

· 论著 ·

金线莲及其混伪品中总黄酮含量的比较研究

张超¹, 易骏², 张若青³, 杨淑玲¹, 叶齐⁴, 吴建国¹, 吴锦忠¹, 吴岩斌¹, 郑承剑⁴ (1. 福建中医药大学药学院, 福建福州 350122; 2. 福建教育学院理科部, 福建福州 350001; 3. 中国人民解放军天津康复疗养中心 464 医院药剂科, 天津 300381; 4. 福建农林大学生命科学学院, 福建福州 350002; 5. 海军军医大学药学院生药学教研室, 上海 200433)

[摘要] 目的 比较金线莲及其混伪品中总黄酮的含量。方法 以芦丁为对照品, 采用紫外分光光度法测定金线莲及其混伪品中总黄酮的含量。结果 12 批金线莲总黄酮含量在 3.89~15.17 mg/g 之间, 其中广东清远的野生金线莲总黄酮含量最高, 为 15.17 mg/g; 13 种混伪品的总黄酮含量在 3.66~21.96 mg/g 之间, 其中野生斑叶兰总黄酮含量最高, 为 21.96 mg/g。结论 金线莲及其混伪品中总黄酮含量存在明显差异。

[关键词] 金线莲; 混伪品; 总黄酮; 含量测定

[中图分类号] R931 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2019)06-0495-04

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2019.06.004

Content comparison of total flavonoids in Herba Anoectochilus and its adulterants

ZHANG Chao¹, YI Jun², ZHANG Ruoqing³, YANG Shuling¹, YE Qi⁴, WU Jianguo¹, WU Jinzhong¹, WU Yanbin¹, ZHENG Chengjian⁵ (1. College of Pharmacy, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, China; 2. Department of Chemistry and Life Science, Fujian institute of education, Fuzhou 350001, China; 3. Department of Pharmacy, 464 Hospital, Tianjin Rehabilitation and Recuperation Center of Chinese PLA, Tianjin 300381, China; 4. Department of Biological Science, College of Life Science, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China; 5. Department of Pharmacognosy, School of Pharmacy, Naval Medical University, Shanghai 200433, China)

[Abstract] **Objective** To compare the content of total flavonoids in Herba Anoectochilus and its adulterants. **Methods** Rutin was selected as reference substance, the total flavonoids in Herba Anoectochilus and its adulterants were determined by ultraviolet spectrophotometry. **Results** The contents of total flavonoids in 12 batches of Herba Anoectochilus varied widely, ranging from 3.89 to 15.17 mg/g, which could be noted that the total flavonoids contents of wild *A. roxburghii* from Guangdong were higher than the other sources. The contents of total flavonoids in 13 batches adulterants ranging from 3.66 to 21.96 mg/g, and *Goodyera schlechtendaliana* possessed the highest total flavonoids content. **Conclusion** The contents of total flavonoids in Herba Anoectochilus and its and adulterants were obviously different.

[Key words] Herba Anoectochilus; adulterants; total flavonoids; content determination

金线莲(Herba Anoectochilus)是福建特色中草药,来源于兰科(Orchidaceae)金线兰属植物金线兰 *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl. 的全草,具有清热解毒、凉血、祛风利湿等功效^[1-2]。现代药理研究表明金线莲具有免疫调节、抗肿瘤、降血糖、抗氧化、保肝、抗骨质疏松等药理作用^[3-11]。除

金线兰外,其他金线兰属植物包括:台湾银线兰 *A. formosanus*、恒春银线兰 *A. koshunensis*、浙江金线兰 *A. zhejiangensis*、峨眉金线兰 *A. emeiensis*、滇越金线兰 *A. chapaensis* 等,金线兰属植物在民间也混做金线莲使用^[12-13]。另外,由于药材形态特征相似,在市场上常有一些同科不同属近缘种植物如:斑叶兰属植物斑叶兰 *Goodyera schlechtendaliana* Rchb. f.、大花斑叶兰 *G. biflora* (Lindl.) Hook. f.、毛梗斑叶兰 *G. hispida* Lindl.、小小斑叶兰 *G. yangmeishanensi* T. P. lin.、天全斑叶兰 *G. wuana* T. Tang et F. T. wang、血叶兰属植物血叶兰 *Ludisia discolor* (Ker-Gawl.) A. Rich., 经过干燥加工后作为金线莲的伪品^[13]。黄酮类成分是金线莲主要的活性成分之一,具有抗氧化和降血糖

