

HPLC 法测定金钱草中紫云英苷、山柰酚-3-O-芸香糖苷、槲皮素、山柰酚和异鼠李素

吴凡, 黄昌晶, 李洁, 程丹, 张伟, 徐步斌*, 周斌*

江西科技师范大学 药学院, 江西 南昌 330013

摘要: 目的 建立 HPLC-UV 法测定金钱草中紫云英苷、山柰酚-3-O-芸香糖苷、槲皮素、山柰酚和异鼠李素。方法 采用 Eclipse XDB-C₁₈ 色谱柱 (150 mm×4.6 mm, 3.5 μm), 流动相为甲醇-0.4% 磷酸水, 梯度洗脱, 检测波长 360 nm, 体积流量 0.5 mL/min, 柱温 30 °C, 进样量 10 μL。结果 紫云英苷、山柰酚-3-O-芸香糖苷、槲皮素、山柰酚、异鼠李素分别在 22.10~176.80、21.14~169.12、17.40~174.00、51.12~408.96、23.30~186.40 μg/mL 呈现良好线性关系 ($R^2 > 0.999 1$); 平均加样回收率分别为 99.50%、100.39%、99.93%、105.58%、98.96%, RSD 值分别为 1.07%、1.44%、0.57%、0.24%、0.65% ($n=6$)。结论 方法的重复性好, 操作简单, 结果准确, 可以用来控制金钱草药材及其制剂的质量。

关键词: 金钱草; 紫云英苷; 山柰酚-3-O-芸香糖苷; 槲皮素; 山柰酚; 异鼠李素; 高效液相色谱

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2024)01-0102-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2024.01.013

Determination of astragalín, kaempferol-3-O-rutinoside, quercetin, kaempferol, and isorhamnetin in *Lysimachia christinae* by HPLC

WU Fan, HUANG Changjing, LI Jie, CHENG Dan, ZHANG Wei, XU Bubín, ZHOU Bin

School of Pharmacy, Jiangxi Science and Technology Normal University, Nanchang 330013, China

Abstract: Objective To develop an HPLC method for determination of astragalín, kaempferol-3-O-rutinoside, quercetin, kaempferol, and isorhamnetin in *Lysimachia christinae*. **Methods** The analysis was performed on Eclipse XDB-C₁₈ column (150 mm × 4.6 mm, 3.5 μm). The mobile phase consisted of methanol and 0.4% phosphoric acid with gradient elution. The detection wavelength was 360 nm, flow rate was 0.5 mL/min, column temperature was 30 °C, and volume of injection was 10 μL. **Results** Astragalín, kaempferol-3-O-rutinoside, quercetin, kaempferol, and isorhamnetin showed good linear relationships of 22.10 — 176.80, 21.14 — 169.12, 17.40 — 174.00, 51.12 — 408.96, and 23.30 — 186.40 μg/mL ($R^2 \geq 0.999 1$), whose average recoveries were 99.50%, 100.39%, 99.93%, 105.58%, and 98.96% with RSD values of 1.07%, 1.44%, 0.57%, 0.24%, and 0.65% ($n=6$), respectively. **Conclusion** The method is reproducible, simple, and accurate, which can be used for the quality control of *Lysimachia christinae* and its preparations.

Key words: *Lysimachia christinae* Hance; astragalín; kaempferol-3-O-rutinoside; quercetin; kaempferol; isorhamnetin; HPLC

金钱草为报春花科植物过路黄 *Lysimachia christinae* Hance 的干燥全草, 具有利湿退黄、利尿通淋、解毒消肿等功效^[1]。金钱草中主要化学成分有黄酮、多糖等^[2-5]。药理研究表明, 金钱草具有抗炎镇痛、利尿排石等作用^[6-9]。目前对金钱草中化学成分分离、提取物的药理作用研究较多, 对药材中多种活性成分检测报道较少^[10-11]。本实验建立 HPLC-UV 法测定金钱草中 5 种黄酮类成分紫云英

苷、山柰酚-3-O-芸香糖苷、槲皮素、山柰酚和异鼠李素, 为金钱草药材的质量控制和进一步开发利用提供参考。

1 仪器与试剂

TU-1950 双光束紫外可见分光光度计, 北京普析通用仪器有限责任公司; 1100 高效液相色谱仪, 美国安捷伦公司; CP225D 分析天平, 天津市泰斯特仪器有限公司; XMTD203 恒温水浴锅, 江苏中

收稿日期: 2023-10-18

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81760701)

