

中图分类号: R932; R284.1; R286.0 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2023)19-0100-05
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2023.19.021



天胡荽质量标准提升研究*

左登平, 李变变, 鹿秀叶, 赵向阳

(安徽省宿州市食品药品检验检测中心, 安徽 宿州 234000)

摘要:目的 提升天胡荽药材的质量标准。方法 参考《安徽省中药饮片炮制规范(2019年版)》对10批药材样品进行性状鉴别;对茎横切面进行显微鉴别;根据2020年版《中国药典(四部)》通则项下方法测定水分、总灰分、酸不溶性灰分、浸出物;采用薄层色谱法进行定性鉴别;采用高效液相色谱法测定槲皮素的含量,色谱柱为Agilent Zorbax Eclipse C₁₈柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm),流动相为甲醇-0.4%磷酸溶液(50:50, V/V),流速为1.0 mL/min,检测波长为360 nm,柱温为25℃,进样量为10 μL。结果 天胡荽根呈细圆柱形,茎细而弯曲,叶多皱缩或破碎,气香,味微苦。茎横切面可见表皮细胞、分泌道、韧皮部、皮部、髓部的显微特征。薄层色谱图中斑点清晰,分离度良好。10批药材样品的水分、总灰分、酸不溶性灰分、浸出物分别为9.0%, 13.8%, 4.2%, 20.0%,槲皮素的平均含量为0.068%。结论 所建立的方法可用于天胡荽药材的质量控制,暂定药材的水分、总灰分、酸不溶性灰分分别不得过11.0%, 15.0%, 4.0%,浸出物及槲皮素(C₁₅H₁₀O₇)含量分别不得少于16.0%, 0.050%。

关键词:天胡荽;高效液相色谱法;薄层色谱法;显微鉴别;槲皮素;质量标准

Quality Standard of *Hydrocotyle Sibthoroides*

ZUO Dengping, LI Bianbian, LU Xiuye, ZHAO Xiangyang

(Anhui Suzhou Food and Drug Inspection and Testing Center, Suzhou, Anhui, China 234000)

Abstract: Objective To improve the quality standard of *Hydrocotyle sibthoroides*. **Methods** According to the *Anhui Province Traditional Chinese Medicine Slice Processing Standards* (Edition 2019), morphological identification was conducted on 10 batches of medicinal samples, microscopic identification was conducted on the transverse section of the stem. According to the general principles of the *Chinese Pharmacopoeia* (Edition 2020, Volume IV), the water content, total ash content, acid-insoluble ash content, and extract were determined. Qualitative identification was conducted 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 Zorbax Eclipse C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was methanol-0.4% phosphoric acid solution (50:50, V/V), the flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelength was 360 nm, the column temperature was 25℃, and the injection volume was 10 μL. **Results** *Hydrocotyle sibthoroides* had cylindrical roots, thin and curved stems, and many wrinkled or broken leaves. It had a fragrant aroma and a slightly bitter taste. Microscopic features of the epidermis cells, secretory ducts, phloem, cortex, and pith could be seen on the stem transection. The TLC spots were clear with good separation. The water content, total ash content, acid-insoluble ash content, and extract of 10 batches of medicinal samples were 9.0%, 13.8%, 4.2%, and 20.0%, respectively. The average content of quercetin was 0.068%. **Conclusion** The established method can be used for quality control of *Hydrocotyle sibthoroides*. The water content, total ash content, and acid-insoluble ash content should less than or equal to 11.0%, 15.0%, and 4.0%, respectively. The content of extract and quercetin (C₁₅H₁₀O₇) should more than or equal to 16.0% and 0.050%, respectively.

Key words: *Hydrocotyle sibthoroides*; HPLC; TLC; microscopic identification; quercetin; quality standard

天胡荽始载于《千金食治》,广泛分布于安徽、江苏、浙江、江西、福建、台湾、湖南、湖北、广东、广西等地^[1-3],具有清热利湿、解毒消肿功效,主治黄疸、痢疾、水肿、淋病、目翳、喉肿、痈肿疮毒、带状疱疹、跌打损伤等症^[4-6]。天胡荽全草含有黄酮苷、酚类、氨基酸、挥发油、香豆素等化合物,目前已从天胡荽中分离出了4种黄酮类化合物,8种齐墩果烷型三萜类化合物,1种木质素类成分和1种甾体成分^[7-10]。其中,黄酮类成分槲皮

