

鱼腥草中 3 种有效成分含量的测定

边清泉^{*1}, 李天东², 何志坚¹, 杨振萍³, 黄宝美¹

(1. 绵阳师范学院天然产物研究所, 绵阳 621000; 2. 绵阳师范学院分子生物学与生物制药重点实验室, 绵阳 621000; 3. 西南科技大学理学院, 绵阳 621000)

摘 要: 建立鱼腥草不同品种、不同部位绿原酸、芸香苷和槲皮素的测定方法。以 90 % EtOH 为溶剂, 采用索氏提取器提取, 利用 HPLC 测定 3 种活性成分的含量。采用 DiamonsilTM C₁₈ (4.6 mm × 150 mm, 5 μm) 为色谱柱, 流动相分别为 0.06 mol/L V(NaH₂PO₄) V(MeOH) = 7.3 2.7、V(MeOH) V(H₂O) V(HAc) = 48 50 2, 流速为 1 mL/min, 绿原酸检测波长为 326 nm, 芸香苷和槲皮素为 254 nm。绿原酸、芸香苷、槲皮素的线性范围分别为 4.6 ~ 30.7 μg/mL、0.30 ~ 7.5 μg/mL、0.034 ~ 0.85 μg/mL, 平均回收率和 RSD 分别为 99.3 %、1.0 %, 98.9 %、1.6 %, 98.7 %、0.7 %。该方法可用于鱼腥草原料选择和制剂质量的控制。

关键词: 鱼腥草; 绿原酸; 芸香苷; 槲皮素; HPLC

中图分类号: O657.7

文献标识码: A

文章编号: 1000-0720(2009)05-057-04

鱼腥草为一年生草本植物, 是三白草科植物蕺菜属蕺菜的干燥全草, 其茎叶搓碎后有鱼腥味, 故名鱼腥草。鱼腥草资源丰富, 广泛分布于我国中部、东南及西南部各省区, 尤以四川、湖南、湖北、江苏等省居多, 为药蔬兼用之品, 目前, 鱼腥草被国家卫生部正式确定为“既是药品, 又是食品”的极具开发潜力的资源之一^[1]。鱼腥草性味辛、微寒, 具有清热解毒、消毒排脓、利尿通淋之功效, 有强抗菌抗病作用^[2, 3]。绿原酸、芸香苷、槲皮素是鱼腥草有效活性成分^[3], 现代药理研究认为绿原酸对消化系统、血液系统和生殖系统均有疗效, 其显著增加肠胃蠕动和促胃液分泌、保肝利胆、清除自由基和抗脂质过氧化为特点, 芸香苷、槲皮素均具有多种药理活性^[5, 6]。绿原酸、芸香苷、槲皮素是具有较高药用价值的活性成分, 其含量是衡量鱼腥草药用价值重要指标。目前对植物中绿原酸、芸香苷、槲皮素的定量分析已有大量报道, 但对不同品种鱼腥草中各部位有效成分绿原酸、芸香苷、槲皮素的同时测定方法, 尚未

见文献报道, 本文采用索氏提取法提取样品中待测组分, 反相高效液相色谱法对野生和人工栽培的鱼腥草不同部位绿原酸、芸香苷、槲皮素进行了有效分离和准确的含量测定, 且操作简便、快速、灵敏度高、重现性好。为鱼腥草作为原料药的选择和制剂的质控提供参考。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

日本岛津高效液相色谱仪, LC-10AT 输液泵, SPD-10AUP 检测器, CLASS-vp5.0 色谱工作站, CTD-6A 色谱柱温箱; 绿原酸对照品(批号: 0861-9902), 芸香苷对照品(批号: 0861-9902), 槲皮素对照品(批号 0081-9904), 由中国药品生物制品的检定所提供。甲醇为谱色纯, 其他试剂均为 AR 级, 水为 2 次重蒸水。

