

反枝苋药材的质量标准研究[△]

刘享锋^{1,2*}, 王武静¹, 杨燕妮^{1,2,3}, 夏天乙^{1,2}, 钟仁兴^{1,2}, 彭明明^{1,2}, 陈莹^{1,2}, 丁子禾^{1,2}, 封帆¹, 李书渊^{1,4}, 王毅¹, 舒尊鹏^{1,2,#}(1. 广东药科大学中药学院, 广州 510006; 2. 广东药科大学广东省中药饮片规范化炮制工程技术研究中心, 广州 510006; 3. 深圳奥萨制药有限公司, 广东深圳 518057; 4. 广州华商职业学院健康医学院, 广州 511300)

中图分类号 R282 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2021)14-1741-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2021.14.13

摘要 目的:为反枝苋药材质量标准的制订提供参考。方法:以7批反枝苋药材为研究对象,对其进行外观性状及粉末特征显微观察;采用薄层色谱法(TLC)对反枝苋药材中芦丁、缬氨酸、亮氨酸进行定性鉴别,参照2015年版《中国药典》(四部)通则相关方法测定其水分、总灰分、酸不溶性灰分和水溶性浸出物含量。采用高效液相色谱法测定反枝苋药材中芦丁的含量,色谱柱为Agilent 5 TC-C₁₈(2),流动相为甲醇-0.3%磷酸溶液(40:60, V/V),检测波长为358 nm,流速为1.0 mL/min,柱温为30 ℃,进样量为10 μL。结果:药材外观性状及显微结构特征与现有描述相符。TLC鉴别结果显示,7批药材供试品色谱中,在与各对照品(芦丁、缬氨酸、亮氨酸)色谱相应的位置上均显相同颜色的斑点。7批反枝苋药材中水分的含量为7.43%~8.72%、总灰分的含量为11.82%~13.78%、酸不溶性灰分的含量为0.15%~0.55%、水溶性浸出物的含量为17.27%~24.74%。芦丁检测质量浓度的线性范围为10~200 μg/mL($R^2=1.0000$);精密性、稳定性(24 h)、重复性试验的RSD均小于2.0%($n=6$);低、中、高质量浓度样品中芦丁的平均加样回收率分别为99.14%、97.98%、98.80%,RSD分别为0.97%、0.95%、0.96%($n=3$)。7批反枝苋药材中芦丁的含量为0.314~1.102 mg/g。结论:本研究对反枝苋药材进行了性状观察、显微鉴别以及水分、总灰分、酸不溶性灰分和水溶性浸出物含量等检查项的考察,并建立了反枝苋药材中亮氨酸、缬氨酸和芦丁定性鉴别的TLC法以及芦丁含量测定的HPLC法,可为反枝苋药材质量标准的制订提供一定参考。

关键词 反枝苋;质量标准;显微观察;水分;总灰分;水溶性浸出物;芦丁;薄层色谱;含量测定

Study on Quality Standard for *Amaranthus retroflexus*

LIU Xiangfeng^{1,2}, WANG Wujing¹, YANG Yanni^{1,2,3}, XIA Tianyi^{1,2}, ZHONG Renxing^{1,2}, PENG Mingming^{1,2}, CHEN Ying^{1,2}, DING Zihe^{1,2}, FENG Fan¹, LI Shuyuan^{1,4}, WANG Yi¹, SHU Zunpeng^{1,2}(1. School of Traditional Chinese Medicine, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China; 2. Guangdong Standardized Processing Engineering Technology Research Center of TCM Decoction Pieces, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China; 3. Shenzhen AUSA Pharmaceutical Co., Ltd., Guangdong Shenzhen 518057, China; 4. Health Medical College of Guangzhou Huashang Vocational College, Guangzhou 511300, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To provide reference for the quality standard establishment of *Amaranthus retroflexus*. METHODS: Taking 7 batches of *A. retroflexus* medicinal materials as the research object, the appearance properties of the medicinal materials were investigated, and the microscopic characteristics of the medicinal powders were observed. TLC method was adopted to qualitatively identify rutin, valine and leucine in *A. retroflexus* medicinal materials. According to the relevant methods of the 2015 edition of *Chinese Pharmacopoeia* (part IV), water content, total ash content, acid-insoluble ash content and water-soluble extract content were determined. HPLC method was used to determine the content of rutin in the medicinal material of *A. retroflexus*. The determination was performed on Agilent 5 TC-C₁₈(2) column with mobile phase consisted of methanol-0.3% phosphoric acid solution (40:60, V/V), at the flow rate of 1.0 mL/min. The detection wavelength was set at 358 nm, and the column temperature was 30 ℃. The sample size was 10 μL. RESULTS: The appearance and microstructure characteristics of the medicinal materials were consistent with the existing description. The identification results of TLC method showed that 7 batches of medicinal materials

