

· 基础研究 ·

UPLC 测定彝药满山香中芦丁含量[△]

郝庆秀, 康利平, 朱寿东, 金艳, 郭兰萍*

(中国中医科学院 中药资源中心/道地药材国家重点实验室培育基地, 北京 100700)

[摘要] 目的: 建立超高效液相色谱法(UPLC)检测彝药满山香中芦丁含量的方法。方法: 利用 BEH C₁₈ 色谱柱(100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm), 以水-乙腈(0.1% 甲酸)为流动相, 梯度洗脱, 流速为 0.50 mL·min⁻¹, 柱温为 40 ℃, 检测波长为 375 nm。结果: 芦丁在 1.64 ~ 210 μg 线性关系良好, 回归线方程为 $Y = 340.3X - 1386.8$ ($r = 0.9996$, $n = 8$), 平均回收率为 100.15%, RSD = 2.62%。根茎中芦丁含量范围 15.50 ~ 199.00 μg·g⁻¹, 叶片中芦丁含量范围 4.2 ~ 13.6 mg·g⁻¹。结论: 该方法简单、重复性好、准确性高, 可用于彝药满山香中芦丁含量的测定。

[关键词] 满山香; 芦丁; 含量测定; 超高效液相色谱法

Determination of Rutin Content in *Schisandra propinqua* by UPLC

HAO Qing-xiu, KANG Li-ping, ZHU Shou-dong, JIN Yan, GUO Lan-ping*

(State Key Laboratory Breeding Base of Dao-di Herbs, National Resource Center for Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a method for determination of rutin in *Schisandra propinqua* by UPLC. **Methods:** The experiment was performed on BEH C₁₈ column(100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm), with acetonitrile-water(containing 0.1% formic acid) as mobile phase, gradient elution, at a flow rate of 0.50 mL·min⁻¹, the column temperature at 40 ℃, detection wavelength at 375 nm. **Results:** The linear range of rutin was 1.64-210 μg·mL⁻¹, the regression equation was $Y = 340.3X - 1386.8$ ($r = 0.9996$, $n = 8$), the average recovery was 100.15% ($n = 6$) with RSD 2.62%. The content range of rutin was 15.50-199.00 μg·g⁻¹ in rhizome and 4.2-13.6 mg·g⁻¹ in leaf in *S. propinqua*. **Conclusion:** The method can be used for determination the content of rutin in *S. propinqua*.

[Keywords] *Schisandra propinqua*; rutin; determination; UPLC

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.20171113002

彝药满山香来源于木兰科植物合蕊五味子的干燥藤茎和根, 具有舒筋活血、消肿止痛的功能, 用于治疗骨折、慢性胃肠炎、风湿性关节炎、痛经、外伤出血等。以满山香为主要原料的灯银脑通胶囊用于中风中经络、瘀血阻络的治疗。目前, 野生满山香植物资源种群稀少, 蕴藏量小^[1]; 在地方标准中, 以根茎入药, 并且没有质量控制的指标成分^[2]。在实际应用中, 制药厂以收购药农采集的野生满山香植物根茎为原料药, 砍伐后的叶片资源没有被有效利用。目前, 文献报道中关注的是满山香根茎中的木脂素类成分^[3-6]。本课题组前期研究结果提示, 彝药满山香富含芦丁成分^[7]。芦丁被称为 Vitamin P, 具有广泛的生物活性, 包括抗炎、抗氧化、降低血压、保持血管弹

性、神经保护作用, 能预防或治疗糖尿病相关疾病^[8-10]。目前未见对满山香中芦丁成分定量研究的报道。本实验利用 UPLC 技术对满山香根茎和叶片中的芦丁含量进行测定, 以期对彝药满山香资源的开发利用提供科学依据; 同时, 为扩大芦丁的天然来源提供参考。

1 材料与仪器

1.1 材料

满山香样品采集于云南、贵州, 共 13 批, 经中国中医科学院金艳助理研究员鉴定为木兰科植物合蕊五味子 *Schisandra propinqua* (Wall.) Baill., 原植物标本保存于中国中医科学院中药资源中心, 样品信息见表 1。

[△] [基金项目] 国家科技支撑计划(2012BAI29B02); 中国中医科学院基本科研业务费自主选题; 北京中医药薪火传承 3+3 工程项目

* [通信作者] 郭兰萍, 研究员, 研究方向: 中药资源学; Tel: (010)64087856, E-mail: glp01@126.com

表1 满山香样品信息

编号	采集地点	地理位置
1	云南昆明	E102°27'56", N25°05'18"
2	云南昆明	E102°58'45", N25°02'06"
3	云南昆明	E102°58'45", N25°02'06"
4	云南罗平	E104°25'23", N24°56'58"
5	云南罗平	E104°25'39", N24°56'32"
6	云南罗平	E104°26'15", N24°57'5"
7	云南禄劝	E102°28'49", N25°35'47"
8	云南武定	E102°05'13", N25°40'20"
9	贵州清镇	E106°27'49", N26°42'17"
10	贵州清镇	E106°27'49", N26°42'17"
11	贵州清镇	E106°27'49", N26°42'17"
12	贵州清镇	E106°27'49", N26°42'17"
13	贵州清镇	E106°27'49", N26°42'17"

