

# HPLC同时测定不同产地荷叶饮片中4种黄酮成分

李慧芬, 张学兰\*, 崔伟亮, 刘洋  
(山东中医药大学, 济南 250355)

**[摘要]** 目的: 采用HPLC同时测定荷叶饮片中4种黄酮类成分的含量, 为制定荷叶饮片的质量标准提供实验依据。方法: 采用Kromasil C<sub>18</sub> (4.6 mm × 200 mm, 5 μm) 色谱柱, 以甲醇(A)-0.2% 磷酸水(B)为流动相, 梯度洗脱(0~8 min, 10%~40% A; 8~23 min, 40%~70% A; 23~30 min, 70%~85% A), 流速1 mL·min<sup>-1</sup>, 柱温30℃, 二极管阵列检测器, 检测波长360 nm。结果: 槲皮素-3-O-桑布双糖苷、金丝桃苷、异槲皮苷和槲皮素的线性范围依次为6.10~97.60, 18.76~300.16, 8.48~135.68, 9.12~145.92 mg·L<sup>-1</sup>, 平均回收率(n=6)依次为100.98% (RSD 1.85%), 99.05% (RSD 1.48%), 99.29% (RSD 1.84%), 97.71% (RSD 1.78%)。5个不同产地荷叶饮片中槲皮素-3-O-桑布双糖苷、金丝桃苷、异槲皮苷和槲皮素的含量分别为0.092%~0.161%, 0.949%~1.862%, 0.067%~0.133%, 0.040%~0.062%。结论: 该方法简便快速, 准确可靠, 可作为荷叶饮片中4种黄酮成分的含量测定方法。不同产地荷叶饮片中上述4种黄酮成分含量相差较大, 建议将黄酮成分纳入荷叶饮片的质量控制标准。

**[关键词]** 荷叶饮片; 槲皮素-3-O-桑布双糖苷; 金丝桃苷; 异槲皮苷; 槲皮素; 高效液相色谱

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)02-0055-04

**[doi]** 10.11653/syfy2014020055

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20131107.1028.003.html>

**[网络出版时间]** 2013-11-07 10:28

## Simultaneous Determination of Four Flavonoids in Nelumbinis Folium from Different Origins by HPLC

LI Hui-fen, ZHANG Xue-lan\*, CUI Wei-liang, LIU Yang

(Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Ji'nan 250355, China)

**[Abstract]** **Objective:** A method was established by HPLC for the determination of four flavonoids in Nelumbinis Folium to supply further basis to the quality control of Nelumbinis Folium. **Method:** Chromatography conditions were Kromasil C<sub>18</sub> (4.6 mm × 200 mm, 5 μm) column, methanol (A) -0.2% phosphoric acid system as mobile phase, (0-8 min, 10%-40% A; 8-23 min, 40%-70% A; 23-30 min, 70%-85% A); the flow rate was 1 mL·min<sup>-1</sup> and column temperature was set at 30℃. Diode array detector was used and detected at 360 nm. **Result:** The assay displayed good linearity; the linear ranges of quercetin-3-O-sambubioside, hyperin, isoquercitrin and quercetin were 6.10-97.60, 18.76-300.16, 8.48-135.68, 9.12-145.92 mg·L<sup>-1</sup> respectively. The average recoveries were 100.98% (RSD 1.85%), 99.05% (RSD 1.48%), 99.29% (RSD 1.84%), 97.71% (RSD 1.78%) respectively. The content of the four flavonoids in Nelumbinis Folium from five different origins was 0.092%-0.161%, 0.949%-1.862%, 0.067%-0.133% and 0.040%-0.062%. **Conclusion:** The method is simple, accurate and can be used to determine quercetin-3-O-sambubioside, hyperin, isoquercitrin and quercetin in Nelumbinis Folium. The content of four flavonoids in Nelumbinis Folium from different origins varied

**[收稿日期]** 20130114(006)

**[基金项目]** 国家科技重大专项-重大新药创制项目(2009ZX09301-013); 山东省自然科学基金项目(ZR2012HM003)

**[第一作者]** 李慧芬, 硕士, 讲师, 从事中药炮制及中药新药研发研究, Tel:0531-89628170, E-mail:lhfen007@126.com

**[通讯作者]** \* 张学兰, 硕士, 教授, 从事中药炮制及中药新药研发研究, Tel:0531-89628170, E-mail:zhang8832440@sina.com

notably and should be taken into the quality control of *Nelumbinis Folium*.