and each reference substance (rutin, valine, leucine) showed spots of the same color at the same position. The moisture content of 7 batches of *A. retroflexus* medicinal materials was 7.43%-8.72%, the total ash content was 11.82%-13.78%, the acid-insoluble ash content was 0.15%-0.55%, and the water-soluble extract content was 17.27%-24.74%. The linear range of

△ 基金项目:内蒙古药材标准研究课题(No.HTDJ2019056)

* 硕士研究生。研究方向:中药(复方)药效物质基础与作用机制及新药开发。E-mail:411085767@qq.com

通信作者:副教授,硕士生导师,博士。研究方向:中药(复方)药效物质基础与作用机制及新药开发。电话:020-39353119。E-mail:shuzunpeng2010@163.com

rutin was 10-200 $\mu\text{g/mL}$ ($R^2=1.0000$). RSDs of precision test, stability test (24 h) and repeatability test were all less than 2.0% ($n=6$). The average recovery rates of rutin were 99.14%, 97.98% and 98.80% in low, medium and high concentration of samples, and RSDs were 0.97%, 0.95%, 0.96% ($n=3$). The contents of rutin in 7 batches of *A. retrophylla* were 0.314-1.102 mg/g. CONCLUSIONS: In this study, character observation, microscopic identification, moisture content, total ash content, acid-insoluble ash content and water-soluble extract content of *A. retroflexus* are investigated; TLC method was established for qualitative identification of leucine, valine and rutin in *A. retroflexus*, and the HPLC method was established for content determination of rutin. It provides reference for the quality standard establishment of *A. retroflexus*.

KEYWORDS *Amaranthus retroflexus*; Quality standard; Microscopic observation; Moisture; Total ash; Water-soluble extract; Rutin; TLC; Content determination

反枝苋为苋科植物反枝苋 *Amaranthus retroflexus* L. 的干燥全草,于春、夏、秋季采收,主要分布于我国东北、华北以及沿长江流域的各省份^[1]。其味甘,性微寒,归大肠、小肠经,具有祛风湿、清肝火的作用,用于目赤肿痛、翳障和高血压的治疗^[2]。反枝苋主要含黄酮、皂苷、生物碱以及甾醇类化合物,具有抗菌、抗炎、抗氧化、抑瘤生长、降血脂、降低胆固醇等生物活性^[3-4]。反枝苋是一种民间沿用历史悠久的药用植物,《神农本草经》《食疗本草》《唐本草》《滇南本草》均对其有所记载^[5]。因学名的不同,反枝苋也作为蒙药“阿日白-淖高”被收载于《内蒙古植物志》中,且已被广泛使用于蒙医临床。然而,目前还未有反枝苋的相关质量标准,不足以指导该药在临床上的合理与规范使用。基于此,本研究根据反枝苋的特点^[6-8],使用显微镜及薄层色谱法对其进行鉴别,测定其水分、总灰分、酸不溶性灰分和水溶性浸出物含量,并采用高效液相色谱法(HPLC)测定反枝苋药材中重要黄酮类成分芦丁的含量,为反枝苋药材质量标准的制订提供参考。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用的主要仪器有 LC-20AT 型 HPLC 仪(日本 Shimadzu 公司)、GL124-1SCN 型电子天平[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司]、SB25-12DT 型超声波清洗器(宁波新芝生物科技股份有限公司)、WFH-203B 型三用紫外分析仪(上海驰唐电子有限公司)、DSZ2000X 型倒置生物显微镜(重庆澳浦光电技术有限公司)、LDO-101-1 型电热恒温鼓风干燥箱(上海龙跃仪器设备有限公司)、RE-52AA 型旋转蒸发器(上海振捷实验设备有限公司)、SHH.W21.420 型智能恒温水箱(北京市长风仪器仪表公司)等。