素性质稳定,是研究天胡荽含量及评价天胡荽质量的重要指标^[11-15]。天胡荽质量标准收载于《安徽省中药饮片炮制规范(2019年版)》《上海市中药材标准(1994年版)》《贵州省中药材民族药材质量标准(2003年版)》《湖南省中药材标准(2003年版)》《湖北省中药材标准(2018年版)》等,但相关标准的项目均不全面,且部分标准中的项目有待进一步完善。本研究中对10批天胡荽药材进行性状、显微、薄层色谱鉴别,检查水分、灰

*基金项目:安徽省中药材标准研究课题[药监办许可函[2020]218号]。

第一作者:左登平,男,副主任药师,研究方向为药品质量评价及中药质量标准,(电话)0557-3022893(电子信箱)389541295@qq.com。

分、浸出物的含量,采用高效液相色谱法测定槲皮素的含量,建立并完善天胡荽的质量标准,为该药材的质量控制提供参考。现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Ultimate3000型高效液相色谱仪(美国Thermo Fisher公司),配有Chromeleon色谱工作站;Camag TLC SCANNER3型薄层扫描仪(瑞士Camag公司);DM750型生物显微镜(德国Leica公司),配有ToupCamE3CMOS成像系统;FP240型精密干燥箱(德国Binder公司);KSL-1200X-M型高温箱式炉(合肥科晶材料技术有限公司);TA-27型超声波清洗器(湖北鼎泰高科有限公司,功率为700 W,频率为40 kHz);BSA 124S型电子天平(德国Sartorius公司,精度为0.1 mg);AB135-S型分析天平(梅特勒-托利多公司,精度为0.01 mg)。

1.2 试药

槲皮素对照品(中国食品药品检定研究院,批号为10081-201610,纯度为99.1%);天胡荽药材样品(10批,均由安徽省中药材标准起草领导小组提供),经安徽中医药大学刘金山教授鉴定为正品,样品信息见表1;甲醇、乙腈(色谱纯,美国Tedia公司);水为纯化水,其他试剂均为分析纯。

表1 天胡荽药材样品信息

Tab. 1 Information of *Hydrocotyle sibthoroides*

样品编号	采集地或收集地	样品编号	采集地或收集地
THS-01	四川省	THS-06	安徽省合肥市蜀山区大蜀山
THS-02	四川省	THS-07	安徽省芜湖市弋江区
THS-03	四川省	THS-08	安徽省六安市舒城县万佛湖
THS-04	四川省	THS-09	四川省
THS-05	四川省	THS-10	四川省

2 方法与结果

2.1 性状

参照《安徽省中药饮片炮制规范(2019年版)》,并结合10批天胡荽药材样品实际性状,本品为不规则的段,根、茎、叶混合,偶见花与果实;根呈细圆柱形,表面

为淡黄色或灰黄色;茎细而弯曲,黄绿色,节处有根痕或残留细根;叶多皱缩或破碎,完整者展平后呈近圆形或肾形,叶片浅裂个数5~7个,浅裂或裂至叶片中部,淡绿色;伞形花序小;双悬果略呈心形,两侧扁平;气香,味微苦。详见图1。



图1 天胡荽药材性状

Fig. 1 Morphological character of *Hydrocotyle sibthoroides*

2.2 鉴别

显微鉴别:本品的茎横切面,表皮细胞1列,外被角质层,表皮下为1列较整齐的厚壁组织,皮层薄壁细胞5~9列;皮层可见分泌道;外韧型维管束5~6个,排列成环,形成层不明显;中央髓部为薄壁组织,常见分泌道。详见图2。

薄层色谱鉴别:取样品粉末2 g,加70%乙醇20 mL和浓盐酸2 mL,加热回流2 h,滤过,取滤液,作为供试品溶液。取槲皮素对照品,加乙醇制成每1 mL含0.1 mg的溶液,作为对照品溶液。按2020年版《中国药典(四部)》通则0502 薄层色谱法试验,吸取10批供试品溶液各5 μ L、对照品溶液2 μ L,分别点于同一硅胶G薄层板上,以甲苯-乙酸乙酯-甲酸(5:4:1, V/V/V)为展开剂,于相对湿度低于70%环境下展开,取出,晾干,喷以3%三氯化铝乙醇溶液,置紫外光灯(365 nm)下检视。结果供试品溶液色谱中,在与对照品溶液色谱相应位置显相同颜色的荧光斑点。详见图3。

