

# 不同产地菟丝子总黄酮及金丝桃苷的含量测定

管群<sup>1</sup> 吕圭源<sup>2</sup> 俞静静<sup>2</sup> 颜美秋<sup>2</sup> 陈素红<sup>1</sup>

1.温州医学院 浙江,温州 325035 2.浙江中医药大学

**摘要:** [目的] 用紫外可见分光光度法测定不同产地(宁夏、内蒙古、辽宁、江苏、河北、陕西、四川、山东)菟丝子中总黄酮的含量;用高效液相色谱(HPLC)法测定金丝桃苷的含量。[方法] 紫外可见分光光度法采用  $\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3\text{-NaOH}$  体系显色,以芦丁为对照,在 504nm 波长处测定吸光度;HPLC 法采用 Ultimate XB-C<sub>18</sub> 色谱柱(250mm×4.6mm,5 $\mu\text{m}$ ),流动相:乙腈-0.1%磷酸溶液(17:83),流速:1.0 mL·min<sup>-1</sup>,柱温:30℃,检测波长:360nm。[结果] 不同产地菟丝子药材中的总黄酮含量最高为 2.55%,最低为 0.38%;金丝桃苷含量最高为 0.276%,最低为 0.012%。[结论] 不同产地菟丝子药材中总黄酮及金丝桃苷含量均存在较大差异,且总黄酮含量越高,金丝桃苷含量相应也高,二者呈一定相关性。

**关键词:** 菟丝子;产地;总黄酮;金丝桃苷;含量测定

中图分类号 R282.71 文献标识码: A 文章编号:1005-5509(2012)02-0184-04

**Quantitative Determination of Total Flavones and Hyperoside in *Cuscuta Chinensis* Lam Collected from Different Places** Guan Qun<sup>1</sup>, Lv Guiyuan<sup>2</sup>, Yu Jingjing<sup>2</sup>, et al 1. Wenzhou Medical College, Zhejiang(325035); 2. Zhejiang Chinese Medical University

**Abstract:** [Objective] Ultraviolet-Visible spectrophotometer (UV) and HPLC methods were developed to determine the content of total flavones and hyperoside in *Cuscuta chinensis* Lam collected from different places (Ningxia, Neimenggu, Liaoning, Jiangsu, Hebei, Shanxi, Sichuan and Shandong). [Methods] Rutin was used as the standard to measure the total flavones, the colour reactoin was carried out with  $\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3\text{-NaOH}$  and measured in the 504 nm wavelength by UV spectrophotometry. The hyperoside was separated with acetonitrile-0.1% $\text{H}_3\text{PO}_4$ (17:83) (flow rate set at 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, wavelength was 360 nm) by Ultimate XB-C<sub>18</sub> (250 mm×4.6 mm,5  $\mu\text{m}$ ) column. [Results] The total flavones contained in *Cuscuta chinensis* was from 0.38% to 2.55%; the amounts of hyperoside was from 0.012% to 0.276%. [Conclusion] The amounts of both total flavones and hyperoside were of significantly different *Cuscuta chinensis* Lam from different places, and there was a significant correlation between the contents of total flavones and the content of the hyperoside in the same sample: namely the higher the level of the total flavones, the higher the content of hyperoside.

**Key words:** *Cuscuta chinensis* Lam; different places; total flavones; hyperoside; content determination

菟丝子为旋花科,一年生缠绕寄生性草本植物,称南方菟丝子 *Cuscuta australis* R.Br. 或菟丝子 *Cuscuta chinensis* Lam. 的干燥成熟种子,始载于《神农本草经》,并被列为上品,具有补益肝肾、固精缩尿、安胎、明目、止泻的功效,用于肝肾不足、阳痿遗精、遗尿尿频、胎动不安等症<sup>[1]</sup>。现代药理活性研究表明菟丝子具有抗衰老作用、抗氧化作用、生殖作用、免疫调节作用、保肝明目作用、预防和治疗心血管疾病作用等<sup>[2]</sup>。菟丝子作为一种临床常用补益中药,在我国分布广泛,主产山东、河北、山西、陕西、江苏、黑龙江、吉林、新疆等地。黄酮类是菟丝子中研究较多的化学成分之一,本文通过紫外可见分光光度法测定不同产地菟丝子中总黄酮含量,采用高效液相色谱法测定金丝桃苷的含量,并探讨二者之间相关性,以期对菟丝子

