

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2022.01.018

重庆市地产药材蓼子草质量标准研究*

陈 健,李洪刚

(重庆市涪陵食品药品检验所,重庆 408000)

摘要:目的 建立重庆市地产药材蓼子草的质量标准。方法 采用显微镜观察蓼子草粉末的纤维特征,采用薄层色谱法定性鉴别蓼子草中的成分金丝桃苷;采用高效液相色谱法测定槲皮素的含量,色谱柱为 Agilent Eclipse XDB-C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm,5 μm),流动相为甲醇-0.4 磷酸水溶液(55:45,V/V),流速为 1.0 mL/min,检测波长为 360 nm,柱温为 30℃,进样量为 10 μL。结果 蓼子草显微特征包括气孔、非腺毛、花粉粒、草酸钙簇晶体;蓼子草薄层色谱图中金丝桃苷特征明显,专属性强;槲皮素的质量浓度在 1.42~71.20 μg/mL 范围内与峰面积线性关系良好($r=0.999\ 9$, $n=5$),精密度、稳定性、重复性试验的 RSD 均小于 2.0%($n=6$),平均加样回收率为 98.00%,RSD 为 0.81%($n=6$)。结论 该方法操作简便,结果准确,专属性强,稳定性和重复性均较好,可用于蓼子草的质量控制。

关键词:蓼子草;显微鉴别;薄层色谱法;高效液相色谱法;金丝桃苷;槲皮素;质量标准

中图分类号:R932;R284.1;R286.0

文献标志码:A

文章编号:1006-4931(2022)01-0071-03

Quality Standard of Chongqing Native Herb *Polygonum Criopolitanum*

CHEN Jian,LI Honggang

(Fuling Institute for Food and Drug Control,Chongqing,China 408000)

Abstract: Objective To establish a quality standard of Chongqing native herb *Polygonum criopolitanum*. **Methods** The fiber characteristics of *Polygonum criopolitanum* powder were observed by microscope, and the hyperoside in *Polygonum criopolitanum* powder was qualitatively identified by the thin-layer chromatography(TLC) method. The content of quercetin was determined by the high-performance liquid chromatography(HPLC) method. The chromatographic column was Agilent Eclipse XDB-C₁₈ column (250 mm×4.6 mm,5 μm), the mobile phase was methanol-0.4 phosphoric acid aqueous solution (55:45,V/V), the flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelength was 360 nm, the column temperature was 30℃, and the injection volume was 10 μL. **Results** The microscopic characteristics of *Polygonum criopolitanum* included stomata, non-glandular hairs, pollen grains and calcium oxalate cluster crystals. Hyperoside in the TLC chromatogram of *Polygonum criopolitanum* had obvious characteristics and strong specificity. The linear range of quercetin was 1.42-71.20 μg/mL ($r=0.999\ 9$, $n=5$). The RSDs of precision, stability and repeatability tests were less than 2.0%($n=6$). The average recovery of quercetin was 98.00% with an RSD of 0.81%($n=6$). **Conclusion** The method is simple, accurate, specific, stable and reproducible, which can be used for the quality control of *Polygonum criopolitanum*.

Key words: *Polygonum criopolitanum*; microscopic identification; TLC; HPLC; hyperoside; quercetin; quality standard

蓼子草常用于治疗痢疾、肠炎、食滞、灭蛆,外用治疗皮肤瘙痒,为川渝地区常用中药材。蓼子草为蓼科蓼属植物水辣蓼 *Polygonum hydropiper* L. 或旱辣蓼 *Polygonum flaccidum* Meisn. 的新鲜或干燥全草,夏、秋二季花开时采挖,除去杂质,鲜用或晒干。水辣蓼分布于东北、华北、河南、陕西、甘肃及长江以南的各省区,旱辣蓼分布于东北、江西、福建、广东等地,四川省及重庆市各地均产^[1-2]。为了有效控制蓼子草药材的质量,参考文献[3-16],本研究中采用显微鉴别法和薄层色谱(TLC)法定性鉴别其成分金丝桃苷,以及采用高效液相色谱(HPLC)法测定其槲皮素的含量。现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

安捷伦 1260 型高效液相色谱系统(美国安捷伦科技有限公司),配有二极管阵列检测器(DAD);XPE205 型

分析天平(美国 Mettler 公司,精度为十万分之一);DP73 型电子显微镜(日本奥林巴斯公司);HH-6D 型数显恒温水浴锅(常州市金坛友联仪器研究所);薄层层析硅胶 G 板(青岛海洋生物制品厂)。