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(81603230;81773846);福建省科技厅引导性项目(2019Y0052);2017年度福建省高校杰出青年科研人才培育计划;上海市卫计委优秀学科带头人计划(2017BR004)

[作者简介] 张超,硕士,研究方向:中药活性成分及品质评价研究,Email: zccc4911@163.com

[通讯作者] 吴岩斌,副研究员,研究方向:中药资源品质评价,Email: wxsq1@163.com

等生物活性,也是衡量该药材质量的重要指标^[14-15]。虽然已有文献报道过金线兰、台湾银线兰和滇越金线兰中的黄酮类成分^[12,16-17],但是关于其他金线莲混伪品中黄酮类成分却鲜见报道。本研究分析金线莲及其混伪品中总黄酮含量的差异,将为金线莲资源的开发利用和药材质量控制提供参考依据。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

UV-1800 紫外可见分光光度计(日本岛津公司);RE-2000A 旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂);AB204-N 电子天平(METTLER TOLEDO);DFT-200 手提式高速万能粉碎机(温岭市林大机械有限公司)。

1.2 试剂

金线莲及其混淆品采自不同省市,经福建中医药大学药学院中药鉴定教研室黄泽豪教授鉴定;芦丁(成都普瑞法科技开发有限公司,批号:15010412,含量大于98%);硝酸铝、氢氧化钠、甲醇、乙醇为分析纯;蒸馏水(实验室自制)。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的制备

精密称取干燥至恒重的芦丁对照品 5.38 mg,置 25 ml 容量瓶中,加 10 ml 乙醇溶解,加水至刻度,摇匀,即得每 1 ml 中含芦丁 0.2152 mg 的对照品溶液。

2.2 供试品溶液的制备

取不同样品粉末约 1.0 g,精密称定,置索氏提取器中,加 70 ml 石油醚加热回流提取至提取液无色,弃去石油醚液,药渣挥去石油醚,加 95%乙醇继续提取至无色,提取液旋转浓缩至干,加入 95%乙醇超声溶解,定容,得总黄酮上清液。

2.3 标准曲线的制备

精密量取对照品溶液 1、2、3、4、5、6 ml,分别置 25ml 容量瓶中,加水至 6.0ml,再加 5%亚硝酸钠溶液 1 ml,混匀,放置 6 min,加 10%硝酸铝溶液 1 ml,摇匀,放置 6 min,加 4%氢氧化钠试液 10 ml,再加水至刻度,摇匀,放置 15 min,以相应的试剂为空白,在 510 nm 波长处测定吸光度,以吸光度(A)为纵坐标,相应浓度(C)为横坐标,计算得到总黄酮含量测定的回归方程: $A = 0.0111C - 0.0097$ ($r = 0.9996$),结果表明芦丁在 8.61~51.65 $\mu\text{g/ml}$ 范围内线性良好。

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度试验

精密吸取“2.1”项下制备的芦丁对照品溶液(215.2 $\mu\text{g/ml}$)6 份,按“2.3”项下方法测定吸光度,计算结果显示 6 份芦丁对照品反应后的吸光度的 RSD 为 0.46%,表明该方法的精密度良好。

2.4.2 重复性试验

取同一批样品(序号 8)1.0 g,平行称取 6 份,按“2.2”项下处理,按“2.3”项下方法测定吸光度,计算结果显示 6 份金线莲样品总黄酮反应体系的吸光度 RSD 为 2.66%,表明该方法测定金线莲总黄酮的含量重复性良好。

2.4.3 稳定性试验

取同一批样品(序号 8)1.0g,按“2.2”项下处理,按“2.3”项下方法测定吸光度,分别每隔 10 min 记录吸光度,计算结果显示该金线莲总黄酮反应体系的吸光度在 120 min 内 RSD 为 0.97%,表明该反应体系在 120 min 内稳定性良好。

2.4.4 回收率试验

取已知含有量的样品(序号 8)0.5 g,平行称定 6 份,按照“2.2”项下供试品溶液的制备方法提取总黄酮,分别取 3 ml 供试液置于 6 支 25 ml 容量瓶中,再分别加入 2.37 mg 芦丁对照品,按“2.3”项下方法测定吸光度,并计算总黄酮含量,计算回收率和 RSD。回收率结果见表 1,结果显示,金线莲总黄酮的平均回收率为 98.85%,RSD 为 2.91%,表明金线莲总黄酮的加样回收率良好。

表 1 金线莲总黄酮加样回收试验结果(n=6)

