

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2020.17.012

水黄花质量标准研究*

马雪¹, 刘春花¹, 王爱民¹, 王永林², 李勇军^{1△}

(1. 贵州医科大学民族药与中药开发应用教育部工程研究中心·省部共建药用植物功效与利用国家重点实验室, 贵州 贵阳 550004; 2. 贵州医科大学贵州省药物制剂重点实验室, 贵州 贵阳 550004)

摘要:目的 建立水黄花药材质量标准。方法 采用性状鉴别、显微鉴别、薄层色谱法对水黄花药材进行鉴别,按2015年版《中国药典(四部)》通则对其进行水分、灰分和浸出物的测定,采用高效液相色谱法测定其槲皮苷的含量。结果 样品的形态特征及显微特征明显;薄层色谱鉴别斑点清晰,专属性强;4批药材水分含量为10.80%~11.10%,总灰分含量为5.29%~5.83%,水溶性浸出物含量为19.20%~20.33%;槲皮苷质量浓度在0.005 0~0.089 6 mg/mL范围内与峰面积线性关系良好($r=0.999\ 9$),平均加样回收率为101.11%, RSD 为0.99%($n=9$)。结论 该方法操作简便、精密度高、结果可靠,可用于水黄花药材的质量控制。

关键词:水黄花;质量标准;显微鉴别;薄层色谱法;高效液相色谱法;含量测定

中图分类号:R932;R284.1;R286.0

文献标识码:A

文章编号:1006-4931(2020)17-0047-05

Quality Standard for *Euphorbia Sikkimensis*

MA Xue¹, LIU Chunhua¹, WANG Aimin¹, WANG Yonglin², LI Yongjun¹

(1. Engineering Research Center for the Development and Application of Ethnic Medicine and TCM < Ministry of Education > · State Key Laboratory of Functions and Applications of Medicinal Plants, Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou, China 550004; 2. Guizhou Provincial Key Laboratory of Pharmaceutics, Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou, China 550004)

Abstract: Objective To establish the quality standard of *Euphorbia sikkimensis*. **Methods** Character identification, microscopic identification, thin layer chromatography (TLC) were carried out. According to the corresponding methods in 2015 edition of *Chinese Pharmacopoeia* (Part IV), the contents of moisture, total ash and soluble extractive from 4 batches of *Euphorbia sikkimensis* were determined. The content of quercitrin was determined by high performance liquid chromatography (HPLC). **Results** The morphological and microscopic characteristics of *Euphorbia sikkimensis* were described in detail. TLC spots were clear, and the specificity was strong. The contents of moisture, total ash, and soluble extract from samples were 10.80%–11.10%, 5.29%–5.83%, 19.20%–20.33%, respectively. Quercitrin had good linear relationship in the range of 0.005 0–0.089 6 mg/mL ($r=0.999\ 9$). The average recovery was 101.11%, the RSD was 0.99% ($n=9$). **Conclusion** This method is simple, accurate, and reliable, which can be used for the quality control of *Euphorbia sikkimensis*.

Key words: *Euphorbia sikkimensis*; quality standard; microscopic identification; thin layer chromatography; high performance liquid chromatography; content determination

黔产苗药水黄花为大戟科大戟属植物黄苞大戟 *Euphorbia sikkimensis* Boiss. 的新鲜或干燥全株^[1],又名刮金板、水杨柳、五虎下西川,主要分布于广西、贵州、湖北、四川、云南等地^[2-3],有利尿逐水、清热解毒等功效,主治水肿、水皰、疥疮等^[4-5]。目前,对水黄花的研究主要围绕其化学成分展开,分离得到的化合物主要有黄酮类、萜类、酚类、甾体、脂肪酸类等^[6-11]。现代药理活性方面,主要对化学成分进行了抗人类免疫缺陷病毒(HIV)、抗血管生成活性研究^[7-8]。水黄花为贵州省民间常用民族药,但2003年版《贵州省中药材、民族药材质量标准》中未收载该品种。现有研究主要集中在重金属检测、含量测定及指纹图谱研究方面^[12-14],其质量标准不完善,不能有效地控制该药材的质量和安全性。本研究通过性状、显微鉴别、薄层色谱法对水黄花进行鉴别,同时还通过常规检查、浸出物测定,以水黄花主要成分之一槲皮苷作为指标

成分进行含量测定,以期建立完善的质量标准,为水黄花的深层次开发和利用提供科学依据。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

