

Ⅳ区(保留时间约为 49.2~67.7 min):峰 15~20, 构成 5+6+3+6 的图谱结构,主要共有峰集中在 I、Ⅱ区。I 区为一组排列较紧密的强吸收峰群,1 号峰最强,峰值比例大约为峰 1>峰 4>峰 2≈峰 3≈峰 5。Ⅱ区为一组排列较疏,分离较佳的强吸收峰群,峰 10 最为突出,为共有峰的第一大峰,峰 10、8、6 相对比值较稳定,峰值比例大约为峰 10>峰 8>峰 6>峰 11≈峰 7≈峰 9。Ⅲ区为一组峰值比例较稳定的 3 峰群,经对照品对照峰 13 为槲皮苷峰,峰值比例大约为峰 13>峰 12>峰 14。Ⅳ区为一组分离度较差的弱峰群。

2.5.3 指纹峰相似度分析:采用国家药典委员会中药指纹图谱相似度软件 2004A 计算均值相似度,结果见表 3。表明不同批次的阳春砂仁相似度较高。

表 3 阳春砂仁药材指纹图谱相似度结果

Table 3 Similarity of HPLC fingerprint of fruits of *A. villosum*

编号	相似度	编号	相似度
1	0.937	10	0.947
2	0.977	11	0.954
3	0.950	12	0.967
4	0.960	13	0.943
5	0.962	14	0.994
6	0.979	15	0.993
7	0.994	16	0.975
8	0.980	17	0.995
9	0.945	18	0.986

3 讨论

试验用甲醇-水,甲醇-2%醋酸,甲醇-0.05% 磷酸的梯度洗脱作为流动相,结果甲醇-2%醋酸系统分离效果较好。用不同的检测波长检测及用光二极管阵列检测器分析,在 260 nm 波长处指纹峰较多,响应值均较大,而且基线较平稳,故选择 260 nm 作为指纹图谱检测波长。

供试品溶液的制备采用不同含水量的甲醇溶液

作为提取溶媒,结果含一定量水的甲醇液对极性较大的组分提取效果较好,但供试品溶液杂质较多,较黏稠,不利于浓缩。经试验用甲醇提取杂质较少,提取 3 次,可基本提取完全,提取的药液可浓缩后进入,某些相对质量分数较小的组分能在指纹图谱中显示出来,体现阳春砂仁的总体指纹特征面貌。通过比较回流提取及超声处理方法,超声处理方法简便,提取效果较好。通过比较样品直接用甲醇提取及先用石油醚(60~90℃)去脂后再用甲醇提取的方法,结果石油醚(60~90℃)去脂对指纹峰基本无影响,为操作方便,采用样品直接用甲醇提取的方法。

本试验测定了 18 批阳春砂仁的甲醇提取物,共有 20 个主要特征峰,总共有峰峰面积平均值为(90.58±3.59)%,各批样品间主要共有峰的相对保留时间较稳定,峰值比例较稳定,以 20 个共有峰作为指标,精密度、稳定性、重现性试验良好,因此可初步拟订为阳春砂仁的甲醇提取物成分指标成分群。相似度分析结果表明,广东省阳春市产的 18 批阳春砂仁 HPLC 指纹图谱相似度较高,达到 0.943~0.995,表明阳春砂仁甲醇提取物的 HPLC 图谱,具有指纹图谱的特征意义,为阳春砂仁药材的质量亦积累了一些的数据,具有一定的参考意义。

本研究初步建立了阳春砂仁 HPLC 指纹图谱研究方法,对不同品种的砂仁(阳春砂、绿壳砂、海南砂)、不同产地及不同采收时期砂仁 HPLC 指纹图谱特征性的区别,还有待于进一步的深入研究。

References:

- [1] Yu J G, Sun L, Zhou L D, et al. Studies on the chemical constituents of *Fructus Amomi* [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 1997, 22(4): 231-232.
- [2] Sun L, Yu J G, Zhou L D, et al. Two flavone glycosides from Chinese traditional medicine *Amomum villosum* [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2002, 27(1): 36-38.

