

HPLC 法同时测定湘莲中芦丁、金丝桃苷及槲皮素含量

Determination of rutin, hyperoside, quercetin in Xiang lotus by HPLC

钟菲菲 李 静 雷德卿 杨 韵 伍健芳 欧阳丽

ZHONG Feifei LI Jing LEI Deqing YANG Yun WU Jianfang OUYANG Li

(长沙市食品药品检验所, 湖南 长沙 410008)

(Changsha Institute for Food and Drug Control, Changsha, Hunan 410008, China)

摘要:目的:建立高效液相色谱法同时测定湘莲中芦丁、金丝桃苷及槲皮素的含量。方法:采用 Agilent ZORBAX SB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm),以甲醇—0.6% 磷酸水溶液为流动相,梯度洗脱,流速 1.0 mL/min,柱温 30 ℃,检测波长 255 nm。结果:20 批湘莲样品中芦丁、金丝桃苷及槲皮素含量分别为 1.32~2.06, 1.36~2.43, 1.41~3.26 mg/kg;芦丁、金丝桃苷和槲皮素检测质量浓度线性范围均为 5~200 μg/mL($R^2=0.999\ 9$),在相应的线性范围内,3 种黄酮类物质线性关系好,灵敏度高,精密度、稳定性、重复性及回收率试验相对标准偏差(RSD)均小于 4.0%;芦丁、金丝桃苷及槲皮素的平均加标回收率分别为 96.6%, 96.9%, 97.4%。结论:该方法操作便捷且结果准确,可用于湘莲中黄酮类成分的含量测定和质量评价。

关键词:湘莲;高效液相色谱;芦丁;金丝桃苷;槲皮素

Abstract: **Objective:** To establish a HPLC method for simultaneous determination of rutin, hyperoside, quercetin in Xiang lotus. **Methods:** The HPLC method was performed on an Agilent ZORBAX SB-C₁₈ column (4.6 mm×250 mm, 5 m) with gradient elution of methanol and 0.6% phosphoric acid solution. The flow rate was 1.0 mL/min. The column temperature was 30 ℃ and the detection wavelength was set at 255 nm. **Results:** The contents of rutin, hypericin and quercetin in 20 batches of lotus samples were 1.32~2.06, 1.36~2.43, 1.41~3.26 mg/kg, respectively. The linear range of the concentration of rutin, hypericin and quercetin was 5~200 g/mL ($R^2=0.999\ 9$), the three flavonoids showed a good linearity, a high sensitivity, and

good serviceability. The relative standard deviation (RSD) for precision, stability, repeatability, and recoveries test were all less than 4.0%, and the average recovery rate of added standard were 96.6%, 96.9%, 97.4%, respectively. **Conclusion:** The method is convenient and accurate, and can be used for the content determination and quality evaluation of flavonoids in Xiang lotus.

Keywords: Xiang lotus; HPLC; rutin; hyperoside; quercetin

莲(*Nelumbo nucifera* Gaerth.)为莲科莲属多年水生草本植物,在中国南北各省均有种植,主要产于湖南、浙江等地,尤以湘莲最为著名,被誉为“中国第一莲子”^[1]。莲子富含淀粉、蛋白质、脂肪、多种维生素、糖类、钙、磷、铁和钾等营养成分^[2],具有抑菌、抗炎、抗氧化等药理作用^[3]。其药用有效成分以生物碱和黄酮类化合物为主,其中黄酮类化合物主要包括芦丁、金丝桃苷及槲皮素。有研究发现,金丝桃苷对肾组织具有保护作用^[4];芦丁可通过下调 NF-κB 信号通路缓解右旋葡聚糖硫酸钠(DSS)诱导的大鼠溃疡性结肠炎(UC)^[5];槲皮素具有抗氧化、抗病毒、抗炎及保护心、脑和肝脏的作用^[6]。

黄酮的测定方法主要有超高效液相色谱法^[7]、荧光分光光度法^[8]、紫外—可见分光光度法^[9]、高效液相色谱法^[9]、超高效液相色谱—串联质谱法^[10]等。其中,高效液相色谱法对中药材中的目标成分及杂质有很好的分离效果、高灵敏度、结果稳定和操作简单等优点,在黄酮分析检测中的应用较广。李静等^[11]曾采用高效液相色谱法同时测定分心木中芦丁、金丝桃苷及槲皮素的含量,但未见采用高效液相色谱法同时测定湘莲中芦丁、金丝桃苷及槲皮素含量的报道。研究拟建立采用高效液相色谱同时测定湘莲中芦丁、金丝桃苷和槲皮素含量的定量分析方法。

基金项目:湖南省自然科学基金项目(编号:2021JJ80076)

作者简介:钟菲菲,女,长沙市食品药品检验所工程师,硕士。

通信作者:雷德卿(1979—),男,长沙市食品药品检验所副主任药师,硕士。E-mail: 53829816@qq.com

收稿日期:2023-06-28 **改回日期:**2023-08-12

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

芦丁对照品:含量 98.24%,斯坦福石油化工有限公司;

金丝桃苷对照品:含量 94.9%,中国食品药品检定研究院;

槲皮素对照品:含量 99.1%,中国食品药品检定研究院;

乙腈、甲醇:色谱纯,美国默克公司;

磷酸、甲酸:分析纯,国药集团化学试剂公司;

超纯水:实验室自制;

湘莲:采自湖南省 14 个地州市,采摘时间为 2022 年 7—9 月,晒干。

1.2 主要仪器设备

高效液相色谱仪:Waters alliance e2695 型,带自动进样器,2996PDA 检测器,美国 Waters 公司;

