

# HPLC 测定不同产地、不同品种绞股蓝中芦丁和槲皮素的含量

彭亮<sup>1</sup>, 李诒光<sup>1,2\*</sup>, 陈杰<sup>1\*</sup>, 饶毅<sup>1</sup>, 季巧遇<sup>1</sup>, 魏惠珍<sup>1</sup>

(1. 江西中医药大学, 南昌 330006; 2. 江中药业股份有限公司, 南昌 330096)

**[摘要]** 目的:建立高效液相色谱同时测定不同产地、不同品种绞股蓝药材中芦丁和槲皮素含量的方法。方法:ZORBAX S<sub>B</sub>-C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm×150 mm, 5 μm), 流动相乙腈(A)-0.2% 磷酸溶液(B)梯度洗脱, 流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 柱温 30 ℃, 检测波长 360 nm, 进样量 10 μL。结果:芦丁在 2.535~10.14 μg 线性良好( $R^2=0.9992$ ), 平均回收率为 98.72%, RSD 1.2%; 槲皮素在 0.0181~0.1448 μg 线性良好( $R^2=0.9993$ ), 平均回收率 98.40%, RSD 1.7%。结论:该方法简便可行、重复性好, 适用于绞股蓝药材 2 种有效成分的同时测定, 可为绞股蓝药材的质量控制提供参考依据。

**[关键词]** 绞股蓝; 高效液相色谱法; 芦丁; 槲皮素

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)06-0045-03

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2016060045

## Content Determination of Rutin and Quercetin in *Gynostemma pentaphyllum* from Different Producing Areas by HPLC

PENG Liang<sup>1</sup>, LI Yi-guang<sup>1,2\*</sup>, CHEN Jie<sup>1\*</sup>, RAO Yi<sup>1</sup>, JI Qiao-yu<sup>1</sup>, WEI Hui-zhen<sup>1</sup>

(1. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330006, China;

2. Jiangzhong Pharmaceutical Co. Ltd., Nanchang 330096, China)

**[Abstract]** **Objective:** To establish a determination method for different varieties of rutin and quercetin in *Gynostemma pentaphyllum* from different producing areas. **Method:** HPLC was performed on ZORBAX S<sub>B</sub>-C<sub>18</sub> column (4.6 mm×150 mm, 5 μm), eluting in a gradient mode with the mobile phase of acetonitrile (A)-0.2% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> as (B) at a flow rate of 1.0 mL·min<sup>-1</sup>. The column temperature was 30 ℃. The detection wavelength was 360 nm. The injection volume was 10 μL. **Result:** The linearity of rutin was good within the range of 2.535-10.14 μg ( $R^2=0.9992$ ), and the average recovery was 98.72% (RSD 1.2%). The linearity of quercetin was good within the range of 0.0181-0.1448 μg ( $R^2=0.9993$ ), and the average recovery of 98.40% (RSD 1.7%). **Conclusion:** The established method is simple, feasible and highly reproducible, and can be used for determining rutin and quercetin in *G. pentaphyllum* and providing reference for quality control of *G. pentaphyllum*.

**[Key words]** *Gynostemma pentaphyllum*; HPLC; rutin; quercetin

绞股蓝<sup>[1-3]</sup>, 又名七叶胆、天堂草、公罗锅底、遍地生根等。该属植物基源复杂、品种繁多, 我国有 14 种和 3 变种<sup>[4]</sup>, 广泛分布于陕西、湖北、安徽、福建、云南、广西等地。具有清热解毒、化痰止咳、益气

健脾、养阴生津、养心安神等功效<sup>[5]</sup>。绞股蓝主要含有皂苷、黄酮和多糖类等成分, 其中芦丁和槲皮素是绞股蓝黄酮类成分中的重要组分。现代研究表明, 绞股蓝具有抗氧化、清除自由基、抗癌防癌、改善

