

# RP-HPLC法测定不同产地杉寄生药材中落新妇苷和芦丁的含量<sup>△</sup>

梁可\*, 申茹, 蔡燕瑜, 谢晓梅, 黄楚敏, 陈文<sup>#</sup>(惠州卫生职业技术学院药学系, 广东惠州 516025)

中图分类号 R284.2;R284.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)13-1769-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.13.10

**摘要** 目的:建立同时测定杉寄生药材中2种黄酮类成分落新妇苷和芦丁含量的反相高效液相色谱(RP-HPLC)法,并比较不同产地药材中2种成分的含量。方法:色谱柱为SHISEIDO-SPOLAR C<sub>18</sub>,流动相为乙腈-0.1%磷酸溶液(14:86, V/V),流速为1.0 mL/min,检测波长为291 nm,柱温为35 ℃,进样量为10 μL;对来源于广西和广东6个市/县的杉寄生药材进行含量测定及比较分析。结果:落新妇苷和芦丁的检测质量浓度线性范围分别为22~440、12~240 μg/mL(*r*分别为0.999 6、0.999 1),平均加样回收率分别为99.44%、99.96%(RSD分别为1.38%、1.50%, *n*=9);杉寄生中落新妇苷含量在各省/区及各市/县之间均相似(0.862 5~0.901 1 mg/g),芦丁含量在同一省/区的市/县间相似,但在2个省/区之间差异较大(平均值分别为0.431 3、0.214 9 mg/g)。结论:本法简便、准确、稳定、重现性好,可用于杉寄生药材的质量控制。

**关键词** 杉寄生;落新妇苷;芦丁;反相高效液相色谱法;含量测定;产地

## Content Determination of Astilbin and Rutin in *Macrosolen cochinchinensis* from Different Producing Areas by RP-HPLC

LIANG Ke, SHEN Ru, CAI Yanyu, XIE Xiaomei, HUANG Chumin, CHEN Wen (Dept. of Pharmacy, Huizhou Health Sciences Polytechnic, Guangdong Huizhou 516025, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To establish RP-HPLC method for simultaneous determination of astilbin and rutin in *Macrosolen cochinchinensis*, and to compare the contents of 2 components in medicinal material from different producing areas. METHODS: The determination was performed on SHISEIDO-SPOLAR C<sub>18</sub> column with mobile phase consisted of acetonitrile-0.1% phosphoric acid (14:86, V/V) at the flow rate of 1.0 mL/min. The detection wavelength was set at 291 nm, and column temperature was 35 ℃, the sampling volume is 10 μL. Content determination and comparative analysis of *M. cochinchinensis* from 6 counties of Guangxi and Guangdong were conducted. RESULTS: The linear range of astilbin and rutin were 22-440 μg/mL (*r*=0.999 6) and 12-240 μg/mL (*r*=0.999 1); average recoveries were 99.44% (RSD=1.38%, *n*=9) and 99.96% (RSD=1.50%, *n*=9). The contents of astilbin in *M. cochinchinensis* were similar between provinces/autonomous region or among cities/counties (0.862 5-0.901 1 mg/g); the contents of rutin were similar among cities/counties in same provinces/autonomous region but there was a great difference between provinces/autonomous region (average values were 0.431 3, 0.214 9 mg/g). CONCLUSIONS: This method is simple, accurate, stable and reproducible for the quality control of *M. cochinchinensis*.

**KEYWORDS** *Macrosolen cochinchinensis*; Astilbin; Rutin; RP-HPLC; Content determination; Producing area

杉寄生药材为桑寄生科植物鞘花[*Macrosolen cochinchinensis* (Lour.) Van Tiegh.]的茎枝,收载于《中华本草》,具有祛风湿、补肝肾、活血止痛、止咳、止痢的功效,主要分布于华南、西南地区,为民间和临床常用中药<sup>[1]</sup>。目前对该药材的研究主要为性状、显微及成分分析,对其有效成分的含量测定及药材质量标准的相关研究较少,故有关其质量控制的研究意义更大。

