

## · 论著 ·

## 红旱莲药材的质量标准研究

陈晓风, 刘莹, 张俊燕 (镇江市食品药品监督检验中心, 江苏 镇江 212000)

**[摘要]** 目的 完善红旱莲药材的质量标准。方法 采用显微鉴别法、薄层色谱(TLC)法鉴别红旱莲;按《中华人民共和国药典》(2015年版)规定方法考察水分、总灰分、酸不溶性灰分和醇溶性浸出物;用HPLC法测定金丝桃苷的含量。结果 建立了红旱莲显微鉴别法和TLC法鉴别,HPLC法含量测定;确定了水分、灰分、醇溶性浸出物的限度。结论 本实验为红旱莲药材的质量标准提高提供了依据。

**[关键词]** 红旱莲;显微鉴别法;薄层色谱;高效液相色谱;金丝桃苷;质量标准

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2018)05-0426-05

**[DOI]** 10.3969/j.issn.1006-0111.2018.05.009

Study on quality standards of *Hypericum ascyron*

CHEN Xiaofeng, LIU Ying, ZHANG Junyan (Zhenjiang Institute for Food and Drug Control, Zhenjiang 212000, China)

**[Abstract]** **Objective** To improve the quality standards of *Hypericum ascyron*. **Methods** *Hypericum ascyron* was identified by microscopic observation and TLC method. The moisture, total ash, acid-insoluble ash and alcohol soluble extract were assayed following the procedures stated in Chinese Pharmacopoeia. The contents were determined by HPLC. **Results** Identification methods for *Hypericum ascyron* with microscopy, TLC and HPLC were established. The limits of moisture, total ash and alcohol soluble extract were defined. **Conclusion** This study provides scientific data for the quality control of *Hypericum ascyron*.

**[Key words]** *Hypericum ascyron*; microscopic identification; TLC; HPLC; hyperin; quality standards

红旱莲为金丝桃科植物黄海棠 *Hypericum ascyron* L. 的干燥地上部分。除新疆及青海外,全国各地均产。生于山坡林下、林缘、灌丛间、草丛或草甸中、溪旁及河岸湿地等处,也广为栽培。红旱莲又名旱莲草、湖南连翘、黄花刘寄奴、大金雀<sup>[1]</sup>。其性寒,味微苦,归肝、胃经。具有平肝、凉血止血、清热解毒的功效,临床用于各种出血和跌打损伤。红旱莲主要含黄酮类化合物和挥发油。黄酮类化合物主要有槲皮素、山柰素、金丝桃苷等<sup>[2]</sup>。

该品种收载于《江苏省中药材标准(1989年版)》、《上海市中药材标准(1994年版)》、《湖南省中药材标准(2009年版)》等地方中药材标准,但检测控制项目不全面,亟待提高。笔者运用显微鉴别法、薄层色谱(TLC)法和HPLC法对多批次红旱莲样品进行了定性鉴别和含量测定。并对药材的水分、总灰分、酸不溶性灰分、重金属、砷盐、醇溶性浸出物等进行常规检测,根据检测数据,制订限量指标,完善、提高了红旱莲的质量标准。

## 1 仪器与试剂

## 1.1 仪器

OLYMPUS BX51 系统显微镜及 Image-pro Express 5.0 显微成像系统(日本奥林帕斯), Agilent 1260 高效液相色谱仪(DAD 检测器,美国安捷伦公司),赛多利斯 BP211D 电子天平(德国赛多利斯公司),KQ-250D 型超声波清洗机(昆山市超声仪器有限公司),Linomat 5 半自动薄层点样仪(瑞士卡玛公司)。

