

## HPLC 测定金莲花中金莲花苷的含量

刘颖, 王如峰\*, 袁铭, 安燕南, 吴秀稳  
(北京中医药大学中药学院, 北京 100102)

**[摘要]** 目的: 建立金莲花中金莲花苷的含量测定方法, 并测定其上市售金莲花药材中的含量。方法: 高效液相色谱法, Kromasil C<sub>18</sub> ODS 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 柱温为室温; 流动相 A 为乙腈, B 为 0.5% 醋酸溶液; 洗脱程序 (0 ~ 30 min, 2% ~ 100% A), 流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 检测波长 258 nm。结果: 金莲花苷在 0.115 8 ~ 1.042 2 μg 线性关系良好, 9 批金莲花药材中的金莲花苷的含量为 0 ~ 0.058%。结论: 本方法精密性、准确性和重复性良好, 适用于测定金莲花中金莲花苷的含量。

**[关键词]** 金莲花; 金莲花苷; 含量测定; 高效液相色谱法

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)12-0075-03

## HPLC Assay of Trollioside in Flowers of *Trollius chinensis*

LIU Ying, WANG Ru-feng\*, YUAN Ming, AN Yan-nan, WU Xiu-wen

(School of Chinese Pharmaceutical Sciences, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China)

**[Abstract]** **Objective:** To establish a HPLC assay method for trollioside and determine its content in the flowers of *Trollius chinensis* commercially available in China. **Method:** High performance liquid chromatography was employed using kromasil C<sub>18</sub> ODS column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), and mobile phase comprising acetonitrile-0.5% acetic acid solution (gradient: 0-30 min, 2%-100% A) at a flow rate of 1.0 mL·min<sup>-1</sup> and detecting wavelength of 258 nm. **Result:** A good linear relationship was demonstrated for trollioside within 0.115 8-1.042 2 μg and the content of trollioside in nine batches of the flowers of *T. chinensis* commercially available in China was within 0-0.058%. **Conclusion:** This assay method is good in terms of precision, accuracy and repeatability and can be used for determination of the content of trollioside.

**[Key words]** *Trollius chinensis*; trollioside; assay; HPLC

金莲花又名旱金莲, 是毛茛科金莲花属植物金莲花的干燥花, 具有清热解毒、消肿明目的功效<sup>[1]</sup>。临床主要用于治疗上呼吸道感染、咽炎、扁桃体炎等症<sup>[2]</sup>。药理学研究证明金莲花具有抗炎、抗菌和抗病毒等生物活性<sup>[3-5]</sup>。目前发现的金莲花中的化学成分主要有三类, 包括黄酮类、酚酸类和生物碱类<sup>[6-13]</sup>。金莲花中黄酮类为碳苷类化合物, 以荜草

素和牡荆素的含量最高。生物碱类仅报道了金莲花碱, 属于异喹啉类生物碱<sup>[7,13]</sup>。金莲花中的酚酸类化合物多以安息香酸为母核, 包括藜芦酸、原金莲酸等。金莲花苷是我们首次从金莲花中发现的一种酚酸类化合物, 经过抑菌试验证明, 该化合物表现出一定的抑菌活性, 对肺炎链球菌的 MIC 为 128 mg·L<sup>-1</sup><sup>[4]</sup>。为了探讨该化合物与金莲花功效的相关性, 我们利用高效液相色谱建立了其含量测定方法, 并用此方法测定了 9 批金莲花药材中该化合物的含量。

### 1 仪器与试剂

Waters 高效液相色谱仪 (Waters 1525 泵, Waters 2489 紫外检测器, 手动进样器), BP 211D 型 1/10 万电子天平 (Sartorius 公司)。

9 批金莲花药材购自全国各地药材市场, 经王

**[收稿日期]** 20111023(001)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目 (81073018); 教育部留学回国启动金项目

**[第一作者]** 刘颖, 硕士, 讲师, 从事生物转化研究, E-mail: liuyliwd@vip.sina.com

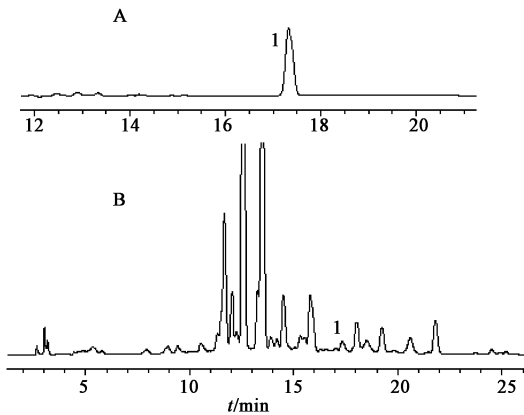
**[通讯作者]** \* 王如峰, 博士, 副教授, Tel: 010-84738646, E-mail: wangrufeng@tsinghua.org.cn