1.2 主要药品与试剂

7 批反枝苋药材均由内蒙古蒙医药工程技术研究院团队采摘并提供,由黑龙江中医药大学中药资源教研室王振月教授鉴定均为苋科植物反枝苋 *A. retroflexus* L. 的

干燥全草。反枝苋药材的来源信息见表 1。芦丁对照品(批号 100080-201811,纯度 91.7%)购自中国食品药品检定研究院;亮氨酸对照品(批号 L-037-171216,纯度 > 98%)、缬氨酸对照品(批号 X-056-161216,纯度 > 98%)均购自成都生物科技有限公司;硅胶 G 购自青岛海洋化工有限公司;D101 大孔吸附树脂(20~60 目)购自江苏东鸿化工有限公司;甲醇为色谱纯,磷酸、乙醇、盐酸等试剂均为分析纯或实验室常用规格,水为超纯水。

表 1 反枝苋药材的来源信息

Tab 1 Source information of *A. retroflexus*

编号	品名	批号	产地
1	反枝苋	201910121	内蒙古锡林郭勒盟西乌珠穆沁旗
2	反枝苋	201910122	内蒙古通辽市奈曼旗青龙山镇
3	反枝苋	201910123	内蒙古锡林浩特市
4	反枝苋	201910124	内蒙古赤峰市巴林右旗索博日嘎镇
5	反枝苋	201910125	内蒙古兴安盟科右中旗新佳木苏木
6	反枝苋	201910126	内蒙古通辽市左旗阿古拉镇
7	反枝苋	201910127	内蒙古海拉尔新巴尔虎左旗木达阿木吉

2 方法与结果

2.1 鉴别

2.1.1 性状鉴别

本品根呈圆锥形,类白色或者淡黄色。茎长 20~80 cm,具有钝棱、叶痕以及细毛。叶互生,有长柄;叶片呈菱状卵形或者椭圆状卵形,叶长 5~12 cm,宽 2~5 cm,先端渐尖,有小芒尖,基部楔形,全缘或波状缘,叶柄长 1.5~3 cm,两面及边缘有柔毛。穗状花序集成圆锥状,苞片呈披针状锥型,细尖头,背面有突起,先端有白色针芒,花被片 5,长圆形或者倒披针形,透明膜状,有一淡绿色中脉。种子扁圆形或近球形,黑色,直径小于 1 mm,有光泽。气微,味淡。反枝苋药材图见图 1。

2.1.2 显微鉴别

本品粉末呈黄绿色。显微观察可见纤维有厚壁和薄壁两种,厚壁纤维纹孔不明显,薄壁纤维纹孔明显。导管主要由网纹导管(长约 0.1~0.3 mm)和螺旋导管(长约 0.18 mm)组成。非腺毛由多个细胞组成,顶端细胞呈圆形,长约 0.14 mm。种皮细胞呈多角形,红棕色,

大小约为 $200\ \mu\text{m} \times 80\ \mu\text{m}$ 。叶表面气孔为类圆形, 不等式。草酸钙簇晶众多, 大小不一, 棱角稍钝。反枝苋药材粉末的显微鉴别图见图2。



图1 反枝苋药材图(编号2)

Fig 1 Picture of *A. retroflexus*(No. 2)