50i型显微镜及DS-Fi2型显微成像系统(日本尼康公司);Reprostar 3型瑞士卡玛薄层色谱成像系统(瑞士CAMAG公司);Ultimate 3000型高效液相色谱仪(赛默飞世尔科技公司);岛津Prominence LC-20A型快速高效液相色谱仪(岛津公司);EL204型电子天平(梅特勒-托利多仪器有限公司,精度为万分之一);WP-MP-II-20型实验室超纯水机(四川沃特尔水处理设备有限公司);CQ-250A-ST型超声波清洗仪(上海跃进医用光学器械厂,功率为250 W,频率为50 kHz);XT-A500型多功能粉碎机(浙江省永康市红太阳机电有限公司);DK-98-II型电热恒温水浴锅(天津市泰

*基金项目:国家自然科学基金[U1812403];贵州省科技计划项目[黔科合平台人才[2016]5613,5677]。

第一作者:马雪,女,回族,硕士研究生,讲师,研究方向为药效物质基础及质量控制,(电子信箱)xuema0111@163.com。

△通信作者:李勇军,男,硕士研究生,教授,博士生导师,研究方向为药效物质基础,(电子信箱)liyongjun026@126.com。

斯特仪器有限公司);KQ-300DE 型超声波清洗器(昆山市仪器有限公司,功率为 300 W,频率为 40 kHz)。

1.2 试药

槲皮苷对照品(中国食品药品检定研究院,纯度为 90.6%,批号为 11538-201606);原植物及样品均由贵州省食品药品检验所李扬副主任鉴定为正品,药材信息见表 1,标本存放于贵州医科大学贵州省药物制剂重点实验室;对照药材(批号为 201601)由贵州医科大学药学院中药民族药标本室提供;所有试剂均为分析纯。

表 1 水黄花药材信息

编号	批号	产地	采收时间
1	201509	贵州省贵阳市清镇市	2015 年 9 月
2	201513	贵州省贵阳市惠水县	2015 年 12 月
3	201608	贵州省贵阳市花溪区	2016 年 8 月
4	201609	贵州省贵阳市花溪区	2016 年 9 月

2 方法与结果

2.1 性状鉴别

根据鉴定,水黄花主根为圆柱形;棕褐色;茎枝为圆柱形,直顺,弯曲少,表面灰绿色,光滑,易折断,断面不平坦;叶对生,完整叶片狭长呈披针形,长 6~10 cm,宽 1~2 cm,先端钝圆,基部急狭,全缘光滑,多延主脉缩卷成条状,表面黄绿色。详见图 1。气微,味苦。



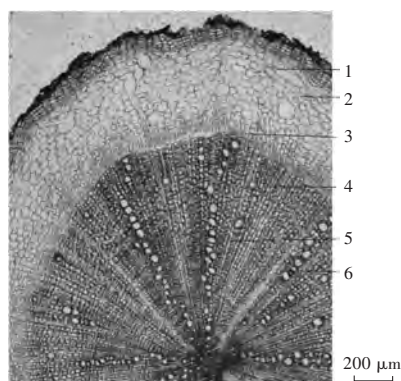
图 1 水黄花药材

2.2 显微鉴别(切片)

根横切面:木栓细胞数列,栓内层为 10 余列薄壁细胞,内含淀粉粒;韧皮部较窄;形成层成环;木质部发达,均木化,占根的大部分,导管单个散在,或多数相聚径向排列,射线宽广。详见图 2 至图 4。

叶横切面:上表皮细胞由 1 列长方形细胞构成,外壁突起;下表皮细胞较小,有乳头状或绒毛状突起;栅栏细胞长柱形,1 列;海绵组织细胞类圆形,4~8 列;中脉维管束外韧型,导管放射状排列,中脉上、下表皮处有 1 列至数列厚角组织细胞。详见图 5。

粉末显微特征:粉末为灰绿色至灰褐色。叶表皮细胞表面呈多角形,外壁乳头状或短绒毛状突起,呈双圈围状;石细胞椭圆形、长方形和类方形,直径 40~150 μm,有的壁厚 10~35 μm,孔沟不明显,有的可见纹孔;木栓



1. 木栓层 2. 栓内层 3. 韧皮部 4. 形成层
5. 木质部 6. 木质部导管

图 2 水黄花根横切面(×100)

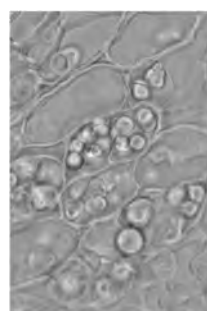


图 3 薄壁细胞中含淀粉粒
(×40)