1.2 试药

蓼子草(自采,分别自拟批号为 2019-L-01,2019-L-02,2019-L-03,2019-L-04,2019-L-05,2019-L-06,2019-L-07),经重庆市涪陵食品药品检验所陈健副主任中药师鉴定为正品;槲皮素对照品(中国食品药品检定研究院,批号为 100081-201610,纯度≥99.8%);盐酸(分析纯,成都科龙化工试剂厂,批号为 190401);甲醇为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为超纯水。

2 方法与结果

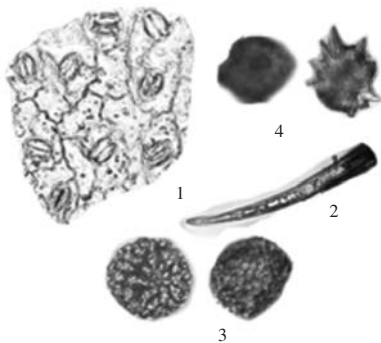
2.1 显微鉴别

取样品粉末,置显微镜下观察。粉末呈灰绿色至黄

*基金项目:重庆市中药材标准研究课题[CQZYC201820]。

第一作者:陈健,男,大学本科,副主任中药师,研究方向为药品检验,(电话)023-72229012(电子信箱)295592572@qq.com。

绿色;叶表皮细胞类多角形或垂周壁微波状弯曲;气孔多平轴式,少有不定式;副卫细胞2~4个;非腺毛黄绿色,壁木化增厚,常多根重叠;草酸钙簇晶体散在,多见,直径30~90 μm ;花粉粒圆球形,表面有网状雕纹,外壁齿状突出,直径约40 μm ;纤维成束,壁增厚。详见图1。



1. 气孔 2. 非腺毛 3. 花粉粒 4. 草酸钙簇晶体

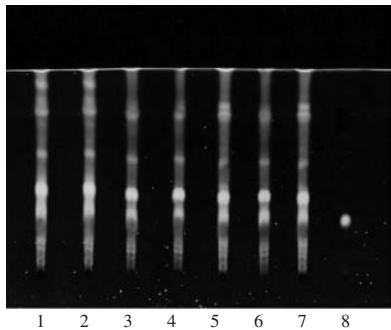
图1 蓼子草显微特征图

1. Stoma 2. Non-glandular hairs 3. Pollen grains 4. Calcium oxalate cluster crystal

Fig. 1 Microscopic characteristics of *Polygonum criopolitanum*

2.2 TLC 鉴别

取样品粉末1 g,精密称定,加稀乙醇30 mL,水浴回流1 h,滤过,滤液蒸干,残渣加水20 mL使溶解,加入乙酸乙酯20 mL振摇提取,分取乙酸乙酯液,蒸干,残渣加甲醇1 mL使溶解,作为供试品溶液。另取金丝桃苷对照品,精密称定,加甲醇制成质量浓度为0.1 mg/mL的对照品溶液。照2020年版《中国药典(四部)》通则0502 TLC法,吸取上述2种溶液各2 μL ,分别点于同一以羧甲基纤维素钠为黏合剂的硅胶G板上,以二氯甲烷-甲醇-甲酸(80:20:3, V/V/V)的下层溶液为展开剂,展开,取出,晾干,喷以三氯化铝试液,晾干,105 $^{\circ}\text{C}$ 加热5 min,置紫外光灯(365 nm)下检视。结果供试品溶液色谱图中,在与对照品溶液色谱相应位置上显相同颜色的荧光斑点。详见图2。



1-7. 供试品溶液 8. 对照品溶液

图2 金丝桃苷薄层色谱图(365 nm)

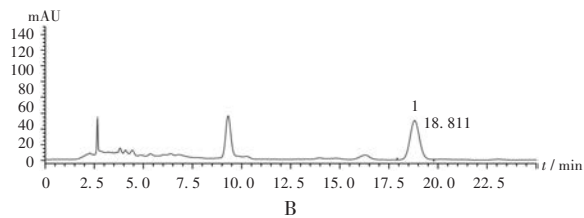
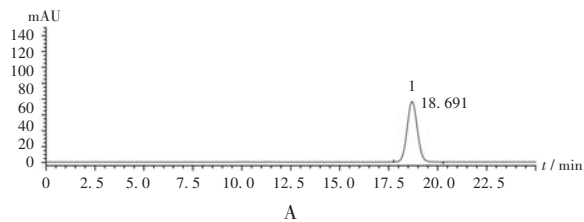
1-7. Test solution 8. Reference solution