**[收稿日期]** 20150228(009)

**[第一作者]** 彭亮, 硕士, 从事中药质量控制研究, Tel:15079048763, E-mail:602982740@qq.com

**[通讯作者]** \*李诒光, 博士, 主任中药师, 从事中药质量评价与开发研究, Tel:15979019136, E-mail:lyg@jzjt.com.j;

\*陈杰, 硕士, 副教授, 从事中药质量评价与开发研究, Tel:15979019631, E-mail:813680107@qq.com

心脑血管循环和调节血压等作用<sup>[6-7]</sup>。绞股蓝作为一种新兴的免疫增强剂,有着“南方人参”的美誉,是一种具有广泛应用前景的药食两用植物资源<sup>[8-11]</sup>。目前,绞股蓝的研究主要集中在皂苷类成分上<sup>[12]</sup>,而对于黄酮类成分的含量测定研究相对较少。为进一步研究绞股蓝药材,本研究以芦丁、槲皮素为指标性成分,建立 HPLC 同时测定不同产地、不同品种绞股蓝中芦丁、槲皮素含量的方法,并测定了不同产地药材中两者成分的含量动态变化,以期为该药用资源的基础研究和质量控制提供参考。

## 1 材料

**1.1 仪器** 1100 系列高效液相色谱仪(美国安捷伦科技有限公司,包括 G1379A 在线真空脱气机、G1311A 四元泵、G1367A 自动进样器、G1316A 柱温箱和 G1315B DAD 检测器),SK5200LH 型超声波清洗器(上海科导超声仪器有限公司),AB204-N 型精密分析天平(Mettler Toledo 上海衡器有限公司),HH-4 型数显恒温水浴锅(江苏省金坛市荣华仪器制造有限公司)。

**1.2 试药** 绞股蓝药材来源于陕西平利、湖北神农架、湖北十堰、云南昆明、广西桂林、福建古田、安徽亳州等地,来源见表 1。经江西药业股份有限公司李诒光主任中药师鉴定,为葫芦科多年生草本植物 *Gynostemma pentaphyllum* 绞股蓝的根茎或全草。芦丁、槲皮素对照品(批号 100080-200707, 100081-200907,中国食品药品检定研究院)。乙腈为色谱纯,水为娃哈哈饮用纯净水,甲醇等其他试剂均为分析纯。

表 1 绞股蓝药材样品的来源

Table 1 Source of *Gynostemma pentaphyllum*

No.	产地	品种	采集日期
S1	陕西平利-1	七叶绞股蓝	2014-02-19
S2	陕西平利-2	五叶绞股蓝	2014-02-19
S3	陕西平利-3	五叶绞股蓝	2014-02-19
S4	陕西平利-4	五叶绞股蓝	2014-02-19
S5	湖北十堰	七叶绞股蓝	2014-04-21
S6	湖北神农架	七叶绞股蓝	2014-06-25
S7	广西桂林	七叶绞股蓝	2014-07-21
S8	云南昆明	五叶绞股蓝	2014-07-29
S9	福建古田	七叶绞股蓝	2014-08-05
S10	安徽亳州	五叶绞股蓝	2014-09-02

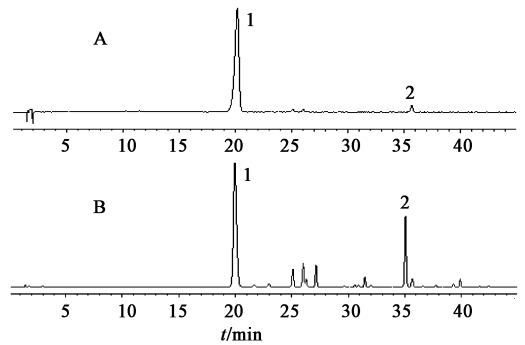
## 2 方法与结果

**2.1 对照品溶液的制备** 取芦丁、槲皮素对照品适量,精密称定,加甲醇溶解制成含芦丁、槲皮素分别为 253.5, 3.62 mg·L<sup>-1</sup> 的对照品溶液。

**2.2 供试品溶液的制备** 取绞股蓝药材粉末(过二号筛)约 2 g,精密称定,置索氏提取器中,加石油

醚(60~90℃)75 mL,加热回流至提取液无色,放冷,弃去石油醚液,药渣连同滤纸挥干溶剂后,移入具塞锥形瓶中,精密加入 70% 甲醇溶液 50 mL,称定质量,回流提取 3 次,每次 1.0 h,过滤,合并滤液,蒸干,残渣用甲醇溶解并转移至 25 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,用 0.45 μm 微孔滤膜过滤,取续滤液,即得。

