

RP-HPLC 法同时测定福建产金线莲中槲皮素、山柰素、异鼠李素的量

刘知远¹, 沈廷明², 吴仲玉²

1. 福建省宁德市食品药品检验检测中心, 福建 宁德 352100

2. 福建省宁德市中医院, 福建 宁德 352100

摘要: 目的 建立同时测定金线莲中槲皮素、山柰素、异鼠李素的方法, 为金线莲及其相关产品的质量控制提供科学的方法。方法 采用高效液相色谱法, 选用 Lanbo-Kromasil-C₁₈ 色谱柱; 以甲醇-0.2%磷酸溶液 (50:50) 为流动相; 检测波长 360 nm, 体积流量 1.0 mL/min, 柱温为 30 °C。结果 槲皮素在 11.0~165.6 ng ($r=1.000\ 0$), 山柰素在 11.4~170.4 ng ($r=0.999\ 8$), 异鼠李素在 10.4~156.0 ng ($r=0.999\ 5$) 内呈良好的线性关系。平均加样回收率槲皮素为 97.69% (RSD=2.4%, $n=9$), 山柰素为 95.59% (RSD=1.5%, $n=9$), 异鼠李素为 95.86% (RSD=1.7%, $n=9$)。结论 本法简便、快速、准确、重复性好, 可作为金线莲质量控制的理想方法。

关键词: 金线莲; RP-HPLC; 槲皮素; 山柰素; 异鼠李素

中图分类号: R286.022 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2015)03-0432-03

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.03.024

Simultaneous determination of quercetin, kaempferide, and isorhamnetin in *Anoectochilus roxburghii* from Fujian by RP-HPLC

LIU Zhi-yuan¹, SHEN Ting-ming², WU Zhong-yu²

1. Fujian Province Ningde Institute for drug control, Ningde 352100, China

2. Fujian province Ningde Hospital of Traditional Chinese Medicine, Ningde 352100, China

Abstract: Objective To establish a method for determining the contents of quercetin, kaempferide, and isorhamnetin in *Anoectochilus roxburghii* and to provide scientific method for quality control of *A. roxburghii* and its related products. **Methods** HPLC was used. Using Lanbo-Kromasil-C₁₈ column, with methanol-0.2% phosphoric acid solution (50:50) as mobile phase; The detection wavelength was 360 nm, flow rate was 1.0 mL/min, and column temperature was 30 °C. **Results** Quercetin, kaempferide, and isorhamnetin showed a good linear relationship in the range of 11.0—165.6 ($r=1.000\ 0$), 11.4—170.4 ($r=0.999\ 8$), and 10.4—156.0 ng ($r=0.999\ 5$). The average recoveries of quercetin, kaempferide, and isorhamnetin were 97.69% (RSD=1.1%, $n=9$), 95.09% (RSD=1.6%, $n=9$), and 95.86% (RSD=1.7%, $n=9$). **Conclusion** The method is simple, rapid, accurate, reproducible, and can be used as an ideal method for quality control.

Key words: *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl; RP-HPLC; quercetin; kaempferide; isorhamnetin

金线莲 *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl 是兰科兰属多年生草本植物, 又名金线兰、金蚕、金不换等, 因其叶脉呈金黄色而得名^[1]。主要分布于我国广东、广西、福建、江西、四川省; 日本、斯里兰卡、印度、尼泊尔也有分布^[2]。民间有“药王”、“金草”之美誉, 其味甘、微苦, 性平、微寒, 具有清热凉血、祛风利湿、强心、固肾、利尿、平肝、降血压、解毒、止痛、镇咳等功效, 民间多用于治疗咯血、支气管炎、肾炎、膀胱炎、糖尿病、乳糜尿、血尿、风湿性关节炎、小儿急惊风、毒蛇咬伤

等, 近年来临床主要用于治疗高血压、糖尿病、心脏病、肺炎、急慢性肝炎、肾炎等病证^[3]。

目前金线莲产业发展迅速, 市场需求量巨大, 福建省政府已将金线莲产业列为十大重点种业创新与产业示范推广工程之一^[4], 如何对金线莲及相关产品的质量进行有效控制已经成为关键问题。本实验以金线莲中主要活性成分黄酮类成分槲皮素、山柰素、异鼠李素为定量指标, 建立了多种成分同时进行测定的方法, 为金线莲及其相关产品的质量控制提供科学依据。

收稿日期: 2014-12-03

作者简介: 刘知远 (1964—), 男, 主任中药师。Tel: (0593)2805203 E-mail: lzy059166@sina.com

1 材料

日本岛津 LC-2010A_{HT} 高效液相色谱仪；美国 Lanbo-Kromasil-C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)；KQ5200DB 型数控超声波清洗器(江苏昆山市超声仪器有限公司)；美国 MILLIPORE SIMS50000 超纯净水器；BP211D 电子分析天平(北京赛多利斯仪器有限公司, 十万分之一)；BS224S 电子分析天平(北京赛多利斯仪器有限公司, 万分之一)。

