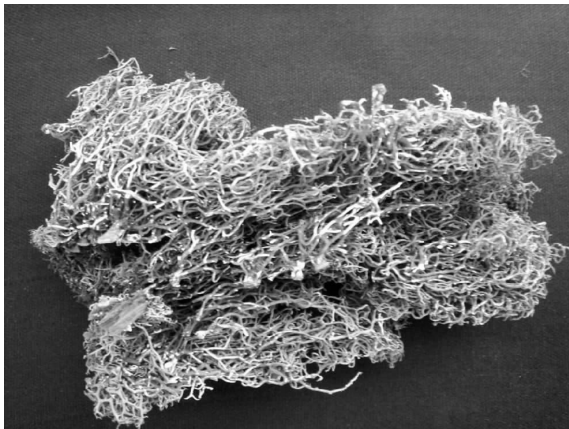
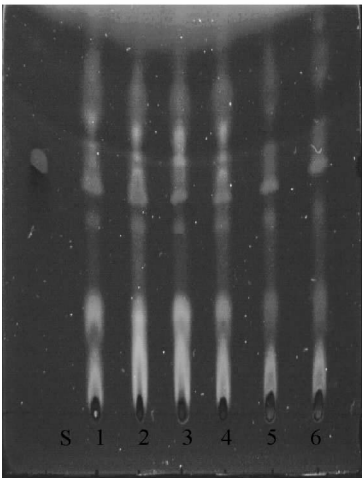


图 4 金刷把形态图

**2.2.2 显微结构特征** 枝状体分枝横切面:皮层薄而脆,厚约 30.4 微米;髓层厚约 84 微米,疏松,藻细胞分散于其中;中轴浅白色,致密,有黑色颗粒状物质,粗壮,直径约 548 微米,横切面可见很多小孔。子囊盘少见,圆盘状,直径 2 mm~4 mm,侧生于分枝上;托缘全缘,常生有小分枝;盘面呈棕褐色,无光泽,幼小时凹陷,以后扁平;侧丝单一,顶端增厚呈头状;子囊棍棒状,内含 8 孢;孢子无色,卵圆形,单胞,大小为 8.4-9×5-5.6 微米<sup>[1]</sup>。

**2.2.3 薄层鉴别结果** 6 批样品在与松萝酸对照品相同的位置上,均显相同颜色的斑点。见图 5。

**2.2.4 水分和灰分的测定结果**



s-松萝酸对照品 1-6 金刷把样品(批号 1-6)

图 5 金刷把薄层色谱图

取 6 批样品,按中国药典(2010 版一部)附录方法,分别测定样品中的水分和灰分含量,结果见表 1。

表 1 金刷把水分、灰分测定结果(n=3)

批号	水分 (%)	RSD (%)	总灰 (%)	RSD (%)	酸灰 (%)	RSD (%)
1	8.58	2.20	5.60	0.08	1.66	2.06
2	9.36	1.04	4.07	0.42	1.07	0.86
3	8.37	0.10	4.14	1.07	1.27	2.76
4	7.73	1.16	3.04	0.81	1.16	2.65
5	8.35	1.84	5.35	2.75	3.42	1.09
6	6.88	0.26	5.54	0.11	1.97	0.61

表 1 显示,金刷把含水分 6.88~9.36%,总灰分小于 5.60%,酸不溶性灰分平均值为 1.76%,水分、总灰、酸不溶性灰分的 RSD 均小于 3%。

**2.2.5 含量测定** 取 6 批样品,每批 2 份,测定多糖含量和松萝酸含量,计算。结果见表 2。

表 1 6 批金刷把中多糖及松萝酸含量测定结果(n=3)

批次	总糖含量 (%)	水溶性多糖 含量(%)	松萝酸含量 (%)
1	34.13	10.79	0.25
2	28.57	11.29	0.32
3	26.56	14.08	0.24
4	26.24	15.29	0.74
5	17.29	8.96	0.77
6	28.84	14.64	0.50
平均	26.94	12.51	0.47

表 2 显示,金刷把中水溶性多糖的含量约占总糖含量的二分之一,6 批样品中的松萝酸含量在

0.24 % ~ 0.77 % 之间。

### 3 结论

**3.1** 太白山为秦岭主峰,为华北、华中和青藏高原植物区系成分交汇地区,植物种类繁多,可作为中草药的种类繁多<sup>[10]</sup>,如金牛七<sup>[11]</sup>、党参<sup>[12]</sup>、金刷把等。据《中国药用地衣》记载陕西或秦岭产药用地衣 35 种,其中 5 种产于太白山,金刷把为其中之一。金刷把产于秦岭北坡,着生于海拔 3000 m 左右针叶树枯枝干上,为松萝科金丝刷 *Lethariella cladonioides* (Nyl.) Krog. 的干燥枝状体,其形态呈灌丛状,藻层分散于髓层,中央为菌丝纵向排列形成的致密中轴,质坚硬,中轴实心,气淡、味苦,水浸液呈暗红色,分布于陕西、甘肃、四川、云南等省区,具有镇静、止痛、消炎等作用<sup>[11]</sup>。