## 1.2 试剂

红旱莲对照药材(自制),金丝桃苷(中国食品药品检定研究院,批号:111521-201205,标示含量 93.3%),芦丁对照品(中国食品药品检定研究院,批号:100080-200707,标示含量 90.5%)。样品为各地收集或实地采集(表1)。对照药材及各批样品经江苏省食品药品监督检验研究院鉴定,除1号、10号样品为混淆品外,其余均为黄海棠 *Hypericum ascyron* L. 的地上部分。甲醇、乙腈为色谱纯,水为超纯水,其他试剂均为分析纯。

表1 样品信息表

| 样品编号 | 标示名称 | 产地   | 药材来源           |
|------|------|------|----------------|
| 1    | 红旱莲  | 贵州   | 安徽井泉集团中药饮片有限公司 |
| 2    | 红旱莲  | 安徽亳州 | 亳州市九泰中药饮片有限公司  |
| 3    | 红旱莲  | 安徽   | 亳州市九泰中药饮片有限公司  |
| 4    | 红旱莲  | 浙江   | 江苏华康中药饮片有限公司   |
| 5    | 红旱莲  | 吉林   | 安徽惠隆中药饮片有限公司   |
| 6    | 红旱莲  | 安徽亳州 | 安徽亳州药材市场       |
| 7    | 红旱莲  | 江苏句容 | 采自江苏句容下蜀斗蓬山    |
| 8    | 红旱莲  | 江苏句容 | 采自江苏句容下蜀斗蓬山    |
| 9    | 红旱莲  | —    | 安徽亳州药材市场       |
| 10   | 红旱莲  | —    | 安徽亳州药材市场       |

注：“—”表示样品产地不详

## 2 鉴别

### 2.1 显微鉴别

分别对叶横切面,叶上、下表皮,粉末进行显微鉴别。红旱莲显微特征见图1~3。

**叶横切面:**上表皮细胞长方形,大小不一;下表皮细胞近方形,稍小;上、下表皮有腺体细胞分布,内含棕黄色分泌物。栅栏组织细胞1列,占叶肉厚度的1/2,海绵组织细胞5~6列,其内有时可见类圆形或长椭圆形的分泌腔,长径50~435 μm,短径50~135 μm,分泌细胞5~9个;腔内充满分泌物。主脉向叶背突出,呈半圆形,其上、下表皮内侧各有厚角细胞2~3列。主脉维管束1束,新月形。

**叶表面观:**上表皮细胞壁微波状弯曲,下表皮细胞壁波状弯曲。腺体细胞内含棕黄色物质,壁略增厚。下表皮可见气孔,气孔不等式或不定式,副卫细胞3~5个。

本品粉末棕褐色。果实、果柄基部及茎节部的石细胞类圆形、长方形或不规则形,单个或成群存在,直径28~135 μm,壁厚6~18 μm,孔沟清晰可见。纤维单个或成束存在,长梭形,多折断,木化,直径20~36 μm。木薄壁细胞长方形,壁稍厚,木化,孔沟明显。离生分泌腔可见,直径114~124 μm,具6~9个分泌细胞。导管多为螺纹、环纹及缘纹孔导管,直径14~45 μm。种皮厚壁细胞壁极厚,深波状弯曲,壁孔、孔沟明显。茎表皮细胞长条形,内含红棕色分泌物;气孔直轴式或不定式。

### 2.2 薄层鉴别

取本品粉末1g,加甲醇50ml,超声处理30min,滤过,滤液蒸干,残渣加甲醇5ml使溶解,溶液加于聚酰胺柱(80~100目,4g,内径为10~15mm),用70%的乙醇液50ml洗脱,收集洗脱液,蒸干,残渣加甲醇2ml使溶解,作为供试品溶液。

