

## HPLC法同时测定山慈菇中3种成分

谢典<sup>1</sup>, 朱聪<sup>1</sup>, 潘红波<sup>1</sup>, 李晓静<sup>2</sup>, 徐步斌<sup>1\*</sup>, 周斌<sup>1\*</sup>

(1. 江西科技师范大学药学院, 江西南昌 330013; 2. 海军勤务学院, 天津 300450)

**摘要:**目的 建立 HPLC 法同时测定山慈菇中 dactylorhin A、militarine、秋水仙碱的含量。方法 山慈菇 70% 甲醇提取物的分析采用 DIKMA Diamonsil C<sub>18</sub> 色谱柱 (4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相乙腈-水, 梯度洗脱; 柱温 30 ℃; 体积流量 1 mL/min; 检测波长 224 nm。结果 3 种成分在各自范围内线性关系良好 ( $R^2 \geq 0.999 1$ ), 平均加样回收率为 94.18%~102.15%, RSD 为 1.53%~1.91%。结论 该方法准确稳定, 重复性好, 可用于山慈菇的质量控制。

**关键词:** 山慈菇; dactylorhin A; militarine; 秋水仙碱; HPLC

**中图分类号:** R284.1

**文献标志码:** B

**文章编号:** 1001-1528(2022)06-2050-04

**doi:**10.3969/j.issn.1001-1528.2022.06.059

山慈菇是兰科植物杜鹃兰 *Crematistra appendiculata* (D. Don) Makino、独蒜兰 *Pleione bulbocodioides* (Franch) Rolfe、云南独蒜兰 *Pleione yunnanensis* Rolfe 的假鳞茎, 秋季采摘, 摘弃茎叶洗净泥沙, 经晒干或烘干后加工而成。山慈菇分布广泛, 在长江以南、西北、西南等地区均有种植。山慈菇具有悠久的历史, 最初记载于唐代《本草拾遗》, 药性甘、微辛、凉, 归肝、脾经, 有清热解毒、化痰祛瘀的功效, 可用于痈肿疔毒、瘰癧痰核等由皮肤炎症或感染引发的外科疾病, 蛇虫咬伤等<sup>[1]</sup>。

从山慈菇中分离得到菲类、联苄类、糖及糖苷类、萜类、甾体类<sup>[2-10]</sup>等成分。山慈菇具有抗肿瘤<sup>[11-17]</sup>、降压<sup>[18-19]</sup>、抗菌<sup>[20-23]</sup>、抗痛风<sup>[24-25]</sup>等药理活性。在我国, 山慈菇常与其他中药配伍治疗肺癌、肝癌、大肠癌、乳腺癌等恶性肿瘤以及抗痛风治疗。dactylorhin A、militarine、秋水仙碱是山慈菇中主要的活性成分, 其中, dactylorhin A、militarine 属于丁二酸苄酯苷类成分, 能够提高由于用药导致缺损的老鼠记忆, 降低脑部神经损伤, 具有延缓衰老和抗老年痴呆的作用<sup>[26-28]</sup>, 秋水仙碱则具有良好的抗痛风、抗肿瘤作用。

近年来, 山慈菇的研究聚焦于抗肿瘤作用机制, 同时 dactylorhin A、militarine 和秋水仙碱的含量测定也分别有报道<sup>[29-32]</sup>。本研究首次建立 HPLC 法同时测定山慈菇中 dactylorhin A、militarine、秋水仙碱的含量, 以期如山慈菇药材的质量控制与评价提供依据。

### 1 材料

1.1 仪器 KQ-3200DB 型超声波清洗器 (江西赣仪科技有限公司); LR4000 型旋转蒸发仪 (德国 Heidolph 公司); 2550 型紫外-可见分光光度计 (日本岛津公司); 1100 型高

效液相色谱仪 (美国安捷伦公司); CP225D 型电子天平 (十万分之一, 瑞士 Mettler-Toledo 公司); 中药粉碎机 (天津市泰斯特仪器有限公司)。