作者简介: 吴凡 (1999—), 男, 硕士研究生, 从事药物分析研究。E-mail: 2990560881@qq.com

*通信作者: 徐步斌, 副教授, 硕士生导师, 从事药物化学中药活性成分研究。E-mail: bubxu@163.com

周斌, 教授, 硕士生导师, 从事天然产物活性研究。E-mail: tju_zhoubin@163.com

大仪器科技有限公司; JC101 电热鼓风干燥箱, 上海成顺仪器仪表有限公司; KQ-200VDE 型双频数控超声波清洗器, 昆山市超声仪器有限公司。

金钱草药材采集于四川省, 批号 S1~S4, 经江西中医药大学邓可众教授鉴定为报春花科植物过路黄 *Lysimachia christinae* Hance 的干燥全草, 标本存放于江西科技师范大学药学院。紫云英苷对照品(成都埃法生物科技有限公司, 批号 AZ2111353, 质量分数 $\geq 98\%$); 山柰酚-3-*O*-芸香糖苷对照品(成都埃法生物科技有限公司, 批号 AF21092904, 质量分数 $\geq 98\%$); 槲皮素对照品(北京索莱宝科技有限公司, 批号 SQ8030, 质量分数 $\geq 98\%$); 山柰酚对照品(北京索莱宝科技有限公司, 批号 SK8030, 质量分数 $\geq 98\%$); 异鼠李素对照品(成都植标化纯生物技术有限公司, 批号 Z20105, 质量分数 $\geq 98\%$); 甲醇(批号 B2106011, 色谱纯)、磷酸(批号 100106, 分析纯)、盐酸(批号 1908051, 分析纯)均购自西陇化工股份有限公司; 娃哈哈纯净水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Eclipse XDB-C₁₈ 色谱柱(150 mm \times 4.6 mm, 3.5 μ m), 流动相为甲醇(A) - 0.4%磷酸水(B), 梯度洗脱(0~5 min, 30%~45% A; 5~15 min, 45%~60% A; 15~20 min, 60%~60.1% A; 20~25 min, 60.1%~80% A; 25~30 min, 80%~30% A), 检测波长 360 nm, 体积流量 0.5 mL/min, 柱温 30 $^{\circ}$ C, 进样量 10 μ L。

2.2 供试品溶液的制备

取金钱草粉末(过 100 目筛)约 2.0 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 80% 甲醇 50 mL, 密塞, 称定质量, 加热回流 1 h, 放冷, 再称定质量, 用 80% 甲醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过。精密量取续滤液 25 mL, 精密加入盐酸 5 mL, 置 90 $^{\circ}$ C 水浴中加热水解 1 h, 取出, 迅速冷却, 转移至 50 mL 量瓶中, 用 80% 甲醇稀释至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

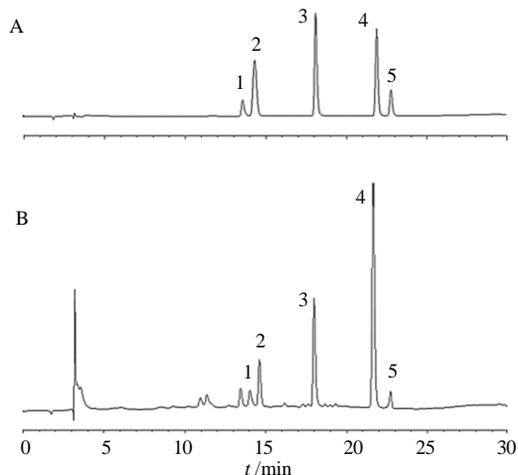
2.3 对照品溶液的制备

精密称取适量紫云英苷、山柰酚-3-*O*-芸香糖苷、槲皮素、山柰酚和异鼠李素对照品, 制备质量浓度分别为 0.215、1.060、0.870、0.640、0.240 mg/mL 的混合对照品溶液, 备用。

2.4 系统适用性试验

分别吸取适量混合对照品、金钱草供试品溶

液, 进样测定, 色谱图见图 1。在此色谱条件下, 紫云英苷、山柰酚-3-*O*-芸香糖苷、槲皮素、山柰酚、异鼠李素与其相邻各组分色谱峰分离度大于 1.5, 理论塔板数均符合要求, 供试品中紫云英苷、山柰酚-3-*O*-芸香糖苷、槲皮素、山柰酚、异鼠李素与混合对照品保留时间一致。



1-紫云英苷 2-山柰酚-3-*O*-芸香糖苷 3-槲皮素 4-山柰酚 5-异鼠李素
1-porphyrin 2-kaempferol-3-*O*-rutinoside 3-quercetin 4-kaempferol 5-isorhamnetin

图 1 混合对照品(A)和金钱草(B)的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatogram of mixed reference substances (A) and *Lysimachia christinae* (B)