2.3 水分、灰分及酸不溶性灰分检查

分别按2020年版《中国药典(四部)》通则0832 水

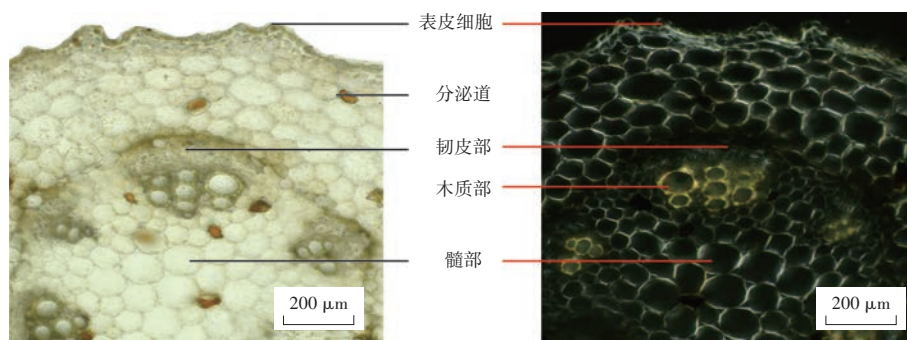
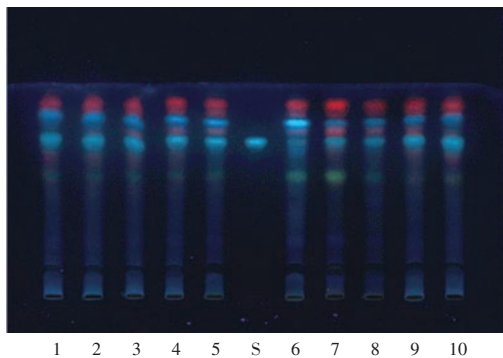


图2 天胡荽药材茎横切面显微特征

Fig. 2 Microscopic characters of stem transection of *Hydrocotyle sibthoroides*



1 2 3 4 5 S 6 7 8 9 10
S. 对照品溶液 1 - 10. 供试品溶液
图3 天胡荽药材薄层色谱图(365 nm)

S. Reference solution 1 - 10. Test solution

Fig. 3 TLC chromatogram of *Hydrocotyle sibthoroides* (365 nm)

分测定法第二法(烘干法)、通则2302 总灰分测定法测定水分、总灰分和酸不溶性灰分的含量,结果10批天胡荽药材中水分、总灰分、酸不溶性灰分的平均含量分别为9.0%,13.8%,4.2%,暂定天胡荽药材中水分、总灰分、酸不溶性灰分分别不得过11.0%,15.0%,4.0%。详见表2。

表2 天胡荽药材中水分、总灰分、酸不溶性灰分及浸出物测定结果(%)

Tab. 2 Results of content determination of water, total ash, acid-insoluble ash and extract in *Hydrocotyle sibthoroides* (%)

样品编号	水分	总灰分	酸不溶性灰分	浸出物
THS-01	8.3	12.6	2.9	20.2
THS-02	10.2	15.5	5.5	17.3
THS-03	8.1	12.7	3.1	19.3
THS-04	8.1	12.7	2.9	19.7
THS-05	8.4	14.6	5.0	17.4
THS-06	10.0	19.2	9.0	24.6
THS-07	9.2	15.8	3.5	22.7
THS-08	9.6	11.7	3.3	19.0
THS-09	9.1	14.1	4.8	18.8
THS-10	8.9	12.0	2.4	21.2

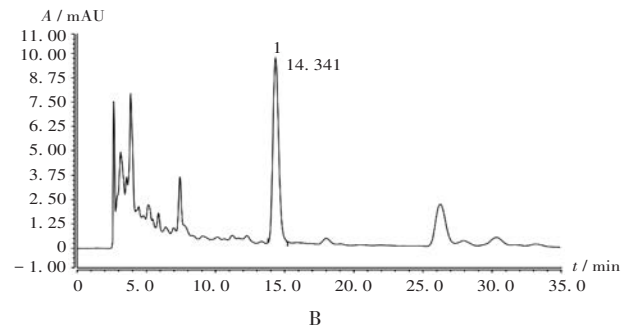
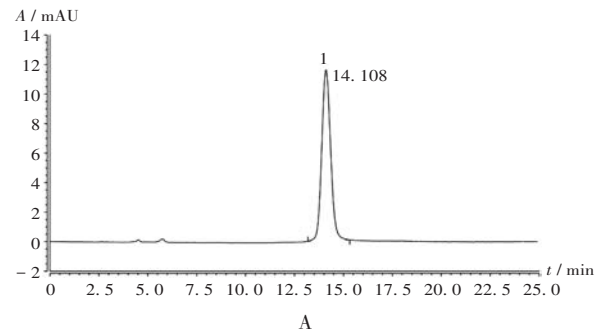
2.4 浸出物