电子分析天平:METTLER XS205DU 型,瑞士梅特勒—托利多公司;

纯化水系统:Millipore Milli-Q Direct 8 型,美国密理博公司。

1.3 方法

1.3.1 高效液相色谱条件 色谱柱为 Agilent ZORBAX SB-C₁₈ (4.6 mm×250 mm, 5 μm), 二元流动相, 流动相 A 为甲醇, 流动相 B 为 0.6% 磷酸, 采用梯度洗脱(洗脱程序: 0 min, 18% A, 82% B; 35 min, 33% A, 67% B; 40 min, 34% A, 66% B; 45 min, 35% A, 65% B; 50 min, 40% A, 60% B), 流速 1.0 mL/min, 柱温 30 ℃, 检测波长 255 nm, 进样量 20 μL。

1.3.2 供试品溶液的制备 湘莲样品干燥粉碎, 取湘莲干燥粉末(粒径 180~250 μm), 精密称取约 50 g, 置于 1 000 mL 锥形瓶中, 加 75% 乙醇约 500 mL, 超声(840 W, 40 kHz)处理 1 h, 蒸发溶剂至约 100 mL, 离心(8 000 r/min) 3 min, 收集上清液, 用 60 mL 氯仿萃取 2 次, 收集乙醇层, 蒸发溶剂至近干, 加甲醇溶解并定容至 1 mL, 用 0.2 μm 微孔滤膜过滤, 取续滤液作为供试品溶液。

1.3.3 对照品溶液的制备 精密称取芦丁 25.31 mg, 金丝桃苷 25.83 mg, 槲皮素 26.55 mg, 置 25 mL 容量瓶中, 用甲醇(80%)—乙腈(20%)溶解并稀释至刻度, 摇匀, 制成约 1 mg/mL 的标准储备液。精密量取标准储备液 0.2, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0, 10.0, 20.0 mL 分别置 100 mL 容量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 得到 3 种成分的系列浓度的标准曲线工作液, 每 1 mL 含芦丁、金丝桃苷及槲皮素约为 2, 5, 10, 20, 50, 100, 200 μg。

1.3.4 高效液相色谱条件优化

(1) 吸收波长:使用紫外分光光度计,对芦丁、金丝桃苷及槲皮素 3 种待测成分在 200~400 nm 范围扫描,选择最佳吸收波长。

(2) 流动相的优化:采用色谱柱为 Agilent ZORBAX SB-C₁₈ (4.6 mm×250 mm, 5 μm), PDA 检测器, 最佳检测波长, 流速 1.0 mL/min, 柱温 30 ℃, 检测波长 255 nm, 进样量 20 μL。比较不同流动相:乙腈—磷酸水溶液(0.2%, 0.4%, 0.6%)、甲醇—磷酸水溶液(0.2%, 0.4%, 0.6%)对 3 种黄酮类物质的分离效果。

(3) 溶剂的选择:采用色谱柱为 Agilent ZORBAX SB-C₁₈ (4.6 mm×250 mm, 5 μm), PDA 检测器, 最佳检测波长, 流速 1.0 mL/min, 柱温 30 ℃, 检测波长 255 nm, 进样量 20 μL。比较不同溶剂配比($V_{\text{甲醇}}:V_{\text{乙腈}}$ 分别为 100:0, 80:20, 60:40, 50:50, 40:60, 0:100)对 3 种黄酮类物质的分离效果。

1.3.5 湘莲中芦丁、金丝桃苷及槲皮素提取方法的优化

(1) 湘莲粉末粒径选择:取 3 种不同粒径(>355, 180~250, <150 μm)的湘莲干燥粉末, 采用超声提取(840 W, 40 kHz), 提取时间为 1 h, 蒸发溶剂至约 100 mL, 离心(8 000 r/min) 3 min, 收集上清液, 最优 HPLC 条件测定 3 种黄酮类物质含量。

(2) 提取时间选择:取湘莲干燥粉末(180~250 μm), 采用超声提取(840 W, 40 kHz), 提取时间分别为 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 h, 分别蒸发溶剂至约 100 mL, 离心(8 000 r/min) 3 min, 收集上清液, 最优 HPLC 条件测定 3 种黄酮类物质含量。

(3) 提取溶剂选择:取湘莲干燥粉末(180~250 μm), 采用超声提取(840 W, 40 kHz), 提取时间 1 h, 选择不同体积分数的甲醇和乙醇(50%甲醇、50%乙醇、60%甲醇、60%乙醇、75%甲醇、75%乙醇、90%甲醇、90%乙醇)作为溶剂提取湘莲中 3 种黄酮, 考察提取溶剂对湘莲中 3 种黄酮类物质定量影响。

(4) 料液比选择:取湘莲干燥粉末(180~250 μm), 采用超声提取(840 W, 40 kHz), 提取时间 1 h, 提取溶剂为 75%乙醇, 考察料液比[1:2, 1:5, 1:10, 1:15 (mg/mL)]对湘莲中 3 种黄酮类物质提取效果的影响。

(5) 提取方法选择:取湘莲干燥粉末(180~250 μm), 提取时间 1 h, 提取溶剂为 75%乙醇, 料液比 1:10 (mg/mL), 分别采用超声(840 W, 40 kHz)和热回流提取湘莲中 3 种黄酮类物质, 考察提取方法对湘莲中 3 种黄酮类物质定量影响。