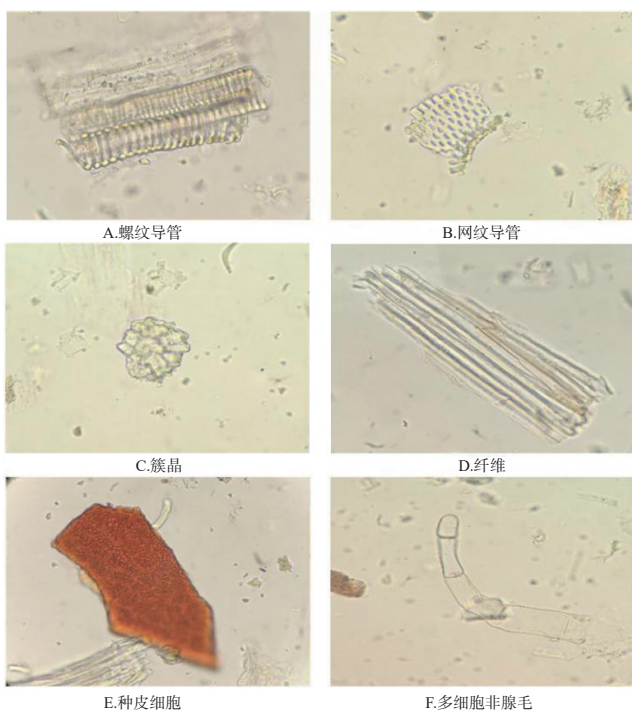


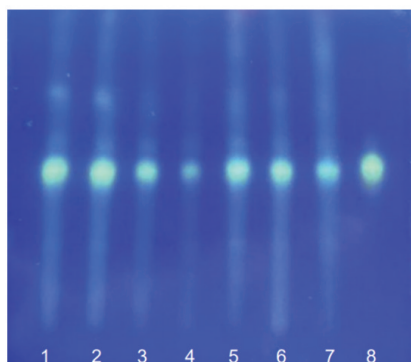
图2 反枝苋药材粉末的显微鉴别图($\times 400$)

Fig 2 Microscopic identification of *A. retroflexus* powder($\times 400$)

2.1.3 薄层色谱鉴别

(1) 芦丁薄层色谱鉴别。取本品粉末1 g, 加50%甲醇25 mL, 超声(频率40 kHz, 功率600 W)处理30 min, 滤过, 滤液蒸干。残渣加水2 mL使溶解后, 上样D101大孔吸附树脂柱(内径1.5 cm、柱高10 cm), 用水洗脱, 当洗脱至无色时换用15%乙醇200 mL洗脱, 弃去洗脱液; 继续用30%乙醇100 mL洗脱, 收集洗脱液, 蒸干; 残渣加甲醇2 mL使溶解, 作为供试品溶液^[9]。另取芦丁对照品适量, 加甲醇溶解并制成每1 mL含芦丁1 mg的对照品溶液。按照2015年版《中国药典》(四部)通则“0502薄层色谱法”进行实验^[11]。吸取上述供试品溶液3 μL 、

对照品溶液1 μL , 分别点样于同一硅胶G薄层板上, 以乙酸乙酯-甲酸-水(6:1:1, $V/V/V$)为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 喷以三氯化铝试液, 在105 $^{\circ}\text{C}$ 加热至斑点显色清晰, 置于紫外灯(波长为365 nm)下检视。结果, 供试品色谱中, 在与对照品色谱相应的位置上, 显相同颜色的荧光斑点。芦丁鉴别的薄层色谱图见图3。



注: 1~7为供试品(编号1~7); 8为芦丁对照品

Note: 1-7 mean test samples (No. 1-7); 8 means rutin reference substance

图3 芦丁鉴别的薄层色谱图

Fig 3 TLC chromatogram of rutin

(2) 氨基酸薄层色谱鉴别。取本品粉末1 g, 加50%甲醇25 mL, 超声(频率40 kHz, 功率600 W)处理30 min, 放冷, 摇匀, 滤过, 滤液蒸干。残渣加甲醇2 mL使溶解, 作为供试品溶液。另取亮氨酸、缬氨酸对照品各适量, 分别加甲醇溶解并制成质量浓度均为1 mg/mL的对照品溶液。按照2015年版《中国药典》(四部)通则“0502薄层色谱法”进行实验^[10]。吸取上述溶液各1 μL , 分别点样于同一硅胶G薄层板上, 以正丁醇-冰乙酸-水-2%茛三酮乙醇溶液(3:1:1:0.25, $V/V/V/V$)为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 在105 $^{\circ}\text{C}$ 加热至斑点显色清晰, 置于日光下检视。结果, 供试品色谱中, 在与对照品色谱相应的位置上, 显相同颜色的斑点。氨基酸鉴别的薄层色谱图见图4。