按2020年版《中国药典(四部)》通则2201 浸出物测定法测定浸出物的含量,结果天胡荽药材中浸出物的平均含量为20.0%,暂定限度为不得少于16.0%。详见表2。

2.5 含量测定

2.5.1 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱:Agilent Zorbax Eclipse XDB C₁₈柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相:甲醇-0.4%磷酸溶液(50:50, V/V);流速:1.0 mL/min;检测波长:360 nm;柱温:25 °C;进样量:10 μL。此色谱条件下,供试品溶液色谱图中杂质峰对主峰无干扰,槲皮素分离度大于1.5,峰



1. 槲皮素

A. 对照品溶液 B. 供试品溶液

图4 高效液相色谱图

1. Quercetin

A. Reference solution B. Test solution

Fig. 4 HPLC chromatograms

对称因子介于0.90~1.20,理论板数大于5000,对照品溶液重复进样5次的RSD不超过1.5%。详见图4。

2.5.2 溶液制备

取槲皮素对照品适量,精密称定,加甲醇制成每1 mL含0.5 μg的对照品溶液。取样品粉末(过3号筛)1.0 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入80%甲醇50 mL,称定质量,加热回流30 min,冷却至室温,用80%甲醇补足减失的质量,滤过,精密量取续滤液25 mL,加盐酸3 mL,加热回流30 min,迅速冷却,转移至50 mL容量瓶中,加甲醇稀释并定容,摇匀,滤过,取续滤液,即得供试品溶液。

2.5.3 方法学考察

线性关系考察:取槲皮素对照品0.01016 g,置100 mL容量瓶中,用80%甲醇定容,制成质量浓度为101.6 μg/mL的对照品溶液,分别取0.1,0.2,0.5,0.8,1.0 mL,置10 mL容量瓶中,用甲醇制成质量浓度分别为1.016,2.032,5.080,8.128,10.160 μg/mL的系列对照品溶液。以峰面积(Y)为纵坐标、槲皮素质量浓度(X, μg/mL)为横坐标进行线性回归,得回归方程 $Y = 0.6654X + 0.054$ ($R^2 = 0.9999, n = 5$)。结果表明,槲皮素的质量浓度在1.016~10.160 μg/mL范围内与峰面积线性关系良好。

精密度试验:取线性关系考察项下对照品溶液,按

2.5.1项下色谱条件重复进样测定5次,记录峰面积。结果的RSD为0.20%($n=5$),表明仪器精密性良好。

稳定性试验:取样品(编号为THS-07)适量,按2.5.2项下方法制备供试品溶液,分别于0,4,8,12,16,20,24 h时按2.5.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果的RSD为3.92%($n=7$),表明供试品溶液在24 h内稳定性良好。

重复性试验:取稳定性试验项下供试品溶液6份,按2.5.1项下色谱条件进样测定,用回归方程计算含量。结果平均含量为0.0727%,RSD为1.75%($n=6$),表明方法重复性良好。

加样回收试验:取已知含量的天胡荽样品(编号为THS-07)粗粉0.500 g,精密称定,平行6份,置100 mL具塞锥形瓶中,分别加入质量浓度为3.612 mg/mL的槲皮素对照品溶液100 μ L,按2.5.2项下方法制备供试品溶液,按2.5.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算回收率。结果见表3。

表3 加样回收试验结果($n=6$)

Tab. 3 Results of the recovery test($n=6$)

取样量(g)	样品含量(μ g)	加入量(μ g)	测得量(μ g)	回收率(%)	\bar{X} (%)	RSD(%)
0.5036	364.663	361.200	710.099	95.64	96.24	1.06
0.5024	364.122	361.200	705.590	94.54		
0.5028	364.340	361.200	712.955	96.52		
0.5031	364.558	361.200	712.828	96.42		
0.5042	364.267	361.200	714.457	96.95		
0.5035	364.231	361.200	715.960	97.38		