1.2 试剂与药物 dactylorhin A 对照品 (批号 256459-34-4, 纯度  $\geq 98\%$ , 成都植标化纯生物技术有限公司); militarine (批号 DST190724-025, 纯度  $\geq 98\%$ )、秋水仙碱 (批号 DST190527-052, 纯度  $\geq 98\%$ ) 对照品 (成都德思特生物技术有限公司)。山慈菇购自云南省丽江市, 由江西中医药大学药学院邓可众副教授鉴定为正品。甲醇 (上海晶纯生化科技股份有限公司); 乙腈 (汕头市西陇科学股份有限公司); 纯净水 (杭州娃哈哈集团有限公司)。

### 2 方法与结果

#### 2.1 溶液制备

2.1.1 对照品溶液 称取 dactylorhin A、militarine、秋水仙碱对照品适量, 置于量瓶中, 甲醇稀释至刻度, 制成质量浓度分别为 0.097、1.006、0.541 mg/mL 溶液, 即得。

2.1.2 供试品溶液 将药材粉碎, 过 30 号筛, 称取粉末 0.5 g, 置于 50 mL 具塞锥形瓶中, 加入 70% 甲醇 50 mL, 静置 1 h, 超声 (100 W, 45 kHz) 处理 1 h, 滤过, 将滤液浓缩转移至 10 mL 量瓶中, 定容, 摇匀, 即得。

2.2 检测波长选择 将“2.1.1”项下对照品溶液于 200~600 nm 波长范围内扫描, 发现 dactylorhin A、militarine 最大吸收波长均为 224 nm, 秋水仙碱最大吸收波长为 242 nm, 但在 224 nm 处也有较好吸收。因此, 选择 224 nm 作为检测波长。

2.3 色谱条件 DIKMA Diamonsil C<sub>18</sub> 色谱柱 (4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相乙腈 (A)-水 (B), 梯度洗脱 (0~10 min, 10% A; 10~40 min, 10%~40% A; 40~

收稿日期: 2020-07-26

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81560635, 81760701)

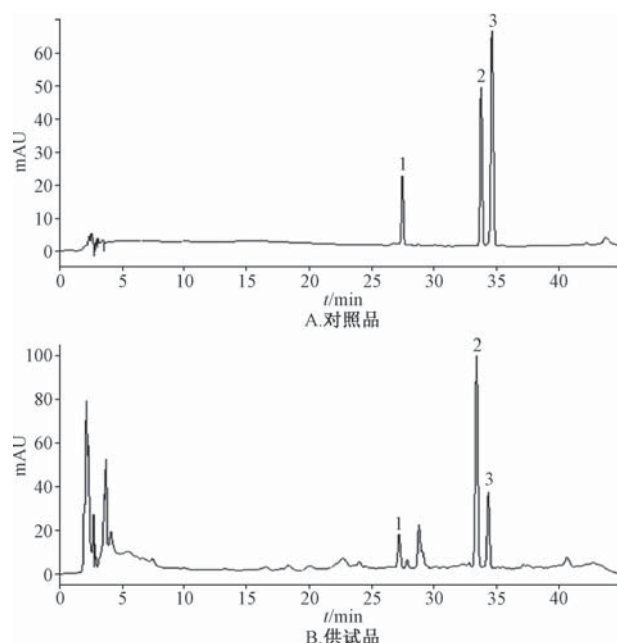
作者简介: 谢典 (1995—), 女, 硕士, 从事药物分析研究。Tel: 15979196329, E-mail: 1306122143@qq.com

\* 通信作者: 徐步斌 (1971—), 男, 博士, 讲师, 从事药物化学、中药活性成分研究。Tel: 17770180199, E-mail: bubxu@163.com

周斌 (1970—), 男, 博士, 教授, 从事中药新药研究。Tel: 15870664871, E-mail: tju\_zhoubin@163.com

45 min, 40%~10% A); 体积流量 1 mL/min; 柱温 30 ℃; 检测波长 224 nm; 进样量 10 μL。

2.4 专属性试验 精密吸取对照品、供试品溶液各 10 μL, 在“2.3”项色谱条件下进样测定, 结果见图 1。由此可知, 各成分分离度理想, 阴性无干扰, 表明该方法专属性良好。



1. dactylorhin A 2. militarine 3. 秋水仙碱

图 1 各成分 HPLC 色谱图

2.5 线性关系考察 精密吸取“2.1.1”项下对照品溶液适量, 甲醇定容至刻度, 制成系列质量浓度对照品溶液, 在“2.3”项色谱条件下进样测定。以峰面积为纵坐标 (Y), 对照品质量浓度为横坐标 (X) 进行回归, 并分别以 S/N=3、S/N=10 计算检测限、定量限, 结果见表 1, 可知各成分在各自范围内线性关系良好。