2.5 线性关系考察

精密吸取混合对照品溶液适量, 分别置于 10 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 配制不同质量浓度的混合对照品溶液(含紫云英苷 176.80、132.60、88.40、44.20、22.10 μ g/mL, 山柰酚-3-*O*-芸香糖苷 169.12、126.84、84.56、42.28、21.14 μ g/mL, 槲皮素 174.00、130.50、87.00、43.50、17.40 μ g/mL, 山柰酚 408.96、306.72、204.48、102.24、51.12 μ g/mL, 异鼠李素 186.40、139.80、93.20、46.60、23.30 μ g/mL)。分别进样测定, 以质量浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 绘制标准曲线, 计算回归方程, 并以 S/N=3 和 S/N=10 计算检测限(LOD)和定量限(LOQ), 结果见表 1。

2.6 精密度试验

精密吸取适量的混合对照品溶液, 按以上色谱条件连续进样 6 次, 测定峰面积, 计算得紫云英苷、山柰酚-3-*O*-芸香糖苷、槲皮素、山柰酚和异鼠李素峰面积的 RSD 值分别为 0.25%、0.20%、0.13%、0.16%、0.14%。

表 1 线性关系考察结果

Table 1 Results of linear relationship investigation

成分	回归方程	R ²	线性范围/(μg·mL ⁻¹)	LOD/(μg·mL ⁻¹)	LOQ/(μg·mL ⁻¹)
紫云英苷	Y=3.991 0 X+6.931 2	0.999 6	22.10~176.80	0.69	2.36
山柰酚-3-O-芸香糖苷	Y=1.524 0 X+0.032 9	0.999 9	21.14~169.12	1.08	4.80
槲皮素	Y=3.670 8 X-16.805 0	0.999 1	17.40~174.00	0.41	1.82
山柰酚	Y=4.245 1 X-19.143 0	0.999 8	51.12~408.96	4.80	13.09
异鼠李素	Y=5.067 8 X-3.046 7	0.999 8	23.30~186.40	0.75	2.28

2.7 稳定性试验

取金钱草 (S1) 供试品溶液分别于 0、2、4、6、8、12、24 h 进样测定, 计算得紫云英苷、山柰酚-3-O-芸香糖苷、槲皮素、山柰酚、异鼠李素峰面积的 RSD 值分别为 0.58%、1.05%、0.33%、0.15%、1.26%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.8 重复性试验

精密称取金钱草 (S1) 粉末 2.0 g, 共 6 份, 制备供试品溶液, 进样测定, 计算得紫云英苷、山柰酚-3-O-芸香糖苷、槲皮素、山柰酚和异鼠李素质量分数的 RSD 值分别为 1.55%、1.24%、0.83%、1.39%、2.06%。

2.9 回收率试验

取金钱草 (S1) 粉末约 1.0 g, 精密称定, 共 6

份, 分别精密加入 0.215 mg/mL 紫云英苷、0.265 mg/mL 山柰酚-3-O-芸香糖苷、0.870 mg/mL 槲皮素、0.640 mg/mL 山柰酚和 0.240 mg/mL 异鼠李素对照品溶液 0.6、0.9、0.7、1.6、0.5 mL, 制备供试品溶液, 进样测定峰面积, 计算加样回收率, 结果紫云英苷、山柰酚-3-O-芸香糖苷、槲皮素、山柰酚和异鼠李素的平均加样回收率分别为 99.50%、100.39%、99.93%、105.58%、98.96%, RSD 值分别为 1.07%、1.44%、0.57%、0.24%、0.65%。

2.10 样品测定

称取金钱草粉末约 2.0 g, 精密称定, 各 3 份, 制备供试品溶液, 进样测定, 按外标法计算金钱草中紫云英苷、山柰酚-3-O-芸香糖苷、槲皮素、山柰酚和异鼠李素的质量分数, 见表 2。

表 2 金钱草中紫云英苷、山柰酚-3-O-芸香糖苷、槲皮素、山柰酚和异鼠李素测定结果 (n=3)

Table 2 Determination of astragalgin, kaempferol-3-O-rutinoside, quercetin, kaempferol, and isorhamnetin in *Lysimachia christinae* (n=3)

批号	质量分数/(mg g ⁻¹)				
	紫云英苷	山柰酚-3-O-芸香糖苷	槲皮素	山柰酚	异鼠李素
S2	0.26	0.48	1.20	2.07	0.22
S3	0.26	0.47	1.21	2.09	0.24
S4	0.27	0.48	1.22	2.08	0.23