**3.2** 松萝酸是地衣的抗菌活性成分,易溶于氯仿、甲醇、乙醇、醋酸乙酯等溶剂,本文在 HPLC 法供试液制备过程中,以松萝酸含量为指标,分别对提取方法,提取溶剂种类、用量、提取时间和提取次数进行了考察,结果发现以氯仿为溶剂,回流提取 1 次、1 小时效果最佳。本文还对流动相进行了考察,其中甲醇 - 0.9 % 冰醋酸水 (70: 30)、乙醇 - 0.9 % 冰醋酸水 (70: 30) 等在不同流速下,对照品色谱峰均出现明显拖尾,色谱图效果欠佳。经多次试验比较,发现甲醇 - 水 - 三乙胺 - 冰醋酸 (70: 30: 0.3: 0.9) 峰形最佳,基本满足含量测定要求。

**3.3** 本文在 TLC 研究过程中,对氯仿: 甲醇: 水 (6: 4: 1)、氯仿: 甲醇 (6: 4)、正丁醇: 乙酸乙酯 (3: 1)、氯仿: 苯: 甲醇 (4: 4: 1) 等展开剂进行比较,结果发现,氯仿: 苯: 甲醇 (4: 4: 1) 为展开剂时能使样品中的松萝酸 ( $R_f = 0.32$ ) 得到较好分离,斑点清晰,无拖尾。

**3.4** 本实验采用苯酚 - 硫酸法测定金刷把中总多糖及水溶性多糖的含量,得出金刷把具有较高含量的总糖 (17.29 % ~ 34.13 %) 和水溶性多糖 (8.96 % ~ 15.29 %),该方法操作简单、显色稳定,适合列入金刷把质量标准的含量测定项。

**3.5** 金刷把醚提部位具有明显的细胞毒活性<sup>[13]</sup>,其抗氧化试验、细胞抗癌活性筛选 (另文发表) 及

药动学结果均显示,金刷把有较好的开发价值<sup>[14]</sup>。因此,有必要在质量标准研究的基础上进一步进行药理活性筛选,为金刷把深层次开发奠定基础。

### 参考文献

- [1] 吴金陵. 中国地衣植物图鉴 [M]. 北京: 中国展望出版社, 1987: 165.
- [2] 陕西省革命委员会. 陕西中草药 [M]. 北京: 科学出版社, 1971: 620.
- [3] 丁恒山. 中国药用孢子植物 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1982: 192.
- [4] 丁东宁, 靳菊情, 王晓美, 等. 金刷把多糖的研究 [J]. 西北植物学报, 1993, 13(4): 312 - 315.
- [5] 靳菊情, 丁东宁, 欧阳雪宇, 等. 松萝酸的提取和抗癌活性研究 [J]. 西北药学杂志, 1996, 11(5): 211 - 212.
- [6] Cansaran D, Cetin D, Halici MG, et al. Determination of usnic acid in some rhizoplaça species from middle Anatolia and their antimicrobial activities [J]. Z Naturforsch, 2006, 61(1 - 2): 47 - 51.
- [7] Proksa B, Prokaova A, Preparation and antineoplastic activity of acylhydrazones of R - and S - usnic acid [J]. Ceska Slow Farm, 1999, 48(5): 233 - 236.
- [8] 赵颖, 宋丹, 钟国跃, 等. HPLC 法测定雪地茶中松萝酸含量 [J]. 中草药, 2009, 40(S): 282.
- [9] 李志浩, 郑芳, 朱雪松, 等. 高效液相色谱法测定不同地区松萝中松萝酸含量 [J]. 中国医院药学杂志, 2010, 30(9): 801 - 802.
- [10] 庞德谦. 秦岭太白山的基本特征 [J]. 宝鸡文理学院 (自然科学版), 1998, 6(18): 2 - 43.
- [11] 寇文龙, 孙鑫, 徐晓琼, 等. 金牛七质量控制标准研究 [J]. 陕西中医学院报, 2012, 35(6): 97 - 99.
- [12] 孙鑫, 张伟, 寇文龙, 等. 秦岭党参质量控制标准研究 [J]. 陕西中医学院学报, 2013, 36(2): 98 - 100, 107.
- [13] 张博, 贺浪冲. 用细胞膜色谱法分析金刷把中具有细胞毒活性的有效成分 [J]. 现代医药卫生, 2006, 12(15): 2303.
- [14] Minfeng Fang, Hui Wang, Yang Wu, et. Liquid Chromatography Quadrupole Time - Of - Flight Tandem Mass Spectrometry for Selective Determination of Usnic Acid and Application in Pharmacokinetic Study. Bull. Korean Chem. Soc. 2013, 34(6): 1684 - 1688.

(收稿日期: 2013 - 04 - 23 编辑: 文颖娟)