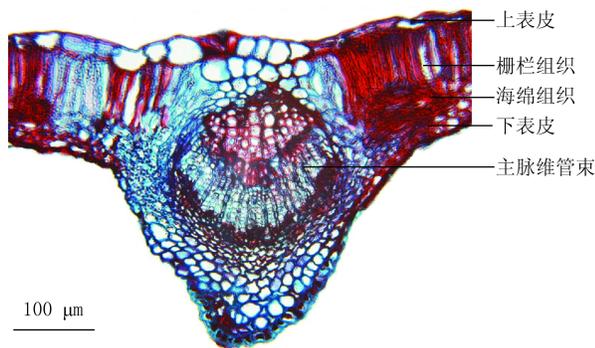


图1 红旱莲叶横切面显微特征

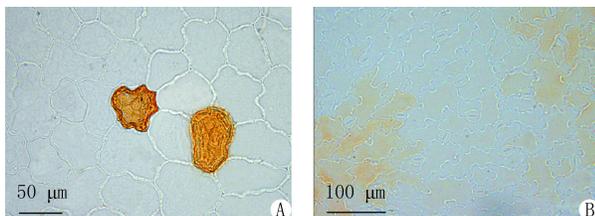


图2 红旱莲叶表皮显微特征

A.叶上表皮细胞;B.叶下表皮细胞

另取红旱莲对照药材1g,同法制成对照药材溶液。再取金丝桃苷对照品,加甲醇制成每1ml含1mg的溶液,作为对照品溶液。吸取上述3种溶液各2 μl,分别点于同一聚酰胺薄膜上,以正丁醇-甲苯-冰醋酸-水(3:2:1:1)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以10%三氯化铝乙醇溶液,热风吹干,置紫外光灯(365nm)下检视。供试品色谱中,在与对照药材和对照品色谱相应的位置上,显相同颜色的荧光斑点。TLC图见图4(温度:20℃,相对湿度:52%)。

## 3 检查及浸出物

### 3.1 水分、总灰分、酸不溶性灰分、浸出物

参照《中华人民共和国药典》(2015年版,简称《中国药典》)四部通则0832、2302、2201测定8批样品的水分、总灰分、酸不溶灰分、醇溶性浸出物(热浸法,60%乙醇作为溶剂),结果见表2。