杉寄生药材中黄酮类成分主要为落新妇苷和芦丁<sup>[2-3]</sup>。研究表明,落新妇苷具有选择性免疫抑制作用、

调节脂肪及胆固醇代谢作用<sup>[4]</sup>,以及抗炎、利尿、镇痛等作用<sup>[5]</sup>;芦丁具有抗心肌缺氧、缺血、降低血清胆固醇、抑制血小板集聚、抗炎、抗过敏、抗病毒和增强免疫力等活性作用<sup>[6]</sup>,这2种成分的活性与杉寄生的功效密切相关。因此,笔者在本文中建立了同时测定杉寄生中落新妇苷和芦丁含量的反相高效液相色谱(RP-HPLC)法,并对来源于不同产地的6批杉寄生药材进行分析与比较,为有效控制杉寄生药材的质量提供依据。

### 1 材料

#### 1.1 仪器

1260 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司);PS-40A 超声仪(深圳市科洁超声科技有限公司);FA2004N 万分之一电子天平(上海青海仪器有限公司);HH-8 数显恒温水浴锅(江苏金坛市环宇科学仪器厂)。

#### 1.2 药品、对照品与试剂

<sup>△</sup>基金项目:广东省省级科技计划项目(No.2017A070712003);

广东大学生科技创新培育专项资金项目(No.pdjh2016b0736)

\* 讲师,硕士。研究方向:药物分析与质量标准。电话:0752-2366800。E-mail:17497108@qq.com

# 通信作者:高级讲师,硕士。研究方向:天然药物的开发与应用。电话:0752-2366777。E-mail:591905673@qq.com

落新妇苷对照品(批号:160604,纯度:≥98%)、芦丁对照品(批号:170322,纯度:≥98%)均来源于北京世纪奥科生物技术有限公司;6批杉寄生药材分别收集于广西河池(批号:20161115)、广西南宁(批号:20161203)、广西桂林(批号:20170211)、广东和平(批号:20161002)、广东博罗(批号:20161005)、广东梅县(批号:20161112),经惠州卫生职业技术学院中药教研室祁银德副教授鉴定为桑寄生科植物鞘花的干燥茎枝;甲醇、乙腈均为色谱纯,水为超纯水,磷酸为分析纯。

## 2 方法与结果

### 2.1 药材提取工艺优化

采用正交试验筛选药材提取方法,制备供含量测定用的供试品溶液,以甲醇为提取溶剂。

2.1.1 正交试验 参考文献[7-12]以及在预试验基础上,精密称定来源于广西河池的杉寄生药材粉末(过三号筛)2 g,置于具塞锥形瓶中,选用超声提取法,以溶剂体积分数(A)、液料比(B)、提取次数(C)和提取时间(D)为考察因素,按 $L_9(3^4)$ 正交表设计试验。将各试验号所得滤液合并,蒸干,残渣用甲醇溶解,定容至10 mL量瓶中,滤过,取续滤液按“2.2”项下色谱条件测定含量。

以落新妇苷和芦丁含量为考察指标进行综合评分,由于落新妇苷的生物活性<sup>[4]</sup>与杉寄生功效更为吻合,且前期试验显示落新妇苷提取率更高,故评分时设定落新妇苷含量的权重为0.7、芦丁含量的权重为0.3。因素与水平见表1,正交试验设计与结果见表2,方差分析结果见表3。

表1 因素与水平

Tab 1 Factors and levels

水平	因素			
	A, %	B, mL/g	C	D, min
1	50	10:1	1	30
2	70	12:1	2	45
3	100	15:1	3	60

表2 正交试验设计与结果

Tab 2 Orthogonal experiment design and results

试验号	A	B	C	D	落新妇苷含量,mg/g	芦丁含量,mg/g	综合评分
1	1	1	1	1	0.317 7	0.395 0	0.340 9
2	1	2	2	2	0.785 0	0.460 8	0.687 7
3	1	3	3	3	0.947 2	0.414 2	0.787 3
4	2	1	2	3	0.754 5	0.410 2	0.651 2
5	2	2	3	1	0.850 5	0.521 6	0.751 8
6	2	3	1	2	0.586 8	0.429 7	0.539 7
7	3	1	3	2	0.713 5	0.250 9	0.574 7
8	3	2	1	3	0.456 9	0.212 8	0.383 6
9	3	3	2	1	0.583 7	0.267 3	0.488 8
$K_1$	0.605	0.522	0.421	0.527			
$K_2$	0.648	0.608	0.609	0.601			
$K_3$	0.482	0.605	0.705	0.607			
$R$	0.166	0.086	0.284	0.080			