的质量评价和合理利用开发提供参考。

## 1 实验材料

**1.1 仪器** Agilent 1200 series 高效液相色谱仪,四元泵、DAD 紫外检测器(美国安捷伦科技有限公司)、PerkinElmer Lambda 45 紫外可见分光光度计(美国珀金埃尔默公司)、AG135 电子分析天平(瑞士 Mettler)、CP114 电子分析天平(奥豪斯仪器上海有限公司)、KQ-500DB 数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)、MILLI-Q BIOCEL 超纯水仪(杭州景元科技有限公司)。

**1.2 药材与试剂** 菟丝子为宁夏、内蒙古、辽宁、江苏、河北、陕西、四川、山东 8 个产地,均购自浙江磐安中药材市场,经浙江中医药大学陈孔荣副教授鉴定为旋花科一年生寄生缠绕草本植物菟丝子

基金项目:国家重点基础研究发展计划(973 计划)(2007CB512603)

Fund project: National Key Basic Research Development Plan(973 Plan)(2007CB 512603)

通讯作者:陈素红,Email:chensuhong06@yahoo.com.cn

*Cuscuta chinensis* Lam. 的干燥成熟种子;乙腈(色谱纯,德国默克公司),无水乙醇、甲醇、亚硝酸钠、硝酸铝、氢氧化钠、磷酸等均为分析纯,水为超纯水;金丝桃苷对照品(111521-201004,供含量测定用,中国药品生物制品检定所)、芦丁对照品(100080-200707,供含量测定用,中国药品生物制品检定所)。

## 2 方法

### 2.1 总黄酮含量测定

**2.1.1 供试品溶液制备** 取菟丝子粉末(过 65 目筛)约 0.5g,精密称定,置 100mL 具塞锥形瓶中,加入 90%乙醇 25mL,称重,超声处理 60min,放冷,补重,摇匀,过滤,取续滤液作为供试品溶液备用。

**2.1.2 对照品溶液制备** 精密称取 120℃干燥至恒重的芦丁对照品 8.04mg,置 50mL 容量瓶中,加 90%乙醇使之溶解并定容,摇匀即得浓度为 0.1608mg·mL<sup>-1</sup> 的芦丁对照品溶液。

**2.1.3 标准曲线绘制** 精确吸取上述对照品溶液 0.0、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0mL,分别置于 10mL 具塞试管中,各加 90%乙醇至 5mL,再依次加 5%NaNO<sub>2</sub> 溶液 0.3mL,摇匀,放置 6min;加 10%Al(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> 溶液 0.3mL,摇匀,放置 6min;加入 4%NaOH 溶液 4mL,摇匀,放置 15min。以不加芦丁对照品溶液同法操作得到的溶液作为空白对照,在 504nm 波长处测定吸光度。以吸光度(A)为纵坐标,溶液浓度(C)为横坐标,绘制标准曲线。

**2.1.4 提取溶剂的比较** 取菟丝子样品粉末 6 份,每份约 0.5g,精密称定,分别加入 50%乙醇、70%乙醇、90%乙醇、50%甲醇、70%甲醇、90%甲醇 25mL 超声提取 30min,过滤,制得各供试品溶液,精密吸取各供试品溶液 1mL,照标准曲线绘制项下的方法测定吸光度,计算并比较总黄酮含量。

**2.1.5 提取时间的比较** 取菟丝子样品粉末 3 份,每份约 0.5g,精密称定,分别加入 90%乙醇 25mL 超声提取 30min、60min、90min,过滤,制得各供试品溶液,精密吸取各供试品溶液 1mL,照标准曲线绘制项下的方法测定吸光度,计算并比较总黄酮含量。

**2.1.6 精密度的试验** 取内蒙古产菟丝子供试品溶液,照标准曲线绘制项下的方法测定吸光度,连续测定 5 次,计算相对标准偏差(RSD)%。

**2.1.7 稳定相对标准偏差性试验** 取内蒙古产菟丝子供试品溶液,照标准曲线绘制项下的方法测定吸光度后,每隔 30min 再测定其吸光度,共计 120min,计算 RSD%。

**2.1.8 重复性试验** 取内蒙古产菟丝子样品粉末 5 份,按“2.1.1”项下制备供试品溶液,精密吸取 1mL,照标准曲线绘制项下的方法测定吸光度,计算总黄酮平均含量及 RSD%。

**2.1.9 加样回收试验** 取内蒙古产菟丝子样品粉末

6 份,每份约 0.25g,精密称定,分别加入芦丁对照品适量,按“2.1.1”项下制备供试品溶液,精密吸取 1mL,照标准曲线绘制项下的方法测定吸光度,得出总黄酮含量,计算加样回收率。