HPLC 法测定鱼腥草不同生长季节、不同药用部位中黄酮类成分

黄琴伟¹, 张文婷², 赵维良^{2*}

(1. 浙江中医药大学药学院, 浙江 杭州 310053; 2. 浙江省药品检验所, 浙江 杭州 310004)

摘要:目的 以芦丁、金丝桃苷、槲皮苷为指标成分,建立了 RP-HPLC 法对鱼腥草中黄酮类成分进行定量测定,并考察鱼腥草不同生长季节、不同药用部位黄酮类成分的量。方法 利用高效液相色谱法梯度洗脱。色谱条件:

收稿日期:2006-12-21

作者简介:黄琴伟(1983—),女,浙江省温州市人,浙江中医药大学药理学硕士。Tel: (0571) 86459414 E-mail: qingwei-h@163.com

* 通讯作者 赵维良

Agilent ZORBAX SB-C₁₈分析柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm),柱温 25℃,流动相为乙腈-0.4% 磷酸溶液梯度洗脱,体积流量 1.0 mL/min,检测波长 256 nm。结果 芦丁、金丝桃苷、槲皮苷质量浓度与峰面积呈良好线性关系,线性范围分别是:芦丁 0.033 4~0.534 4 μg, $r=1$ ($n=6$);金丝桃苷 0.166 0~2.656 0 μg, $r=1$ ($n=6$);槲皮苷 0.380 5~6.088 0 μg, $r=1$ ($n=6$);回收率芦丁为 103.3%,金丝桃苷为 106.6%,槲皮苷为 107.6% ($n=9$)。结论 本方法分离度好,稳定,适合于作为鱼腥草的质量控制方法。黄酮类成分的量高低是:花>叶>果实>地上茎,地下部分基本无黄酮类成分。花期各成分的量相对高于果实期。

关键词:鱼腥草药材;黄酮;芦丁;金丝桃苷;槲皮苷;药用部位;高效液相色谱法

中图分类号:R282.6

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2007)08-1253-03

Determination of flavonoids in different fractions of *Herba Houttuyniae* collected in various seasons by HPLC

HUANG Qin-wei¹, ZHANG Wen-ting², ZHAO Wei-liang²

(1. College of Pharmacy, Zhejiang University of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou 310053, China;

2. Zhejiang Provincial Institute for Drug Control, Hangzhou 310004, China)

Key words: *Herba Houttuyniae*; flavonoids; rutin; hyperin; quercitrin; medical fractions; HPLC

鱼腥草为三白草科植物蕺菜 *Houttuynia cordata* Thunb. 的新鲜全草或干燥地上部分^[1]。花期 5~8 月,果期 7~8 月,全草供药用,清热解毒、利尿消肿。鱼腥草中含槲皮素、槲皮苷、芦丁、金丝桃苷等黄酮类成分。黄酮具有抗肿瘤、抗过敏等多种疗效。因此对鱼腥草中的黄酮类成分进行研究具有重大意义。目前鱼腥草中黄酮类成分的测定方法主要是高效液相色谱法^[2-5],并且不同季节、不同组织部位黄酮类成分量的比较分析尚未见报道。本实验首次建立了 HPLC 法同时测定鱼腥草中芦丁、金丝桃苷和槲皮苷的测定方法,并首次考察了鱼腥草不同生长季节、不同药用部位上述 3 种黄酮类成分的量,为鱼腥草的合理采收提供依据。

1 仪器与试药

1.1 仪器:Agilent 1100 系列高效液相色谱仪;G1379A 脱气机,G1311A 四元泵,G1313A 自动进样仪,G1316A 柱温箱,Chemstation 色谱工作站;TU-1901 型紫外-可见分光光度计(北京普析通用公司);SIGMA NSK1-15K 型高速冷冻离心机(德国 Sigma 公司)。

1.2 试剂、样品:芦丁对照品(供定量测定用,批号:0080-9705, P₂O₅减压干燥 24 h)中国药品生物制品检定所提供。金丝桃苷对照品(供定量测定用,批号:1521-200001, P₂O₅减压干燥 24 h)中国药品生物制品检定所提供。槲皮苷对照品(供定量测定用,批号:111538-200403, P₂O₅减压干燥 24 h)中国药品生物制品检定所提供。鱼腥草为浙江省药品检验所人工栽培品并经笔者鉴定为三白草科植物蕺菜 *Houttuynia cordata* Thunb. 的新鲜全草。乙腈为色谱纯,磷酸、甲醇均为分析纯。