2.6 精密度试验 吸取“2.1.1”项下对照品溶液适量 (质量浓度分别为 dactylorhin A 29.9 μg/mL、militarine 83.5 μg/mL、秋水仙碱 34.6 μg/mL), 在“2.3”项色谱条件下进样测定 6 次, 测得 dactylorhin A、militarine、秋水仙碱峰面积 RSD 分别为 0.64%、0.28%、0.27%, 表明仪器精密度良好。

2.7 稳定性试验 精密称取药材粉末 0.5 g, 按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液, 于 0、2、4、6、8、10、24 h 在“2.3”项色谱条件下进样测定, 测得 dactylorhin A、militarine、秋水仙碱峰面积 RSD 分别为 0.62%、0.80%、1.04%, 表明溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.8 重复性试验 精密称取药材粉末 0.5 g, 共 6 份, 按“2.2”项下方法制备供试品溶液, 在“2.3”项下色谱条件进样测定, 测得 dactylorhin A、militarine、秋水仙碱峰面积 RSD 分别为 0.66%、0.79%、0.37%, 表明该方法重复性良好。

2.9 加样回收率试验 精密称取药材粉末 0.25 g, 平行 6 份, 按 100% 水平精密加入对照品溶液适量, 按“2.2”项下方法制备供试品溶液, 在“2.3”项色谱条件下进样测定, 计算回收率, 结果见表 2。

表 1 各成分线性关系

| 成分            | 回归方程               | $R^2$   | 线性范围/( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) | 检测限/( $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) | 定量限/( $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) |
|---------------|--------------------|---------|-------------------------------------------|----------------------------------------|----------------------------------------|
| dactylorhin A | $Y=12.672X-15.283$ | 0.999 8 | 4.85~58.2                                 | 16                                     | 48                                     |
| militarine    | $Y=18.514X-87.737$ | 0.999 3 | 10.06~160.96                              | 30                                     | 90                                     |
| 秋水仙碱          | $Y=44.044X-76.767$ | 0.999 1 | 5.41~54.1                                 | 18                                     | 54                                     |

表 2 各成分加样回收率试验结果 ( $n=6$ )

| 成分            | 取样量/g   | 原有量/ $\mu\text{g}$ | 加入量/ $\mu\text{g}$ | 测得量/ $\mu\text{g}$ | 回收率/%  | 平均回收率/% | RSD/% |
|---------------|---------|--------------------|--------------------|--------------------|--------|---------|-------|
| dactylorhin A | 0.250 7 | 98.32              | 97.00              | 194.90             | 99.57  | 99.58   | 1.53  |
|               | 0.251 1 | 97.97              | 97.00              | 195.54             | 100.59 |         |       |
|               | 0.251 3 | 98.81              | 97.00              | 194.35             | 98.49  |         |       |
|               | 0.250 6 | 99.76              | 97.00              | 193.96             | 97.11  |         |       |
|               | 0.251 0 | 99.03              | 97.00              | 196.96             | 100.95 |         |       |
|               | 0.251 1 | 98.89              | 97.00              | 196.64             | 100.77 |         |       |
| militarine    | 0.250 7 | 429.55             | 402.40             | 822.91             | 97.75  | 94.18   | 1.91  |
|               | 0.251 1 | 433.28             | 402.40             | 807.87             | 93.09  |         |       |
|               | 0.251 3 | 434.88             | 402.40             | 813.81             | 94.17  |         |       |
|               | 0.250 6 | 435.64             | 402.40             | 812.46             | 93.64  |         |       |
|               | 0.251 0 | 431.70             | 402.40             | 807.38             | 93.36  |         |       |
|               | 0.251 1 | 436.41             | 402.40             | 810.97             | 93.08  |         |       |
| 秋水仙碱          | 0.250 7 | 68.76              | 70.33              | 139.32             | 100.33 | 102.15  | 1.66  |
|               | 0.251 1 | 69.15              | 70.33              | 139.33             | 99.78  |         |       |
|               | 0.251 3 | 69.27              | 70.33              | 142.11             | 103.57 |         |       |
|               | 0.250 6 | 68.85              | 70.33              | 141.81             | 103.74 |         |       |
|               | 0.251 0 | 69.22              | 70.33              | 141.28             | 102.46 |         |       |
|               | 0.251 1 | 69.89              | 70.33              | 142.34             | 103.02 |         |       |