**2.1.10 样品测定** 取不同产地菟丝子样品粉末约 0.5g,精密称定,按“2.1.1”项下制备供试品溶液,精密吸取续滤液 2mL,照标准曲线绘制项下的方法测定吸光度,计算总黄酮的含量。

### 2.2 金丝桃苷的含量测定

**2.2.1 色谱条件**<sup>[1]</sup> 色谱柱:Ultimate XB-C<sub>18</sub>(250mm×4.6mm,5μm)色谱柱;流动相:乙腈-0.1%磷酸溶液(17:83);流速 1.0mL·min<sup>-1</sup>;检测波长 360nm;柱温 30℃;进样量 10μL。

**2.2.2 供试品溶液制备** 取不同产地菟丝子粉末(过 65 目筛)约 0.5g,精密称定,至 100mL 具塞锥形瓶中,加入 60%乙醇 25mL,称重,超声处理 1h,放冷,补重,摇匀,0.45μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

**2.2.3 对照品溶液制备** 精密称取干燥至恒重的金丝桃苷对照品 2.11mg,置 10mL 容量瓶中,加甲醇超声使溶解并定容,摇匀,即制成 1mL 含 211μg 的金丝桃苷对照品溶液。

**2.2.4 标准曲线绘制** 精密量取上述金丝桃苷对照品溶液 0.1、0.2、0.5、1.0、2.0、5.0mL 置 10mL 容量瓶中,加甲醇定容,摇匀,0.45μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,分别进样 10μL,按上述色谱条件测定峰面积。以峰面积(Y)为纵坐标,对照品溶液浓度(X)为横坐标,绘制标准曲线。

**2.2.5 含量测定** 分别精密吸取各供试品溶液 10μL,注入液相色谱仪,按色谱条件测定峰面积,以外标法计算金丝桃苷含量。

## 3 结果

### 3.1 总黄酮含量测定

**3.1.1 线性关系** 总黄酮标准曲线的回归方程为  $A=12.039C+0.0032$ ,  $r=0.9999$ ,表明芦丁在 0.02~0.08mg·mL<sup>-1</sup> 范围内线性关系良好。

**3.1.2 提取溶剂的比较** 根据菟丝子总黄酮回归方程,计算各溶剂提取所得的菟丝子总黄酮含量,结果见表 1。表明 90%乙醇溶液提取菟丝子总黄酮含量最高。

表 1 不同溶剂对菟丝子总黄酮的提取率比较(%)

提取溶剂	总黄酮含量
50%乙醇	2.24
70%乙醇	2.34
90%乙醇	2.46
50%甲醇	2.07
70%甲醇	2.10
90%甲醇	1.87

**3.1.3 提取时间的比较** 根据菟丝子总黄酮回归方程, 计算 90%乙醇溶液超声 30min、60min、90min 所得菟丝子总黄酮含量分别为 2.46%、2.55%、2.50%, 表明超声提取 60min 所得菟丝子总黄酮含量最高。

**3.1.4 精密度** 内蒙古产菟丝子供试品溶液连续 5 次测定的吸光度 RSD 为 0.12%, 表明仪器精密度较好。

**3.1.5 稳定性** 内蒙古产菟丝子供试品溶液 120

min 内测定的吸光度 RSD 为 0.94%, 表明供试品溶液在显色后 120min 内基本保持稳定。

**3.1.6 重复性** 5 份内蒙古产菟丝子样品的总黄酮平均含量为 1.40%, RSD 为 1.06%, 表明方法重复性良好。

**3.1.7 加样回收率** 6 份内蒙古产菟丝子样品粉末平均加样回收率为 99.4%, RSD 为 2.68%, 表明回收率良好。见表 2。

表 2 菟丝子中总黄酮加样回收率试验结果

取样量(g)	样品中含量(mg)	芦丁加入量(mg)	测得总量(mg)	回收率(%)	平均回收率(%)	RSD(%)
0.2515	3.52	3.66	7.17	99.7		
0.2511	3.52	4.00	7.36	96.2		
0.2509	3.51	3.85	7.32	99.0	99.4	2.68
0.2508	3.51	3.66	7.23	101.5		
0.2513	3.52	3.65	7.29	103.2		
0.2515	3.52	4.12	7.52	97.0		

**3.1.8 菟丝子总黄酮含量** 根据菟丝子总黄酮回归方程, 计算各产地菟丝子总黄酮含量, 结果见表 3。

表 3 不同产地菟丝子中总黄酮含量测定结果(%)

产地	含量
江苏	2.55
宁夏	2.08
内蒙古	1.43
河北	1.35
辽宁	1.34
山东	0.71
陕西	0.51
四川	0.38

表 4 不同产地菟丝子中金丝桃苷含量测定结果(%)