2 方法

2.1 色谱条件:Agilent ZORBAX SB-C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱;柱温 25℃;体积流量 1.0 mL/min;检测波长:256 nm;流动相 A 为乙腈,流动相 B 为 0.4% 磷酸溶液;进样量:20 μL;梯度洗脱条件:0~35 min,流动相 A 为 85%,35~55 min,流动相 A 为 85%→78%,55~60 min,流动相 A 为 78%,60~70 min,流动相 A 为 78%→20%,70~75 min,流动相 A 为 20%→85%,75~80 min,流动相 A 为 85%。

2.2 混合对照品的制备:精密称取芦丁对照品 13.36 mg 于 100 mL 的量瓶中,用 50% 甲醇溶解并定容至刻度。精密称取金丝桃苷对照品 13.28 mg 于 100 mL 的量瓶中,用 50% 甲醇溶解并定容至刻度。精密称取槲皮苷对照品 15.22 mg 于 100 mL 的量瓶中,再分别精密加入上述芦丁对照品溶液、金丝桃苷对照品溶液 10、50 mL,用 50% 甲醇定容至刻度即得芦丁、金丝桃苷、槲皮苷质量浓度分别为 13.36、66.4、152.2 μg/mL 的混合对照品溶液。

2.3 供试品的制备:鱼腥草全草阴干后碾碎,精密称取生药 0.5 g,加入 50% 甲醇 25 mL,称定质量,水浴回流 45 min,取出,放冷,再称定质量,用 50% 甲醇补足减失的质量,摇匀,离心,取上清液,即得。

2.4 线性关系考察:精密吸取 2.2 项下的混合对照品溶液 2.5、5、10、20、30、40 μL 进样,以色谱峰面积(Y)对进样量(X)进行回归,计算回归方程,芦丁、金丝桃苷与槲皮苷的线性方程分别为 $Y=1901.1X-0.7631$, $r=1$,线性范围为 0.0334~0.534 4 μg; $Y=2727X+1.7554$, $r=1$,线性范围为 0.166~2.656 μg; $Y=2737.2X+19.139$,

$r=1$, 线性范围为 0.380 5~6.088 0 μg 。

2.5 精密度试验:精密吸取 2.2 项下的混合对照品溶液 20 μL ,在上述色谱条件下,重复进样 6 次,分别计算芦丁、金丝桃苷、槲皮苷的峰面积 RSD 值,芦丁 RSD 为 0.12%、金丝桃苷 RSD 为 0.10%、槲皮苷 RSD 为 0.08%,表明仪器进样精密度良好。

2.6 重现性试验:精密称取果实期鱼腥草全草 6 份,每份 0.5 g,照供试品溶液制备方法进行提取处理后,精密吸取 20 μL 在上述色谱条件下进行分析,计算峰面积的 RSD 值,芦丁 RSD 为 1.87%、金丝桃苷 RSD 为 1.79%、槲皮苷 RSD 为 2.55%,结果表明使用该法处理样品的重现性良好。

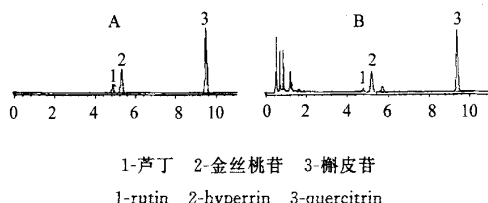


图 1 对照品(A)和鱼腥草叶(B)色谱图

Fig.1 HPLC Chromatograms of reference substance (A) and leaves of *Herba Houttuyniae* (B)

2.7 稳定性试验:果实期鱼腥草全草制备后,分别在 0、5、9、16、20、24 h 测定芦丁、金丝桃苷、槲皮苷的峰面积,结果表明芦丁、金丝桃苷、槲皮苷在 24 h 内稳定性良好,RSD 分别为 2.02%,2.46%,1.92%。

2.8 加样回收率试验:精密称取果实期鱼腥草全草 9 份,每份 0.25 g,3 份为一水平,分别精密加入 2.2 项下的混合对照品溶液 5、10、15 mL 混合对照品,用 50% 甲醇补足至 25 mL。按供试品溶液制备项下处理,在上述色谱条件下进行分析,结果芦丁平均回收率 103.3%,RSD 为 3.27%。金丝桃苷平均回收率 106.6%,RSD 为 3.85%。槲皮苷平均回收率 107.6%,RSD 为 2.77%。