1.4 数据处理

将仪器测得的数据结果使用 Excel 2010 软件记录、处理计算。提取色谱图通过仪器软件导出 csv 数据文件,

使用 Origin 8.5 绘图软件重新绘制。

2 结果与分析

2.1 高效液相色谱图

如图 1 所示,按 1.3.1 的色谱条件进样,芦丁、金丝桃

苷和槲皮素的保留时间分别为 41.07, 42.81, 47.92 min。样品中的目标峰具有良好的峰型和分离度,杂质峰对目标峰的含量测定没有干扰。因此,在该色谱条件下所测得的结果可以代表芦丁、金丝桃苷和槲皮素的含量。

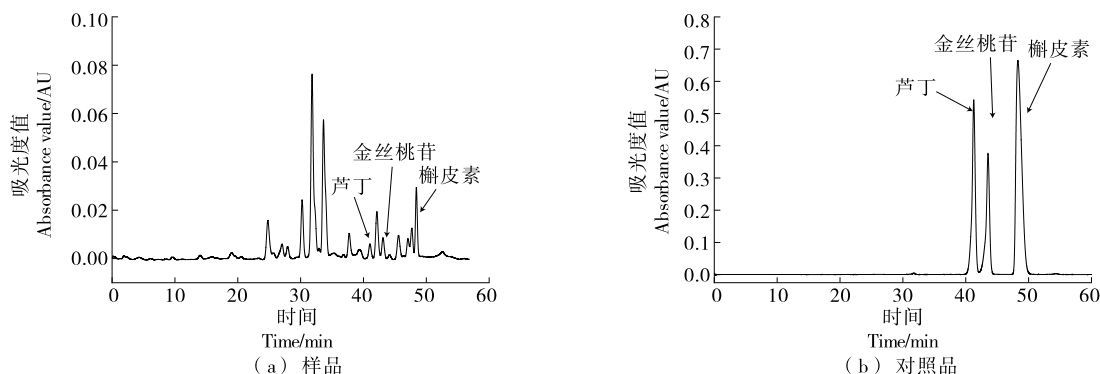


图 1 混合对照品和样品 HPLC 色谱图

Figure 1 HPLC chromatogram of mixed reference substance and sample

2.2 色谱条件优化

2.2.1 波长选择 精密量取 1.3.1 项下供试品溶液 0.1 mL,加甲醇定容至 10 mL 容量瓶,摇匀。取芦丁、金丝桃苷及槲皮素对照品,加甲醇溶液(浓度适量)作对照,在紫外可见分光光度计 200~400 nm 进行全波长扫描,以甲醇为空白溶剂。结果供试品和芦丁、金丝桃苷及槲皮素对照品均在 255 nm 处有最大吸收,故确定其为检测波长。

2.2.2 溶剂选择和优化 如图 2 所示,当溶剂中乙腈体

积分数>40%时,槲皮素含量明显降低;以甲醇(60%)—乙腈(40%)为溶剂时,槲皮素的色谱峰拖尾严重;以纯甲醇为溶剂时,芦丁及金丝桃苷分离度<1.5,而且芦丁色谱峰存在前延和变形问题。综合考虑目标物质峰的响应值、拖尾因子、分离度和峰宽,最终选择甲醇(80%)—乙腈(20%)作为溶剂溶解稀释标准品。