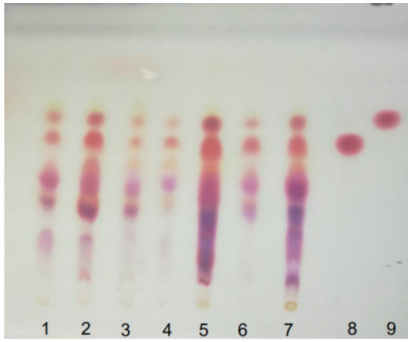
2.2 检查

2.2.1 水分含量测定

精密称取7批反枝苋药材粉末(过二号筛)各约2 g, 按照2015年版《中国药典》(四部)通则“0832水分测定法”的第二法——烘干法进行测定^[10], 每批样品重复测定3次, 取平均值。结果, 7批样品中水分的含量为7.43%~8.72%, 平均含量为8.07%。反枝苋药材中水分含量测定结果见表2。

2.2.2 总灰分和酸不溶性灰分含量测定

精密称取7批反枝苋药材粉末(过二号筛)各约2 g, 按照2015年版《中国药典》(四部)通则“2302灰分测定



注:1~7为供试品(编号1~7);8为缬氨酸对照品;9为亮氨酸对照品

Note: 1-7 mean test samples (No. 1-7); 8 means valine substance control; 9 means leucine substance control

图4 氨基酸鉴别的薄层色谱图

Fig 4 TLC chromatogram of amino acids

表2 反枝苋药材中水分、总灰分、酸不溶性灰分和水溶性浸出物含量测定结果($n=3, \%$)

Tab 2 Results of content determination of moisture, total ash, acid insoluble ash and water-soluble extract in *A. retroflexus* ($n=3, \%$)

编号	水分	总灰分	酸不溶性灰分	水溶性浸出物
1	8.72	13.32	0.33	24.74
2	7.75	12.27	0.32	19.89
3	7.70	12.71	0.34	22.19
4	7.43	12.70	0.15	17.88
5	8.39	13.78	0.55	24.69
6	8.06	11.82	0.46	17.27
7	8.42	12.75	0.40	20.92

法”进行测定^[10],每批样品重复测定3次,取平均值。结果,7批样品中总灰分含量为11.82%~13.78%,平均含量为12.76%;7批样品中酸不溶性灰分的含量为0.15%~0.55%,平均含量为0.36%。反枝苋药材中总灰分和酸不溶性灰分含量测定结果见表2。

2.2.3 水溶性浸出物含量测定

精密称取7批反枝苋药材粉末(过二号筛)各约3g,按照2015年版《中国药典》(四部)通则“2201 浸出物测定”项下的热浸法进行测定^[10],每批样品重复测定3次,取平均值。结果,7批样品中水溶性浸出物含量为17.27%~24.74%,平均含量为21.08%。反枝苋药材中水溶性浸出物含量测定结果见表2。

2.3 芦丁含量测定

2.3.1 供试品溶液的制备

取本品粉末(过三号筛)约1g,精密称定,置于具塞锥形瓶中,精密加入甲醇25mL,称定质量,超声(频率40kHz,功率600W)处理40min,冷却;再次称定质量,用甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.3.2 对照品溶液的制备

取芦丁对照品适量,精密称定,加甲醇溶解并制成

每1mL含芦丁0.2mg的对照品溶液,即得。

2.3.3 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱为Agilent 5 TC-C₁₈(2)(250mm×4.6mm,5μm);流动相为甲醇-0.3%磷酸溶液(40:60, V/V);检测波长为358nm;流速为1.0mL/min;柱温为30℃;进样量为10μL。分别取“2.3.1”项下供试品溶液、“2.3.2”项下对照品溶液以及空白溶液(甲醇),按上述色谱条件进样测定,记录色谱图。结果,待测成分色谱峰与相邻色谱峰的分离度>1.5,理论板数按芦丁计不低于3000,且空白溶液对测定无干扰,表明该方法的专属性较好。系统适用性试验的高效液相色谱图见图5。