槲皮素、山柰素、异鼠李素对照品由中国食品药品检定研究院提供(批号 100081-200406、0861-200002、110860-200205)；甲醇为色谱纯(美国迪马公司)，盐酸、磷酸为分析纯；水为超纯水。样品由福建闽东地区金线莲种植基地收集，并经宁德市药品检验所刘知远主任中药师鉴定为金线莲 *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl, 具体信息见表 1。

表 1 样品信息

Table 1 Information of samples

编号	产地	编号	产地
JXL-1	周宁李墩	JXL-7	福鼎太姥山
JXL-2	宁德古田	JXL-8	福安赛岐
JXL-3	宁德霍童	JXL-9	宁德七都
JXL-4	宁德屏南	JXL-10	宁德七都
JXL-5	宁德霍童	JXL-11	宁德漳湾
JXL-6	宁德八都	JXL-12	福安坂中

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 Lanbo-Kromasil-C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm)；流动相为甲醇-0.2%磷酸溶液(50:50)；体积流量为 1 mL/min；检测波长为 360 nm^[5]；进样量 10 μL；柱温为 30 °C。理论板数按槲皮素峰计算应不低于 5 000。色谱图见图 1。

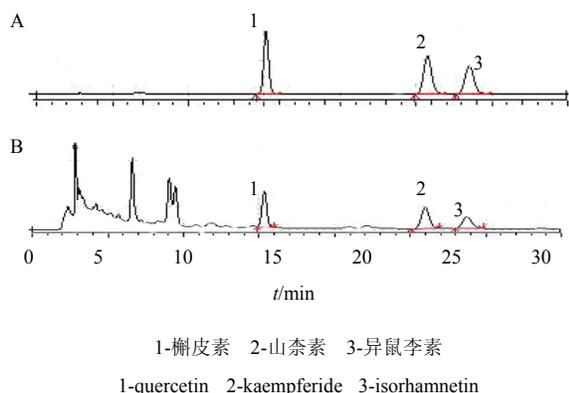


图 1 对照品 (A) 和样品 (B) HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of reference substance (A) and sample (B)

2.2 对照品溶液的制备

精密称取槲皮素、山柰素、异鼠李素对照品各适量，置 50 mL 容量瓶中，加甲醇溶解并稀释至刻度，溶解摇匀；精密吸取 1 mL，置 50 mL 量瓶，加甲醇至刻度，摇匀，制成含槲皮素 5.52 μg/mL、山柰素 5.68 μg/mL、异鼠李素 5.20 μg/mL 的溶液，过 0.45 μm 的微孔滤膜，即得。

2.3 供试品溶液的制备

取金线莲药材粉碎，过 3 号筛备用。精密称取 0.5 g，精密加入甲醇-盐酸(10:1)混合溶液 25 mL，称定质量，静置 30 min。置 60 °C 水浴中超声(200 W, 40 kHz) 1 h，放置至室温，补足损失的质量，滤纸滤过，再过 0.45 μm 的微孔滤膜，即得。

2.4 线性关系考察

取对照品溶液按进量 2、10、15、20、25、30 μL 依次进样，分别测定峰面积，以峰面积为纵坐标(Y)，进样量(X)为横坐标，进行线性回归，得回归方程：槲皮素 $Y=22\,224 X+100$, $r=1.000\,0$ ；山柰素 $Y=21\,127 X+3\,901$, $r=0.999\,8$ ；异鼠李素 $Y=17\,493 X+4\,001$, $r=0.999\,5$ 。表明槲皮素、山柰素、异鼠李素在进样量 11.0~165.6、11.4~170.4、10.4~156.0 ng 呈良好的线性关系。

2.5 精密度试验

取混合对照品溶液重复进样 6 次，每次进样量 10 μL，测定槲皮素、山柰素、异鼠李素峰面积，结果槲皮素、山柰素、异鼠李素峰面积 RSD 均小于 0.8% ($n=6$)，表明精密度良好。

2.6 重复性试验

取样品(JXL-3)，按照“2.3”项方法重复制备 6 份供试品溶液，依次进样 10 μL，测定槲皮素、山柰素、异鼠李素质量分数，结果槲皮素、山柰素、异鼠李素质量分数平均 RSD 均小于 1.9% ($n=6$)，表明重复性良好。

2.7 稳定性试验

取样品(JXL-3)，按照“2.3”项方法制备供试品溶液，分别于 0、5、10、15、20、24 h 进样 10 μL，测定槲皮素、山柰素、异鼠李素峰面积，结果槲皮素、山柰素、异鼠李素峰面积 RSD 均小于 1.7% ($n=6$)，表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.8 加样回收率试验

精密称取样品(JXL-3) 0.2 g，共 9 份，分成 3 组；取“2.2”项第一步稀释的对照品溶液 0.2、0.4、0.6 mL 分别加入样品中，按照“2.3”项方法制备供

试品溶液,依次进样 10 μL ,分别测定槲皮素、山柰素、异鼠李素的量,结果显示,槲皮素、山柰素、异鼠李素的平均回收率分别为 97.69%、95.59%、95.86%;RSD 值分别为 2.4%、1.5%、1.7%。