2.9 不同季节、不同药用部位样品测定:收集不同生长季节鱼腥草的地下部分、地上茎、叶、花、果实,按供试品溶液制备项下处理,在上述色谱条件下进行分析,用外标法计算鱼腥草不同药用部位的芦丁、金丝桃苷、槲皮苷的量,结果见表 1。

3 讨论

3.1 实验通过对鱼腥草分别采用甲醇回流和 50% 甲醇回流,结果 50% 甲醇溶出率更高而且峰形更对称。对溶剂体积和回流时间进行考察优化,选用供

试品精密加入 50% 甲醇 25 mL,回流 45 min。

表 1 不同季节、不同药用部位样品鱼腥草黄酮类成分测定结果 ($n=2$)

Table 1 Determination of flavonoids in different fractions of *Herba Houttuyniae* collected in different seasons ($n=2$)

药用部位	采收/月份	取样量/ g	芦丁/ ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	金丝桃苷/ ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	槲皮苷/ ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)
地下部分	5	0.502 3	—	—	—
	7	0.499 1	—	—	—
	10	0.498 3	—	—	—
地上茎	5	0.503 2	—	0.127	0.186
	7	0.507 6	0.089	0.181	0.231
	10	0.470 7	—	0.164	0.120
叶	5	0.499 5	0.673	2.726	9.129
	7	0.507 8	0.644	2.837	7.075
	10	0.522 4	0.353	2.019	1.910
花	5	0.494 1	0.833	6.867	8.439
果实	7	0.508 9	0.216	2.082	1.467
	8	0.504 7	0.056	1.197	0.530

3.2 在选择流动相时,用甲醇-0.4% 磷酸溶液进行梯度洗脱,由于芦丁和金丝桃苷极性相似,分离效果不佳,换成乙腈-0.4% 磷酸溶液为流动相进行梯度洗脱后,芦丁和金丝桃苷能获得较好的分离度。

3.3 实验同时也对鱼腥草中的槲皮素的量进行测定,因为样品未水解,所以基本测不出槲皮素,故取消了对槲皮素的测定,只测芦丁、金丝桃苷和槲皮苷。

3.4 本实验分别在 5、7、8、10 月采集鱼腥草,主要比较了花期(5 月)和果实期(7、8 月)以及各药用部位黄酮类成分的量。从本实验的结果看出:地下部分基本无黄酮类成分,黄酮类成分量高低是:花>叶>果实>地上茎。花期各成分量相对高于果实期。尤其是花中的金丝桃苷和花期叶中的槲皮苷的量最高。7 月份采的果实是幼果,8 月份采的果实是成熟果,从实验结果来看:幼果的量高于成熟果。从上述多条规律可以得出花期采集的鱼腥草植株黄酮类量最高,其次是果实期。从黄酮类成分考虑,花期为最佳采收季节。

References:

- [1] Ch P (中国药典) [S]. Vol I. 2005.
- [2] Yang Y L, Zhou Q, Liu D H, et al. Study on determination of flavonoid in *Houttuynia cordata* Thunb. by solid phase extraction and RP-HPLC [J]. *J Yunnan Univ: Nat Sci* (云南大学学报:自然科学版), 2006, 28(2): 157-160.
- [3] Zheng Y M, Xu X Y, Fu S Q, et al. Quantitative determination of hyperoside and quercitrin in *Houttuynia cordata* by HPLC [J]. *Res Pract Chin Med* (现代中药与实践), 2005, 19(3): 27-29.
- [4] Bian Q Q, Liu J D, Li S. Determination and comparison of the content of quercetin in different kinds of *Houttuynia cordata* Thunb. [J]. *Chin J Spectrosc Lab* (光谱实验室), 2005, 22(5): 1118-1119.
- [5] Liu W Y, Liang A J, Bai H. Determination of quercetin in *Houttuynia cordata* Thunb. by HPLC [J]. *Pharm J Chin PLA* (解放军药学报), 1999, 15(6): 40-41.