芦丁对照品(成都曼思特生物科技有限公司,批号:12040302,纯度 $\geq 98.0\%$)。色谱级乙腈、甲醇、甲酸(Merck公司,德国);超纯水为Milli-Q纯水系统制备(电阻 $\geq 18.2\text{ M}\Omega$,Millipore公司,美国)。

1.2 仪器

UPLC-H-CLASS,全波长紫外检测器(PDA)(Waters公司,美国),色谱柱为Acquity UPLC BEH C_{18} 柱(50 mm $\times$ 2.1 mm, 1.7 μm , Waters公司,美国),分析天平(梅特勒-托利多,瑞士),离心机(Eppendorf公司,德国),KQ-100DE超声清洗器(昆山市超声仪器有限公司),0.2 μm 注射器式滤器(Pall公司,美国)。

2 方法与结果

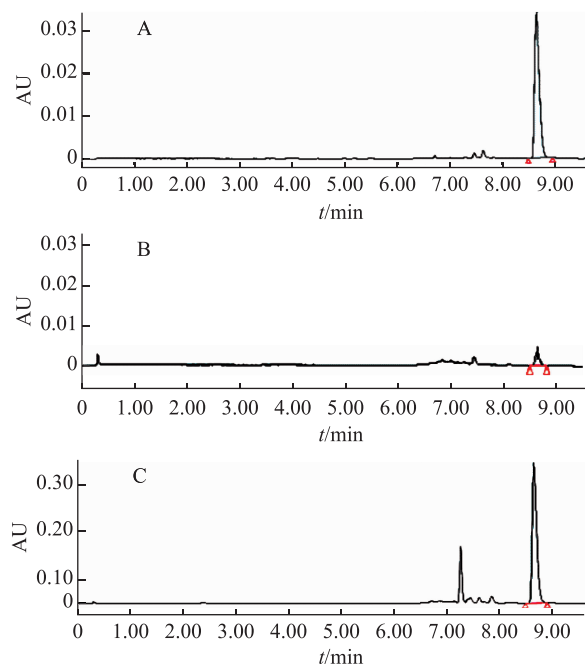
2.1 样品溶液及对照品溶液制备

样品经干燥、粉碎,过40目筛,准确称取样品粉末0.3 g,加70%甲醇水溶液(V/V)15 mL,超声提取30 min,12 000 g离心10 min,取上清液经0.2 μm 滤膜过滤,重复提取1次,合并滤液,作为供试品溶液。准确称取对照品适量,用70%甲醇水溶解,定容10 mL,备用。

2.2 实验条件

2.2.1 色谱条件 流动相为0.1%甲酸水溶液(A)-0.1%甲酸乙腈(B),按程序梯度洗脱(5:95 $\rightarrow$ 95:5,13 min),柱温:40 $^{\circ}\text{C}$,流速:500 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$,进样量:1.0 μL 。Acquity UPLC PDA检测器,波长范围:190~400 nm。通过优化色谱条件,发现芦丁在365 nm处干扰少,吸光度强,选择365 nm进行检测。

分析。芦丁对照品和满山香样品提取物的UPLC-PDA色谱分析结果见图1。



注: A 芦丁对照品; B 根茎提取物; C 叶片提取物。

图1 满山香提取物的UPLC-PDA图

2.2.2 定量下限考察 通过考察不同浓度和不同进样量的对照品溶液,结果发现芦丁的检测下限为0.328 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,定量下限为1.64 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

2.2.3 线性关系考察 精密称取2.10 mg芦丁对照品,置10 mL量瓶中,加70%甲醇水至刻度摇匀,制成对照品溶液I(210 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$),吸取对照品溶液I 5.0 mL稀释定容到10 mL量瓶中,制成对照品溶液II(105 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$),依次稀释配成对照品溶液III(52.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)、对照品溶液IV(26.25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)、对照品溶液V(13.125 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)、对照品溶液VI(6.5625 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)、对照品溶液VII(3.28125 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)、对照品溶液VIII(1.640625 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$),进样1.0 μL ,按上述色谱条件测定峰面积,以峰面积积分为纵坐标,芦丁的质量浓度为横坐标,绘制标准曲线。结果芦丁在1.64~210 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 具有良好的线性关系,计算得回归方程: $Y = 340.3X - 1386.8$, $r = 0.9998$ 。