称样量(g)	样品量(mg)	加入量(mg)	实测量(mg)	回收率(%)	平均回收率(%)	RSD(%)
0.5003	2.3714	2.37	4.6321	95.39		
0.5003	2.3714	2.37	4.7050	98.46		
0.5000	2.3700	2.37	4.6530	96.33	98.85	2.91
0.5003	2.3714	2.37	4.7110	98.72		
0.5001	2.3705	2.37	4.7700	101.24		
0.5005	2.3724	2.37	4.8130	102.98		

2.5 样品含量的测定

精密吸取供试品溶液 3 ml 置 25 ml 容量瓶中,照“2.3”项下的方法,自“加水至 6.0 ml”起,依法测定吸光度,每批样品平行 3 次,根据标准曲线计算总黄酮含量,结果见表 2。

7 批来源于野生金线莲的样品总黄酮含量在 5.90~15.17 mg/g 之间,均值为 9.93 mg/g,RSD 为 33.04%,来源于广东清远的野生金线莲样品总

黄酮含量最高,为 15.17 mg/g;5 批组培金线莲样品的总黄酮含量在 3.89~5.57 mg/g 之间,均值为 4.50 mg/g,RSD 为 15.33%;5 批组培台湾银线兰样品的总黄酮含量在 3.66~9.91 mg/g,均值为 6.59 mg/g,RSD 为 44.30%;其余 7 种野生金线兰属样品总黄酮含量在 6.88~9.19mg/g 之间;4 种斑叶兰属植物(斑叶兰、大花斑叶兰、小小斑叶兰、天全斑叶兰)和 1 种血叶兰属植物(血叶兰),它们的总黄酮含量分别为 21.96、9.66、11.10、12.70 和 4.82mg/g。

表 2 金线莲及其混淆品中总黄酮的含量(n=3)

序号	样品	代码	采集地	含量(mg/g)
1	金线兰	<i>A. roxburghii</i>	AR-1 广东清远	9.57±0.02
2		<i>A. roxburghii</i>	AR-2 广西来宾	5.90±0.00
3		<i>A. roxburghii</i>	AR-3 广西南宁	12.10±0.01
4		<i>A. roxburghii</i>	AR-4 江西赣州	6.58±0.01
5		<i>A. roxburghii</i>	AR-5 广东清远	15.17±0.04
6		<i>A. roxburghii</i>	AR-6 广西南宁	11.63±0.03
7		<i>A. roxburghii</i>	AR-7 福建三明	8.55±0.01
8		<i>A. roxburghii</i>	AR-8 福建漳州	4.74±0.02
9		<i>A. roxburghii</i>	AR-9 福建漳州	5.57±0.01
10		<i>A. roxburghii</i>	AR-10 福建漳州	3.94±0.01
11		<i>A. roxburghii</i>	AR-11 福建漳州	3.89±0.00
12		<i>A. roxburghii</i>	AR-12 福建漳州	4.37±0.01
13	台湾银线兰	<i>A. formosanus</i>	AF-1 福建漳州	3.66±0.01
14		<i>A. formosanus</i>	AF-2 福建漳州	4.19±0.01
15		<i>A. formosanus</i>	AF-3 福建漳州	5.76±0.00
16		<i>A. formosanus</i>	AF-4 福建漳州	9.91±0.02
17		<i>A. formosanus</i>	AF-5 福建漳州	9.42±0.02
18	兴仁金线兰	<i>A. xingrenensis</i>	AX-1 贵州兴义	7.48±0.01
19		<i>A. xingrenensis</i>	AX-2 云南屏边	8.57±0.00
20	丽蕾金线兰	<i>A. lylei</i>	AL-1 云南景洪	7.00±0.00
21	南丹金线兰	<i>A. nandanensis</i>	AN-1 广西河池	7.29±0.01
22	长片金线兰	<i>A. longilobus</i>	LO-1 云南麻栗坡	6.88±0.00
23	短唇金线兰	<i>A. brevilabris</i>	AB-1 云南麻栗坡	9.52±0.01
24	滇南金线兰	<i>A. burmannicus</i>	BU-1 云南景洪	12.39±0.04
25	高金线兰	<i>A. elatus</i>	AE-1 云南景洪	9.19±0.01
26	斑叶兰	<i>Goodyera schlechtendaliana</i>	GS-1 浙江丽水	21.96±0.00
27	大花斑叶兰	<i>G. biflora</i>	GB-1 云南屏边	9.66±0.03
28	小小斑叶兰	<i>G. yangmeishanensis</i>	GY-1 广西河池	11.10±0.02
29	天全斑叶兰	<i>G. wuana</i>	GW-1 云南怒江	12.70±0.00
30	血叶兰	<i>Ludisia discolor</i>	LD-1 广西南宁	4.82±0.00