2.2.3 流动相的选择和优化 芦丁和金丝桃苷的极性相似,但槲皮素的极性与二者相差较大,故选择梯度洗脱。如图 3 所示,当流动相为甲醇—0.2%磷酸水溶液和甲

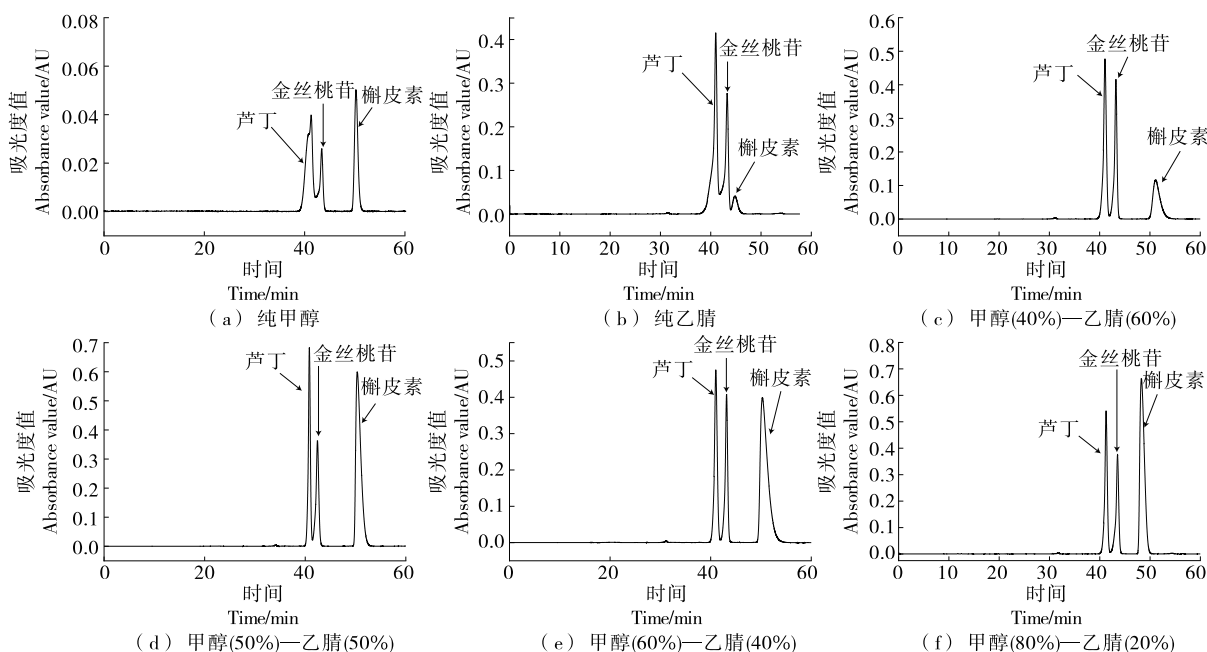


图 2 不同溶剂的色谱图

Figure 2 Chromatogram of different solvents

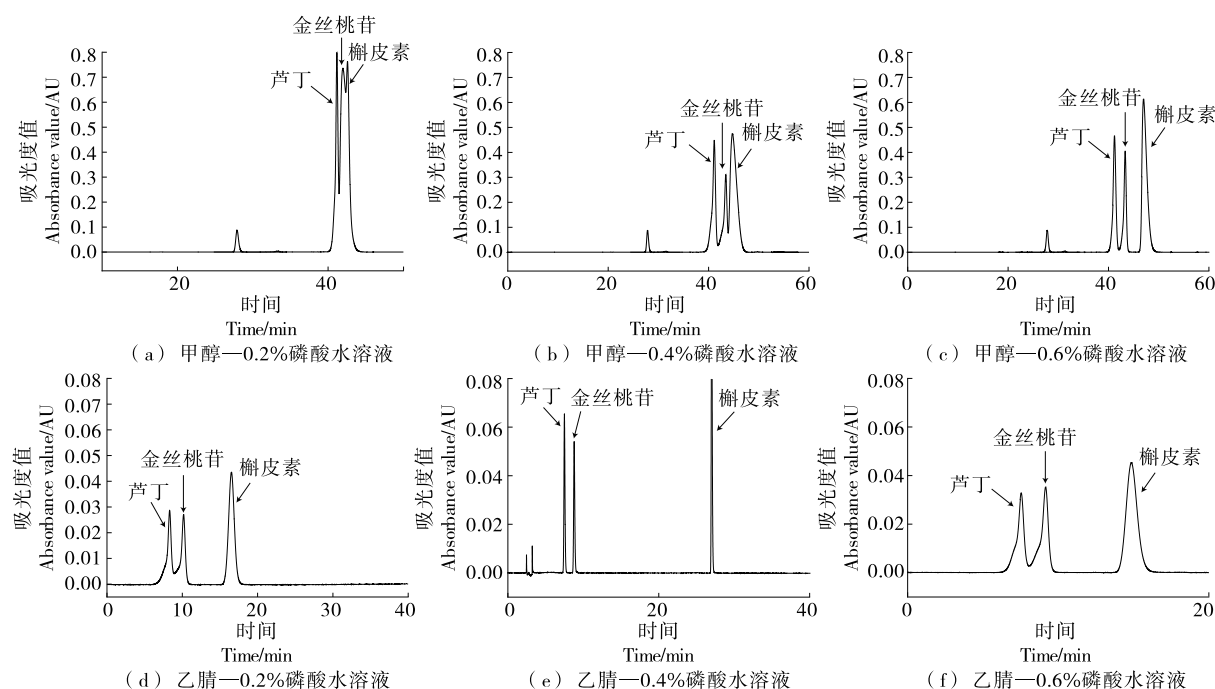


图 3 不同流动相的色谱图

Figure 3 Chromatograms of different mobile phases

醇—0.4%磷酸水溶液时,3种黄酮类物质的分离效果差,可能是流动相的酸度不够;以甲醇—0.6%磷酸水溶液为流动相时,3种物质的目标峰分离效果较好,分离度均大于1.5,且峰形较好。0.6%磷酸水溶液 pH 为 2.3,考虑到 $\text{pH} \leq 2$ 时会缩短色谱柱的使用寿命,因此不再选用更高酸度的磷酸水溶液作为流动相。与甲醇相比,乙腈作为流动相时,3种黄酮类物质的保留时间靠前,湘莲药材的杂质峰可能会干扰目标物质的测定,综合考虑目标峰洗脱时间和分离效果,选择甲醇—0.6%磷酸水溶液作为流动相。

2.3 提取条件优化

2.3.1 湘莲粉末粒径对 3 种目标物含量的影响 由表 1 可知,湘莲粉末粒径 $>355 \mu\text{m}$ 或 $<150 \mu\text{m}$ 时 3 种黄酮类物质的提取率均比粒径为 $180 \sim 250 \mu\text{m}$ 的低,原因可能是粉末粒径过大,与溶剂接触的比表面积小,有效成分渗出少;粉末过细,颗粒表面积大,其吸附作用强,会影响 3 种目标物质的扩散速度,同时杂质提取量也会增加,干

扰目标物质的定量。故湘莲粉末粒径选择 $180 \sim 250 \mu\text{m}$ 。

2.3.2 提取时间对 3 种目标物含量的影响 由表 2 可知,提取时间为 0.5 h 时,3 种黄酮类物质的提取率较低;提取时间为 1.0 h 与提取时间为 1.5 h 的芦丁、金丝桃苷及槲皮素的提取率相近;提取时间为 2 h 时,3 种黄酮类物质虽然提取率较高,但杂质峰较多。综合分析,提取时间选择 1.0 h。