由表2和表3可知,各因素的影响大小依次为 $C > A > B > D$ ,即提取次数对综合评分影响最大,其次为溶

剂体积分数和液料比,提取时间影响最小。考虑操作的方便与效率,选择最优提取工艺为 $A_2B_3C_3D_2$ ,即以70%甲醇为提取溶剂,12倍量超声提取3次,每次45 min。

表3 方差分析结果

Tab 3 Results of variance analysis

因素	偏差平方和	自由度	F比	F临界值
A	0.044	2	3.667	19.000
B	0.014	2	1.167	19.000
C	0.125	2	10.417	19.000
D	0.012	2	1.000	19.000
误差	0.01	2		

2.1.2 验证试验 称取同一批药材粉末约2 g,3份,精密称定,按最优提取工艺进行验证试验,结果显示该提取工艺条件稳定可靠、重现性好。验证试验结果见表4。

表4 验证试验结果( $n=3$ )

Tab 4 Results of verification test( $n=3$ )

编号	药材量,g	落新妇苷		芦丁	
		含量,mg/g	RSD, %	含量,mg/g	RSD, %
1	2.001 4	0.860 5	1.13	0.436 3	1.78
2	2.001 1	0.872 4		0.421 1	
3	2.001 8	0.880 1		0.430 2	
平均值		0.871 0		0.429 2	

### 2.2 落新妇苷和芦丁的含量测定

2.2.1 色谱条件 色谱柱:SHISEIDO-SPOLAR  $C_{18}$  (250 mm×4.6 mm, 5  $\mu$ m);流动相:乙腈-0.1%磷酸溶液(14:86, V/V);流速:1.0 mL/min;检测波长:291 nm;柱温:35  $^{\circ}$ C;进样量:10  $\mu$ L。在上述色谱条件下,取“2.2.2”项下对照品和供试品溶液进样分析,结果在供试品溶液色谱中,落新妇苷和芦丁均可完全分离,峰形较好;芦丁、落新妇苷峰理论板数分别为11 208、8 992,各峰间分离度均大于1.5。3种溶液的色谱图见图1。