[ **Key words** ] *Nelumbinis Folium*; quercetin-3-*O*-sambubioside; hyperin; isoquercitrin; quercetin; HPLC

荷叶为睡莲科植物莲的干燥叶,具有清暑化湿、升发清阳、凉血止血的功效,主治暑热烦渴、暑湿泄泻、脾虚泄泻、血热吐衄、便血崩漏<sup>[1]</sup>。荷叶的主要活性成分为黄酮类和生物碱类。现代研究表明,荷叶总黄酮具有降血脂及保护大鼠心肌缺血再灌注损伤作用<sup>[2-3]</sup>,金丝桃苷具有保护心、脑、肝及胃黏膜、解痉镇痛、抗抑郁等活性<sup>[4-6]</sup>,异槲皮苷具有抗氧化、保肝退黄等作用<sup>[7-8]</sup>,槲皮素具有止血作用<sup>[9]</sup>。目前有文献采用 HPLC 测定荷叶饮片中金丝桃苷<sup>[10]</sup>及药材中金丝桃苷、异槲皮苷的含量<sup>[11]</sup>。本文建立了 HPLC 同时测定荷叶饮片中槲皮素-3-*O*-桑布双糖苷、金丝桃苷、异槲皮苷和槲皮素含量的方法,并测定了 5 个不同产地荷叶饮片中 4 种成分的含量,为控制荷叶饮片的质量和进一步研究提供依据。

## 1 材料

Agilent 1100 型高效液相色谱仪(二极管阵列检测器,HP 色谱工作站),FA1604N 型电子天平(1/10 万,上海精密科学仪器有限公司)。

荷叶饮片购自济南市建联中药店和山东百味堂中药饮片有限公司,产地分别为江西、河南、湖南、湖北、山东,批号分别为 20101011,100821,110701,101103,20110908,经山东中医药大学药学院生药系周凤琴教授鉴定为睡莲科植物莲 *Nelumbo nucifera* Gaertn. 的干燥叶的丝状片。

金丝桃苷、槲皮素对照品(中国药品生物制品检定所,批号 111521-200303,100081-200406),槲皮素-3-*O*-桑布双糖苷、异槲皮苷对照品(本实验室自制,经理化反应、UV,MS,<sup>1</sup>H-NMR,<sup>13</sup>C-NMR 鉴定其结构,HPLC 检测,峰面积归一化法测定,槲皮素-3-*O*-桑布双糖苷的纯度为 98.1%,异槲皮苷的纯度为 98.3%,符合定量要求)。乙腈(色谱纯),甲醇(色谱纯),水为纯净水,其余试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

**2.1 对照品溶液的制备** 分别取槲皮素-3-*O*-桑布双糖苷、金丝桃苷、异槲皮苷和槲皮素对照品适量,精密称定,置 25 mL 量瓶内,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,制得每 1 mL 含槲皮素-3-*O*-桑布双糖苷、金丝桃苷、异槲皮苷、槲皮素分别为 0.122 0,0.375 2,0.169 6,0.182 4 mg 的混合对照品溶液。

**2.2 供试品溶液的制备** 取各样品粉末(过 2 号筛)约 0.1 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入 70% 乙醇溶液 20 mL,密塞,称定质量,水浴回流提取 1 h,取出,放冷,再称定质量,用 70% 乙醇溶液补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液即得。

**2.3 色谱条件** Kromasil C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 200 mm,5 μm),流动相甲醇(A)-0.2% 磷酸水(B),线性梯度洗脱(0 ~ 8 min,10% ~ 40% A;8 ~ 23 min,40% ~ 70% A;23 ~ 30 min,70% ~ 85% A),流速 1 mL·min<sup>-1</sup>,柱温 30 ℃,检测波长 360 nm。

**2.4 线性关系考察** 分别精密吸取混合对照品溶液 0.1,0.2,0.4,0.8,1.2,1.6 mL,置 2 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀。按上述色谱条件,分别进样 20 μL,测定峰面积(Y)为纵坐标,质量浓度 X(mg·L<sup>-1</sup>)为横坐标,进行线性回归,所得槲皮素-3-*O*-桑布双糖苷、金丝桃苷、异槲皮苷和槲皮素的回归方程分别为  $Y = 40.434X + 0.174 (r = 0.999 0)$ ,  $Y = 45.878X - 0.089 9 (r = 0.999 8)$ ,  $Y = 48.601X - 0.25 87 (r = 0.999 6)$ ,  $Y = 46.505X + 0.466 2 (r = 0.999 8)$ 。线性范围分别为 6.10 ~ 97.60,18.76 ~ 300.16,8.48 ~ 135.68,9.12 ~ 145.92 mg·L<sup>-1</sup>。