表 2 提取时间对 3 种目标物含量的影响

Table 2 Effects of extraction time on the extraction rate of three objectives

提取时间/h	芦丁/ ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	金丝桃苷/ ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	槲皮素/ ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)
0.5	1.43	1.50	2.61
1.0	1.91	2.33	3.06
1.5	1.96	2.38	3.14
2.0	2.05	2.42	3.25

表 1 粉末粒径对 3 种目标物含量的影响

Table 1 Effects of powder particle size on the extraction rate of three objectives

粉末粒径/ μm	芦丁/ ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	金丝桃苷/ ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	槲皮素/ ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)
>355	1.56	1.62	2.74
$180 \sim 250$	2.01	2.38	3.13
<150	1.87	2.11	3.04

2.3.3 提取溶剂对 3 种目标物含量的影响 由表 3 可知,乙醇溶液提取效果优于甲醇溶液,可能是乙醇与 3 种黄酮类物质的极性相近。不同体积分数的乙醇溶液中,75%乙醇的提取效果最佳,乙醇体积分数过高会使湘莲粉末中的糖类物质、脂溶性物质大量析出,导致 3 种目标物质的定量受到影响;当乙醇体积分数过低时,湘莲粉末中 3 种目标物的含量明显降低。因此,提取溶剂选择 75%乙醇溶液。

表 3 提取溶剂对 3 种目标物含量的影响

Table 3 Effects of extraction solvents on the extraction rates of three objectives

提取溶剂	芦丁/ (mg · kg ⁻¹)	金丝桃苷/ (mg · kg ⁻¹)	槲皮素/ (mg · kg ⁻¹)
50%甲醇	1.40	1.58	2.57
50%乙醇	1.45	1.65	2.62
60%甲醇	1.56	1.77	2.68
60%乙醇	1.66	1.82	2.76
75%甲醇	1.92	2.37	3.02
75%乙醇	2.06	2.42	3.24
90%甲醇	1.92	2.31	2.99
90%乙醇	2.00	2.39	3.20

2.3.4 料液比对 3 种目标物含量的影响 由表 4 可知,随着液料比值的增大,3 种目标物质的提取率先增大后趋于平衡。考虑到耗材用量、人力及时间,料液比选择 1 : 10 (mg/mL)。

2.3.5 提取方法对 3 种目标物含量的影响 由表 5 可知,采用热回流法时芦丁及金丝桃苷的提取率较超声法的低,可能是因为芦丁及金丝桃苷受热易分解,而且超声法设备简单、操作方便、耗时短。因此,选择超声法。

2.4 线性关系、检出限及定量限考察

以目标物质量浓度为横坐标(X),峰面积为纵坐标

表 4 料液比对 3 种目标物含量的影响

Table 4 Effects of liquid to material ratio on the extraction rate of three objectives

料液比 (mg/mL)	芦丁/ (mg · kg ⁻¹)	金丝桃苷/ (mg · kg ⁻¹)	槲皮素/ (mg · kg ⁻¹)
1 : 2	0.85	0.88	1.41
1 : 5	1.66	1.96	2.83
1 : 10	2.02	2.33	3.22
1 : 15	2.05	2.37	3.26

表 5 提取方法对 3 种目标物含量的影响

Table 5 Effects of extraction methods on the extraction rates of three objectives

提取方法	芦丁/ (mg · kg ⁻¹)	金丝桃苷/ (mg · kg ⁻¹)	槲皮素/ (mg · kg ⁻¹)
超声	2.03	2.41	3.26
热回流	2.01	2.40	3.24

(Y)绘制标准曲线,芦丁、槲皮素及金丝桃苷在质量浓度为 5~200 μg/mL 的范围内线性良好,相关系数 R² 均大于 0.999。以信噪比 S/N ≥ 3 确定检出限,以信噪比 S/N ≥ 10 确定定量限,如表 6 所示,芦丁、金丝桃苷及槲皮素均有较低的检出限及定量限,有较好的灵敏度。

表 6 3 种组分线性范围与检测限

Table 6 Linearity range and detection limit of three components

组分	回归方程	相关系数(R ²)	线性范围/(μg · mL ⁻¹)	检出限/(μg · mL ⁻¹)	定量限/(μg · mL ⁻¹)
芦丁	Y=2 527X-1 136	0.999 9	5~200	0.10	0.42
金丝桃苷	Y=4 818.6X-3 712	0.999 9	5~200	0.10	0.40
槲皮素	Y=2 809.8X-108.4	0.999 9	5~200	0.10	0.40

2.5 稳定性试验

取湘莲供试品溶液分别于 0,4,8,16,24,36,48 h 进样,各时间点平行 2 次,测定湘莲供试品溶液中 3 种黄酮的平均峰面积。由表 7 可知,芦丁、金丝桃苷及槲皮素的均小于 2%(n=7),表明湘莲供试品溶液在 48 h 内稳定,但超过 72 h,3 种黄酮类物质的峰面积明显降低。

2.6 精密度试验

取混合对照品溶液,按 1.3.1 的色谱条件,平行进样 6 次,测定 3 种成分的峰面积。由表 8 可知,芦丁、金丝桃苷及槲皮素峰面积的 RSD 均小于 2%,表明该方法具有良好的精密度。

2.7 重复性试验

按 1.3.2 的供试品溶液制备方法平行处理 6 份样品,按 1.3.1 的色谱条件测定。由表 9 可知,芦丁、金丝桃苷和槲皮素峰面积的 RSD 分别为 1.8%,1.1%,1.5%,表明

表 7 稳定性试验

Table 7 The test of stability (n=2)