注:AR 8-12 分别是来自不同企业的组培金线兰;AF 1-5 分别是来自不同企业的组培台湾银线兰;其余样品均为野生。

3 讨论和结论

金线莲已成为福建省特色中药材“福九味”之一,但其来源混杂、混伪品多,导致药材质量良莠不齐,影响到临床用药的有效性和安全性。目前,市场上金线莲的主要伪品为斑叶兰属植物和血叶兰的全草,主要的混淆品或地方习用品为台湾银线兰、滇越金线兰等金线兰属植物。本研究采集了 30 批次不同来源的金线莲及其混淆品和伪品,包括金线兰、台湾银线兰、兴仁金线兰、丽蕾金线兰、南丹金线兰、长片金线兰、滇南金线兰、短唇金线兰、高金线兰、斑叶兰、大花斑叶兰、小小斑叶兰、天全斑叶兰、血叶兰,其中短唇金线兰和高金线兰为课题组在中国首次发现的金线兰属植物,其植物形态与金线兰极其相似,在云南省也被当作金线莲使用^[18-19]。

金线莲为全草类中药,色素较多,本试验通过石油醚回流提取后,再采用乙醇提取总黄酮,可以减少其他类成分对总黄酮含量测定的干扰。试验结果显示,金线莲及其混淆品、伪品的总黄酮含量存在差异。12 批次的金线莲总黄酮含量在 3.89~15.17 mg/g 之间,其余金线莲混淆品和伪品的总黄酮含量在 3.66~21.96 mg/g 之间。不同产地的野生金线莲总黄酮含量存在差异,这可能与其生长年限和生长环境等因素有关;不同厂家的组培金线莲和台湾银线兰的总黄酮含量差别较大,这可能与不同厂家生产组培品所用的外植体不同有关,此外组织培养所用的培养基、光照、温度等也可能对总黄酮的积累产生影响;金线莲与其混淆品、伪品中总黄酮的含量差异可能与种的不同及其生长环境有关。黄酮含量的高低,仅可作为金线莲质量评价的标准之一,若要全面地评价金线莲的质量,还应当对其多糖、内酯苷等成分进行系统的研究。

【参考文献】

- [1] 黄有霖. 福建省中药材标准[S]. 福州:海风出版社, 2006:154.
- [2] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志. 第 17 卷[M]. 北京:科学出版社,1999:225.
- [3] 张赛男. 金线莲多糖口服液调节免疫功能实验研究[J]. 实用中医药杂志,2014,30(11):987-988.
- [4] 翁秀华,王长连,袁曦,等. 金线莲对人前列腺癌 PC-3 细胞增殖能力的影响[J]. 中国医院药学杂志,2011,31(13):1083-1087.
- [5] 钟添华,黄丽英. 金线莲水提物给药前后肿瘤细胞蛋白质组的差异比较[J]. 中国医院药学杂志,2011,31(8):623-626.