2.10 样品含量测定 精密称取药材粉末 3 份, 每份 0.5 g, 按“2.2”项下方法制备供试品溶液, 在“2.4”项色谱条件下进样测定, 计算含量, 结果见表 3。

表 3 各成分含量测定结果 (mg/g)

| 试验号 | dactylorhin A | militarine | 秋水仙碱    |
|-----|---------------|------------|---------|
| 1   | 0.393 3       | 1.718 0    | 0.275 4 |
| 2   | 0.391 9       | 1.733 0    | 0.275 0 |
| 3   | 0.395 3       | 1.740 0    | 0.276 6 |
| 平均值 | 0.393 5       | 1.730 0    | 0.275 7 |

### 3 讨论

本实验考察不同流动相体系(乙腈-水、甲醇-水)的分离效果, 比较超声法、回流法对于成分提取的效果。结果, 以甲醇-水为流动相体系所得的目标峰理论塔板数低, militarine、秋水仙碱色谱峰分离度差, 且基线不平稳, 而乙腈洗脱能力强、黏度低, 可以提高色谱峰理论塔板数, 使出峰提前, 有效缩短进样检测时间, 故选择以乙腈-水为流动相, 经过不断调整洗脱梯度, 使得 3 个目标峰有较好的分离度。同时, 进行超声和回流提取方式的比较, 测得两者相差不大, 超声提取简便、易操作、适用于多批次样品提取, 故选取超声为提取方法。以乙腈-水为流动相对 3 种成分进行分离和含量测定, 表明该方法具有较好的准确性、精密度和重复性。

### 4 结论

山慈菇有着悠久的药用历史, 具有抗肿瘤、降压、抗菌、镇痛等作用, 开发潜力较大。本研究首次建立 HPLC 法对山慈菇中 dactylorhin A、militarine、秋水仙碱进行含量测定, 该方法准确、重复性好, 可为山慈菇的质量控制提供参考。

### 参考文献:

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2020 年版一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 34-35.

[2] 朱毅. 杜鹃兰的化学成分研究[D]. 武汉: 湖北中医药大学, 2014.

[3] 申勇. 杜鹃兰 *Cremastra appendiculata* 化学成分及抗肿瘤活性研究[D]. 保定: 河北大学, 2007.

[4] 夏文斌, 薛震, 李帅, 等. 杜鹃兰化学成分及肿瘤细胞毒活性研究[J]. 中国中药杂志, 2005, 30(23): 1827-1830.

[5] 甘甜, 韩金秀, 田义新. 长白山珍稀药材山兰醋酸乙酯部位化学成分研究[J]. 中草药, 2017, 48(15): 3051-3055.

[6] 林冰, 周英. 山慈菇化学成分研究(I)[J]. 中国中医药资讯, 2011, 3(5): 183.

[7] 张尧, 黄波, 赵致, 等. 山慈菇乙酸乙酯部位化学成分研究[J]. 中药材, 2011, 34(12): 1882-1883.

[8] Li Y P, Chen Y P, Shao Y T, et al. A new phenanthraquinone from the aerial parts of *Cremastra appendiculata* [J]. *Chem Nat Compd*, 2020, 56(5): 785-787.

[9] Li Y, Wu Z H, Zeng K W, et al. A new prenylated flavone from *Pleione bulbocodioides*[J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2017, 19(7): 738-743.

[10] Shao S Y, Wang C, Han S W, et al. Two new phenanthrenequinones with cytotoxic activity from the tubers of *Pleione bulbocodioides*[J]. *Phytochem Lett*, 2020, 35: 6-9.

[11] 曹晓东, 张楠, 杨冬冬, 等. 定量蛋白质组学筛选及分析山慈菇酯提取物抗 4T1 乳腺癌的新启示[J]. 天然产物研究与开发, 2021, 33(2): 246-255.

[12] 叶丽芳, 徐俊鸿, 仇志坤. 山慈菇水提取物对胃癌 HGC27 细胞增殖抑制的影响[J]. 中医临床研究, 2019, 11(17): 28-30.