### 3.2 重金属、砷盐

参照《中国药典》四部通则0821、0822测定8批样品。8批样品重金属量均低于百万分之十,砷盐量均低于百万分之二,故未将砷盐检查纳入标准。

## 4 含量测定

### 4.1 色谱条件<sup>[3]</sup>

色谱柱:Agilent ZORBAX SB-C<sub>18</sub>(4.6mm×250mm,5 μm);流动相:乙腈-0.1%磷酸(17:83),

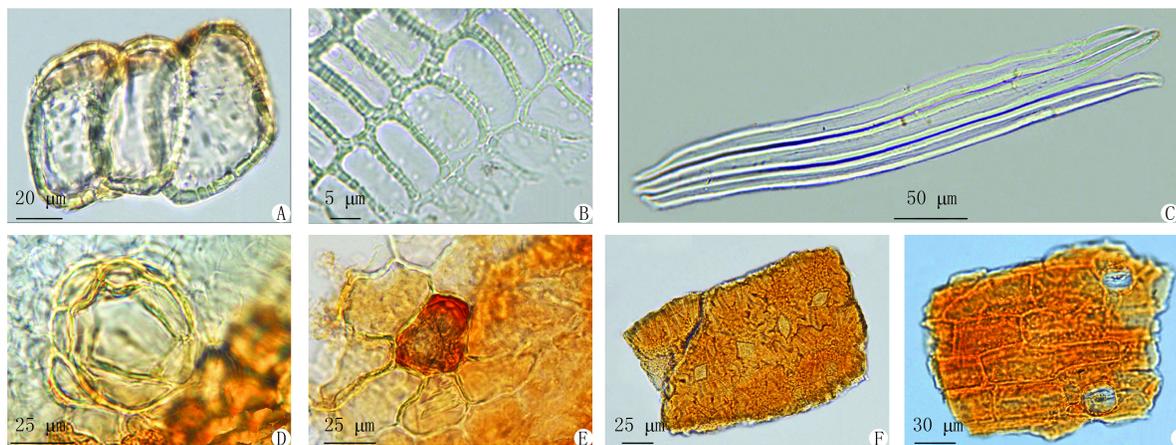


图3 红旱莲粉末显微特征

A.石细胞;B.木薄壁细胞;C.纤维;D.分泌囊;E.分泌细胞;F.种皮厚壁细胞;G.茎表皮气孔

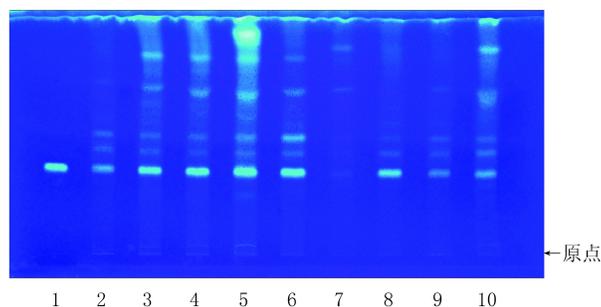


图4 8批样品 TLC图

1. 金丝桃苷对照品; 2. 红旱莲对照药材; 3~10. 样品 2~9

表2 红旱莲水分、灰分、浸出物测定结果(%)

| 样品编号 | 水分    | 总灰分  | 酸不溶性灰分    | 浸出物  |
|------|-------|------|-----------|------|
| 2    | 9.37  | 2.11 | 0.22      | 6.4  |
| 3    | 9.51  | 1.77 | 0.11      | 6.5  |
| 4    | 9.58  | 1.57 | 0.10      | 6.8  |
| 5    | 8.83  | 2.66 | 0.28      | 16.5 |
| 6    | 7.77  | 2.25 | 0.22      | 8.0  |
| 7    | 9.13  | 1.47 | 0.10      | 5.2  |
| 8    | 10.04 | 2.45 | 0.24      | 17.7 |
| 9    | 9.87  | 3.00 | 0.38      | 11.3 |
| 平均值  | 9.3   | 2.2  | 0.2       | 数据离散 |
| 拟定限度 | 11.5  | 3.0  | 量较少,未纳入标准 | 6.0  |

流速:1.0 ml/min;柱温:40 °C;检测波长:360 nm;进样量:10 μl。

## 4.2 溶液的制备

### 4.2.1 对照品溶液

精密称取芦丁对照品、金丝桃苷对照品约10 mg,加甲醇制成每1 ml含芦丁5 μg、金丝桃苷20 μg的混合溶液,作为对照品溶液。

### 4.2.2 供试品溶液

取样品粉末(过3号筛)约1 g,精密称定,置具

塞锥形瓶中,精密加甲醇50 ml,密塞,称定重量,水浴加热回流30 min,放冷,再称定重量,用甲醇补足减失的重量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

### 4.2.3 空白对照品溶液

取甲醇,即得。

## 4.3 方法学考察

### 4.3.1 系统适用性试验

在“4.1”项色谱条件下,芦丁和金丝桃苷峰形均良好,芦丁保留时间为8.857 min,金丝桃苷保留时间为10.205 min。理论塔板数均大于5 000,分离度大于1.5,见图5。

### 4.3.2 标准曲线的制备

分别精密称取芦丁和金丝桃苷对照品10.58、10.48 mg,置100 ml容量瓶中,加甲醇溶解、稀释至刻度,分别作为芦丁对照品储备溶液、金丝桃苷对照品储备液。分别精密吸取芦丁对照品储备溶液、金丝桃苷对照品储备液适量,加甲醇稀释制成含浓度分别为0.958、3.830、5.745、7.660、9.575 μg/ml的芦丁对照品溶液及浓度分别为4.889、9.788、19.556、29.334、39.112 μg/ml的金丝桃苷对照品溶液,分别进样10 μl,记录峰面积,以浓度为横坐标,以峰面积为纵坐标,绘制标准曲线,得回归方程。芦丁: $Y=6.9291X-4.5814$ ,  $r=0.9993$ ; 金丝桃苷: $Y=20.1566X-9.8695$ ,  $r=0.9997$ ; 芦丁在0.9575~9.575 μg/ml, 金丝桃苷在4.8889~39.1114 μg/ml范围内呈良好的线性关系。