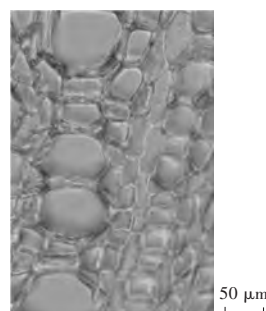
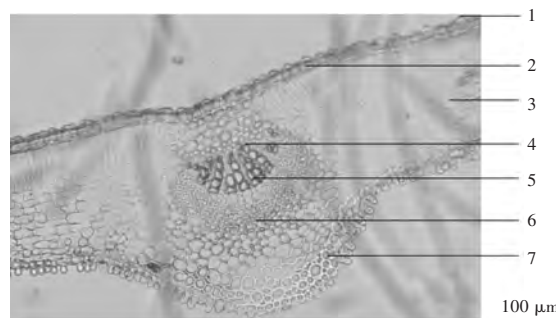


图 4 根木质部导管
(×40)



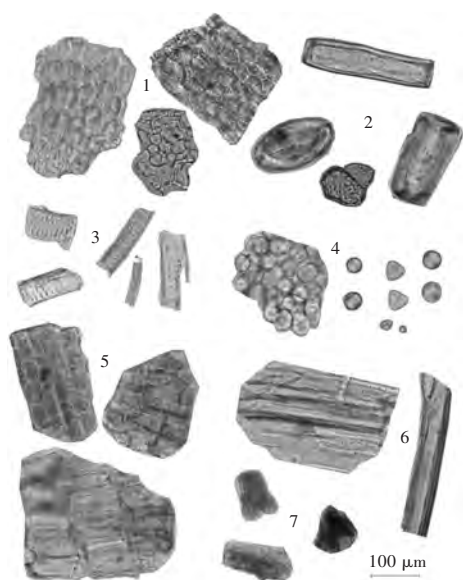
1. 上表皮 2. 栅栏组织 3. 海绵组织 4. 中脉木质部
5. 中脉韧皮部 6. 厚角组织 7. 下表皮

图 5 水黄花叶横切面(×10)

细胞类长方形或类多角形,内含棕色物;淀粉粒多见,单粒类球形,复粒由 2~4 分粒组成,有的聚集成团,脐点多点状,可见“一”字状,直径 10~40 μm;分泌道碎片易见,含黄棕色分泌物。导管为具缘纹孔、梯纹和螺纹,直径 10~80 μm;纤维成束或散在,壁厚,可见纹孔。详见图 6。

2.3 薄层色谱鉴别

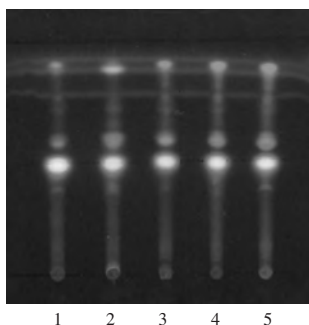
取样品粉末 0.5 g,加乙醇 10 mL,超声(功率 200 W,频率 40 kHz)处理 10 min,滤过,滤液蒸干,残渣加乙醇 1 mL 使其溶解,作为供试品溶液。另取水黄花对照药材 0.5 g,同法制备对照药材溶液。照 2015 年版《中国药典(四部)》通则 0502 薄层色谱法试验,吸取上述溶液各



1. 叶表皮细胞 2. 石细胞 3. 导管 4. 淀粉粒
5. 木栓细胞 6. 纤维 7. 分泌管

图6 水黄花粉末显微特征图

2 μL , 分别点于同一硅胶 G 板上, 以乙酸乙酯-石油醚 (60~90 $^{\circ}\text{C}$)-甲酸 (2:1:0.05, $V/V/V$) 为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 置紫外光灯 (365 nm) 下检视。供试品溶液色谱中, 在与对照药材溶液色谱相应位置上显相同颜色的斑点。色谱图见图 7。



1-4. 供试品溶液 5. 对照药材溶液
图7 不同批次水黄花药材薄层色谱图

2.4 水分、总灰分和浸出物测定

水分:照 2015 年版《中国药典(四部)》通则 0832 水分测定法(第二法 烘干法)测定, 取样品粉末(过 2 号筛)2 g, 精密称定, 平铺于干燥恒重的扁形称量瓶中, 厚度不超过 5 mm, 精密称定, 开启瓶盖在 105 $^{\circ}\text{C}$ 干燥 5 h, 盖好瓶盖, 移至干燥器中, 放冷 30 min, 精密称定, 再在上述温度干燥 1 h, 放冷, 称定质量, 至连续 2 次称得质量的差异不超过 5 mg 为止, 根据减失的质量, 计算供试品的水分(%)。结果 4 批水黄花药材水分含量为 10.80%~11.10%, 详见表 2。