[13] 季漪, 吴勉华. 山慈菇化学成分及其抗肿瘤作用机制研究进展[J]. 中华中医药学刊, 2018, 36(3): 596-598.

[14] 于治凡, 刘英华, 肖均财, 等. 山慈菇对甲状腺癌 SW579 细胞增殖及凋亡的影响[J]. 癌症进展, 2018, 16(10): 1292-1294; 1298.

[15] 兴伟, 刘远, 徐墨, 等. 山慈菇通过 PI3K/Akt 信号通路影响乳腺癌 MDA-MB-231 细胞的增殖和凋亡[J]. 中国免疫学杂志, 2020, 36(6): 693-698; 706.

[16] 李雪莲, 李智, 黄芊, 等. 山慈菇介导 VEGF-A 血管生成抑制乳腺癌细胞上皮-间质转化的实验研究[J]. 中国医师杂志, 2019, 21(11): 1658-1662.

[17] 唐纯明, 何自力, 李军. 山慈菇提取物对肝癌细胞增殖及 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 表达的影响[J]. 山东医药, 2020, 60(8): 11-14.

[18] 孟海波. 山慈菇多糖的抗氧化及降脂作用研究[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2015.

[19] Fujisawa Pharmaceutical Co., Ltd. Antihypertensive crematosine I and II isolation; Japan, 57035518[P]. 1982-02-26.

[20] 田新新, 韩金秀, 田义新. 山兰对 3 种常见病原菌抑菌作用的研究[J]. 人参研究, 2016, 28(4): 33-35.

[21] 阮小丽, 施大文. 山慈菇的抗肿瘤及抑菌作用[J]. 中药材, 2009, 32(12): 1886-1888.

[22] 黄小容. 山慈菇水层部分抗菌活性筛选和分离纯化研究[D]. 贵阳: 贵州大学, 2009.

[23] 孙红祥. 一些中药及其挥发性成分抗霉菌活性研究[J]. 中国中药杂志, 2001, 26(2): 27-30.

[24] 马子密, 傅延龄. 历代本草药性汇解[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2002: 197.

[25] 孙佳. 治疗痛风和高尿酸血症药物进展[J]. 中国处方药, 2019, 17(1): 28-29.

[26] Zhang D, Liu G T, Shi J G, et al. *Coelloglossum viride* var. *bracteatum* extract attenuates D-galactose and NaNO<sub>2</sub> induced memory impairment in mice [J]. *J Ethnopharmacol*, 2006, 104(1-2): 250-256.

[27] 张丹, 张建军. CE 对衰老小鼠免疫器官指数以及神经系统病理改变的影响[J]. 中国神经免疫学和神经病学杂志, 2005, 12(5): 55-58; 77.

[28] Sakuno E, Kamo T, Takemura T, et al. Contribution of militarine and dactylorhin A to the plant growth-inhibitory

- activity of a weed-suppressing orchid, *Bletilla striata* [J]. *Weed Biol Manag*, 2010, 10(3): 202-207.
- [29] 崔保松, 宋 杰, 李 帅, 等. RP-HPLC 同时测定山慈菇药材中 dactylorhin A 和 militarine 的含量 [J]. 中国中药杂志, 2013, 38(24): 4347-4350.
- [30] 管伦兴, 储益平. 云南丽江山慈菇品种考证及有效成分秋水仙碱含量的研究 [J]. 中药与临床, 2015, 6(3): 1-3.
- [31] 林新艳, 王 宓, 徐 超, 等. 正交试验法优选山黄祛痛喷雾剂醇提工艺 [J]. 中国药业, 2019, 28(9): 28-30.
- [32] 杨红燕, 项微微, 李玲燕. HPLC 法指纹图谱在山慈菇真伪鉴别中的应用 [J]. 浙江中医杂志, 2020, 55(1): 72-73.