### 4.3.3 精密度试验

分别精密吸取芦丁和金丝桃苷对照品混合溶液10 μl,按“4.1”项下色谱条件连续进样6次,记录芦丁、金丝桃苷峰面积。结果芦丁RSD为0.6%, 金丝桃苷RSD为0.1%。结果表明精密度良好。

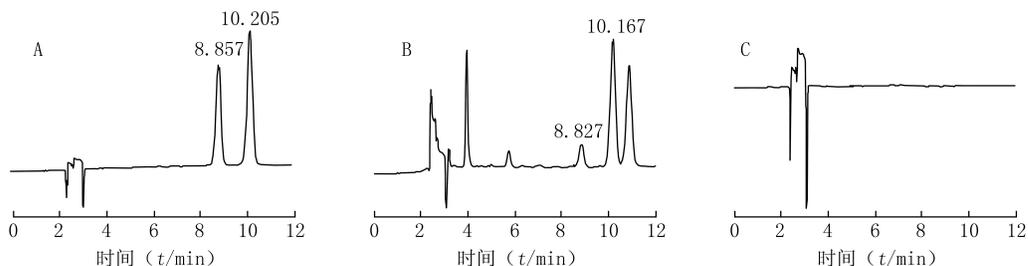


图5 红旱莲 HPLC 图

A. 对照品; B. 红旱莲供试品; C. 空白对照

#### 4.3.4 重复性试验

取5号样品,按“4.2.2”方法,平行制备6份供试品溶液,按“4.1”色谱条件测得芦丁含量为0.225 mg/g, RSD为1.6%;测得金丝桃苷含量为0.833 mg/g, RSD为1.6%。结果表明方法重复性良好。

#### 4.3.5 稳定性试验

取5号供试品溶液,分别在0、4、8、12、16、24 h各进样10 μl,记录芦丁和金丝桃苷的峰面积。结果芦丁RSD为1.00%,金丝桃苷RSD为1.02%,表明样品溶液在24 h内稳定。

#### 4.3.6 加样回收率试验

取5号样品(含量为0.833 mg/g)约0.5 g,精

密称定,共6份,分别精密加入芦丁和金丝桃苷对照品混合溶液50 ml(称取芦丁对照品11.19 mg、金丝桃苷对照品10.41 mg,分别置100 ml容量瓶中,加甲醇适量溶解并稀释至刻度。精密量取芦丁对照品溶液10 ml、金丝桃苷对照品溶液50 ml,置500 ml容量瓶中,加甲醇稀释至刻度),按照“4.2.2”项下方法制备供试品溶液,按“4.1”项下色谱条件测定,计算回收率,结果见表3。

#### 4.3.7 样品含量测定

分别取上述8批药材,按照“4.2.2”项下方法制备供试品溶液,按“4.1”项下色谱条件分别用外标法进行测定,根据相应的线性关系,含量以干燥品计算。测定结果见表4。