总灰分:照 2015 年版《中国药典(四部)》通则 2302 灰分测定法测定, 取样品粉末 3 g, 置炽灼至恒重的坩埚中, 称定质量(精度为 0.01 g), 缓缓炽灼, 避免燃烧, 至完

表2 水黄花药材中水分、总灰分、水溶性浸出物含量测定结果
(%, $n=2$)

批号	水分	总灰分	浸出物
201509	11.08	5.29	19.20
201513	11.10	5.64	20.33
201608	11.02	5.83	19.47
201609	10.80	5.29	19.58

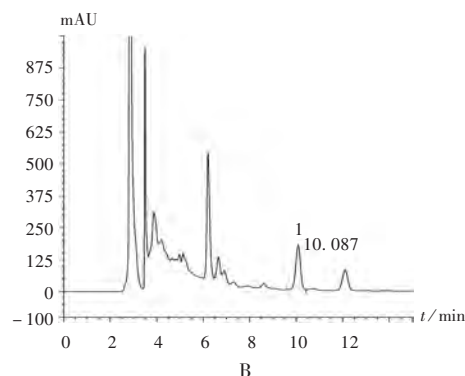
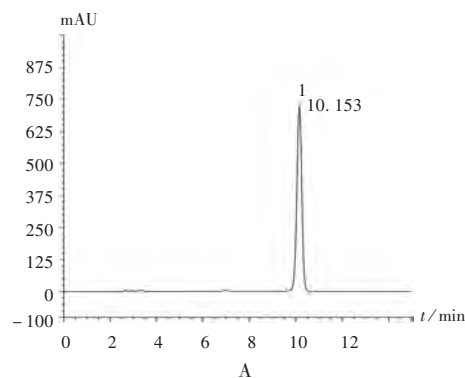
全炭化时, 逐渐升高温度至 550 $^{\circ}\text{C}$, 使完全灰化并至恒重, 根据残渣质量, 计算供试品中总灰分的含量(%)。结果 4 批水黄花药材总灰分含量为 5.29%~5.83%, 详见表 2。

浸出物含量:水黄花民间习用方法为水煎煮或捣碎, 故选择以水为溶剂进行水溶性浸出物研究, 以浸出物作为本品质量控制指标之一。取样品粉末(过 2 号筛)2 g, 精密称定, 置 100 mL 锥形瓶中, 精密加水 50 mL, 照 2015 年版《中国药典(四部)》通则 2201 浸出物测定法中水溶性浸出物热浸法测定, 以干燥品计算供试品中水溶性浸出物的含量。结果 4 批水黄花药材水溶性浸出物含量为 19.20%~20.33%, 详见表 2。

2.5 槲皮苷含量测定

2.5.1 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱:Venusil XBP C_{18} (L) 柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm); **流动相:**乙腈-0.1% 磷酸溶液 (20:80, V/V); **流速:**1 mL/min; **柱温:**35 $^{\circ}\text{C}$; **检测波长:**258 nm; **进样**



1. 槲皮苷

A. 对照品溶液 B. 供试品溶液

图8 高效液相色谱图

量:10 μ L。理论板数以槲皮苷峰计应不低于5 000。在此色谱条件下的色谱图见图8。

2.5.2 溶液制备

取水黄花药材粉末(过3号筛)约1 g,精密称定,置锥形瓶中,精密加入甲醇25 mL,称定质量,超声处理(功率为200 W,频率为40 kHz)1 h,再称定质量,用甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得供试品溶液。取槲皮苷对照品适量,精密称定,加甲醇溶解,制成每1 mL含槲皮苷0.521 9 mg的溶液,摇匀,即得对照品贮备液。精密量取对照品贮备液适量,配制成质量浓度为0.024 9 mg/mL的对照品溶液。

2.5.3 方法学考察

线性关系考察:分别精密量取对照品贮备液适量,置10 mL容量瓶中,用甲醇稀释至刻度,摇匀,配制成质量浓度为0.005 0,0.024 9,0.049 8,0.074 7,0.089 6 mg/mL的系列对照品溶液,分别注入液相色谱仪,记录色谱峰面积,以质量浓度(X ,mg/mL)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归。得回归方程 $Y=515.03X-0.0793$ ($r=0.9999$)。结果表明,槲皮苷质量浓度在0.005 0~0.089 6 mg/mL范围内与峰面积线性关系良好。