如峰副教授鉴定为毛茛科金莲花属植物金莲花 *Trollius chinensis* 的干燥花。金莲花苷对照品为作者自制,经归一化法测定其纯度不低于 98%。

色谱试剂乙腈为色谱纯(Fisher 公司,美国),其他试剂均为分析纯,水为市售娃哈哈纯净水。

## 2 方法与结果

**2.1 液相色谱条件及系统适用性试验** Kromasil C<sub>18</sub> ODS 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm);柱温为室温,流动相 A 为乙腈, B 为 0.5% 醋酸溶液(pH 2.9),洗脱程序(0 ~ 30 min, 2% ~ 100% A),流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>,检测波长 258 nm,进样量 10 μL。得到金莲花苷对照品和金莲花药材的色谱图,见图 1。以金莲花苷计,理论塔板数约为 2 900,拖尾因子为 1.03。样品中金莲花苷的色谱峰的保留时间约为 17.42 min,与相邻色谱峰基线分离。



A. 对照品; B. 药材; 1. 金莲花苷

图 1 对照品及药材的 HPLC

**2.2 对照品溶液的制备** 精密称取对照品金莲花苷 4.67 mg,置 10 mL 量瓶中,加适量甲醇溶解并稀释至刻度,即得对照品的储备溶液。再精密量取 3.1 mL 该储备溶液,置 25 mL 量瓶中,制成每 1 mL 含金莲花苷 0.057 9 mg 的对照品溶液。

**2.3 标准曲线的制备** 精密吸取上述对照品溶液 2,6,10,14,18 μL,注入液相色谱仪。以金莲花苷的量对峰面积作图,进行回归。得到回归方程为  $Y = 979\ 288X - 6\ 423$  ( $r = 0.998\ 7$ ),线性范围 0.115 8 ~ 1.042 2 μg,说明金莲花苷在此范围内线性关系良好。

**2.4 供试品提取溶剂考察** 取金莲花药材 3 批,每批精密称取 4 份,每份 1.000 0 g,用移液管分别加入 14 mL 甲醇、70% 甲醇、40% 甲醇和水,超声提取 50 min。过滤,取续滤液,用 0.22 μm 的微孔滤膜滤过。分别取 10 μL 进样,计算金莲花苷的含量,考察各提取溶剂对金莲花苷的提取率。结果表明,甲醇

对金莲花苷的提取效果最好,故选用甲醇作为提取溶剂。

**2.5 供试品提取时间考察** 取金莲花药材 3 批,每批精密称取 4 份,每份 1.000 0 g,用移液管分别加入 14 mL 甲醇。然后,分别超声提取 15,30,50,75 min。过滤,取续滤液,用 0.22 μm 的微孔滤膜滤过。分别取 10 μL 进样,计算金莲花苷的含量,考察不同的提取时间对金莲花苷的提取率。结果表明,提取时间为 50 min 时,提取率明显高于 15,30 min,而 50,75 min 的提取率差别不明显,故选用 50 min 作为提取时间。

**2.6 供试品溶液的制备** 精密称取供试品 1.000 0 g,用移液管加入 14 mL 甲醇,称重,超声提取 50 min,用甲醇补足失重。过滤,取续滤液,用 0.22 μm 的微孔滤膜滤过,即得供试品溶液。

**2.7 精密度试验** 取上述对照品溶液,一日内连续进样 6 次,每次进样 10 μL,根据对照品峰面积考察日内精密度,计算 RSD 0.94%。另取上述对照品溶液,于 6 日内每日进样 1 次,每次进样 10 μL,根据对照品峰面积考察日间精密度,计算 RSD 1.29%。说明仪器精密度良好,方法可行。

**2.8 稳定性试验** 取供试品溶液,分别在 0,4,8,12,24 h 时间点进样,每次 10 μL。根据金莲花苷峰面积考察样品的稳定性,计算 RSD 2.3%,说明样品在室温下可稳定至少 24 h。

**2.9 重复性试验** 精密称取供试品 6 份,按供试品溶液的制备方法制成供试品溶液,分别进样 10 μL,根据金莲花苷峰面积考察重复性。计算 RSD 2.75%,说明该方法重复性良好。

**2.10 回收率试验** 精密称取同批供试品 6 份,定量加入金莲花苷对照品,测定样品中金莲花苷的含量,计算对照品的回收率,结果见表 1。

表 1 金莲花苷的回收率

称样量 /g	样品中含量/mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
0.500 2	0.168 0	0.347 4	0.502 3	96.23	95.95	1.49
0.500 0	0.168 0	0.347 4	0.498 7	95.19		
0.500 1	0.168 0	0.347 4	0.500 2	95.62		
0.500 3	0.168 0	0.347 4	0.510 8	98.68		
0.500 2	0.168 0	0.347 4	0.499 0	95.28		
0.500 5	0.168 0	0.347 4	0.496 9	94.67		