3 讨论

因金钱草中黄酮类化合物呈弱酸性, 并参考《中国药典》2020 年版一部中金钱草的测定方法, 分别考察了甲醇-酸水溶液、乙腈-酸水溶液不同体系的醋酸和磷酸水溶液, 最终确定为甲醇-0.4% 磷酸水溶液系统梯度洗脱, 5 种黄酮类化合物能达到较好的分离。将紫云英苷、山柰酚-3-O-芸香糖苷、槲皮素、山柰酚和异鼠李素 5 种对照品溶液和金钱草供试品溶液分别在 300~450 nm 波长进行扫描, 根据紫外扫描图谱和预实验的结果, 选择 360 nm 作

为金钱草药材中活性成分测定的检测波长。

现代药理研究表明, 紫云英苷、山柰酚-3-O-芸香糖苷、槲皮素、山柰酚、异鼠李素具有抗肿瘤、调节脂质代谢和保护神经损伤等药理作用^[12-16], 对这些活性成分进行质量分析研究对金钱草的质量控制具有重要的实际意义。本研究建立 HPLC 法测定金钱草药材中紫云英苷、山柰酚-3-O-芸香糖苷、槲皮素、山柰酚和异鼠李素 5 种有效成分的方法, 方法的重复性好, 操作简单, 结果准确, 可以用来控制金钱草药材及其制剂的质量。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 229-230.
- [2] 陈亚南. 金钱草化学成分的分与结构鉴定 [D]. 昆明: 云南中医药大学, 2020.
- [3] 李军, 蔡泓, 王君明, 等. 金钱草化学成分、药理作用及临床应用 [J]. 中国老年学杂志, 2017, 37(24): 6262-6264.
- [4] 高飞飞. 金钱草的化学成分研究 [D]. 重庆: 西南大学, 2013.
- [5] 周凌波. 金钱草挥发性化学成分分析 [J]. 广西科学院学报, 2010, 26(3): 221-222.
- [6] 高志慧, 秦瑶, 王雪飞, 等. 金钱草多糖的研究进展 [J]. 科技创新与应用, 2017(17): 38.
- [7] 陶海英, 杨宏伟, 孔祥静, 等. 金钱草提取物对糖尿病肾病大鼠肾脏保护作用及对肾组织 Akt/GSK-3 β 信号通路的影响 [J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2020, 21(7): 576-580.
- [8] 李飞艳, 刘群群, 赵月珍, 等. 金钱草对高脂血症模型大鼠脂代谢及相关炎性因子的影响 [J]. 中国卫生工程学, 2020, 19(2): 303-304.
- [9] 刘晓晨. 金钱草和广金钱草中黄酮类化合物的鉴定比较及基于体内成分分析的金钱草抗大鼠肾草酸钙结石作用机制研究 [D]. 石家庄: 河北医科大学, 2019.
- [10] 廖明冬, 张晓春. HPLC 法同时测定金钱草中槲皮素、槲皮素-3-甲醚及山奈酚的含量 [J]. 中国药师, 2013, 16(12): 1856-1858.
- [11] 周祎, 郜红利. HPLC-DAD 法同时测定中药金钱草中 6 种活性成分的含量 [J]. 中国药师, 2016, 19(8): 1609-1611.
- [12] 梁勇, 陈伟. 紫云英苷对肺癌 A549 细胞增殖、迁移、凋亡和氧化应激的影响 [J]. 中国临床药理学杂志, 2023, 39 (7): 999-1003
- [13] 王婷婷, 张鹏珂. 异鼠李素通过上调自噬水平预防巨噬细胞脂质代谢紊乱 [J]. 实用心脑血管病杂志, 2023, 31(9): 70-73.
- [14] 张文通, 李俊, 吴玉婷. 山奈酚-3-O-芸香糖苷对血管平滑肌细胞增殖、迁移及 TGFBR1 信号通路活化的影响 [J]. 中国病理生理杂志, 2018, 34(5): 832-838.
- [15] 胡春雷, 廖博, 王琪, 等. 槲皮素通过抑制细胞凋亡减轻脊髓损伤 [J]. 神经损伤与功能重建, 2023, 18(10): 584-588
- [16] 朱志明, 周绮纯. 山奈酚通过 Met/PI3K/Akt/mTOR 通路诱导非小细胞肺癌 NCI-H1650 细胞发生自噬进而影响其增殖 [J/OL]. 中国肿瘤生物治疗杂志, https://kns.cnki.net/kcms2/article/abstract?v=OHSidZhWKUundCsf8z-RVyelqIqxrqKuzhf8Dky_tNNHmOBJFAnBPc_1aekRhDF6UN90JC9_62HLSZ_Mc-vg-VS8QTk6GN9OxNflx5mJlXKgON2LOiFQqQ==&uniplatform=NZKPT&language=gb

[责任编辑 解学星]