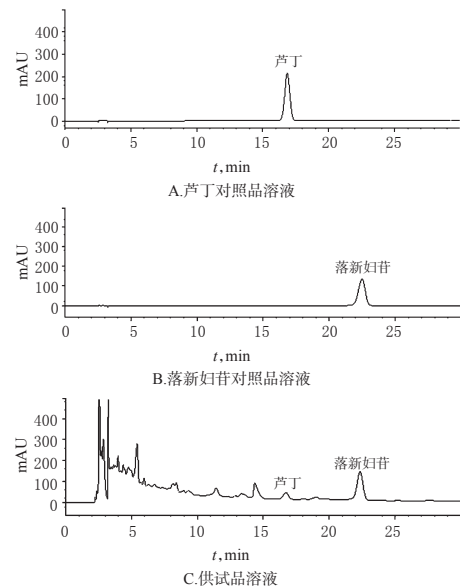


图1 高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms

2.2.2 溶液制备 (1)对照品溶液。取落新妇苷对照

品、芦丁对照品适量,精密称定,加甲醇分别制成每1 mL含落新妇苷0.44 mg、芦丁0.6 mg的对照品溶液,即得。(2)供试品溶液。取广西河池的杉寄生药材粉末(过三号筛)约2 g,精密称定,置于具塞锥形瓶中,精密加入70%甲醇25 mL,称定质量,超声3次(功率:250 W,频率:40 kHz),每次45 min,滤过,合并滤液,蒸干,残渣用70%甲醇溶解,转移至10 mL量瓶中,加70%甲醇至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.2.3 线性关系及定量限考察 (1)落新妇苷。分别精密吸取落新妇苷对照品溶液适量,用甲醇稀释成质量浓度分别为22、44、88、132、220、440  $\mu\text{g/mL}$ 的系列对照品溶液。吸取各对照品溶液10  $\mu\text{L}$ ,按“2.2.1”项下色谱条件分别进样分析。以质量浓度( $c$ ,  $\text{mg/mL}$ )为横坐标、峰面积积分值( $A$ )为纵坐标,绘制标准曲线,得落新妇苷的回归方程为 $A=22\ 151c-65.335$ ( $r=0.999\ 6$ )。结果表明,落新妇苷检测质量浓度线性范围为22~440  $\mu\text{g/mL}$ 。根据相应方法进行操作,落新妇苷定量限为0.5  $\mu\text{g/mL}$ 。(2)芦丁。分别精密吸取芦丁对照品溶液适量,用甲醇稀释成质量浓度分别为12、30、60、84、120、240  $\mu\text{g/mL}$ 的系列对照品溶液。吸取各对照品溶液10  $\mu\text{L}$ ,按“2.2.1”项下色谱条件分别进样分析。同“(1)”方法得芦丁的回归方程为 $A=10\ 165c-27.545$ ( $r=0.999\ 1$ )。结果表明,芦丁检测质量浓度线性范围为12~240  $\mu\text{g/mL}$ ,定量限为1.2  $\mu\text{g/mL}$ 。

2.2.4 精密度试验 分别精密吸取落新妇苷、芦丁2种对照品溶液各10  $\mu\text{L}$ ,分别连续进样6次,测定落新妇苷和芦丁的峰面积,计算其RSD分别为0.70%、2.88%( $n=6$ ),表明仪器精密度良好。

2.2.5 稳定性试验 精密吸取同一批广西河池供试品溶液适量,分别于0、4、8、12、16、24 h内各进样10  $\mu\text{L}$ ,测定落新妇苷、芦丁的峰面积,计算其RSD分别为1.62%、1.18%( $n=6$ ),表明供试品溶液在24 h内基本稳定。

2.2.6 重复性试验 精密称取同一批广西河池供试品约2 g,共6份,分别按“2.2.2(2)”项下方法制备供试品溶液,进样测定落新妇苷和芦丁的含量,计算其RSD分别为1.57%和0.78%( $n=6$ ),表明该测定方法重复性良好。

2.2.7 加样回收率试验 精密称取已知落新妇苷含量和芦丁含量的样品(过三号筛)0.5 g,共9份,每3份为一组,每组分别精密加入落新妇苷和芦丁对照品溶液各0.5、1.0、1.5 mL,制备成供试品溶液,进样测定,计算2种成分的回收率。结果表明,落新妇苷、芦丁的平均回收率分别为99.44%、99.96%(RSD=1.38%、1.50%, $n=9$ ),具体详见表5。

### 2.3 不同产地样品含量测定

取不同产地杉寄生样品各3份,分别按“2.2.2(2)”项下方法制备成供试品溶液,再按照“2.2.1”项下色谱条件进样测定峰面积,按外标法计算不同产地杉寄生样品中

落新妇苷和芦丁的含量,结果见表6。

表5 落新妇苷、芦丁的回收率试验结果( $n=9$ )

Tab 5 Results of recovery tests of astilbin and rutin ( $n=9$ )

成分	编号	样品含量,mg	加入量,mg	测得量,mg	回收率,%	平均回收率,%	RSD,%
落新妇苷	1	0.444 6	0.220 5	0.664 5	99.72	99.44	1.38
	2	0.445 7	0.220 5	0.662 7	98.40		
	3	0.445 9	0.220 5	0.670 6	101.92		
	4	0.445 7	0.441 0	0.888 6	100.42		
	5	0.444 6	0.441 0	0.877 5	98.17		
	6	0.446 2	0.441 0	0.889 6	100.55		
	7	0.445 9	0.661 5	1.099 8	98.85		
	8	0.445 7	0.661 5	1.090 8	97.52		
	9	0.445 0	0.661 5	1.102 5	99.39		
芦丁	1	0.217 4	0.110 0	0.325 5	98.27	99.96	1.50
	2	0.217 9	0.110 0	0.328 7	100.69		
	3	0.218 0	0.110 0	0.326 9	98.99		
	4	0.217 9	0.220 0	0.442 2	101.94		
	5	0.217 4	0.220 0	0.433 9	98.42		
	6	0.218 2	0.220 0	0.440 2	100.93		
	7	0.218 0	0.330 0	0.551 4	101.02		
	8	0.217 9	0.330 0	0.541 5	98.05		
	9	0.217 6	0.330 0	0.551 9	101.30		