## 菊苣根中二氧化硫残留量分析及其风险评估

李耀磊<sup>1</sup>, 巨珊珊<sup>1</sup>, 张 冰<sup>1\*</sup>, 吴 昊<sup>1</sup>, 任志鑫<sup>1</sup>, 王 雨<sup>1</sup>, 林志健<sup>1</sup>, 金红宇<sup>2</sup>, 马双成<sup>2</sup>

(1. 北京中医药大学中药学院, 北京 102488; 2. 中国食品药品检定研究院, 北京 102629)

**摘要:** 目的 分析菊苣根中二氧化硫残留量, 并对其进行风险评估。方法 菊苣根加酸后水蒸气蒸馏, 3% 双氧水吸收、氧化, 离子色谱法测定二氧化硫含量。测定条件为 IonPac AS-11-HC 阴离子交换柱 (4 mm×250 mm, 10 μm), 洗脱液 20 mmol/L KOH 溶液; 柱温 30 ℃; 体积流量 1 mL/min; 电导检测器检测。基于危害系数法 (HI) 进行风险评估。结果 硫酸根在一定范围内线性关系良好 ( $r=0.999\ 9$ ), 平均加样回收率为 91.3%, RSD 为 0.45%, 残留量为 7.8~46.3 mg/kg。结论 菊苣根中二氧化硫潜在的安全风险整体较低。

**关键词:** 菊苣根; 二氧化硫; 风险评估; 离子色谱

**中图分类号:** R284.1

**文献标志码:** B

**文章编号:** 1001-1528(2022)06-2053-04

**doi:** 10.3969/j.issn.1001-1528.2022.06.060

外源性有害残留物的监测对中药质量控制具有重要的意义, 是中药材及饮片质量评价时不可或缺的一部分<sup>[1]</sup>。由于中药材及饮片在贮藏时, 容易产生虫蛀, 破坏药材及饮片的质量, 故传统多采用硫磺熏蒸的方法防止虫蛀<sup>[2-3]</sup>。硫磺熏蒸是我国药农传统习用中药材产地粗加工方法, 但硫磺熏蒸后的中药材及饮片中残留有挥发性二氧化硫, 过量的含硫物质的残留会对人体健康产生损害。因此, 关注中药材及饮片中的二氧化硫残留对于药品质量、疗效及患者安全具有重要的意义。

菊苣根为维吾尔族习用药材, 是常用的药食同源品种, 其具有调节血脂、降尿酸的作用, 可改善由高脂高嘌呤饮食引起的腹型肥胖、高尿酸血症<sup>[4-6]</sup>; 在日常生活中, 菊苣根多用来泡水服用, 市场上更有众多菊苣根茶相关产品。菊苣根中含有多糖, 因此在常规贮藏过程中极易产生虫蛀等问题而影响其质量, 硫熏是解决其虫蛀问题的方法之一。根据 2020 年度中药材/中药饮片质量不合格数据统计报告, 在 1 047 批药材及饮片中, 二氧化硫项目不合格有 25 批, 约占 2.4%。由此可见, 中药材及饮片过度硫熏问题仍然存在。本研究通过收集不同产地的菊苣根及饮

片, 将样品经加酸后水蒸气蒸馏法进行处理, 采用离子色谱法, 初步分析菊苣根中二氧化硫残留量情况, 对其安全性进行风险评估, 为菊苣药材质量评价提供基础数据支撑。

### 1 材料

1.1 仪器 ICS-3000 型离子色谱仪, 配置电导检测器 (美国赛默飞公司); XS105DU 电子天平、FX-200 电热套 (天津市泰斯特仪器有限公司); Milli-Q 超纯水仪 (美国 Millipore 公司)。

1.2 试剂与药物 硫酸根标准物质溶液 [中国计量科学研究院, 编号 GBW (E) 080266]。26 批菊苣根收集于河北安国、安徽亳州等地药材市场, 以及部分药店、药材公司 (编号 JJG1~JJG26), 经北京中医药大学中药学院张冰教授鉴定为正品。过氧化氢 (30%, 优级纯)、盐酸 (优级纯)、无水亚硫酸钠 (分析纯) (国药集团化学试剂有限公司); 水为去离子水。

### 2 方法与结果

2.1 色谱条件 采用离子色谱法测定二氧化硫含量。分析采用 AS11-HC 阴离子交换柱 (4 mm×250 mm, 10 μm)、

收稿日期: 2021-09-29

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (U20A20406); 北京市自然科学基金项目 (7212178)

作者简介: 李耀磊 (1990—), 男, 博士, 研究方向为中药防治代谢性疾病、中药药物警戒与合理用药

\* 通信作者: 张 冰 (1959—), 女, 博士, 教授, 主任医师, 研究方向为中药药物警戒与合理用药、中药药性理论与名老中医传承、中药防治代谢性疾病