

G13) from Fructus Ligustri Lucidi and determine nuezhenoside and G13 in samples from different acquisition times and different places **Method:** The sample was separated on a YMG-C₁₈ (4.6 mm ×250 mm, 10 μm) column. The mobile phase was acetonitrile-water, gradient elution (CH₃CN: 0 min, 20%; 15 min, 25%) with the flow rate of 1 mL · min⁻¹, the detection wavelength was 240 nm, and the column temperature was set at 25 °C. **Result:** In HPLC analysis, the linear ranges of nuezhenoside and G13 were 0.341-34.1 μg and 0.331-33.1 μg, respectively; their average recoveries were 97.5% (RSD 1.35%) and 98.1% (RSD 1.82%), respectively. The results of content determination (nuezhenoside and G13) of samples from different places varied greatly. This may be caused by different species sources and different preparation methods, etc. The experiment led up to the fact that from the beginning to the middle of November the content of nuezhenoside and G13 reached the maximum. **Conclusion:** The established method can be used to determine two major secoiridoid glucosides (nuezhenoside and G13) in Fructus Ligustri Lucidi simultaneously. Meanwhile it can be used for the quality control of Fructus Ligustri Lucidi.

[Key words] Fructus Ligustri Lucidi; secoiridoid glucosides; nuezhenoside; G13; HPLC

[责任编辑 王亚君]

RP-HPLC测定几种花类药材黄酮含量

牛迎凤^{1,2}, 邵 赞^{1*}, 赵晓辉¹, 文怀秀¹, 陶燕铎¹

(1. 中国科学院 西北高原生物研究所, 青海 西宁 810001;

2. 中国科学院 研究生院, 北京 100049)

[摘要] 目的:为充分利用花类药材,建立马蔺花、桃花、月季等 15 种花类药材中黄酮含量测定的 RP-HPLC 方法,并比较它们的含量。方法:花类药材用甲醇提取,反相高效液相色谱法分析药材中槲皮素、山柰酚、异鼠李素 3 种黄酮苷元。结果:采用 Kromasil C₁₈ 柱 (4.6 mm ×250 mm, 5 μm),以甲醇-0.1% 磷酸 (50:50) 为流动相,可使 3 种黄酮苷元达到基线分离,其中马蔺花含槲皮素 1.536%,桃花含山柰酚 0.572%,茶花含异鼠李素 0.029%,皆为听测样品中最高。结论:本实验首次采用 RP-HPLC 法测定这 15 种花类药材的总黄酮含量,本方法操作简便,快速,准确,可作为黄酮的定量分析方法。

[关键词] RP-HPLC; 槲皮素; 山柰酚; 异鼠李素; 含量测定

[中图分类号] R 284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1001-5302(2008)18-2102-03

黄酮类化合物类型多样,分布广泛,最集中分布于被子植物中。研究表明,黄酮类化合物具有抗癌、抗肿瘤、抗心脑血管疾病、抗炎镇痛、免疫调节、降血糖、治疗骨质疏松、抑菌抗病毒、抗氧化、抗衰老、抗辐射等作用^[1-2]。近年来,世界上掀起了植物药开发的热潮,植物药以其天然低毒的特点倍受青睐,而黄酮类化合物以其广谱的药理作用引人瞩目。目前我国黄酮类保健食品的功效成分测定是比色法测总黄酮,测定的是一大类混合物的总量,但这不一定是有效成分的

含量,为了使黄酮类物质的有效成分与功效对应起来,测定黄酮类物质的功效成分单体是势之所趋^[3]。本实验定了 15 种花类药材中 3 种苷元的含量,桃花、菊花、雪梨、月季、马蔺花、绿绒蒿中均含有较为丰富的黄酮类化合物,具有广泛的开发和利用价值。

1 材料

Waters 515 高效液相色谱输液泵; Waters 2996 DAD 检测器; Waters Empower 色谱工作站; Waters 色谱柱恒温箱; DZKW - C 型电子恒温水浴锅 (北京化玻联医疗器械公司); 超声振荡仪。

葛花、千日红、桃花、凤尾花、杭白菊、菊花、雪梨、月季、鸡冠花、槐花、雪莲花、马蔺花、绿绒蒿、细果角茴香、镰形棘豆由中国科学院西北高原生物研

[收稿日期] 2007-12-18

[基金项目] 青海省重点科技攻关 (2007-N-136)

