

HPLC 法同时测定珍珠菜提取物中 5 种黄酮

陈韶华¹, 邹意琼^{1,2}, 吴威¹, 李夏¹, 许琼明^{1*}, 杨世林¹

1. 苏州大学药学院, 江苏 苏州 215123

2. 西南药业股份有限公司, 重庆 400038

摘要: 目的 建立同时测定珍珠菜提取物中芦丁、异鼠李素-3-*O*-芸香糖苷、江户樱花苷、槲皮素、山柰酚的 HPLC 方法。方法 采用 Chromasil C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5.0 μm), 柱温 35 °C, 以乙腈-0.1%磷酸水溶液为流动相, 梯度洗脱, 双波长检测 (λ₁=283 nm, λ₂=370 nm), 体积流量 1.0 mL/min。结果 5 个成分均能达到基线分离, 线性回归方程分别为芦丁 $Y=14\ 958 X+179.22$ ($r=0.999\ 3$), 异鼠李素-3-*O*-芸香糖苷 $Y=12\ 126 X+3.14$ ($r=0.999\ 4$), 江户樱花苷 $Y=23\ 821 X+76.81$ ($r=0.999\ 4$), 槲皮素 $Y=35\ 761 X-20.30$ ($r=0.999\ 5$), 山柰酚 $Y=39\ 078 X+1.81$ ($r=0.999\ 1$), 芦丁、异鼠李素-3-*O*-芸香糖苷、江户樱花苷、槲皮素、山柰酚进样量分别在 228.60~1 143.00、99.60~498.00、232.20~1 161.00、22.08~110.40、15.12~75.60 ng 与峰面积线性关系良好, 平均回收率分别为 97.8%、98.9%、102.4%、98.4%、92.2%。结论 本检测方法简便、准确, 为珍珠菜提取物中黄酮类成分的质量控制提供了依据。

关键词: HPLC; 珍珠菜提取物; 芦丁; 江户樱花苷; 槲皮素; 异鼠李素-3-*O*-芸香糖苷; 山柰酚

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2011)07-1317-04

Simultaneous determination of five flavonoids in extract of *Lysimachia clethroides* by HPLC

CHEN Shao-hua¹, ZOU Yi-qiong^{1,2}, WU Wei¹, LI Xia¹, XU Qiong-ming¹, YANG Shi-lin¹

1. College of Pharmacy, Soochow University, Suzhou 215123, China

2. The Southwest Pharmaceutical Co., Ltd., Chongqing 400038, China

Abstract: Objective To develop an HPLC method for determination of five flavonoids (rutin, isorhamnetin-3-*O*-rutinoside, prunin, quercetin, and kaempferol) in extract of *Lysimachia clethroides*. **Methods** HPLC was performed on a Chromasil C₁₈ analytical column (250 mm × 4.6 mm, 5.0 μm) at 35 °C with acetonitrile-0.1% phosphoric acid solution as the mobile phase by gradient elution. The detection wavelengths were 283 and 370 nm and the flow rate was 1.0 mL/min. **Results** Five flavonoids were separated perfectly. The equation linear regressions were rutin $Y=14\ 958 X+179.22$ ($r=0.999\ 3$), isorhamnetin-3-*O*-rutinoside $Y=12\ 126 X+3.14$ ($r=0.999\ 4$), prunin $Y=23\ 821 X+76.81$ ($r=0.999\ 4$), quercetin $Y=35\ 761 X-20.30$ ($r=0.999\ 5$), and kaempferol $Y=39\ 078 X+1.81$ ($r=0.999\ 1$). Linearities of rutin, isorhamnetin-3-*O*-rutinoside, prunin, quercetin, and kaempferol were good in ranges of 228.60–1143.00, 99.60–498.00, 232.20–1161.00, 22.08–110.40, and 15.10–75.60 ng, respectively. The average recoveries were 97.8%, 98.9%, 102.4%, 98.4%, and 92.2%, respectively. **Conclusion** The validated method is simple, accurate, and able to provide the basis for the quality control of flavonols in active fraction of *L. clethroides*.