产地	含量
江苏	0.276
宁夏	0.237
内蒙古	0.156
河北	0.100
陕西	0.065
山东	0.042
辽宁	0.031
四川	0.012

**3.2 金丝桃苷的含量测定**

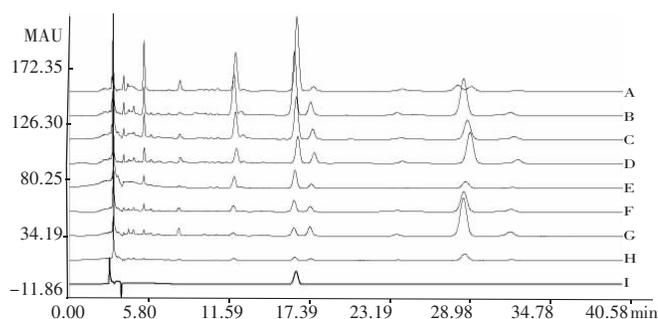
**3.2.1 线性关系** 金丝桃苷标准曲线的回归方程为  $Y=21.786X-2.1818$ ,  $r=0.9999$ , 表明金丝桃苷在  $2.11\sim 105.50\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  范围内线性关系良好。

**3.2.2 菟丝子金丝桃苷含量** 以外标法计算得各产地菟丝子中金丝桃苷含量, 见表 4。金丝桃苷对照品及各产地菟丝子样品 HPLC 色谱图, 见图 1。

**4 讨论**

菟丝子中化学成分包括黄酮类、多糖类、生物碱类、萜类、甾体类、挥发油以及木脂素等化合物<sup>[2]</sup>, 其中黄酮类化合物是菟丝子主要的一类有效成分, 总黄酮含量较高, 可达 3%<sup>[3]</sup>。目前从菟丝子中分离鉴定的黄酮类化合物有金丝桃苷、山柰酚、紫云英苷等<sup>[4]</sup>, 其中以金丝桃苷的含量较高<sup>[5]</sup>。

本实验采用超声法提取菟丝子中总黄酮, 操作简便, 节省时间和溶剂, 重现性好, 并且考察了不同



A:江苏产菟丝子; B:宁夏产菟丝子; C:内蒙古产菟丝子; D:河北产菟丝子; E:陕西产菟丝子; F:山东产菟丝子; G:辽宁产菟丝子; H:四川产菟丝子; I:金丝桃苷对照品

图 1 HPLC 色谱图

溶剂(50% 甲醇、70% 甲醇、90% 甲醇、50% 乙醇、70% 乙醇、90% 乙醇), 不同超声时间(30min、60min、90min)对菟丝子中总黄酮含量测定的影响, 结果表明用 90%乙醇超声提取 60min, 测得含量最高, 故采取该方法提取菟丝子样品中总黄(下转第 191 页)

管群,等:不同产地菟丝子总黄酮及金丝桃苷的含量测定

作为函数估计的工具,将多因子试验中因素与指标的相互关系用多项式进行拟合,依此可对函数的响应面和等高线进行分析,该方法具有周期短,回归方程精度高等优点<sup>[8]</sup>。目前优化白花蛇舌草多糖提取工艺多采用正交试验法,而采用响应面分析法优化多糖提取工艺的研究还没有。本研究采用响应面分析法优化白花蛇舌草水溶性多糖的提取工艺,以液固比、提取温度和提取时间为主要因素进行中心组合试验,建立了多糖提取量预测的回归方程: $Y=6.52+0.46X_1+0.30X_2+0.50X_3+0.070X_1X_2+0.14X_1X_3+0.060X_2X_3-1.07X_1^2-1.03X_2^2-0.56X_3^2$ 。试验结果表明液固比、提取温度和提取时间对多糖提取量都有显著影响,当提取工艺条件中液固比为 31.26、提取温度 84.71℃、提取时间为 2.07h,提取 2 次时白花蛇舌草多糖提取量达到极大值为 6.721mg·g<sup>-1</sup>,与模型预测值误差在 3% 以内。因此采用 RSA 分析法优化得到的浸提条件参数准确可靠,具有实用价值。

参考文献:

[1] 广西僮族自治区卫生厅.广西中药志[M].广西:广西僮族

自治区人民政府,1959.