表6 不同产地杉寄生中落新妇苷和芦丁的含量测定结果( $\text{mg/g}$ )

Tab 6 Results of content determination of astilbin and rutin in *M. cochinchinensis* from different producing areas ( $\text{mg/g}$ )

编号	产地	落新妇苷	芦丁
1	广西河池	0.870 4	0.431 3
2	广西南宁	0.862 5	0.424 7
3	广西桂林	0.876 5	0.435 0
4	广东和平	0.901 1	0.210 3
5	广东博罗	0.897 2	0.219 7
6	广东梅县	0.890 7	0.214 8

由表6可见,杉寄生中落新妇苷含量在各省/区及各市/县之间均相似(0.862 5~0.901 1  $\text{mg/g}$ ),芦丁含量在同一省/区的市/县间相似,但在2个省/区之间差异较大(平均值分别为0.431 3、0.214 9  $\text{mg/g}$ )。

### 3 讨论

笔者在前期试验中,经HPLC全波长扫描确定了291 nm为杉寄生中黄酮类成分的检测波长;另分别考察了甲醇-磷酸水溶液、乙腈-磷酸水溶液等流动相对分离效果的影响。结果显示,选用甲醇-0.2%磷酸水溶液(70:30,  $V/V$ )及乙腈-0.2%磷酸水溶液(20:80,  $V/V$ )时,芦丁保留时间过短,分离效果不佳,并考虑到酸度对色谱柱的影响,最终选用乙腈-0.1%磷酸水溶液作为流动相。再对流动相中二者体积比经过多次调整和考察,确定当体积比为14:86时,落新妇苷和芦丁的保留时间适合,峰形好,分离度及理论板数高。

同时测定落新妇苷和芦丁含量在其他药物制剂质量标准中已有相关研究<sup>[7]</sup>,但在杉寄生药材中同时测定此2种成分尚为首次报道。此外,本研究进行了供试品

# 白耙齿菌固体发酵物对庆大霉素所致大鼠急性肾衰竭的改善作用研究<sup>Δ</sup>

李 昂<sup>1\*</sup>, 黄 静<sup>1,2</sup>, 刘 旭<sup>1</sup>, 步洪石<sup>1</sup>, 刘馨晨<sup>1</sup>, 王淑敏<sup>1#</sup> (1. 长春中医药大学药学院, 长春 130117; 2. 赤峰市中心血站外采科, 内蒙古 赤峰 024000)

中图分类号 R285.5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)13-1772-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.13.11

**摘要** 目的: 研究白耙齿菌固体发酵物对庆大霉素(GM)所致大鼠急性肾衰竭的改善作用。方法: 将50只大鼠随机分为空白对照组、模型组、阳性对照组(尿毒清颗粒, 2 g/kg)和白耙齿菌固体发酵物低、高剂量组(2、4 g/kg), 每组10只。除空白对照组外, 其余各组大鼠均连续7 d腹腔注射GM(140 mg/kg)复制急性肾衰竭模型。给药组大鼠每天在造模2 h后灌胃给药1次, 空白对照组和模型组在相应时间灌胃等量生理盐水; 造模结束后, 各组大鼠再连续给药7 d, 每天给药1次。给药结束后, 检测大鼠血肌酐(Scr)、血尿素氮(BUN)、尿肌酐(Ucr)和右肾组织中白细胞介素6(IL-6)、肿瘤坏死因子 $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )含量, 苏木精-伊红染色后观察大鼠左肾组织病理学变化。结果: 与空白对照组比较, 模型组大鼠Scr、BUN、Ucr和右肾组织中IL-6、TNF- $\alpha$ 含量均显著增加( $P < 0.01$ ); 左肾组织发生肾小管上皮细胞明显水肿、变性、细胞核消失以及管腔内蛋白样沉积增多等病理学变化。与模型组比较, 阳性对照组大鼠Ucr和白耙齿菌固体发酵物低剂量组大鼠BUN以及白耙齿菌固体发酵物高剂量组大鼠Scr、BUN、Ucr含量均显著减少( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ ); 同时给药组大鼠右肾组织中IL-6、TNF- $\alpha$ 含量均显著减少( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ ); 左肾组织的炎症浸润减轻、肾小管和血管的增生受到抑制, 病理学变化得到明显改善。结论: 白耙齿菌固体发酵物对GM所致急性肾衰竭具有一定的改善作用。