耐用性试验:取水黄花药材(批号为201513)粉末1 g,共3份,精密称定,依法制备供试品溶液,按拟订色谱条件,分别调整流动相比例[乙腈-0.1%磷酸溶液(19:81, V/V)、乙腈-0.1%磷酸溶液(20:80, V/V)和乙腈-0.1%磷酸溶液(21:79, V/V)],pH[乙腈-0.05%磷酸溶液(20:80, V/V)、乙腈-0.1%磷酸溶液(20:80, V/V)和乙腈-0.15%磷酸溶液(20:80, V/V)],流速[0.9, 1.0, 1.1 mL/min]、色谱柱[(Puls C_{18} 柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m)、Venusil XBP C_{18} 柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m)、Luna C_{18} 柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m)]、检测波长(256, 258, 260 nm)、柱温(32, 35, 38 $^{\circ}$ C)、仪器[UIMate 3000型(双三元)、UIMate3000型、岛津 Prominence LC-20A型],进行试验,并计算不同条件下供试品溶液中槲皮苷的含量。结果的 RSD 低于2.0%($n=9$),表明该方法耐用性良好。

重复性试验:分别取水黄花药材(批号为201513)粉末0.5, 1.0, 1.5 g,各3份,精密称定,依法制备供试品溶液,按拟订色谱条件进样分析,并计算不同质量浓度的供试品溶液中槲皮苷的含量。结果3个不同质量浓度供试品溶液中槲皮苷的平均含量为0.19%(按干燥品计), $RSD=3.02\%$ ($n=9$),表明方法重复性良好。

中间精密度试验:以不同的试验人员(2名),在不同时间按上述方法分别取水黄花药材(批号为201513)粉末1 g,各3份,精密称定,依法制备供试品溶液,按拟订色谱条件进样分析,记录峰面积。结果槲皮苷含量的

$RSD=2.86\%$ ($n=6$),表明方法的中间精密度良好。

稳定性试验:取同一供试品溶液,分别于0, 1, 2, 4, 8 h时按拟订色谱条件进样分析,记录峰面积。结果槲皮苷峰面积的 RSD 为0.49%($n=5$),表明供试品溶液在8 h内稳定。

加样回收试验:取已知含量的水黄花药材(批号为201513)粉末0.5 g,精密称定,共9份,分别按称量样品被测定成分的样品含量加入50%, 100%, 150%,各3份,依法制备供试品溶液,按拟订色谱条件进样分析,记录峰面积,并计算回收率。结果见表3。

表3 槲皮苷加样回收试验结果($n=9$)

取样量(g)	样品含量(mg)	加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	$\bar{X}$ (%)	RSD (%)
0.504 5	0.972 5	0.474 0	1.456 1	102.03		
0.504 9	0.973 3	0.474 0	1.456 3	101.90		
0.509 3	0.981 8	0.474 0	1.461 3	101.16		
0.504 7	0.972 9	0.948 1	1.933 4	101.31		
0.503 3	0.970 2	0.948 1	1.928 3	101.05	101.11	0.99
0.500 4	0.964 6	0.948 1	1.931 5	101.98		
0.501 5	0.966 7	1.354 40	2.327 4	100.47		
0.500 3	0.964 4	1.354 40	2.336 5	101.31		
0.501 6	0.966 9	1.354 40	2.305 0	98.80		

2.5.4 样品含量测定

取各批次水黄花药材粉末1 g,各2份,精密称定,分别依法制备供试品溶液,按拟订色谱条件进样分析,计算含量。结果见表4。

表4 水黄花药材含量测定结果(%, $n=2$)

编号	批号	来源	槲皮苷
1	201509	贵州省贵阳市清镇市	0.064
2	201513	贵州省贵阳市惠水县	0.190
3	201608	贵州省贵阳市花溪区	0.014
4	201609	贵州省贵阳市花溪区	0.014

3 讨论

水黄花药材作为贵州省民族药广泛使用,目前尚无完整质量控制方法。因此,本研究中首次从根横切面、叶横切面及粉末3方面对水黄花药材进行了显微鉴别,其显微特征明显,为水黄花药材生药学鉴别提供了科学基础;其次,在薄层色谱鉴别研究中考察了不同厂家的薄层色谱板(青岛海洋硅胶G板、青岛鼎康硅胶G板和烟台江友硅胶HSG板)、不同温度(10, 25, 30 $^{\circ}$ C)、不同相对湿度(32%, 58%, 72%)、稳定性(0, 1, 2, 3 d)对薄层色谱鉴别方法进行耐用性试验。结果显示,在不同条件下,薄层色谱方法均可鉴别水黄花药材,表明该方法可行。含量测定试验中,对供试品溶液的提取方法(超声提取,回流提取,索式提取),提取溶剂(甲醇, 75%甲醇, 50%甲醇, 25%甲醇, 水, 95%乙醇, 75%乙醇, 50%乙