2.5.4 样品含量测定

取槲皮素对照品溶液及10批天胡荽药材样品的供试品溶液各适量,按2.5.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积,分别按外标法计算样品中槲皮素的含量。结果10批天胡荽药材中槲皮素含量分别为0.072%,0.073%,0.076%,0.073%,0.097%,0.014%,0.053%,0.038%,0.089%,0.100%,平均为0.068%。以统计学方法分析含量数据,暂定限度为按干燥品计算,含槲皮素($C_{15}H_{10}O_7$)不得少于0.050%。

3 讨论

3.1 浸出物检查考察

按2020年版《中国药典(四部)》通则2201浸出物测定法,考察了不同浸出方法(冷浸法、热浸法)和不同溶剂(水、稀乙醇、70%乙醇、乙醇)对浸出物含量的影响,结果热浸法的浸出物含量高于冷浸法,故选择热浸法作为提取方法。在热浸法中用水、稀乙醇为溶剂时浸出物的含量相对更高,但用水提取很难过滤,故提取溶剂选择稀乙醇。

3.2 薄层色谱条件考察

分别考察不同提取溶剂(乙醇30 mL、50%乙醇30 mL、70%乙醇30 mL和浓盐酸3 mL、70%乙醇20 mL和浓盐

酸2 mL),不同提取方式(超声提取、加热回流提取),不同提取时间(1,2,3,4 h),不同点样量(供试品溶液1,2,3,4,5,6 μ L,对照品溶液1,2 μ L),不同展开剂[环己烷-乙酸乙酯-甲酸(7:5:0.8, V/V/V),甲苯-乙酸乙酯-甲酸(5:2:1, V/V/V),甲苯-乙酸乙酯-甲酸(10:8:1, V/V/V),甲苯-乙酸乙酯-甲酸(5:4:1, V/V/V)],不同薄层板(硅胶H薄层板、聚丙烯酸钠硅胶G薄层板、羧甲基纤维素钠硅胶G薄层板)对槲皮素提取效果的影响,最终确定2.2项下薄层色谱条件的提取效果较好,条带较清晰,能满足试验要求。

3.3 含量测定供试品溶液制备方法考察

槲皮素可溶于甲醇、乙酸乙酯、冰醋酸、吡啶、丙酮等,不溶于水、苯、乙醚、氯仿、石油醚等,参照《湖北省中药材标准(2018年版)》、2020年版《中国药典(一部)》中有关槲皮素含量测定方法及其他有关槲皮素含量测定的文献,考察甲醇和盐酸回流提取1次及先用80%甲醇回流再用盐酸水解回流提取(回流2次,第2次稀释了2倍)对提取效果的影响,结果色谱峰无明显差异,但回流提取2次的峰面积普遍更大,可能是由于先用80%甲醇提取再用盐酸水解,槲皮素提取更完全,故选择提取2次。采用 $L_9(3^4)$ 正交试验考察取样量(0.5, 1.0, 1.5 g),甲醇体积分数(50%, 80%, 100%),回流时间(回流提取2次,每次30 min,1次1 h、1次30 min,每次1 h),盐酸体积(3, 5, 7 mL)对提取效果的影响,结果样品取样0.5 g,甲醇体积分数80%,回流提取2次,每次30 min,盐酸体积3 mL时的效果最佳。根据槲皮素含量与浓度相同的对照品峰面积相比,取样0.5 g时峰面积相对较小,为减小误差,最终确定样品取样1.0 g。故确定2.5.2项下供试品溶液制备方法。

3.4 方法评价

本研究中建立的方法可用于天胡荽药材的质量控制,暂定药材的水分、总灰分、酸不溶性灰分分别不得过11.0%, 15.0%, 4.0%,浸出物及槲皮素($C_{15}H_{10}O_7$)含量分别不得少于16.0%, 0.050%。

参考文献

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志[M]. 北京: 科学出版社, 2004: 17-18.
- [2] 南京中医药大学. 中药大辞典:上册(第二版)[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2006: 446.
- [3] 中华本草编委会. 中华本草[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999: 968-969.
- [4] 云南省食品药品监督管理局. 云南省中药材标准(2005年版)[M]. 昆明: 云南科技出版社, 2005: 47-78.
- [5] 福建省食品药品监督管理局. 福建省中药饮片炮制规范(2012年版)[M]. 福州: 福建科学技术出版社, 2012: 38.
- [6] 安徽省药品监督管理局. 安徽省中药饮片炮制规范(2019年版)[M]. 合肥: 安徽科学技术出版社, 2019: 34.
- [7] 张嫩玲, 叶道坤, 田璧榕, 等. 天胡荽的化学成分研究[J].