**2.3 色谱条件与系统适应性试验** ZORBAX S<sub>B</sub>-C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm),流动相乙腈(A)-0.2% 磷酸(B)溶液梯度洗脱(0~15 min, 13% A; 15~35 min, 13%~28% A; 35~45 min, 28%~40% A; 45~50 min, 13% A),流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>,柱温 30℃,检测波长 360 nm,进样量 10 μL。结果表明,混合对照品溶液和供试品溶液的色谱图中芦丁、槲皮素色谱峰无拖尾,分离度良好,  $R > 1.5$ , 见图 1。



A. 混合对照品; B. 供试品; 1. 芦丁; 2. 槲皮素

图 1 绞股蓝 HPLC

Fig. 1 HPLC Chromatogram of *Gynostemma pentaphyllum*

**2.4 线性关系考察** 精密吸取芦丁对照品溶液 10, 15, 20, 30, 40 μL 及槲皮素对照品溶液 5, 10, 20, 30, 40 μL 注入液相色谱仪中,按上述色谱条件测定,记录色谱图。以峰面积为纵坐标 Y, 对照品进样量(μg)为横坐标 X, 绘制标准曲线,并进行线性回归。得芦丁、槲皮素回归方程分别为  $Y = 314.45X + 2928.5 (R^2 = 0.9992)$  和  $Y = 1961X + 35.326 (R^2 = 0.9993)$ , 结果表明,芦丁、槲皮素分别在 2.535~10.14, 0.0181~0.1448 μg 与峰面积有良好线性关系。

**2.5 精密度试验** 取 2.1 项下的芦丁和槲皮素对照品溶液,连续进样 6 次,每次 10 μL,按 2.3 项下色谱条件测定,结果芦丁、槲皮素峰面积的 RSD 分别为 0.5%, 1.7%; 表明该方法精密度良好。

**2.6 稳定性试验** 取绞股蓝药材样品(湖北神农架),按 2.2 项下方法制备供试品溶液,分别在 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 精密吸取 10 μL 注入液相色谱仪,按

2.3 项下色谱条件测定。结果芦丁、槲皮素峰面积的 RSD 分别为 0.4%, 1.6%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.7 重复性试验 取同一批绞股蓝药材样品(湖北神农架)6 份,每份 2.0 g,按 2.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.3 项下色谱条件测定。结果芦丁、槲皮素的平均质量分数分别为 27.57, 0.12 mg·g<sup>-1</sup>, RSD 分别为 0.8%, 1.3%, 表明该方法重复性良好。

2.8 加样回收率试验 取已知含量的同一批绞股蓝药材样品(湖北神农架)6 份,每份 1.0 g,精密称定,分别精密加入一定量的芦丁、槲皮素对照品,按 2.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.3 项下色谱条件测定,计算回收率。结果见表 2。

表 2 绞股蓝药材中芦丁和槲皮素加样回收率试验

Table 2 Recovery test results of rutin and quercetin in *Gynostemma pentaphyllum*

样品	取样量 /g	样品中量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%
芦丁	1.005 5	27.725	27.750	55.348	99.54	98.72 (1.2)
	1.007 9	27.791	27.750	54.653	96.80	
	1.008 6	27.811	27.750	55.496	99.77	
	1.007 6	27.783	27.750	55.215	98.86	
	1.003 7	27.675	27.750	55.317	99.61	
	1.006 7	27.758	27.750	54.886	97.76	
槲皮素	1.005 5	0.119	0.110	0.228	98.50	98.40 (1.7)
	1.007 9	0.119	0.110	0.230	100.15	
	1.008 6	0.120	0.110	0.227	97.53	
	1.007 6	0.119	0.110	0.230	100.36	
	1.003 7	0.119	0.110	0.227	97.97	
	1.006 7	0.119	0.110	0.225	95.91	