Key words: HPLC; extract of *Lysimachia clethroides* Duby; rutin; prunin; quercetin; isorhamnetin-3-*O*-rutinoside; kaempferol

珍珠菜为报春花科植物虎尾珍珠菜 *Lysimachia clethroides* Duby 的根或全草, 具有清热利湿, 活血散瘀, 解毒消痈的作用^[1]。文献报道^[2-4]其化学成分主要为黄酮类和皂苷类, 早期文献报道^[5]珍珠菜黄酮苷对腹水型网状细胞肉瘤细胞有显著破坏作用,

并对瘤细胞有丝分裂有较明显的抑制作用。本课题组对珍珠菜抗肿瘤活性部位的化学成分进行了较系统的研究, 发现其中总黄酮苷具有较好的抗肿瘤作用^[6-9]。以芦丁作为对照品, 采用紫外分光光度法^[10]测定了珍珠菜提取物中总黄酮的量约为 55.2%。珍

收稿日期: 2010-09-09

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30873362); “重大新药创制” 科技重大专项资助项目 (2009ZX09102-135)

作者简介: 陈韶华 (1961—), 女, 高级实验师, 研究方向为天然药物化学。Tel: (0512)65882070 E-mail: chenshaohua@suda.edu.cn

*通讯作者 许琼明 Tel: (0512)65882080 E-mail: xuqiongming@suda.edu.cn

珠菜中含有丰富的二氢黄酮, 但紫外分光光度法不能准确测定, 为了更好地控制珍珠菜提取物中黄酮类成分的量, 本实验建立了以 HPLC 双波长法同时测定提取物中芦丁、异鼠李素-3-O-芸香糖苷、江户樱花苷、槲皮素、山柰酚的方法。

1 仪器与材料

日本 Shimadzu LC-20A 高效液相色谱仪 (日本岛津公司), 含 SPD-M20A 二极管阵列检测器, CBM-20A 系统控制器, CTO-20A 柱温箱; EL-204 十万分之一分析天平 (上海梅特勒-托利多仪器有限公司); SE-93 自动双重蒸馏水蒸馏器 (上海亚荣生化仪器厂); KQ-100DE 数控超声仪 (昆山市超声仪器有限公司); N-1001 旋转蒸发仪 (日本东京理化器械株式会社); C-605 中压制备色谱仪 (瑞士 Buchi 公司)。

芦丁、异鼠李素-3-O-芸香糖苷、江户樱花苷、槲皮素、山柰酚对照品均由本实验室分离得到, 经 MS、 $^1\text{H-NMR}$ 和 $^{13}\text{C-NMR}$ 确定结构, HPLC 峰面积归一化法分析质量分数均达到 98% 以上。珍珠菜药材采购于苏州雷允上药材采购站, 经苏州大学药学院生药教研室刘春宇教授鉴定为 *Lysimachia clethroides* Duby 的全草; 珍珠菜提取物样品由苏州

大学药学院唐丽华课题组提供 (批号分别为 200801、200802、200803, 以芦丁为对照品, UV 法测定提取物中总黄酮的质量分数大于 50%)。乙腈为色谱纯, 水为二次蒸馏水, 其余试剂为分析纯; 色谱硅胶为青岛海洋化工厂生产。

2 方法与结果

2.1 珍珠菜提取物的制备

取珍珠菜干燥药材, 用 10 倍量 80% 乙醇提取 3 次, 合并提取液, 加水沉淀除去弱极性物质, 上清液浓缩至无醇味, 滤过, 滤液上 AB-8 大孔树脂, 上样后先用水洗脱至无色, 再依次用 40%、95% 乙醇洗脱, 将 40% 乙醇洗脱部位浓缩、冷冻干燥成粉末, 即得珍珠菜提取物。