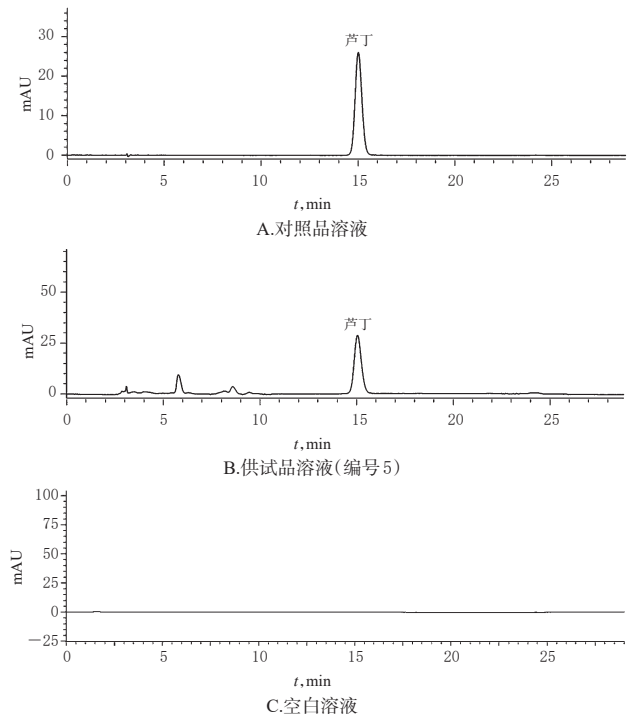


图5 系统适用性试验的高效液相色谱图

Fig 5 HPLC chromatograms of system suitability tests

2.3.4 线性关系考察

精密量取“2.3.2”项下芦丁对照品溶液0.5、1.0、2.5、5.0、7.5、10mL,分别置于10mL量瓶中,用甲醇稀释至刻度,摇匀,按“2.3.3”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以峰面积(y)为纵坐标、对照品质量浓度(x, μg/mL)为横坐标进行线性回归,得到芦丁的回归方程为 $y=14851x+270.36$ ($R^2=1.0000$),表明芦丁在质量浓度10~200μg/mL范围内与其峰面积呈良好的线性关系。

2.3.5 精密度的考察

取“2.3.4”项下同一份芦丁对照品溶液(100μg/mL),按“2.3.3”项下色谱条件连续进样6次,记录峰面积。结果,芦丁峰面积的RSD为0.12% ($n=6$),表明仪器精密度良好。

2.3.6 稳定性试验

取同一份供试品溶液(编号6),分别于室温放置0、

2、4、6、12、24 h时按“2.3.3”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,芦丁峰面积的RSD为0.65% ($n=6$),表明该供试品溶液在室温24 h内稳定。

2.3.7 重复性试验

取同一批样品(编号1),按“2.3.1”项下方法平行制备6份供试品溶液,再按“2.3.3”项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并采用外标法计算其含量。结果,芦丁的平均含量为0.887 mg/g, RSD为0.91% ($n=6$),表明本方法重复性良好。

2.3.8 加样回收率试验

取9份已知芦丁含量的样品粉末(编号3),每份约0.5 g,精密称定,分别按样品已知量的50%、100%、150%加入芦丁对照品溶液,每个浓度平行3份,按“2.3.1”项下方法制备供试品溶液,再按“2.3.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算加样回收率。结果,低、中、高质量浓度供试品溶液中芦丁的平均加样回收率分别为99.14%、97.98%、98.80%, RSD分别为0.97%、0.95%、0.96% ($n=3$),表明本方法的准确度较好。加样回收率试验结果见表3。

表3 加样回收率试验结果($n=3$)

Tab 3 Results of recovery tests($n=3$)

序号	取样量,g	已知量,mg	加入量,mg	测得量,mg	加样回收率,%	平均回收率,%	RSD,%
1	0.502 2	0.355 2	0.178 4	0.533 3	99.83	99.14	0.97
2	0.502 3	0.355 3	0.178 4	0.530 2	98.04		
3	0.502 4	0.355 3	0.178 4	0.532 9	99.55		
4	0.502 1	0.355 3	0.356 8	0.702 5	97.31	97.98	0.95
5	0.502 4	0.355 1	0.356 8	0.703 3	97.59		
6	0.502 3	0.355 3	0.356 8	0.708 7	99.05		
7	0.502 1	0.355 1	0.535 1	0.887 0	99.40	98.80	0.96
8	0.502 0	0.355 1	0.535 1	0.877 9	97.70		
9	0.502 1	0.355 1	0.535 1	0.886 4	99.29		

2.3.9 样品含量测定

分别取7批样品粉末(过三号筛)各约0.5 g,精密称定,每批药材平行称定2份,分别按“2.3.1”项下方法制备供试品溶液,再按“2.3.3”项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并采用外标法计算样品中芦丁含量,取平均值。结果,编号1~7的样品中芦丁的平均含量依次为0.886、1.102、0.707、0.342、0.837、0.923、0.314 mg/g。