2.9 样品含量测定 分别取各产地药材 2.0 g,精密称定,平行 2 份,按 2.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.3 项下色谱条件测定,计算各产地绞股蓝中芦丁和槲皮素的含量。结果见表 3。

表 3 绞股蓝药材中芦丁和槲皮素含量

Table 3 Content of rutin and quercetin in *Gynostemma pentaphyllum* mg·g<sup>-1</sup>

No.	芦丁	槲皮素
S1	19.061 9	0.101 4
S2	68.670 0	1.031 4
S3	42.733 8	0.622 6
S4	76.640 1	0.523 7
S5	25.649 9	0.309 1
S6	27.573 4	0.118 5
S7	0.842 3	0.199 0
S8	2.012 4	2.306 6
S9	1.970 9	0.048 6
S10	0.214 4	0.694 0

### 3 讨论

10 批绞股蓝药材中芦丁质量分数在 0.21 ~ 76.64 mg·g<sup>-1</sup>,槲皮素质量分数在 0.05 ~ 2.31 mg·g<sup>-1</sup>,且不同产地、不同品种间芦丁和槲皮素含量差异较大,这可能与不同产地温度、湿度、土质等外部生长环境因素有关。

根据对芦丁与槲皮素的混合对照品溶液及供试品溶液进行紫外光谱测定,发现在 254, 360 nm 处二者均有最大吸收,但在 254 nm 处杂质峰干扰较重,经过比较,最后选择检测波长为 360 nm。

本试验通过对提取溶剂、提取方法进行考察,并对提取时间、提取次数进行单因素试验,确定以 70% 甲醇为提取溶剂、回流提取 3 次、每次 1.0 h 为最佳提取条件。

在试验过程中曾用甲醇-水、甲醇-0.2% 磷酸、乙腈-水、乙腈-0.2% 磷酸为流动相进行梯度洗脱。结果表明,以乙腈-0.2% 磷酸为流动相进行梯度洗脱时,各色谱峰的峰形和分离度均优于其他流动相系统。

#### [参考文献]

[1] 何显忠,邱江沁.绞股蓝化学成分和药理作用研究进展[J].中国中医药信息杂志,2008,15(增刊):84-86.

[2] 孙万森,吴喜利,乔成林,等.绞股蓝总皂苷防治多脏器损伤的药理研究进展[J].中成药,2007,30(2):241-244.

[3] 李金青,杨洪军.绞股蓝的药理作用研究进展[J].中国现代药物应用,2009,3(7):189-190.

[4] 丁树利,朱兆仪,李勇.绞股蓝及同属植物的生药学研究[J].中国药学杂志,1994,29(2):79-83.

[5] 陈武,邹盛勤,吴晓春,等.绞股蓝无糖口含片的制备工艺研究[J].食品科学,2008,29(3):245-248.

[6] 杨静.绞股蓝化学成分的研究[J].陕西中医杂志,2000,21(8):3771-3773.

[7] 阴建.中药现代研究与临床应用[M].北京:中医古籍出版社,1999:524.

[8] Ding S L, Zhu Z Y, Li Y. Pharm aceutical study of genus *Gynostemma* of cucurbitaceous in China[J]. Chin Pharmaceu J, 1994, 29(2):79-84.

[9] 张晓喻,黎艳,雍彬,等.复方绞股蓝皂苷改善小鼠学习记忆的研究[J].食品科学,2007,28(3):330-333.

[10] 周建华,张兴亚.绞股蓝开发研究新进展及应用[J].食品科技,2010,35(2):74-77.

[11] 王睿.绞股蓝皂苷提取工艺研究进展[J].广西轻工业,2010(7):16-17.

[12] 吴宗群,王艳.绞股蓝的化学成分和药理作用研究现状[J].中华全科医学,2011,9(1):116-117.

[责任编辑 顾雪竹]