2.9 样品测定

取不同产地的样品按照“2.3”项下方法制备供试品溶液,分别进样 10 μL ,分别测定峰面积,计算槲皮素、山柰素、异鼠李素质量分数,结果见表 2。

表 2 样品测定结果 ($n=3$)

Table 2 Results of samples determination ($n=3$)

编号	质量分数/%		
	槲皮素	山柰素	异鼠李素
JXL-1	0.034 3	0.033 7	0.018 9
JXL-2	0.022 5	0.025 4	0.017 2
JXL-3	0.020 8	0.022 0	0.015 8
JXL-4	0.017 8	0.016 1	0.013 6
JXL-5	0.019 0	0.017 9	0.014 2
JXL-6	0.016 6	0.015 2	0.013 0
JXL-7	0.033 7	0.032 1	0.021 1
JXL-8	0.031 4	0.030 1	0.018 4
JXL-9	0.018 6	0.019 4	0.011 7
JXL-10	0.020 7	0.019 5	0.014 0
JXL-11	0.017 2	0.016 0	0.012 5
JXL-12	0.024 5	0.023 3	0.017 8

3 讨论

3.1 指标性成分的选择

现代科学研究表明金线莲主要含有黄酮类、糖类、生物碱类、甾体类、三萜类和氨基酸类等成分,黄酮类是重要的有效成分之一^[6],具有扩张冠状动脉、增加脑血流量、改善脑营养、抗菌、抗氧化、抗肿瘤、抗病毒^[7]等作用。槲皮素、山柰素、异鼠李素是金线莲中黄酮类主要活性成分^[8]。

3.2 提取方法的选择

黄酮类化合物在植物中很少以游离态存在,大部分以苷类等结合态的形式存在^[9]。槲皮素、山柰素峰、异鼠李素属于黄酮类苷元,因此在提取时必须先进行水解反应。本实验选用多种不同浓度的甲醇、乙醇及不同比例的醇-盐酸混合溶剂进行比较,发现醇-盐酸混合液提取与单独使用醇提取相比,3种成分峰的总面积相差巨大,单独醇提取的峰总面积很小,这进一步说明了酸水解的必要性。实验结果甲醇-盐酸溶液(10:1)混合溶液峰总面积最大;提取方法上用回流提取法与超声提取法进行对比,结果峰总面积相差不大,因此选用更加方便快捷

的超声提取法;提取温度方面,较高提取温度(70 $^{\circ}\text{C}$)对槲皮素有破坏作用,61 $^{\circ}\text{C}$ 提取效果最好^[10];在提取时间上,选 30、60、90 min 进行实验,结果 30 min 峰面积较小,60、90 min 差别不明显,因此最后确定 60 min。高效液相色谱定量分析方法的制定,关键是样品的前处理,前处理越复杂,误差就越大。本方法前处理简单,避免了繁杂的步骤,减少了操作上的误差。

3.3 流动相的选择

黄酮类化合物分子结构中带有多个羟基,通常呈弱酸性,因此应使用酸性的流动相,《中国药典》2010 年版金钱草定量测定流动相采用甲醇-0.4%磷酸(47:53)。但该流动相酸性较大,pH 约为 1,只能使用特殊的酸性柱,考虑到尽可能使系统的适用性更广,故改用酸性较小的甲醇-0.2%磷酸(50:50),结果色谱峰分离度良好,且单针运行时间较短。

质量控制是中药开发利用的关键,本方法简便、快速、准确、重复性好,可作为金线莲及其相关产品质量控制的理想方法。

参考文献

- [1] 杨春勇,李 戈,王艳芳,等.福建金线莲 DALP 遗传多样性分析[J].中草药,2014,45(19):2824-2828.
- [2] 中国科学院北京植物研究所.中国高等植物图鉴(第5册)[M].北京:科学出版社,1976.
- [3] 关 景,王春兰,郭顺星.福建产金线莲中黄酮苷成分的研究[J].中草药,2005,36(10):1450-1453.
- [4] 林晓红.福建南靖金线莲产业发展的优势、问题及对策[J].亚热带植物科学,2013,42(1):82-85.
- [5] 胡 月,李启艳.RP-HPLC 法测定垂盆草药材中槲皮素、山柰素、异鼠李素的含量[J].药物分析杂志,2010,30(1):507-510.
- [6] 张秀才,吴岩斌,吴锦玉,等.金线莲总黄酮回流提取工艺研究[J].福建中医药,2013,44(4):53-55.
- [7] 郑成凤,潘裕添,蔡文燕,等.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):1381-1383.
- [8] 牟 洋,李顺兴,陈丽慧,等.高效液相色谱法同时检测 4 种黄酮苷元及其在提取工艺评价中的应用[J].分析科学学报,2013,29(4):465-468.
- [9] 万素英,赵亚军,李 琳,等.尚待开发的一类天然食品抗氧化剂——黄酮类化合物[J].中国食品添加剂,1998,20(4):29-34.
- [10] 余 清.乌饭树叶中黄酮等有效成分分析及抗肿瘤作用研究[D].福州:福建农林大学,2008.