3 讨论

3.1 药材鉴别与检查

为了更好地鉴别药材的基原,本课题组首先对7批反枝苋药材的性状和显微特征进行了鉴别。结果显示,7批反枝苋药材的性状与《中国植物志(第二十五卷:第二分册)》^[9]及文献[3]所描述的一致。在显微鉴别中,可明显地观察到螺纹导管和网纹导管;也可观察到红棕色的种皮细胞,且随处可见多细胞非腺毛以及镶嵌于叶肉

细胞的草酸钙簇晶,与现有文献记载的显微鉴别特征相一致^[3]。前人对反枝苋药材有过单独的显微鉴别,但有关其水分、总灰分、酸不溶性灰分和水溶性浸出物含量等检查项并未见相关报道,故本研究考察了上述检查项,结果测得7批样品中水分、总灰分、酸不溶性灰分和水溶性浸出物的平均含量分别为8.07%、12.76%、0.36%和21.08%。

3.2 定性和定量分析指标成分的选择

据现有研究报道,反枝苋药材中富含蛋白质、维生素、脂肪酸等多种成分,且含有8种人体无法合成的必需氨基酸^[2,11]。本课题组前期对反枝苋药材中的氨基酸进行了薄层色谱鉴别,发现亮氨酸、缬氨酸的斑点较为明显,便于定性鉴别。同时,现有研究证实,亮氨酸和缬氨酸能够协同发挥修复肌肉、控制血糖、供能等作用,是人体内必不可少的氨基酸^[12]。因此,本课题组最终选择亮氨酸和缬氨酸作为薄层鉴别的指标成分。而后,笔者通过查阅文献发现,反枝苋中黄酮类成分含量较高^[13]。芦丁作为黄酮类成分的代表,具有抗炎、抗氧化、抗过敏、抗病毒等功效^[14]。因此,本课题组选取芦丁同时作为反枝苋药材薄层色谱鉴别和HPLC含量测定的指标成分。

3.3 薄层色谱条件的选择

在芦丁的薄层色谱鉴别研究中,前期笔者先以甲醇为溶剂进行芦丁提取,然后分别以乙酸乙酯-水-冰乙酸(5:2:1.5, V/V/V)和乙酸乙酯-甲醇-水-甲酸(9:2:1:0.1, V/V/V/V)为展开剂展开,发现所得色谱图均有严重的拖尾现象。后经多次实验摸索后发现,这可能是样品前处理方法不当所致。经查阅文献[9]后,笔者将上述所得的芦丁甲醇提取液上样D101大孔吸附树脂柱,然后分别以水、15%乙醇200 mL、30%乙醇100 mL进行梯度洗脱,以甲醇为溶剂对30%乙醇洗脱部位进行芦丁提取,再以乙酸乙酯-甲酸-水(6:1:1, V/V/V)为展开剂展开,所得色谱图的斑点清晰、圆整,分离效果较好。在氨基酸的薄层色谱鉴别研究中,笔者参考文献[15-16],分别以正丁醇-冰乙酸-水(4:1:1, V/V/V)、0.2%茛三酮正丁醇溶液-冰乙酸-水(6:2.2:1, V/V/V)和正丁醇-冰乙酸-水-2%茛三酮乙醇溶液(3:1:1:0.25, V/V/V/V)为展开剂进行展开。结果发现,以正丁醇-冰乙酸-水-2%茛三酮乙醇溶液(3:1:1:0.25, V/V/V/V)为展开剂时,所得色谱图的斑点明显且分离效果最好。并且,笔者后续通过考察其在不同厂家硅胶G板[青岛海洋化工有限公司的硅胶G板、烟台江友硅胶开发有限公司的预制硅胶G板、实验室硅胶G自制板(硅胶G购自青岛海洋化工有限公司)]、不同湿度(32%、58%、72%)、不同温度(4、25、