进样时间/ h	含量		
	芦丁/ (μg · mL ⁻¹)	金丝桃苷/ (μg · mL ⁻¹)	槲皮素/ (μg · mL ⁻¹)
0	108.6	96.7	100.1
4	109.2	96.9	99.8
8	104.7	94.6	96.1
16	104.2	94.6	96.1
24	107.1	95.8	98.4
36	104.7	94.7	96.3
48	105.9	95.4	97.4
RSD/%	1.9	1.0	1.7

表 8 精密度试验

Table 8 The test of precision ($n=6$)

组分	含量/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$						RSD/%
	平行 1	平行 2	平行 3	平行 4	平行 5	平行 6	
芦丁	103.2	103.5	104.7	107.6	107.9	104.8	1.9
金丝桃苷	100.2	100.5	101.1	104.4	103.7	101.5	1.8
槲皮素	99.3	100.7	101.0	104.1	103.7	101.0	1.8

表 9 重复性试验

Table 9 The test of repeatability ($n=6$)

组分	含量/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$						RSD/%
	平行 1	平行 2	平行 3	平行 4	平行 5	平行 6	
芦丁	136.0	140.1	142.4	142.8	141.7	141.1	1.8
金丝桃苷	136.1	139.5	139.6	139.9	138.0	137.9	1.1
槲皮素	171.6	178.1	178.2	178.6	175.6	175.4	1.5

该方法的重复性良好。

2.8 回收率试验

取已知含量的湘莲样品 9 份,每份约 25 g,精密称定,按 1.3.2 的方法处理之前,在 9 份湘莲样品中分别加入高、中、低 3 种不同浓度的芦丁、金丝桃苷及槲皮素高、中、低混合的对照品溶液 1 mL,质量浓度分别为 60,50,

40 $\mu\text{g}/\text{mL}$,置振荡器中混匀。按 1.3.1 的色谱条件测定,计算各对照品的平均加样回收率和 RSD 值。由表 10 可知,芦丁、金丝桃苷、槲皮素的平均加标回收率分别为 96.6%,96.9%,97.4%,RSD 值分别为 1.3%,1.5%,1.5% ($n=9$),表明该方法的加样回收率符合要求,对结果的准确度影响小。

表 10 回收率试验

Table 10 The test of recovery ($n=3$)

参数	水平	加标量/ μg	样品中含量/ μg			测得量/ μg			回收率/%			平均回收率/%	RSD/%
			平行 1	平行 2	平行 3	平行 1	平行 2	平行 3	平行 1	平行 2	平行 3		
芦丁	低	40.1	53.5	53.2	52.8	91.2	90.1	89.0	97.4	96.6	95.8	96.6	1.3
	中	51.3	54.1	54.0	53.7	103.1	101.0	99.5	97.8	95.9	94.8		
	高	60.5	53.6	53.3	53.2	112.7	110.5	108.6	98.8	97.1	95.5		
金丝桃苷	低	40.3	60.8	60.5	60.1	99.8	97.3	96.1	98.7	96.5	95.7	96.9	1.5
	中	50.9	61.6	61.2	60.9	109.2	106.8	105.5	97.1	95.3	94.4		
	高	60.4	61.0	60.8	60.3	119.2	118.8	118.0	98.2	98.0	97.8		
槲皮素	低	39.8	80.6	80.1	79.5	116.2	114.1	113.3	96.5	98.0	97.8	97.4	1.5
	中	50.2	81.4	81.1	81.0	128.5	127.7	126.0	97.6	97.3	96.0		
	高	59.7	80.8	80.4	80.0	139.0	139.0	137.5	99.5	99.2	98.4		

2.9 耐用性试验

按 1.3.2 的方法平行处理 2 份样品,更改柱温条件(25,30,35,40 $^{\circ}\text{C}$)、流动相 pH 值(2.0,2.5,3.0,3.5)及色谱柱(Agilent- C_{18} 柱、Waters- C_{18} 柱、Thermo- C_{18} 柱),其他条件参照 1.3.1。由表 11~表 13 可知,同一供试品在改变柱温条件下,芦丁、金丝桃苷和槲皮素的 RSD 分别为 2.8%,2.2%,2.4%;同一供试品在改变流动相 pH 值条件下,芦丁、金丝桃苷和槲皮素的 RSD 分别为 2.1%,1.8%,1.9%;同一供试品在改变色谱柱的条件下,芦丁、金丝桃

苷和槲皮素的 RSD 分别为 1.7%,0.9%,1.4%。湘莲供试品溶液在柱温、流动相 pH 值及色谱柱条件微小变化后,3 种黄酮类物质色谱峰分离良好,对结果的测定没有较大的影响,说明该方法具有良好的耐用性。

2.10 重现性

不同的分析人员在不同的实验室取同一批次湘莲样品,各按 1.3.2 的方法平行处理 5 份样品,按 1.3.1 的色谱条件进样检测。由表 14 可知,该方法具有良好的重现性。

表 11 柱温耐用性试验

Table 11 The serviceability test of different column temperatures ($n=2$)

柱温/ $^{\circ}\text{C}$	含量/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$					
	芦丁		金丝桃苷		槲皮素	
	平行 1	平行 2	平行 1	平行 2	平行 1	平行 2
25	92.0	91.9	97.0	97.0	136.0	136.5
30	92.3	92.4	99.2	99.9	135.2	134.8
35	92.2	92.2	96.7	98.3	135.8	136.4
40	97.5	97.9	94.1	93.8	129.0	129.1
RSD/%	2.8		2.2		2.4	