2.2 色谱条件

色谱柱为 Chromasil C₁₈ 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5.0 μm); 流动相为乙腈 (A) - 0.1% 磷酸水溶液 (B), 梯度洗脱: 0~20 min, 13%~35% A; 20~30 min, 35%~100% A; 体积流量 1.0 mL/min; 双波长检测 $\lambda_1=283$ nm (江户樱花苷), $\lambda_2=370$ nm (芦丁、异鼠李素-3-O-芸香糖苷、槲皮素、山柰酚); 柱温 35 °C。色谱图见图 1。

2.3 对照品储备液的制备

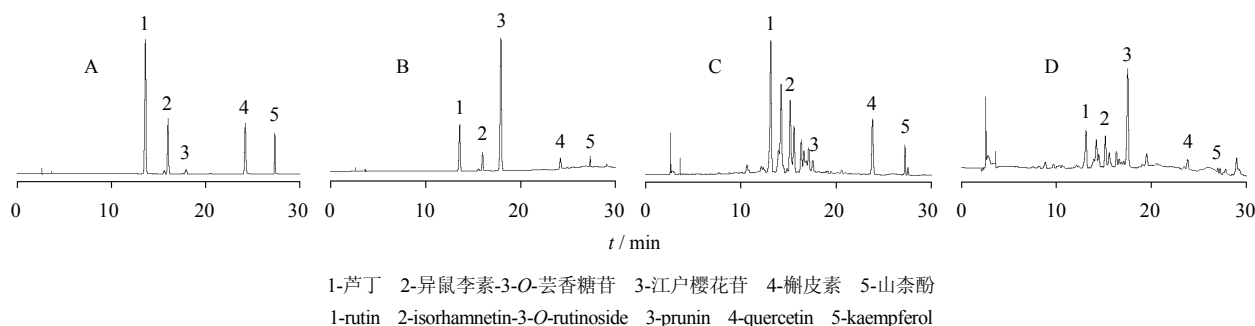


图 1 混合对照品 (A: $\lambda=370$ nm, B: $\lambda=283$ nm) 和珍珠菜提取物 (C: $\lambda=370$ nm, D: $\lambda=283$ nm) 的 HPLC 色谱图
Fig. 1 HPLC chromatograms of mixed reference substances (A: $\lambda=370$ nm, B: $\lambda=283$ nm) and *L. clethroides* extract (C: $\lambda=370$ nm, D: $\lambda=283$ nm)

精密称取各对照品适量, 用甲醇溶解并定容, 分别得到含芦丁 381.0 μg/mL、异鼠李素-3-O-芸香糖苷 166.0 μg/mL、江户樱花苷 387.0 μg/mL、槲皮素 55.2 μg/mL、山柰酚 25.2 μg/mL 的对照品储备液。

2.4 供试品溶液的制备

精密称取珍珠菜提取物样品 25.0 mg, 置 25 mL 量瓶中, 加甲醇定容至刻度, 摇匀, 过 0.45 μm 膜, 即得供试品溶液。

2.5 线性关系考察

分别精密量取芦丁、异鼠李素-3-O-芸香糖苷、江户樱花苷和山柰酚对照品储备液各 15.0、12.0、9.0、6.0、3.0 mL 及槲皮素对照品储备液 10.0、8.0、6.0、4.0、2.0 mL, 分别置 100 mL 量瓶中, 甲醇稀释并定容至刻度, 摇匀, 配制成一系列质量浓度的混合对照品溶液, 精密吸取各混合对照品溶液 20 μL, 分别注入液相色谱仪, 测定, 以进样量为横坐标, 峰面积为纵坐标进行线性回归, 得回归方程 (表 1), 各对照品与峰面积线性关系良好。

2.6 检测限

取上述对照品储备液，定量稀释成不同质量浓度对照品溶液后，直接进样，直到某一进样量出峰峰高为仪器噪音的 3 倍时，即为该对照品的检测限，结果见表 1。

2.7 精密度试验

精确吸取上述 5 种混合对照品溶液 20 μL，重复进样 6 次，计算峰面积的 RSD，即为日内精密度；连续检测 3 d，每天检测 2 次，计算峰面积的 RSD，