1.2 实验材料

鱼腥草人工栽培样品 4 月中旬采集于绵阳城郊乡, 野生样品 4 月中旬采集于绵阳小观, 经成都天然产物研究所黄明研究员鉴定为蕺菜 *Houttuynia*

* 收稿日期: 2008-04-15; 修订日期: 2008-07-20

基金项目: 四川省教育厅重点(2006A175)和绵阳市科技局自然科学研究重点(06S041-04)项目资助

作者简介: 边清泉(1955 -), 男, 教授; E-mail: bian-55@sohu.com

cordata Thunb. 将鱼腥草样品分为野生叶(地上部分)、根(地下部分), 人工栽培叶(同前)、根(同前), 70 ℃ 干燥 48 h, 粉碎, 过 0.27 mm 筛。

1.3 样品溶液的制备

通过预试, 已知 90 % EtOH 提取样品中 3 种待测组的提取率较高, 故以 90 % EtOH 为溶剂, 采用索氏提取法提取样品中待测组分。精密称定约 1 g 鱼腥草野生叶样品, 滤纸包好, 置索氏提取器中, 水浴加热回流 9 h, 得样品提取液。分别用 20 mL 60~90 ℃ 石油醚各洗涤样品提取液 2 次, 挥干溶剂, 残渣用甲醇定容至 50 mL, 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 取续滤液待测。

同法制备鱼腥草样品野生根、人工栽培叶、人工栽培根的待测液。

1.4 对照品溶液制备

精密称取绿原酸对照品 4.6 mg, 置于 50 mL 容量瓶中, 加水定容至刻度, 得到 92.0 μg/mL 对照品溶液。同法分别精密称取经 P₂O₅ 干燥的芸香

苷、槲皮素对照品适量, 甲醇配制成芸香苷质量浓度为 7.5 μg/mL、槲皮素质量浓度为 0.85 μg/mL 的溶液。

1.5 色谱条件

色谱柱为: Diamonsil™ C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 柱温: 28 ℃; 流速: 1 mL/min; 进样量: 10 μL。绿原酸流动相: V(NaH₂PO₄): V(MeOH) = 7.3: 2.7; 检测波长: 326 nm; 理论塔板数按绿原酸峰计大于 4000。芸香苷、槲皮素流动相: V(MeOH): V(H₂O): V(HAc) = 48: 50: 2; 检测波长: 254 nm; 理论塔板数分别按芸香苷、槲皮素计算均不低于 3500。

1.6 供试品含量的测定

在 1.5 色谱条件对 4 种供试品和 2 组对照品溶液进行色谱分析, 平行测定 6 次(见图 1), 求各组积分面积均值, 计算样品中各组分的含量, 结果见表 1。

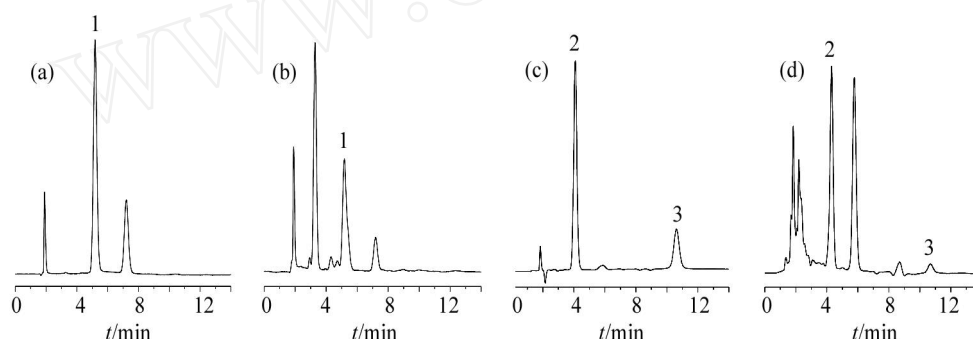


图 1 对照品和样品 HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC chromatograms of a chlorogenic acid standard and a sample

(a) 绿原酸对照品; (b) 野生鱼腥草叶; (c) 混标对照品; (d) 野生鱼腥草叶
1 - 绿原酸; 2 - 芸香苷; 3 - 槲皮素

表 1 样品的测定结果

Tab. 1 Determination results of samples (mg/g, n = 6)