Fig. 2 TLC chromatogram of hyperoside (365 nm)

2.3 含量测定

2.3.1 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱:Agilent Eclipse XDB-C₁₈柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);检测波长:360 nm;流动相:甲醇-0.4%磷酸水溶液(55:45, V/V),使用前经0.45 μm 有机滤膜抽滤并脱气;流速:1.0 mL/min;柱温:30 $^{\circ}\text{C}$;进样量:10 μL 。在此色谱条件下,供试品溶液色谱图中,在与对照品溶液色谱相同保留时间处有色谱峰出现。详见图3。通过样品光谱扫描,发现纯度大于98%,表明分离效果良好。



1. 槲皮素

A. 对照品溶液 B. 供试品溶液

图3 高效液相色谱图

1. Quercetin

A. Reference solution B. Test solution

Fig. 3 HPLC chromatograms

2.3.2 溶液制备

对照品溶液:取槲皮素对照品适量,精密称定,加甲醇制成每1 mL含30 μg 的溶液,即得。

供试品溶液:将样品粉末过3号筛,取2 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,加甲醇-25%盐酸溶液(4:1, V/V)100 mL,称定质量,加热回流1 h,放冷,再称定质量,用甲醇-25%盐酸溶液(4:1, V/V)补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.3.3 方法学考察

线性关系考察:分别精密量取对照品溶液各1, 5, 10, 25, 50 mL,加甲醇分别定容于100 mL容量瓶中,按2.3.1项下色谱条件进样测定,以峰面积(Y)为纵坐标、对照品溶液的质量浓度(X, $\mu\text{g/mL}$)为横坐标进行线性回归,得回归方程 $Y=15.148X+7.3025$ ($r=0.9999$, $n=5$)。结果表明,槲皮素的质量浓度在1.42~71.20 $\mu\text{g/mL}$ 范围内与峰面积线性关系良好。

精密度试验:取同一质量浓度的对照品溶液,按2.3.1项下色谱条件重复进样测定6次,记录峰面积。结果槲皮素峰面积的RSD为0.42%($n=6$),表明仪器精

密度良好。

重复性试验:取同一批(批号为2019-L-01)样品2 g,精密称定,共6份,按2.3.2项下方法制备供试品溶液,按2.3.1项下色谱条件进样测定,并计算含量。结果槲皮素含量的RSD为1.68%($n=6$),表明方法重复性良好。

稳定性试验:取同一供试品溶液,室温放置,分别于配制后0,2,4,8,12,24 h时进样测定,记录峰面积。结果槲皮素峰面积的RSD为1.06%($n=6$),表明供试品溶液在室温下放置24 h稳定。

加样回收试验:取同一批(批号为2019-L-01)已知含量的样品适量,共6份,精密称定,精密加入槲皮素对照品溶液(质量浓度为0.500 2 mg/mL)适量,依法制备供试品溶液,按2.3.1项下色谱条件进样测定,并计算回收率。结果见表1。

表1 槲皮素加样回收试验结果($n=6$)

Tab. 1 Results of the recovery test($n=6$)

取样量 (g)	样品含量 (mg)	加入量 (mg)	测得量 (mg)	回收率 (%)	$\bar{X}$ (%)	RSD (%)
2.125 8	2.232 1	0.500 2	2.714 4	96.42	98.00	0.81
2.202 5	2.312 6	0.500 2	2.802 5	97.94		
2.017 8	2.118 7	1.001 0	3.102 8	98.31		
2.225 8	2.337 1	1.001 0	3.321 6	98.35		
2.005 4	2.105 7	2.002 0	4.076 5	98.44		
2.524 7	2.650 9	2.002 0	4.623 2	98.52		

2.3.4 样品含量测定

取7批(批号分别为2019-L-01,2019-L-02,2019-L-03,2019-L-04,2019-L-05,2019-L-06,2019-L-07)样品各适量,依法制备供试品溶液,按2.3.1项下色谱条件进样测定。结果样品中槲皮素的含量分别为0.07%,0.10%,0.08%,0.09%,0.08%,0.08%,0.09%,平均含量为0.08%。