即为日间精密度，结果见表 1。

2.8 稳定性试验

精确称取提取物样品，制备供试品溶液，每隔 4 h 进样测定，共进样 6 次，计算峰面积的 RSD，结果见表 1，表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.9 重现性试验

精确称取提取物样品 5 份，分别制备供试品溶液，各精密吸取 20 μL 进样测定，计算各成分质量分数的 RSD，结果见表 1。

表 1 线性关系考察及精密度、重现性和稳定性试验结果

Table 1 Results of linear relation and test of precision, repeatability, and stability

成分	回归方程	r	线性范围/ng	检测限/	日内精密度	日间精密度	稳定性	重现性
				ng	RSD/%	RSD/%	RSD/%	RSD/%
芦丁	$Y=14\ 958 X+179.22$	0.999 3	228.60~1 143.00	3.81	0.74	1.64	0.44	1.74
异鼠李素-3-O-芸香糖苷	$Y=12\ 126 X+3.14$	0.999 4	99.60~498.00	3.32	0.26	0.98	1.19	2.80
江户樱花苷	$Y=23\ 821 X+76.81$	0.999 4	232.20~1 161.00	5.36	0.23	1.34	1.60	1.78
山柰酚	$Y=39\ 078 X+1.81$	0.999 1	22.08~110.40	2.21	0.90	1.76	1.69	2.22
槲皮素	$Y=35\ 761 X-20.30$	0.999 5	15.12~75.60	1.98	0.83	1.58	1.75	2.15

2.10 回收率试验

精密称取 9 份批号为 200801 的珍珠菜提取物样品，每份约 4.0 mg，分别置 5.0 mL 量瓶中，平均分成 3 组，按照样品中每种待测成分量的 80%、100%、120% 定量加入 5 种对照品，甲醇定容，分别取 20 μL 进样分析，外标法计算各成分平均回收率。结果芦丁、异鼠李素-3-O-芸香糖苷、江户樱花苷、槲皮素、山柰酚的平均回收率分别为 97.8%、98.9%、102.4%、98.4%、92.2%，RSD 分别为 2.70%、1.71%、1.16%、0.50%、3.81%。

2.11 样品测定

取 3 个批次的珍珠菜提取物样品，制备供试品溶液，分别进样 20 μL，测定，外标法计算，结果见表 2。

表 2 珍珠菜提取物各组分测定结果 (n=3)

Table 2 Determination of five flavonoids in *L. clethroides* extract (n=3)

批号	质量分数/(mg·g ⁻¹)				
	芦丁	异鼠李素-3-O-芸香糖苷	江户樱花苷	山柰酚	槲皮素
200801	25.91	10.48	23.16	2.03	1.34
200802	24.16	9.89	21.68	2.14	1.06
200803	26.48	11.01	24.34	1.96	1.41

3 讨论

3.1 提取物中化学成分的分离纯化与结构鉴定

取珍珠菜提取物粉末，先利用中压液相色谱、常压硅胶色谱柱，以不同比例氯仿-甲醇为洗脱溶剂进行分离，得各组分，然后用 Sephadex-LH 20 除色素，高效液相检测质量分数，并采用 UV、¹H-NMR、¹³C-NMR 等多种现代波谱手段及与文献对照，共鉴定出 14 个化合物，均为黄酮类成分。后经抗肿瘤活性筛选，并结合各成分在提取物中量的多少，选择其中量较高的具有一定抗肿瘤活性的 5 种化合物，即芦丁、异鼠李素-3-O-芸香糖苷、江户樱花苷、山柰酚、槲皮素进行了定量测定方法研究。

3.2 色谱条件的优化

由于黄酮类和二氢黄酮类化合物紫外吸收峰差别较大，故建立了双波长同时测定的方法，在 283 nm 下测定二氢黄酮类成分（江户樱花苷），在 370 nm 下测定黄酮类成分（芦丁、异鼠李素-3-O-芸香糖苷、槲皮素、山柰酚）。