组分名	野生叶	野生根	人工栽培叶	人工栽培根
绿原酸	1.40	0.36	0.73	0.26
芸香苷	0.29	0.044	0.23	0.015
槲皮素	0.011	0.0027	0.0063	0.0019

2 结果与讨论

2.1 标准曲线

分别吸取 1.4 制备的 2 组对照品溶液, 稀释成不同浓度梯度, 进样量 10 μL, 测定的峰面积,

以对照品质量浓度 ρ (μg/mL) 对峰面积均值 Y (μV/s) 进行线性回归, 得到绿原酸直线方程 $Y = 31968.5\rho - 17398.9$, $r = 0.9998$, 线性范围 4.6~30.7 μg/mL; 芸香苷直线方程 $Y = 1.66883 \times 10^6 \rho - 24173.55$, $r = 0.9994$, 线性范围 0.30~7.5 μg/mL; 槲皮素直线方程 $Y = 2.60104 \times 10^5 \rho - 169056.46$, $r = 0.9992$, 线性范围 0.034~0.85 μg/mL。

2.2 回收率试验

精密称取野生鱼腥草叶同批 6 份, 其中 5 份分别加入等量对照品, 另一份作为测定本底值样品用。各份均依 1.3 项下制样方法制备供试品溶

液,测定,重复进样 3 次,求均值计算平均回收率,结果见表 2。

表 2 回收率实验结果 ($n = 5$)Tab. 2 The recoveries of added standard ($n = 5$)

对照品	测定值 ($\mu\text{g/g}$)	回收率 / %	平均回收率 / %	RSD / %
绿原酸	32.0	99.8	99.3	1.0
	32.9	100.7		
	32.6	98.7		
	32.8	98.0		
	31.9	99.1		
	27.4	101.2		
芸香苷	27.0	98.8	98.9	1.6
	26.8	98.5		
	27.2	99.0		
	26.7	96.9		
	6.4	98.8		
槲皮素	6.2	97.9	98.7	0.7
	6.3	99.2		
	6.2	98.1		
	6.1	99.4		

注:绿原酸样品中含量均为 $17.5 \mu\text{g}$,加入量均为 $15.3 \mu\text{g}$,芸香苷样品中含量均为 $11.0 \mu\text{g}$,加入量均为 $16.20 \mu\text{g}$ 槲皮素样品中含量均为 $2.7 \mu\text{g}$,加入量均为 $3.6 \mu\text{g}$

2.3 精密度

吸取绿原酸对照品和芸香苷、槲皮素混标对照品溶液 $10 \mu\text{L}$,连续进样 8 次,结果绿原酸的峰面积均值为 801572.8 , $\text{RSD} = 1.9\%$;芸香苷的峰面积均值为 $339\ 541.1$, $\text{RSD} = 1.5\%$;槲皮素的峰面积均值为 $118\ 193.2$, $\text{RSD} = 1.2\%$ 。

2.4 溶液的稳定性

取 1.3 制备的野生鱼腥草叶供试品溶液分别在 0, 3, 6, 9 h 进样分析,连续进样 5 次,测定 3 组分的峰面积,绿原酸、芸香苷、槲皮素的 RSD 分别为 1.8% 、 1.2% 、 0.9% ,结果表明供试品溶液在 9 h 内基本稳定。

2.5 HPLC 测定条件选择

用二极管阵列检测器在本实验溶剂体系条件

下,分析了绿原酸、芸香苷、槲皮素对照品色谱峰和 4 种样品中目标组分相应色谱峰的紫外光谱,结果二者相同保留值处紫外光谱基本一致,绿原酸在 326 nm ,芸香苷在 256 、 355 nm ,槲皮素在 254 、 370 nm 有最大吸收。 326 、 254 nm 处待测组分与杂质峰基本能基线分离,检测灵敏度高,确定绿原酸检测波长为 326 nm ,芸香苷、槲皮素检测波长为 254 nm 。本实验对文献^[7~10]测定绿原酸、芸香苷、槲皮素等流动相体系进行了考察,对比后认为采用 $0.06 \text{ mol/L } V(\text{NaH}_2\text{PO}_4) : V(\text{MeOH}) = 7.3 : 2.7$ 体系检测绿原酸; $V(\text{MeOH}) : V(\text{H}_2\text{O}) : V(\text{HAc}) = 48 : 50 : 2$ 为流动相检测芸香苷、槲皮素,待测组分与其它组分有效分离 ($R > 1.5$),且保留值适宜。