3 讨论

关于品种的来源,沿用《四川省中药材标准(1987年版增补本)》中记载蓼科多种植物作辣蓼药用,强调“味不辣不用,有辣味者可用”^[1],市售品主要为水辣蓼和旱辣蓼的新鲜或干燥全草,故收入标准。

关于显微特征的确定,课题组通过大量试验对比发现,2种来源的蓼子草粉末显微特征无明显差异,故合并描述。

进行TLC鉴别时发现,中国食品药品检定研究院未供应蓼子草对照药材,自行制备又不具备条件,故选用金丝桃苷为阳性对照,考察了多种展开系统,最后确定以二氯甲烷-甲醇-甲酸(80:20:3,V/V/V)的下层溶液为展开剂。结果供试品溶液色谱图中斑点显色清晰,分离效果好,专属性强,故选定此流动相为展开剂。

含量测定时,考察指标性成分时发现金丝桃苷易水解,不稳定,故选取其苷元槲皮素作为指标性成分。预试验结果显示,蓼子草中槲皮素的含量较高,HPLC法测定含量技术较成熟。综合考虑,参考《中国药典》银杏叶(总黄酮醇苷)含量测定方法^[9],采用HPLC法测定蓼子草中槲皮素的含量。经研究选用甲醇-25%盐酸溶液(4:1,V/V)加热回流1 h制备供试品溶液。考察了样品的回流提取时间,分别测定回流提取0.5,1.0,2.0,4.0 h时样品的含量,结果回流提取1.0 h的含量基本达到最高,故被选定。

综上所述,本研究中建立的方法操作简便,结果准确,专属性强,稳定性和重复性均较好,可用于蓼子草的质量控制。

参考文献

- [1] 四川省卫生厅. 四川省中药材标准(1987年版增补本)[M]. 成都:成都科技大学出版社,1992:107-108.
- [2] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志:第二十五卷 第一分册[M]. 北京:科学出版社,1998:61.
- [3] 马雪,吴莹莹,贺亚都,等. 苗药酢浆草药材的质量标准研究[J]. 中国药房,2019,30(15):2091-2095.
- [4] 罗露香,岳玲,黄嘉欢,等. 水蓼及其近缘植物本草考证[J]. 中成药,2021,43(1):272-276.
- [5] 陈静,陈铭阳,孙宇峰,等. 六神曲中辣蓼的本草考证[J]. 中国现代中药,2017,19(1):116-119.
- [6] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京:中国医药科技出版社,2020:329.
- [7] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草:第二册第六卷[M]. 上海:上海科学技术出版社,1999:653.
- [8] 丁长玲,崔俊凤,石效荣,等. HPLC-DAD法同时测定柴黄片中6种成分的含量[J]. 中国药房,2019,30(11):1477-1481.
- [9] 张宏武,任恒春,丁刚,等. 水辣蓼中2种黄酮类成分含量测定[J]. 药学实践杂志,2012,30(5):378-379.
- [10] 刘峰,马久泰,王浩仁,等. 一测多评法测定沙棘鲜果中槲皮素、山柰素和异鼠李素含量[J]. 中国药业,2017,26(13):24-27.
- [11] 童学飞,吴雪,杨智海. 高效液相色谱法同时测定滋肝益气丸中槲皮素和丹皮酚含量[J]. 中国药业,2016,25(16):67-69.
- [12] 沈洁,王琴,熊维建,等. HPLC-一测多评法测定参芪延肾颗粒中淫羊藿药材中的6个黄酮类成分的含量[J]. 中国药房,2019,30(17):2327-2331.
- [13] 张妍,董琳,雍婧姣,等. HPLC法同时测定黄芪药材中10种黄酮类成分的含量[J]. 中国药房,2017,28(21):2970-2973.
- [14] 王凯,欧春丽,张文玉,等. 瑶药花皮胶藤药材质量标准研究[J]. 中国药业,2020,29(13):60-62.
- [15] 解小霞,苏文煊,孙晓静,等. 灵香草药材质量标准初步研究[J]. 中国药业,2019,28(14):35-37.
- [16] 王众宽,明梦碟,石磊,等. 玉米须药材质量标准研究[J]. 中国药业,2017,26(14):1-3.

(收稿日期:2021-03-28;修回日期:2021-06-29)