- [2] Zhang YY,Chen Y,Fan CL,et al. Two new iridoid glucosides from Hedyotis diffusa[J].Fitoterapia,2010,81(6):515-517.
- [3] 代龙,杨培民,魏永利.中药白花蛇舌草研究进展[J].现代中药研究与实践,2009,23(4):75-78.
- [4] 张惟杰.糖复合物生化研究技术[M].杭州:浙江大学出版社,1994.
- [5] Dubois M,Gilles KA,Hamilton JK,et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances [J]. Analytical Chemistry,1956,28: 350-356.
- [6] Mawhinney TP,Feather MS,Barbero G.J,et al.The rapid, quantitative determination of neutral sugars (as aldononitrile acetates) and amino sugars (as O-methylxime acetates) in glycoproteins by gas-liquid chromatography [J].Analytical Biochemistry,1980,101: 112-117.
- [7] 赵国华,陈宗道,李志孝,等.活性多糖的研究进展[J].食品与发酵工业,2001,27(7):45-48.
- [8] 刘洋,赵谋明,杨宁,等.响应面分析法优化仙人掌多糖提取工艺的研究[J].食品与机械,2006,22(6):42-44.

(收稿日期 2011-12-01)

蒋剑平,等: 响应面分析法优化白花蛇舌草水溶性多糖的提取工艺

(上接第 186 页) 酮。从表 3 可以看出江苏产菟丝子总黄酮含量最高为 2.55%,而四川产菟丝子总黄酮含量最低为 0.38%,不同产地菟丝子中总黄酮含量差别较大。

金丝桃苷的含量是评价菟丝子药材质量的依据之一,聂新华<sup>[6]</sup>用 HPLC 法测定了几种不同产地菟丝子中金丝桃苷含量,含量范围从 0.07% 到 0.37%,差别较大。2010 版药典对菟丝子药材也新增了金丝桃苷的含量测定方法,规定菟丝子中金丝桃苷含量不得少于 0.10%。本实验尝试了文献的甲醇-0.4%磷酸、甲醇-0.2%磷酸、甲醇-0.1%磷酸、乙腈-1%冰醋酸、乙腈-0.1%磷酸、乙腈-水等流动相系统,结果只有按照 2010 版药典菟丝子的流动相乙腈-0.1%磷酸(17:83)所得的色谱图中金丝桃苷出峰时间短,峰形对称,分离度较好,其它流动相所得色谱图分离均不好。故采用流动相乙腈-0.1%磷酸(17:83)对不同产地菟丝子进行金丝桃苷的含量测定,从表 4 可以看出不同产地菟丝子中金丝桃苷含量差别显著,其中江苏产最高达 0.276%,四川产最低为 0.012%。结合表 3 和表 4 还发现菟丝子中总黄酮含量较高时,金丝桃苷含量也较高,二者呈一定相关性,这可能与金丝桃苷在菟丝子总黄酮中所占比重较大有一定关系。

2010 版中国药典规定菟丝子中金丝桃苷含量不得少于 0.10%,而根据本实验结果,菟丝子的很多产地药材不符合规定,因此在药材的产地选择中要

加以注意。另外菟丝子为寄生植物,不同寄主植物以及菟丝子种子成熟度对菟丝子的化学成分也有一定影响,林慧彬等<sup>[7]</sup>考查不同的寄主植物及不同生长环境对菟丝子药材中金丝桃苷含量的影响,结果发现植株较大的寄主植物如黄芩、大豆、牛膝等,营养物质供应比较充沛,菟丝子生长良好,籽粒饱满,金丝桃苷的含量高;而植株较小的寄主植物如葎草、猪毛菜等,种子往往不成熟,金丝桃苷含量低。因此除了产地,还需结合其它因素对菟丝子的质量进行综合评价。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典.一部[S].北京:中国医药科技出版社,2010:290-291.
- [2] 李建平,王静,张跃文,等.菟丝子的研究进展[J].中国医药导报,2009,6(23):5-6.
- [3] 伍晓春.超声波提取菟丝子总黄酮的工艺研究[J].食品研究与开发,2009,30(3):34-37.
- [4] 林倩,贾凌云,孙启时.菟丝子的化学成分[J].沈阳药科大学学报,2009,26(12):968-971.
- [5] 林慧彬,林建群,路宁,等.菟丝子及南方菟丝子的质量控制研究[J].中药材,2007,30(11):1446-1449.
- [6] 聂新华.高效液相色谱法测定菟丝子中金丝桃苷的含量[J].中国实验方剂学杂志,2006,12(9):13-14.
- [7] 林慧彬,杨金平,林建群,等.不同寄主植物对两种菟丝子中金丝桃苷含量的影响[J].中华中医药杂志,2008,23(1): 12-15.

(收稿日期 2011-12-01)