[通讯作者] * 邵赞, Tel: (0971) 6117264, E-mail: shaoyun11@

126.com

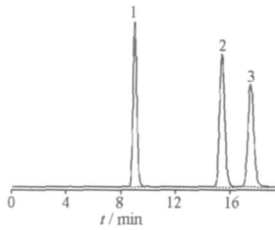
· 2102 ·

究所梅丽娟高级工程师鉴定。

氯仿、甲醇、磷酸均为分析纯，25%盐酸溶液，色谱甲醇。槲皮素、山柰酚、异鼠李素均购自中国药品生物制品检定所。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Kromasil C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm)，以甲醇-0.1%磷酸 (50:50) 为流动相，流速 1.0 mL · min⁻¹，柱温 30℃，检测波长 360 nm，采集时间 20 min。对照品色谱图见图 1。



1. 槲皮素; 2. 山柰酚; 3. 异鼠李素

图 1 标准品 RP-HPLC 图

2.2 对照品溶液的制备 分别精密称取经五氧化二磷干燥过夜的槲皮素、山柰酚、异鼠李素对照品适量，加甲醇制成 0.16, 0.22, 0.12 g · L⁻¹ 的溶液，摇匀，0.45 μm 的微孔滤膜过滤后作为对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备 [4] 15 种花类药材粉末各取约 0.5 g，精密称定，置索氏提取器中；加氯仿 70

回流提取 2 h，弃去氯仿，药渣挥干；加甲醇 90 回流提取 4 h，提取液蒸干；残渣加甲醇-25%盐酸溶液 (4:1) 混合液 25 mL，90℃ 回流 30 min，冷却；转移至 50 mL 量瓶中，用甲醇定容，摇匀，即得。

2.4 标准曲线及线性范围 分别精密吸取对照品溶液 2, 4, 6, 8, 10 μL，在上述色谱条件依次进样，以进样量 (X) 为横坐标，峰面积 (Y) 为纵坐标绘制标准曲线，回归方程见表 1。

表 1 3 种黄酮标准曲线

化合物	线性范围 /μg	标准曲线	r
槲皮素	0.108 ~ 0.540	$Y = 2.61 \times 10^7 X - 2.41 \times 10^5$	0.999 9
山柰酚	0.148 ~ 0.740	$Y = 1.88 \times 10^7 X + 6.3 \times 10^5$	0.999 8
异鼠李素	0.080 ~ 0.400	$Y = 3.55 \times 10^7 X - 1.75 \times 10^5$	0.999 8

由于一些样品中，3 种黄酮苷元的含量不在线性范围内，所以将对照品溶液稀释 20 倍，分别吸取稀释后对照品溶液 2, 4, 6, 8, 10 μL 进样，测得峰面积，以进样量 (X) 为横坐标，峰面积 (Y) 为纵坐标绘制标准曲线，回归方程见表 2。

2.5 精密度试验 精确吸取对照品溶液 10 μL，按 2.1 项下色谱条件测定 5 次，结果槲皮素、山柰酚和

表 2 3 种黄酮标准曲线 (稀释后)

化合物	线性范围 /μg	标准曲线	r
槲皮素	0.005 ~ 0.021	$Y = 2.11 \times 10^7 X - 1.74 \times 10^3$	0.999 9
山柰酚	0.007 ~ 0.030	$Y = 1.91 \times 10^7 X + 3.14 \times 10^3$	0.999 8
异鼠李素	0.004 ~ 0.016	$Y = 3.05 \times 10^7 X + 8.17 \times 10^3$	0.999 9

异鼠李素峰面积的 RSD 分别为 1.0%，0.81% 和 0.96%，表明仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验 精密称取镰形棘豆粉末 0.5 g，按 2.3 项下方法制备供试品溶液，分别在 0, 2, 4, 6, 8 h 后在上述色谱条件下进样 10 μL，结果槲皮素、山柰酚和异鼠李素峰面积的 RSD 分别为 1.3%，1.2% 和 1.7%，表明样品溶液在 8 h 内稳定。

2.7 重复性试验 精密称取镰形棘豆粉末 0.5 g，按上述供试品溶液的制备方法和测定条件，重复测定 5 份，结果槲皮素、山柰酚和异鼠李素峰面积的 RSD 分别为 1.3%，1.2% 和 1.4%，表明重复性良好。

2.8 加样回收率试验 称取已知槲皮素、山柰酚和异鼠李素含量的镰形棘豆粉末 5 份，每份约 0.5 g，加入对照品储备液 1.0 mL，制备样品溶液。精密吸取 10 μL 进样分析，计算平均回收率，结果见表 3。