**2.5 精密度试验** 取同一供试品溶液,用 0.45 μm 滤膜滤过后,连续进样 6 次,记录峰面积,计算槲皮素-3-*O*-桑布双糖苷、金丝桃苷、异槲皮苷、槲皮素峰面积的 RSD,分别为 0.79%,0.55%,0.87%,0.93%,表明仪器精密度良好。

**2.6 稳定性试验** 取同一供试品溶液,用 0.45 μm 滤膜滤过后,分别在 0,2,4,6,8,12 h 进行测定,记录峰面积,计算槲皮素-3-*O*-桑布双糖苷、金丝桃苷、异槲皮苷、槲皮素峰面积的 RSD,分别为 1.25%,0.60%,0.97%,1.18%,表明供试品溶液在 12 h 内基本稳定。

**2.7 重复性试验** 取同一山东产荷叶样品,平行 6 份,按 2.1 项下方法制备供试品溶液,用 0.45 μm 滤膜滤过后,按 2.3 项下色谱条件进行测定,记录峰面积,计算 4 种成分的平均含量,结果 6 次测得槲皮素-3-*O*-桑布双糖苷、金丝桃苷、异槲皮苷、槲皮素平均含量的 RSD 依次为 1.49%,0.79%,1.97%,2.11% (n=6),表明该测定方法重复性良好。

**2.8 加样回收率试验** 取已知含量的山东产荷叶

粉末(过2号筛)共6份,每份约0.1g,精密称定,分别精密加入槲皮素-3-*O*-桑布双糖苷( $0.150\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ )对照品溶液1 mL、金丝桃苷( $0.805\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ )对照品溶液1 mL、异槲皮苷( $0.442\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ )0.5 mL、槲皮素

( $0.680\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ )对照品溶液0.5 mL,按2.2项下方法制备供试品溶液,用 $0.45\text{ }\mu\text{m}$ 滤膜滤过后,按2.3项下色谱条件进行测定,记录峰面积,计算回收率,结果见表1。

表1 荷叶中4种成分加样回收率试验

成分	取样量/g	样品中已知量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值/%	RSD/%
槲皮素-3- <i>O</i> - 桑布双糖苷	0.100 3	0.145 3	0.150	0.296 5	100.80	100.98	1.85
	0.100 4	0.145 5	0.150	0.293 6	98.73		
	0.099 7	0.144 5	0.150	0.298 2	102.47		
	0.100 1	0.145 0	0.150	0.297 7	101.80		
	0.100 2	0.145 2	0.150	0.293 5	98.87		
	0.099 8	0.144 6	0.150	0.299 4	103.20		
金丝桃苷	0.100 5	0.862 0	0.805	1.677 3	101.28	99.05	1.48
	0.100 2	0.859 4	0.805	1.658 0	99.20		
	0.100 6	0.862 8	0.805	1.649 9	97.78		
	0.099 6	0.854 3	0.805	1.651 9	99.08		
	0.100 4	0.861 1	0.805	1.664 7	99.83		
	0.099 7	0.855 1	0.805	1.637 2	97.16		
异槲皮苷	0.100 2	0.119 0	0.220	0.335 4	97.92	99.29	1.84
	0.099 6	0.118 3	0.220	0.338 8	100.23		
	0.100 6	0.119 5	0.220	0.338 5	99.55		
	0.099 4	0.118 1	0.220	0.336 4	99.23		
	0.100 3	0.119 2	0.220	0.332 1	96.77		
	0.099 8	0.118 6	0.220	0.343 1	102.05		
槲皮素	0.100 1	0.337 8	0.340	0.681 0	100.94	97.71	1.78
	0.100 3	0.338 5	0.340	0.6722	98.15		
	0.100 3	0.338 5	0.340	0.669 3	97.29		
	0.100 4	0.338 9	0.340	0.664 9	95.88		
	0.100 5	0.339 2	0.340	0.668 7	96.91		
	0.099 6	0.336 2	0.340	0.666 2	97.06		

**2.9 样品含量测定** 取5个不同产地的荷叶饮片,按2.2项下方法制备供试品溶液,按2.3项下色谱条件进行测定,记录峰面积,代入回归方程,计算槲皮素-3-*O*-桑布双糖苷、金丝桃苷、异槲皮苷、槲皮素的含量,色谱图见图1,结果见表2。

### 3 讨论

荷叶黄酮类成分具有较好的生理活性,其中金丝桃苷和异槲皮苷是荷叶所含黄酮类成分中含量较高的两种成分。《中国药典》2010年版一部中仅以荷叶碱的限量作为荷叶生饮片的质量控制指标,难