2.2.4 精密度试验 取同一对照品溶液,在所确定的HPLC条件下,连续进样6次,分别记录其峰面积,计算芦丁峰面积的RSD=0.69%。

2.2.5 稳定性试验 准确称取同一样品粉末6份,按2.1制成供试品溶液,在所确定的UPLC条件下,分别于配制后0、1、3、5、8、12、16、20 h,测定芦

丁峰面积, $RSD = 1.03\%$, 表明样品至少在 20 h 内稳定。

2.2.6 重复性试验 准确称取同一样品粉末 6 份, 按 2.1 制成供试品溶液, 在所确定的 HPLC 条件下测定峰面积, $RSD = 1.58\%$ 。

2.2.7 加样回收率试验 准确称取同一粉末样品 6 份 (1 号根茎样品), 分别添加两份 $16.8 \mu\text{g}$ 芦丁对照品, 两份 $21.0 \mu\text{g}$ 芦丁对照品, 两份 $25.2 \mu\text{g}$ 芦丁对照品, 按供试品溶液制备方法制备样品溶液, 进样量 $1.0 \mu\text{L}$, 计算回收率, 结果见表 2。

表 2 满山香药材中芦丁加样回收率试验

样品量/g	样品中含 量/ μg	对照品加 入量/ μg	测出量 / μg	回收率 (%)	平均回收 率(%)	RSD (%)
0.286 4	14.76	16.80	16.09	95.75	100.51	2.62
0.301 6	15.55	16.80	16.77	99.79		
0.299 0	15.43	21.00	51.54	102.61		
0.302 4	15.59	21.00	51.21	102.38		
0.301 1	15.52	25.20	86.28	102.35		
0.301 7	15.55	25.20	86.14	100.17		

2.3 样品含量测定

分别准确称取各个满山香样品粉末 0.3 g , 按 2.1 制成供试品溶液, 在所确定的 UPLC 条件下测定, 结果见表 3。

表 3 满山香药材中芦丁含量检测结果

编号	芦丁质量分数	
	叶片/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$	根茎/ $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$
1	6.589	15.50
2	4.539	34.22
3	6.525	74.30
4	9.339	199.00
5	7.474	197.80
6	6.041	194.50
7	6.879	60.28
8	13.620	51.55
9	4.241	61.05
10	7.094	61.35
11	6.028	91.96
12	6.075	94.17
13	5.699	162.20

3 讨论

在本实验选定的条件下, 对彝药满山香药材中芦丁含量进行了定量测定, 经方法学考察, 方法准

确可靠、简便快速。从检测结果看, 不同产地满山香的根茎中芦丁质量分数在 $30 \sim 187 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$, 差异明显。本研究所用根茎样品的直径从 0.1 cm 到 4 cm 不等, 其中 1 号根茎样品直径最大, 而芦丁含量最低, 据当地药农估计, 1 号根茎的生长年限有 40 年左右, 其他根茎的生长年限大约为 2、3、5、10 年不等。由于野生药材的生长年限不易准确断定, 只能粗略地认为药材直径与藤茎的生长年限呈正相关关系。从本实验结果看, 芦丁成分的含量与药材的年限呈负相关关系。年限和产地差异对药材的影响有待进一步研究。

不同产地满山香的叶片中芦丁含量在 $4.2 \sim 13.6 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。叶片中芦丁的含量均比较高, 并且比对应的根茎药材中高出数十倍、甚至数百倍, 某些地区满山香叶片中芦丁含量达 1.36% 。满山香叶片有开发利用价值, 建议开展满山香叶片的应用研究, 避免根茎药材采集时废弃大量的叶片而造成自然资源的浪费。本研究为彝药满山香资源的开发利用奠定了基础, 同时为扩大芦丁的天然来源提供了参考。

参考文献

- [1] 郝庆秀, 刘超, 金艳, 等. 彝药满山香的资源调查和鉴别研究[J]. 中国现代中药, 2015, 17(7): 698-703.
- [2] 云南省卫生厅. 云南药品标准[M]. 昆明: 云南大学出版社, 1996: 120.
- [3] 陈业高, 秦国伟, 谢毓元. 满山香木脂素成分的研究[J]. 中药材, 2001, 24(2): 105-107.
- [4] 陈业高, 秦国伟, 谢毓元. 满山香中的联苯环辛二烯木脂素[J]. 高等学校化学学报, 2001, 22(9): 1518-1521.
- [5] 李洪梅. 两种五味子属药用植物的化学成分和生物活性研究[D]. 昆明: 昆明理工大学, 2008.
- [6] 吴彤, 李燕, 孔德云, 等. 藤香树茎藤的化学成分[J]. 中国药理学杂志, 2010, 45(12): 902-905.
- [7] 郝庆秀, 康利平, 朱寿东, 等. 基于 UPLC-Q/ToF MSE 技术的彝药满山香的化学成分鉴别研究[J]. 中国中药杂志, 2017, 42(21): 4234-4245.
- [8] Ganeshpurkar A, Saluja A K. The Pharmacological potential of rutin[J]. J Saudi Pharm, 2017, 25(2): 149-164.
- [9] Budzynska B, Faggio C, Kruk-Slomka M, et al. Rutin as neuroprotective agent: from bench to bedside[J]. J Curr Med Chem, 2017, 24: 1-12.
- [10] Ghorbani A. Mechanisms of antidiabetic effects of flavonoid rutin[J]. J Biomed Pharmacother, 2017, 96: 305-312.

(收稿日期 2017-11-13)