表 12 pH 值耐用性试验

Table 12 The serviceability test of different pH values ($n=2$)

pH 值	含量/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$					
	芦丁		金丝桃苷		槲皮素	
	平行 1	平行 2	平行 1	平行 2	平行 1	平行 2
2.0	93.2	93.5	95.5	94.6	126.8	125.4
2.5	94.2	93.8	97.0	97.0	130.0	131.6
3.0	93.3	93.2	99.4	98.4	128.6	131.1
3.5	97.8	97.5	94.4	95.8	131.9	132.0
RSD/%	2.1		1.8		1.9	

表 13 色谱柱耐用性试验

Table 13 The serviceability test of different chromatographic columns ($n=2$)

色谱柱	含量/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$					
	芦丁		金丝桃苷		槲皮素	
	平行 1	平行 2	平行 1	平行 2	平行 1	平行 2
色谱柱 1	102.8	100.6	97.0	97.4	131.7	128.3
色谱柱 2	98.0	99.1	94.9	96.2	126.9	128.0
色谱柱 3	99.5	100.6	96.5	96.9	130.0	130.7
RSD/%	1.7		0.9		1.4	

表 14 重现性试验

Table 14 The test of reproducibility ($n=5$)

试验	芦丁/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$		金丝桃苷/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$		槲皮素/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	
	人员 1	人员 2	人员 1	人员 2	人员 1	人员 2
	人员 1	人员 2	人员 1	人员 2	人员 1	人员 2
1	90.2	89.1	96.5	95.2	133.2	131.1
2	89.6	89.6	95.3	95.5	132.5	131.2
3	90.5	90.0	96.2	96.1	133.6	132.9
4	91.2	91.0	97.1	96.2	133.8	133.0
5	92.5	90.7	98.0	95.2	134.2	132.7
RSD/%	1.2	0.9	1.0	0.5	0.5	0.7
总 RSD/%	1.0		0.9		1.0	

2.11 样品的含量测定

取 20 批湖南省 14 个地市州的湘莲样品粉末各 50 g, 先按 1.3.2 项下的样品处理方法制备, 再按照 1.3.1 项下的色谱条件测定样品中芦丁、金丝桃苷及槲皮素含量。由表 15 可知, 20 批湘莲样品中芦丁、金丝桃苷及槲皮素含量的平均值分别为 1.62、1.78、2.29 mg/kg, 不同产地和采收季节均会对湘莲中的芦丁、金丝桃苷及槲皮素含量有一定程度的影响。从产地看, 湘潭的莲子中芦丁、金丝桃苷及槲皮素的含量最高, 可能是因为湘潭位于湘江下游, 气候湿润, 年平均气温为 17 $^{\circ}\text{C}$ 左右, 形成了湘莲生产的有利地理条件; 从采收季节看, 湘潭、永州、怀化、衡阳和娄底地区 8 月份采收的莲子 3 种黄酮类物质的含量均比 7 月份的高, 可能与阳光照射温度有关, 因为南方地区 8 月份气候温度比 7 月份高, 大部分地区的温度在 34 $^{\circ}\text{C}$ 左右, 有些地区可能会超过 39 $^{\circ}\text{C}$, 甚至达到 40~41 $^{\circ}\text{C}$, 因此推测夏季三伏天的中伏和末伏期间为莲子比较适合采收的季节。

3 结论

研究建立了高效液相色谱法测定湘莲中芦丁、金丝

表 15 样品测定结果

Table 15 The results of samples ($n=1$)

样品	来源	采摘日期	芦丁/ $(\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1})$	金丝桃苷/ $(\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1})$	槲皮素/ $(\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1})$
1	湘潭	2022 年 7 月	1.97	2.20	3.05
2	湘潭	2022 年 8 月	2.06	2.43	3.26
3	湘潭	2022 年 9 月	2.01	2.31	3.11
4	永州	2022 年 7 月	1.38	1.51	1.87
5	永州	2022 年 8 月	1.49	1.75	2.09
6	怀化	2022 年 7 月	1.74	1.93	2.95
7	怀化	2022 年 8 月	1.82	2.06	3.03
8	衡阳	2022 年 7 月	1.71	1.88	2.67
9	衡阳	2022 年 8 月	1.83	2.04	2.97
10	张家界	2022 年 8 月	1.70	1.89	2.66
11	邵阳	2022 年 9 月	1.42	1.61	1.90
12	益阳	2022 年 9 月	1.32	1.36	1.41
13	郴州	2022 年 8 月	1.70	1.80	2.05
14	株洲	2022 年 8 月	1.50	1.62	1.80
15	长沙	2022 年 8 月	1.35	1.40	1.74
16	常德	2022 年 8 月	1.45	1.51	1.76
17	湘西	2022 年 8 月	1.48	1.52	1.79
18	岳阳	2022 年 9 月	1.40	1.51	1.70
19	娄底	2022 年 7 月	1.43	1.55	1.81
20	娄底	2022 年 8 月	1.56	1.77	2.13
平均值			1.62	1.78	2.29

桃苷及槲皮素含量的方法。该法采用色谱柱 Agilent ZORBAX SB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相: A 相为甲醇, B 相为 0.6% 磷酸, 梯度洗脱(洗脱程序: 0 min, 18% A, 82% B; 35 min, 33% A, 67% B; 40 min, 34% A, 66% B; 45 min, 35% A, 65% B; 50 min, 40% A, 60% B), 流速 1.0 mL/min; 柱温 30 ℃; 检测波长 255 nm; 进样量 20 μL。芦丁、金丝桃苷及槲皮素在 5~200 μg/mL ($R^2=0.999\ 9$) 范围内均有良好的线性关系, 回归方程分别为 $Y=2\ 527X-1\ 136$ 、 $Y=4\ 818.6X-3\ 712$ 和 $Y=2\ 809.8X-108.4$ 。