2.6 提取条件的确定

实验说明, C_{EtOH} 90% ,样品中脂类含量过高,后处理工作量加大, $C_{\text{EtOH}} < 90\%$,芸香苷提取困难,提取时间过长。石油醚洗涤样品可除脂类物质,改善峰形、保护反向柱。

2.7 目标组分萃取程度的确定

经过对 4 种鱼腥草样品目标组分萃取后的药渣 HPLC 检测,无待测组分特征峰出现,说明鱼腥草样品经 $90\% \text{ EtOH}$ 索氏提取 9 h 后,绿原酸、芸香苷、槲皮素已提取完全。

参考文献

- [1] 吴卫. 中草药, 2001, 32(40): 367
- [2] 凌揆. 中药学. 上海: 上海科学技术出版社, 2003. 10
- [3] 田代毕. 实用中药大辞典(下卷). 北京: 人民卫生出版社, 2002. 1199
- [4] 沙世炎. 中草药有效成分分析法. 北京: 人民卫生出版社, 1985. 511
- [5] Patrizio, R oetti. Diabetes, 1990, 37: 796
- [6] 黄河胜, 孙传庆, 陈志武. 中国中药杂志, 2000, 25(10): 589
- [7] 应甲, 苏流坤. 中药材, 2004, 27(10): 737
- [8] 桑旭峰, 吴海雯, 徐奇超. 中成药, 2005, 27(1): 69
- [9] 宁文. 广亚中医药, 2003, 26(5): 56
- [10] 李鹏, 陈科力, 叶从进. 中药材, 2004, 27(2): 102

Simultaneous determination of three effective components in *Houttuynia cordata* thunb

BIAN Qing-quan^{*1}, LI Tian-dong², HE Zhi-jian¹, YANG Zhen-ping³ and HUANG Bao-mei¹ (1. Department of Chemistry and Chemical Engineering, Mianyang Teachers College, Mianyang 621000; 2. Key Laboratory for Molecular Biology and Biopharmaceutic, Mianyang Normal University, Mianyang 621000; 3. Science College, South-West University of Science and Technology, Mianyang 621021), Fenxi Shiyanshi, 2009, 28(5): 57~60

Abstract: To establish a method for the determination of chlorogenic acid, rutin and quercetin in different kinds of and different parts of *houttuynia cordata* thunb. The three compounds were distilled and their contents were determined by HPLC with 90% EtOH as solvent using Soxhlet distillation machine with DiamonsilTM C₁₈ (4.6 mm × 150 mm i. d., 5 μm) as a chromatographic column and 0.06 mol/L V(NaH₂PO₄) : V(MeOH) = 7.3 : 2.7, V(MeOH) : V(H₂O) : V(HAc) = 48 : 50 : 2 as the mobile phase. The flow rate is 1 mL/min, and the detection wavelength of chlorogenic acid, rutin and quercetin is 326 nm, 254 nm, 254 nm. The linear ranges of chlorogenic acid, rutin and quercetin are 4.6~30.7 μg/mL, 0.30~7.5 μg/mL and 0.034~0.85 μg/mL and the average recoveries are 99.3%, 98.9%, 98.7% and RSDs are 1.0%, 1.6%, 0.7%, respectively. The method can be used for the quality control of *Houttuynia cordata* thunb materials and preparations.

Key words: *Houttuynia cordata* thunb; Chlorogenic acid; Rutin; Quercetin; HPLC