表3 芦丁与金丝桃苷加样回收率测定结果

| 成分   | 取样量 (m/g) | 样品含量 (m/mg) | 加入量 (m/mg) | 测得量 (m/mg) | 回收率 (%) | 平均回收率 (%) | RSD (%) |
|------|-----------|-------------|------------|------------|---------|-----------|---------|
| 芦丁   | 0.503 4   | 0.109 2     | 0.101 3    | 0.210 2    | 99.70   | 99.00     | 0.64    |
|      | 0.500 7   | 0.108 7     | 0.101 3    | 0.208 9    | 98.91   |           |         |
|      | 0.509 8   | 0.110 6     | 0.101 3    | 0.211 1    | 99.21   |           |         |
|      | 0.501 4   | 0.108 8     | 0.101 3    | 0.208 3    | 98.22   |           |         |
|      | 0.501 9   | 0.108 9     | 0.101 3    | 0.208 5    | 98.32   |           |         |
|      | 0.508 9   | 0.110 4     | 0.101 3    | 0.211 3    | 99.61   |           |         |
| 金丝桃苷 | 0.503 4   | 0.419 3     | 0.485 6    | 0.911 1    | 101.28  | 107.97    | 0.62    |
|      | 0.500 7   | 0.417 1     | 0.485 6    | 0.908 1    | 101.11  |           |         |
|      | 0.509 8   | 0.424 7     | 0.485 6    | 0.921 1    | 102.22  |           |         |
|      | 0.501 4   | 0.417 7     | 0.485 6    | 0.914 4    | 102.29  |           |         |
|      | 0.501 9   | 0.418 1     | 0.485 6    | 0.916 9    | 102.72  |           |         |
|      | 0.508 9   | 0.423 9     | 0.485 6    | 0.920 2    | 102.20  |           |         |

## 5 讨论

### 5.1 红旱莲来源与性状

《新修本草》载有鳢肠,释名旱莲草。李时珍认为:“旱莲有二种,一种苗似旋覆而花白细者,是鳢肠;一种花黄紫而结房如莲房者,乃是小莲翘也。”<sup>[4]</sup>即菊科(Compositae)植物鳢肠(*Eclipta prostrata*

L.)为墨旱莲,另一种即金丝桃科黄海棠(*Hypericum ascyron* L.)为红旱莲。现在有些地区仍将红旱莲与墨旱莲混用,统称旱莲草。两者功能不尽相同,墨旱莲滋补肝肾,凉血止血;红旱莲凉血止血,清热解毒,须分别入药。野外采集时,发现同科属植物元宝草、赶山鞭等生长于一处,极易混淆。前者与黄

(下转第467页)

- [J]. 胃肠病学和肝病杂志, 2016, 25(5): 481-484.
- [2] 张欣. 糖皮质激素治疗肝衰竭疗效及安全性的 Meta 分析[J]. 实用肝脏病杂志, 2017, 20(1): 73-77.
- [3] 中华医学会感染病学分会肝衰竭与人工肝学组, 中华医学会肝病学会重型肝病与人工肝学组. 肝衰竭诊治指南(2012年版)[J]. 中华临床感染病杂志, 2012, 5(6): 321-327.
- [4] 黄燕, 罗二平, 黄小平, 等. 糖皮质激素对乙型肝炎重症化阻断作用的临床观察[J]. 胃肠病学和肝病杂志, 2011, 20(3): 272-274.
- [5] 周超, 罗生强, 宫嫚, 等. 糖皮质激素在常见肝病治疗中的应用[J]. 胃肠病学和肝病杂志, 2015, 24(1): 15-17.
- [6] ZHANG XQ, JIANG L, YOU JP, *et al.* Efficacy of short-term dexamethasone therapy in acute-on-chronic pre-liver failure[J]. *Hepatology Res*, 2011, 41(1): 46-53.
- [7] 中华医学会肝病学会, 中华医学会消化病学分会, 中华医学会感染病学分会. 自身免疫性肝炎诊断和治疗共识(2015)[J]. 临床肝胆病杂志, 2016, 32(1): 9-22.
- [8] European Association for the Study of the Liver. EASL clinical practice guidelines: autoimmune hepatitis[J]. *J Hepatol*, 2015, 63(4): 971-1004.
- [9] 中华医学会肝病学会脂肪肝和酒精性肝病学组. 酒精性肝病诊疗指南(2010年修订版)[J]. 中华肝胆病杂志, 2010, 26(3): 229-232.
- [10] European Association for the Study of Liver. EASL clinical practical guidelines: management of alcoholic liver disease[J]. *J Hepatol*, 2012, 57(2): 399-420.
- [收稿日期] 2018-01-30 [修回日期] 2018-04-13  
[本文编辑] 李睿旻