- Functional connectivity of the hippocampus in temporal lobe epilepsy: feasibility of a task-regressed seed-based approach [J]. *Brain Connect*, 2013, 3(5): 464-474.
- [7] 韩彬, 刘立涛, 邵振俊, 等. 进口头孢替安酯体内抗菌作用的实验研究[J]. *四川生理科学杂志*, 2016, 38(2): 57-59.
- [8] 杨晨, 任凤英, 杨红, 等. 顶空气相色谱法测定盐酸头孢替安酯原料药中残留溶剂含量[J]. *医药导报*, 2016, 35(2): 177-180.
- [9] 任凤英, 李强, 杨晨, 等. RP-HPLC法测定盐酸头孢替安酯的含量及有关物质[J]. *国外医药(抗生素分册)*, 2012, 33(6): 253-257.
- [10] WANG D X, LING X, PENG H, et al. High-temperature analogy experimental investigation on dry granulating characteristic of rotating disk for waste heat utilization of molten slag[J]. *Appl Therm Eng*, 2017, 125(10): 846-855.
- [11] TAKEUCHI Y, YOSHIDA M, ITO A, et al. Uniformity of drug content during pharmaceutical dry granulating by roller compaction and tableting processes[J]. *J Drug Deliv Sci Technol*, 2009, 19(2): 119-124.
- [12] LAFONTAINE A, SANSELMÉ M, CARTIGNY Y, et al. Characterization of the transition between the monohydrate and the anhydrous citric acid[J]. *J Therm Anal Calorim*, 2013, 112(1): 307-315.
- [13] 杜昌群, 杜昌勇. 紫外分光光度法测定盐酸头孢替安酯片溶出度的方法[J]. *中国民康医学*, 2013, 25(4): 16-17.
- [14] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(四部) [S]. 北京: 化学工业出版社, 2015.
- [15] 林集端, 赵璐. PEG/ α -环糊精准聚轮烷水凝胶与BSA相互作用的光谱学研究[J]. *化工进展*, 2016, 35(11): 3590-3594.
- [16] WANG J, WILLIAMSON G S, YANG H. Branched polyrotaxane hydrogels consisting of α -cyclodextrin and low-molecular-weight four-arm polyethylene glycol and the utility of their thixotropic property for controlled drug release [J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2018, 165(5): 144-149.
- [收稿日期] 2018-12-03 [修回日期] 2019-07-07
[本文编辑] 陈盛新
-
- (上接第497页)
- [6] LI L, LI Y M, LIU Z L, et al. The renal protective effects of *Anoectochilus roxburghii* polysaccharose on diabetic mice induced by high-fat diet and streptozotocin[J]. *J Ethnopharmacol*, 2016, 178: 58-65.
- [7] ZHANG J G, LIU Q, LIU Z L, et al. Antihyperglycemic activity of *Anoectochilus roxburghii* polysaccharose in diabetic mice induced by high-fat diet and streptozotocin[J]. *J Ethnopharmacol*, 2015, 164: 180-185.
- [8] LIU Z L, LIU Q, XIAO B, et al. The vascular protective properties of kinsenoside isolated from *Anoectochilus roxburghii* under high glucose condition [J]. *Fitoterapia*, 2013, 86: 163-170.
- [9] ZENG B Y, SU M H, CHEN Q X, et al. Antioxidant and hepatoprotective activities of polysaccharides from *Anoectochilus roxburghii*[J]. *Carbohydr Polym*, 2016, 153: 391-398.
- [10] HSIAO H B, LIN H, WU J B, et al. Kinsenoside prevents ovariectomy-induced bone loss and suppresses osteoclastogenesis by regulating classical NF- κ B pathways [J]. *Osteoporos Int*, 2013, 24(5): 1663-1676.
- [11] 刘青, 刘珍伶, 周娟, 等. 金线莲多糖的体外抗氧化活性[J]. *华侨大学学报(自然科学版)*, 2010, 31(6): 718-720.
- [12] 尹泽楠, 徐柯心, 樊娇娇, 等. 中国兰科开唇兰属植物化学成分研究进展[J]. *环球中医药*, 2016, 9(9): 1153-1160.
- [13] 张铁, 万京, 沐建华, 等. 文山地区金线莲种质资源初步调查[J]. *文山师范高等专科学校学报*, 2005, 18(1): 26-28.
- [14] 尹泽楠, 徐柯心, 樊娇娇, 等. 中国兰科开唇兰属植物化学成分研究进展. *环球中医药*, 2016, 9(9): 1153-1160.
- [15] 吴岩斌, 张超, 张秀才, 等. 不同来源金线莲总黄酮含量及其体外抗氧化、降血糖活性研究[J]. *药学服务与研究*, 2017, 17(3): 206-209.
- [16] CAI J, NI J, ZHAO L, et al. An UPLC-MS/MS application to investigate the chemical composition of the ethanol extract from *Anoectochilus chapaensis* and its hypoglycemic activity in insulin-resistant HepG2 cells[J]. *J Chin Pharm Sci*, 2016, 25(5): 380-386.
- [17] 郑成凤, 潘裕添, 蔡文燕. HPLC-UV-MS/MS法对金线莲中黄酮类组分的鉴定和测定[J]. *天然产物研究与开发*, 2013, 25(10): 1381-1386.
- [18] 郑丽香, 田怀珍, 吴锦忠, 等. 中国兰科植物一新记录种: 高金线兰[J]. *中国现代中药*, 2018, 20(1): 14-16.
- [19] 吴岩斌, 田怀珍, 郑丽香, 等. 短唇金线兰: 中国兰科植物新记录种[J]. *亚热带植物科学*, 2017, 46(3): 285-287.
- [收稿日期] 2019-03-24 [修回日期] 2019-07-08
[本文编辑] 陈盛新