35 ℃)下的展开效果,发现与本研究上述结果并无明显差别,提示该方法的耐用性较好。

3.3 HPLC 测定条件的选择

在HPLC测定过程中,笔者对供试品溶液的提取方法(超声和回流提取)、提取溶剂(甲醇、75%甲醇、50%甲醇、乙醇、75%乙醇、50%乙醇)及提取时间(30、40、50、60、90 min)等进行了考察。结果,以甲醇为溶剂超声提取40 min为制备供试品溶液的最优提取方法。接着,笔者分别对不同流动相[甲醇-0.1%磷酸溶液(45:55, *V/V*)、甲醇-0.3%磷酸溶液(40:60, *V/V*)、甲醇-0.3%磷酸溶液(65:35, *V/V*)、甲醇-0.5%磷酸溶液(45:55, *V/V*)、甲醇-0.5%磷酸溶液(55:45, *V/V*)、甲醇-0.5%磷酸溶液(60:40, *V/V*)]和不同柱温(25、30 ℃)进行了考察。结果,以流动相为甲醇-0.3%磷酸溶液(40:60, *V/V*)、柱温为30 ℃时,可得到保留时间适宜、色谱峰分离度更佳的色谱图,故最终选择此条件作为检测条件。而后,笔者通过观察色谱图及光谱图发现,芦丁在254、358 nm波长处均有吸收,但当检测波长为358 nm时,色谱图的基线更平稳、色谱峰分离度更好。因此,本研究最终选择358 nm作为检测波长。且方法学考察结果显示,本文所建方法符合含量测定要求。

综上所述,本研究对反枝苋进行了性状观察、显微鉴别以及水分、总灰分、酸不溶性灰分和水溶性浸出物含量等检查项的考察,并建立了反枝苋中亮氨酸、缬氨酸和芦丁的薄层色谱定性鉴别方法以及芦丁的HPLC定量测定方法,可为反枝苋药材质量标准的制订提供一定的实验参考。然而,因本研究中所用的样本批次、数量均较少,故暂未对各定量指标的限度进行初步拟定,后续仍需采用更多的不同产地的样本进行进一步研究。

参考文献

[1] 马毓泉.内蒙古植物志:第二卷[M].2版.呼和浩特:内蒙古人民出版社,1989:322.
[2] 豆文科.反枝苋化学成分的提取分离与结构鉴定[D].长

春:吉林大学,2012.

[3] 朱爱丽,张洁.反枝苋的生药鉴别[J].中药材,2015,38(2):287-289.
[4] 顾勇,梁佩芳,丁骁,等.苋科植物化学成分的研究进展[J].天然产物研究与开发,2008(5):910,944-948.
[5] 夏克波.反枝苋化学成分的提取鉴别与含量测定[D].长春:吉林大学,2010.
[6] 秦涛,吴培,李巧巧.维吾尔药帕卡·优普日密克及其伪品反枝苋的鉴别[J].中国民族医药杂志,2018,24(5):41-42.
[7] 国家中医药管理局中华本草编委会.中华本草:第六卷[M].上海:上海科学技术出版社,1999:844-845.
[8] 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:第二分册[M].北京:科学出版社,1979:208-210.
[9] 王长青,杨丽莹,李书渊,等.尖嘴林檎叶药材质量标准的初步研究[J].广东药学院学报,2013,29(6):612-614.
[10] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:四部[S].2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:57,104,202,204.
[11] 曾颖.反枝苋化学成分及其生物活性的研究[D].长春:吉林大学,2008.
[12] 王镜岩,朱圣庚,徐长法.生物化学教程[M].北京:高等教育出版社,2008:17.
[13] FIORITO S, EPIFANO F, PALMISANO R, et al. A re-investigation of the phytochemical composition of the edible herb *Amaranthus retroflexus* L.[J]. J Pharm Biomed Anal, 2017, 143:183-187.
[14] 臧志和,曹丽萍,钟铃.芦丁药理作用及制剂的研究进展[J].医药导报,2007,26(7):758-760.
[15] 陈春丽,马晓丽,谢湘云,等.哈药别克参中氨基酸成分薄层鉴别及测定[J].中成药,2014,36(9):1915-1920.
[16] 李晓艳,努尔麦麦提·阿卜力孜,孙莲.桑枝中三种氨基酸成分的薄层鉴别[J].新疆医科大学学报,2018,41(2):234-236.

(收稿日期:2021-01-28 修回日期:2021-06-16)

(编辑:林 静)

《中国药房》杂志——RCCSE 中国核心学术期刊,欢迎投稿、订阅