(上接第 429 页)

表 4 红旱莲目标成分含量测定结果

| 样品编号 | 芦丁<br>(mg/g) | 金丝桃苷<br>(mg/g) |
|------|--------------|----------------|
| 2    | 0.023        | 0.069          |
| 3    | 0.017        | 0.055          |
| 4    | 0.029        | 0.077          |
| 5    | 0.217        | 0.833          |
| 6    | 0.036        | 0.099          |
| 7    | 0.041        | 0.046          |
| 8    | 0.024        | 0.316          |
| 9    | 0.042        | 0.120          |
| 平均值  | 0.054        | 0.202          |

海棠主要区别为:茎圆柱形,无四棱线;花萼、花瓣有黑色腺点;花柱头 3,分离;蒴果小,3室。元宝草叶片基部合生在一起,茎贯穿其中<sup>[5]</sup>。

收集的样品中,1号和10号样品性状与正品有很大差异。1号样品表面红棕色;茎基部圆柱形,具多纵棱,叶皱缩,多破碎;种子球形,亮黑色。10号样品表面棕褐色;叶互生,基生叶具长柄而稍抱茎,叶长椭圆形;节明显膨大。

### 5.2 TLC 条件的选择

对供试品溶液制备、薄层板、展开系统进行了优化,对温度、湿度等影响因素进行了考察。采用不同取样量(1,2 g),不同提取溶剂(60%乙醇、乙醇、甲醇)和不同提取方式(回流 30 min、超声处理 30 min)试验,确立了供试品溶液的制备方法。

在 TLC 法的建立过程中,分别对不同薄层板(聚酰胺薄膜、自制青岛海洋硅胶 G 板、Merck 硅胶 G 板),不同展开系统[甲醇-冰醋酸-水(4:1:5)、

正丁醇-甲苯-冰醋酸-水(3:2:1:1)、乙酸乙酯-丁酮-甲酸-水(5:3:1:1)],不同点样量(1、2、3、4、5、6  $\mu$ l)和不同温度及湿度(温度:25  $^{\circ}$ C,相对湿度:20%、70%;温度:5  $^{\circ}$ C、30  $^{\circ}$ C,相对湿度:45%)等 TLC 条件进行了考察、比较和优化。结果表明,本实验建立的 TLC 条件重现性好,分离效果佳。另对供试品溶液稳定性进行了考察,结果表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

### 5.3 HPLC 条件的选择

以理论板数、分离度为主要考察指标,对色谱柱、柱温、流动相、检测波长优化,确立良好的色谱分析条件。同时考察了不同品牌的液相色谱仪、不同品牌及类型的色谱柱及柱温,数据稳定。

本实验由于受收集样品数量少的局限,加之产地、采收加工、储存等原因,质量上存在较大差异,不同样品之间含量测定数据离散度大,故未能明确限度范围,待收集更多样品进行深入研究。

### 【参考文献】

- [1] 南京中医药大学. 中药大辞典(上册)[M]. 2版. 上海:上海科学技术出版社, 2006:1396-1397.
- [2] 徐国钧, 徐璐珊. 常用中药材品种整理和质量研究(第二册)[M]. 福州:福建科学技术出版社, 1997:904-905.
- [3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)2015年版[S]. 北京:中国医药科技出版社, 2015:309.
- [4] 李时珍. 本草纲目[M]. 第二册校点本. 北京:人民卫生出版社, 1977:1078-1079.
- [5] 江苏省植物研究所. 江苏植物志(下册)[M]. 南京:江苏科学技术出版社, 1982:508-509.

[收稿日期] 2018-01-08 [修回日期] 2018-05-02  
[本文编辑] 李睿旻