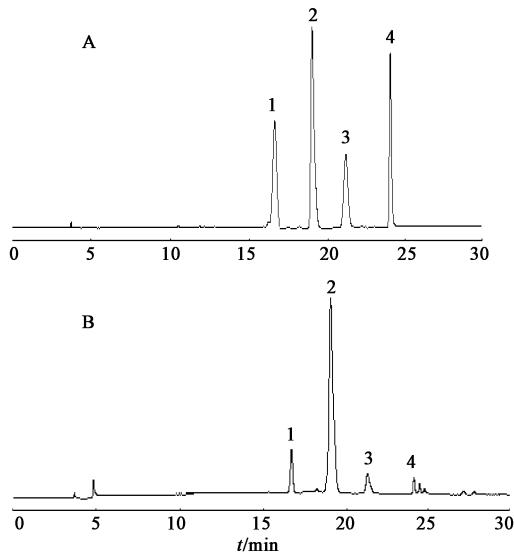
以全面反映荷叶生饮片的质量。因此,建议将金丝桃苷和异槲皮苷的含量限度纳入荷叶生饮片质量标准中,以期更全面地控制荷叶生饮片的质量。

实验中曾对不同提取方法(加热回流法、超声法)进行考察,结果回流提取法4种有效成分的提取总量明显高于超声法。对不同提取溶剂(甲醇、50%乙醇、70%乙醇、90%乙醇)进行比较,结果以70%乙醇提取量最高。考察了回流时间(0.5,1,1.5,2 h)对有效成分提取量的影响,结果随提取时间延长提取量逐渐增加,但超过1 h后提取率无显

表 2 5 个不同产地荷叶饮片中 4 种黄酮成分含量测定 (n=3)

%

样品	槲皮素-3-O-桑布双糖苷		金丝桃苷		异槲皮苷		槲皮素	
	$\bar{X}$	RSD	$\bar{X}$	RSD	$\bar{X}$	RSD	$\bar{X}$	RSD
江西	0.154	0.26	1.421	0.98	0.070	1.36	0.040	0.27
河南	0.161	0.83	0.953	1.21	0.126	2.86	0.056	1.30
湖南	0.115	0.45	1.301	0.43	0.072	1.03	0.050	1.16
湖北	0.113	0.77	0.949	1.16	0.067	0.85	0.062	1.03
山东	0.092	0.93	1.862	0.86	0.133	0.45	0.049	0.87



A. 混合对照品; B. 供试品;

1. 槲皮素-3-O-桑布双糖苷; 2. 金丝桃苷;  
3. 异槲皮苷; 4. 槲皮素

图 1 混合对照品及荷叶饮片 HPLC

著性差异。最终确定以 70% 乙醇加热回流提取 1 h 作为样品的提取方法。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社, 2010:259.  
[2] 黄阿根, 施洪飞, 韦红, 等. 荷叶黄酮和生物碱的提纯及调节血脂作用比较[J]. 扬州大学烹饪学报, 2006, 2(3):23.

[3] 纪冰, 宋涛, 徐晟伟, 等. 荷叶黄酮对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 齐鲁医学杂志, 2009, 24(6):515.  
[4] 李庆林, 孟刚, 陈志武, 等. 金丝桃苷对心肌缺血损伤的保护作用[J]. 安徽医科大学学报, 2001, 36(1):18.  
[5] 韩喻美, 赵小曼, 晏金平. 金丝桃苷与维生素 E 对小鼠脑肝组织的保护作用[J]. 江西医学院学报, 2002, 42(1):38.  
[6] 王卫星, 胡新颖, 刘鹏, 等. 金丝桃苷等 10 个天然黄酮化合物的抗抑郁活性筛选研究[J]. 中草药, 2007, 38(6):900.  
[7] 陈季武, 胡斌, 赵实, 等. 天然黄酮类化合物清除 DPPH 的构效关系[J]. 发光学报, 2005, 26(5):664.  
[8] 李沛波, 王永刚, 吴钉红. 田基黄中三个黄酮类化合物保肝退黄作用的实验研究[J]. 中山大学学报:医学科学版, 2007, 28(1):40.  
[9] 李惠, 原桂东, 金亚宏, 等. 槐花饮片及其提取物止血作用的实验研究[J]. 中国中西医结合杂志, 2004, 24(1):1007.  
[10] 唐超, 张学兰, 徐鑫. 荷叶炮制金丝桃苷含量变化研究[J]. 山东中医药大学学报, 2011, 35(1):78.  
[11] 袁丽春, 刘斌, 石任兵. HPLC 法测定不同市售荷叶药材中金丝桃苷和异槲皮苷的含量[J]. 药物分析杂志, 2010, 30(1):41.

[责任编辑 顾雪竹]