**关键词** 白耙齿菌; 固体发酵物; 急性肾衰竭; 庆大霉素; 大鼠

溶液制备的提取工艺考察, 且对色谱条件进行了优化, 使杉寄生药材及制剂的质量控制结果更准确。

目前杉寄生道地药材产区还有待进一步明确, 前期调查研究显示, 该药材主产地为华南地区, 为广西和广东地区民间临床常用药材, 故本研究选用这2个省/区不同市/县的药材进行比较。试验结果表明, 杉寄生中芦丁含量在2个省/区之间差异较大, 证实地理环境对杉寄生药材质量有一定影响。笔者认为这是由于杉寄生药材多为野生所致, 且药材的生产年限、采收时间、加工及产地等对药材的质量也有影响, 故这些因素与药材质量的相关性有待进行深入研究。

## 参考文献

- [1] 《中华本草》编委会. 中华本草: 第2册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999: 600-601.
- [2] 陆国寿, 卢文杰, 陈家源, 等. 杉寄生化学成分[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(3): 44-46.
- [3] 陆国寿, 叶勇, 卢文杰, 等. HPLC法测定杉寄生中落新妇苷的含量[J]. 中医药导报, 2014, 20(5): 86-87.
- [4] 张清峰, 聂海纯, 郑国栋, 等. 落新妇苷的理化性质与生物

活性研究进展[J]. 现代食品科技, 2012, 28(12): 1834-1838.

- [5] 张由嘉, 刘亚欧, 刘榴, 等. 土茯苓及落新妇苷抗炎、镇痛、利尿作用研究[J]. 中药药理与临床, 2004, 20(1): 11-12.
- [6] 马溶, 庞广昌. 芦丁对现代文明病的作用[J]. 食品科学, 2013, 34(7): 307-311.
- [7] 蔡果, 龚春燕, 申国庆. HPLC法同时测定复方土茯苓胶囊中落新妇苷和芦丁的含量[J]. 中国药房, 2012, 23(47): 4486-4488.
- [8] 白梅, 刘为萍, 李素珍. HPLC测定不同产地土茯苓中落新妇苷和黄杞苷含量[J]. 药物分析杂志, 2013, 33(8): 1352-1354.
- [9] 刘东平, 廖启元, 刘嫫嫫. 土茯苓中落新妇苷含量测定方法改进的研究[J]. 泸州医学院学报, 2016, 39(2): 141-143.
- [10] 方圆, 王雪彦, 晁若冰. 土茯苓药材中落新妇苷和总黄酮的含量测定方法研究[J]. 药物分析杂志, 2010, 30(9): 1738-1741.
- [11] 韩光明, 张艳艳, 刘加秀. 正交试验优选蒲公英益康胶囊中落新妇苷的提取工艺[J]. 中国药房, 2015, 26(31): 4421-4423.
- [12] 林耿丰, 梁伟杰, 肖凤霞. 正交设计法优选土茯苓中落新妇苷及总黄酮的提取工艺[J]. 亚太传统医药, 2011, 7(6): 39-42.

<sup>Δ</sup> 基金项目: 吉林省科技发展计划项目(No. 20160101219JC)

\* 硕士研究生。研究方向: 药用微生物物质基础与药效学。电话: 0431-86763998。E-mail: 879462586@qq.com

# 通信作者: 教授, 博士生导师, 博士。研究方向: 药用微生物物质基础与药效学、中药分析学。电话: 0431-86763998。E-mail: wangsm@ccucm.edu.cn

(收稿日期: 2017-12-12 修回日期: 2018-02-06)

(编辑: 刘 萍)