根据上述方法学考察结果,高效液相色谱法适

用于准确测定金莲花药材中的金莲花苷的含量。

**2.11 金莲花药材中金莲花苷的含量测定** 取购自全国各地的金莲花药材9批,每批取样3份,按上述方法测定其中金莲花苷的含量,并计算平均值,结果见表2。

表2 金莲花药材中金莲花苷的含量 %

批号	购买地	金莲花苷	RSD
101203	北京同仁堂药店	0.057 8	2.34
100812	吉林省长春市	ND	
100928	上海市	0.045 8	1.78
100830	河北省秦皇岛市	0.023 5	1.96
100925	河北省安国市	0.033 6	1.75
060716	河南省郑州市	ND	
100925	四川省成都市	0.034 3	1.32
100205	山东省威海市	0.040 0	2.01
060727	山西省大同市	0.045 5	1.67

ND:未检测到。

### 3 结论与讨论

金莲花中金莲花苷的含量相对较低,其范围在0~0.058%之间,最高含量在0.05%左右,其中有2批未检测到金莲花苷成分,占所收集药材的22%以上。上述结果说明,该成分可能不是金莲花的共有成分,也可能是存在某种转化途径,使其在金莲花中转化为另一种成分,因为该化合物也是一种苷类化合物,在一定的条件下糖苷键水解,产生苷元和葡萄糖<sup>[4]</sup>。因此,我们推断,该化合物在金莲花中酶的作用下,也可能存在类似转化途径。正是由于这种转化途径的存在,部分地造成了金莲花中金莲花苷的含量差异,甚至部分样品中检测不到该成分的存在。但是,由于我们现有的金莲花苷样品有限,不能进行有效的水解实验来证明这种推断,这方面有待于进一步研究。

酚酸类和黄酮类一直被认为是金莲花的主要化学成分,这两类成分也都有体外抗菌和抗病毒的活性报道,对金莲花的疗效贡献显然不可忽视。包括本文报道的金莲花苷在内,金莲花中的酚酸类都以安息香酸为母核,是苯甲酸的类似物。众所周知,苯甲酸具有抑菌作用,常作为药物或食品防腐剂使用。

我们的抑菌试验结果也证明,金莲花苷对肺炎链球菌表现出一定的抗性。因此,值得对金莲花苷的抑菌活性进行进一步研究。同时,本研究还提示我们,通过对该化合物进行结构修饰,有望获得具有优良抗菌或抗病毒活性的先导化合物。

### [参考文献]

- [1] 北京制药厂. 金莲花的药理实验和临床观察报告[J]. 新医药学杂志, 1973, 4(5): 31.
- [2] 徐秀泉, 许源, 汤建, 等. 响应面法优化金莲花总黄酮的超声提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(14): 35.
- [3] 江苏新医学院. 中药大辞典. 下册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1997:1398.
- [4] Wang R F, Ma C M, Yang X W, et al. Trollioside, a new compound from the flowers of *Trollius chinensis*[J]. J Asian Nat Prod Res, 2004, 6(2): 139.
- [5] 赵宏伟, 赵玉珍. 金莲花醇提取物体外抗甲型流感病毒作用研究[J]. 中国农业, 2010, 19(1): 10.
- [6] 刘召阳, 罗都强. 金莲花的化学成分研究[J]. 中草药, 1982, 41(3): 370.
- [7] Wang R F, Ma C M, Yang X W, et al. A bioactive alkaloid from the flowers of *Trollius chinensis* [J]. Heterocycles, 2004, 63(6): 1443.
- [8] Cai S Q, Wang R F, Yang X W, et al. Antiviral flavonoid-type C-glycosides from the flowers of *Trollius chinensis*[J]. Chem Biodivers, 2006, 3(3): 343.
- [9] Li Z L, Li D Y, Hua H M, et al. Three new acylated flavone C-glycosides from the flowers of *Trollius chinensis* [J]. J Asian Nat Prod Res, 2009, 11(5): 426.
- [10] 康少文, 于永芳, 王沛. 金莲花化学成分研究[J]. 中草药, 1984, 15(6): 7.
- [11] 李镇. 金莲花中藜芦酸的分离和鉴定[J]. 中草药, 1982, 13(3): 34.
- [12] Wang R F, Liu R N, Zhang T, et al. A new natural ceramide from *Trollius chinensis* Bunge[J]. Molecules, 2010, 15: 7467.
- [13] 王如峰, 马群, 杨继锋. HPLC测定金莲花中金莲花碱的含量[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(2): 247.

[责任编辑 顾雪竹]