表 3 槲皮素、山柰酚、异鼠李素加样回收率

化合物	样品中量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
槲皮素	0.204	0.160	0.360	97.5	98.8	1.3
	0.206	0.160	0.362	97.5		
	0.201	0.160	0.359	98.8		
	0.212	0.160	0.371	99.4		
	0.206	0.160	0.367	100.6		
山柰酚	0.221	0.220	0.437	98.2	98.5	0.75
	0.212	0.220	0.430	99.1		
	0.213	0.220	0.432	99.5		
	0.213	0.220	0.429	98.2		
	0.217	0.220	0.432	97.7		
异鼠李素	0.128	0.120	0.248	100.0	98.7	0.97
	0.130	0.120	0.248	98.3		
	0.133	0.120	0.252	99.2		
	0.121	0.120	0.238	97.5		
	0.126	0.120	0.244	98.3		

2.9 样品含量测定 取供试品溶液，过 0.45 μm 的微孔滤膜，分别进样 10 μL，测定 (n=3)，取 3 次测定的平均值，结果见表 4。

3 讨论

本实验做了冷浸提取，热回流和索氏提取 3 种

表 4 15 种花类药材中黄酮含量 (n=3) %

药材	槲皮素	山柰酚	异鼠李素
葛花	0.082	0.007	0.001
千日红	0.009	0.020	0.004
桃花	0.165	0.572	0.001
凤尾花	0.000	0.000	0.020
杭白菊	0.008	0.012	0.001
菊花	0.006	0.006	0.290
雪梨花	0.008	0.158	0.000
月季	0.377	0.005	0.095
鸡冠花	0.006	0.019	0.001
槐花	0.004	0.007	0.002
雪莲花	0.018	0.000	0.010
马蔺花	1.536	0.130	0.008
绿绒蒿	0.364	0.014	0.006
细果角茴香	0.102	0.024	0.003
镰形棘豆	0.042	0.044	0.026

提取方法的比较及 65%乙醇,甲醇不同溶剂对黄酮甙元分离的影响,结果发现索氏提取并以甲醇为溶剂,提取效率最高。

从表 4 中可以看出,桃花、菊花、雪梨花、月季、马蔺花、绿绒蒿、细果角茴香、镰形棘豆的黄酮含量都较高,其中马蔺花中的槲皮素含量明显高于其他

几种花,桃花中的山柰酚含量远远高于其他,菊花中的异鼠李素含量也高于其他花。所以这几种花类药材可用于提取黄酮制品。本实验选用的 15 种花类药材中,许多都用于藏药,如:十二味翼首散中用到镰形棘豆,治疗流行性感冒^[4];二十五味绿绒蒿丸中用到绿绒蒿,可解毒,清肝热;二十九味羌活散中用到角茴香、镰形棘豆,清热消炎,镇痛杀疔^[5]。通过对这 15 种花类药材总黄酮含量的测定及比较,可以更好的开发和利用它们。

[参考文献]

- [1] 谭萍,赵云婵. 黔产酢浆草总黄酮含量的测定及提取方法研究 [J]. 山西医药杂志, 2006, 35 (5): 462
- [2] 俞一心,戈升荣,王桂珍. 槲皮素及其衍生物的药理作用研究进展 [J]. 中药材, 2003, 26 (12): 902
- [3] 王春娥,潘振球,冯家力,等. HPLC 法测定保健食品中二氢杨梅素的研究 [J]. 中国卫生检验杂志, 2006, 16 (6): 694
- [4] 才让吉. 藏药十二味翼首散合四味藏木香汤治疗流行性感冒 108 例 [J]. 中国民族医药杂志, 1999, 5 (3): 13
- [5] 药典委员会. 卫生部药品标准藏药. 第 1 册 [S]. 1995: 141, 160.

RP-HPLC determination of flavonoids in several flowers

NIU Ying-feng^{1,2}, SHAO Yun¹, ZHAO Xiao-hui¹, WEN Huai-xiu¹, TAO Yan-duo¹

(1. Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810001, China;

2. Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

[Abstract] **Objective:** To develop a RP-HPLC method for the determination of flavonoids in fifteen kinds of flowers such as *Iris lacteal pall*, *pnunus persica* and *rosa chinensis*. **Method:** The contents of quercetin, kaempferol and isorhamntin in fifteen kinds of flowers were extracted with methanol. The analysis was performed on a Kromasil C₁₈ column (4.6 mm ×250 mm, 5 μm) with methanol-0.1% phosphoric acid (50:50) as mobile phase. **Result:** The quercetin, kaempferol and isorhamntin were separated well, and the result shows that the content of quercetin in the *Iris lacteal Pall* was the highest (1.536%), the content of kaempferol in *Persica persica* was the highest (0.572%), and the content of isorhamntin in *chrysanthemum morifolium* was up to 0.290%. **Conclusion:** The contents of flavonoids in these flowers were by determined RP-HPLC for the first time and the method can be used for quantitative determination of flavonoids in the flowers.

[Key words] RP-HPLC; quercetin; kaempferol; isorhamntin; determination

[责任编辑 王亚君]