研究对湘莲中芦丁、金丝桃苷及槲皮素 3 种黄酮类物质的分析方法进行了改进, 3 种黄酮标准品的色谱峰得到了很好的分离且出峰时间适宜。湘莲中有较多黄酮类化合物以及其他类别化合物, 试验只对湘莲中 3 种黄酮类化合物进行了定量分析, 尚未对湘莲中其他活性成分做进一步的分离分析, 其主要活性成分有待于进一步研究。

参考文献

- [1] 彭斯文, 黄艳宁, 沈容. 湘莲的本草考证[J]. 中国民族民间医药杂志, 2015, 24(17): 13-14.
PENG S W, HUANG Y N, SHEN R. Textual research of the *Nelumbo nucifera gaertn*[J]. Chinese Journal of Ethnomedicine and Ethnopharmacy, 2015, 24(17): 13-14.
- [2] 高燕菁. 荷花: 药食同用 全身是宝[N]. 中国医药报, 2016-07-15(2).
GAO Y Q. Lotus: Medicine and food with the whole body is treasure[N]. China Medical News, 2016-07-15(2).
- [3] 廖立, 舒展, 李笑然, 等. 莲类药材的化学成分和药理作用研究进展[J]. 上海中医药杂志, 2010, 44(12): 82-84.
LIAO L, SHE Z, LI X R, et al. Research advance in chemical compositions and pharmacological actions of medicinal herbs related to lotus[J]. Shanghai Journal of Traditional Chinese Medicine, 2010, 44(12): 82-84.
- [4] 张元丽, 王素利, 张宇, 等. 金丝桃苷调控胰岛素受体底物 1/磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B 信号通路对糖尿病肾病大鼠肾组织损伤的保护作用[J]. 中国临床药理学杂志, 2023, 39(2): 241-245.
ZHANG Y L, WANG S L, ZHANG Y, et al. Protective effect of hyperoside on renal tissue damage in rats with diabetic nephropathy by regulating the insulin receptor substrate 1 / phosphatidylinositol 3-kinase / protein kinase B signaling pathway [J]. Chin J Clin Pharmacol, 2023, 39(2): 241-245.
- [5] 郭建军, 凌应飞, 李强. 芦丁通过抑制 NF-κB 信号通路缓解大鼠结肠炎的研究[J]. 安徽医药, 2023, 27(1): 46-49.
GUO J J, LING Y F, LI Q. Rutin relieves colitis in rats by inhibiting NF-κB signaling pathway [J]. Anhui Medical and Pharmaceutical Journal, 2023, 27(1): 46-49.
- [6] 马纳, 李亚静, 范吉平. 槲皮素药理作用研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报, 2018, 20(8): 221-224.
MA N, LI Y J, FAN J P. Research progress on pharmacological action of quercetin[J]. Journal of Liaoning University of Tcm, 2018, 20(8): 221-224.
- [7] 刘丽娜, 李海亮, 李耀磊, 等. 银杏叶片中 5 种银杏双黄酮类成分同时测定方法的建立[J]. 中国药房, 2022, 33(10): 1 220-1 224.
LIU L N, LI H L, LI Y L, et al. Establishment of determination method for five Ginkgo biflavones in Ginkgo biloba leaves tablets [J]. China Pharmacy, 2022, 33(10): 1 220-1 224.
- [8] 郑凯, 刘保山, 宋歌, 等. 比较荧光分光光度法和紫外—可见分光光度法检测刺葡萄叶片总黄酮含量[J]. 湖北民族大学学报(自然科学版), 2023, 41(1): 14-18, 32.
ZHENG K, LIU B S, SONG G, et al. Comparison of fluorescence spectrophotometry and uv-vis spectrophotometry for determination of total flavonoids in vitis davidii leaves[J]. Journal of Hubei Minzu University (Natural Science Edition), 2023, 41(1): 14-18, 32.
- [9] 王亚, 杨青山, 徐猛, 等. 银杏叶及其提取物中银杏黄酮的 HPLC 测定方法研究[J]. 食品研究与开发, 2018, 39(9): 135-141.
WANG Y, YANG Q S, XU M, et al. Study on the determination method of Ginkgo flavonoids in ginkgo leaves and egb by HPLC [J]. Food Research and Development, 2018, 39(9): 135-141.
- [10] 周宗洲, 张艳萍, 黄婉锋, 等. 超高效液相色谱—串联质谱法同时测定化妆品植物提取物原料中 13 种黄酮类化合物[J]. 广东化工, 2022, 49(22): 181-183, 196.
ZHOU Z Z, ZHANG Y P, HUANG W F, et al. Simultaneous deyermination of 13 flavonoids in cosmetic plant extracts by ultra performance liquid chromatograohy thandem mass spectrometry[J]. Guangdong Chemical Industry, 2022, 49(22): 181-183, 196.
- [11] 李静, 贾文江, 曹望弟, 等. 高效液相色谱法同时测定分心木中芦丁、槲皮素、金丝桃苷含量[J]. 中国药业, 2021, 30(20): 61-63.
LI J, JIA W J, CAO W D, et al. Content determination of ruyin, quercetin and hyperoside in diaphragma juglandis fructus by HPLC [J]. Chinese Traditional Patent Medicine, 2021, 30(20): 61-63.