为了得到快速高效的 HPLC 条件，分别对流动相、体积流量和柱温进行了优化。由于样品中既含有黄酮类苷元，又含有黄酮苷，等度洗脱保留时间相差较大，因此采用了梯度洗脱的方式。黄酮类为酚酸类化合物，容易造成拖尾峰，在流动相中加入 0.1% 磷酸，有效消除了峰的拖尾现象。较高的体积

流量影响各峰的分离度, 体积流量较慢又造成保留时间延长, 峰形展宽, 综合考虑确定体积流量为 1.0 mL/min。柱温对一些峰的分离度有一定影响, 在柱温为 35 °C 时各峰得到了满意的分离, 故以 35 °C 为分析柱温。

3.3 测定结果

实验结果表明不同批次珍珠菜提取物样品间所测化学成分的量相差不大。黄酮类化合物既是珍珠菜提取物中的主要成分, 又是主要的抗肿瘤活性成分, 通过测定发现芦丁、江户樱花苷等黄酮苷的量较高, 而槲皮素、山柰酚等苷元的量较低, 故可用芦丁、江户樱花苷为指标来控制提取物中黄酮类和二氢黄酮类的量。本方法操作简便快捷, 结果准确可靠, 重复性好, 灵敏度高, 可用于珍珠菜提取物中黄酮类化合物的质量控制。

参考文献

- [1] 《中华本草》编委会. 中华本草 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999.
- [2] Yasukawa K, Takido M. Studies on the chemical constituents of genus *Lysimachia*. I. On the whole parts of *Lysimachia japonica* Thunb. and *Lysimachia clethroides* Duby [J]. *Yakugaku Zasshi*, 1986, 106(10): 939-941.
- [3] Kim J S, Kim H J, Park H. Studies on the chemical constituents of *Lysimachia clethroides* [J]. *Yakuhak Hoechi*, 1993, 37(4): 325-328.
- [4] 邹海艳, 屠鹏飞. 珍珠菜黄酮类化合物的研究 [J]. 中国天然药物, 2004, 2(1): 59-61.
- [5] 空军汉口医院肿瘤防治小组. 珍珠菜黄酮甙抗肿瘤作用的实验研究 [J]. 新医学, 1977, 8(3): 112-113.
- [6] 唐丽华, 徐向毅, 游本刚, 等. 珍珠菜总黄酮苷的抗肿瘤作用及机制研究 [J]. 上海中医药杂志, 2007, 41(5): 74-76.
- [7] 唐丽华, 游本刚, 徐向毅, 等. 珍珠菜总黄酮苷诱导 HL-60 细胞凋亡作用的研究 [J]. 上海中医药大学学报, 2007, 21(1): 54-57.
- [8] 唐丽华, 徐向毅, 游本刚, 等. 珍珠菜总黄酮苷对 HL-60 细胞周期调控相关基因表达的影响 [J]. 药学与临床研究, 2007, 15(1): 21-24.
- [9] 唐丽华, 游本刚, 刘 扬. 正交试验设计优化 AB-8 树脂对珍珠菜总黄酮的吸附条件 [J]. 抗感染药学, 2006, 3(3): 102-104.
- [10] 游本刚, 唐丽华, 刘 扬. 紫外分光光度法测定珍珠菜中总黄酮含量 [J]. 中国野生植物资源, 2007, 26(1): 43-45.

郑重声明

天津中草药杂志社(出版《中草药》、*Chinese Herbal Medicines* (CHM, 中草药英文版)、《现代药物与临床》、《药物评价研究》4 本期刊)未与任何单位或个人签署版面合作及论文代理发表协议, 凡是以天津中草药杂志社及其所属期刊的名义进行的版面合作及论文代理发表等非法活动, 均严重侵害了天津中草药杂志社的合法权益, 天津中草药杂志社将保留对其采取法律行动的权利, 特此郑重声明。

希望广大作者、读者认准天津中草药杂志社门户网站“www.中草药杂志社.中国或 www.tiprpress.com”, 切勿上当受骗; 若发现假冒天津中草药杂志社及所属期刊的情况, 请检举揭发。

Tel: (022)27474913 E-mail: zcy@tiprpress.com

天津中草药杂志社