

# HPLC 测定凤仙透骨草中的芦丁、槲皮素和山奈酚的含量

田振坤<sup>1</sup>, 顾媛媛<sup>2</sup>, 宋成贵<sup>1</sup>, 代金红<sup>1</sup>, 王建明<sup>2\*</sup>

(1. 黑龙江中医药大学药学院, 哈尔滨 150040; 2. 黑龙江中医药大学中医药研究院, 哈尔滨 150040)

**[摘要]** 目的: 建立凤仙透骨草中的芦丁、槲皮素和山奈酚的 HPLC 含量测定方法。方法: 采用 Diamonsil C<sub>18</sub> (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱; 以乙睛-0.1% 冰乙酸为流动相进行线性梯度洗脱, 流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 柱温 30 °C, 检测波长 260 nm。结果: 芦丁、槲皮素和山奈酚与其他组份的色谱峰均得到基线分离, 加样回收率平均值分别为 98.89%, 98.39%, 98.48%, RSD 分别为 2.05%, 1.51%, 1.89%。结论: 该方法快速、准确、重复性好, 可作为凤仙透骨草质量控制的有效方法。

**[关键词]** 高效液相色谱法; 凤仙透骨草; 芦丁; 槲皮素; 山奈酚

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)18-0106-03

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20120711.1204.018.html>

**[网络出版时间]** 2012-7-11 12:04

## Determination of Content of Eldrin, Quertetin and Kaempferol in *Impatiens balsamina* by HPLC

TIAN Zhen-kun<sup>1</sup>, GU Yuan-yuan<sup>2</sup>, SONG Cheng-gui<sup>1</sup>, DAI Jin-hong<sup>1</sup>, WANG Jian-ming<sup>2\*</sup>

(1. College of Pharmacy, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China;

2. Institute of Traditional Chinese Medicine, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China)

**[Abstract]** **Objective:** To establish a HPLC method for the determination of eldrin, quertetin and kaempferol in *Impatiens balsamina*. **Method:** The determination was performed on a Diamonsil C<sub>18</sub> column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), with a gradient mobile phase of acetonitrile-0.1% glacial acetic acid; the flow rate was 1.0 mL·min<sup>-1</sup>; column temperature was 30 °C; the detection wavelength was at 260 nm. **Result:** The chromatographic peaks of eldrin, quertetin and kaempferol with other components were completely separated. The average recovery was 98.71%, 98.96%, 98.89%, RSD 2.13%, 2.34%, 2.38%. **Conclusion:** The method was rapid and accurate for quality control of *I. balsamina*, and laid foundations for further research and development.

**[Key words]** HPLC; *Impatiens balsamina*; eldrin; quertetin; kaempferol

凤仙透骨草来源于凤仙花科凤仙花属植物凤仙花的干燥茎, 凤仙始载于《救荒本草》, 其种子名为急性子, 李时珍谓<sup>[1]</sup>: “其花头翘尾足, 俱翘翘然如凤状, 故以名之”, 在我国大部分地区均有分布, 南

北各地均有栽培, 资源十分丰富。凤仙透骨草<sup>[2]</sup>作为药材具有祛风湿、活血、止痛等功效, 临床广泛应用于风湿痹痛、筋骨挛缩、寒湿肢气、疮癣肿毒、跌打损伤瘀积肿痛、闭经、痛经、痈肿、丹毒、鹅掌风、蛇虫咬伤等症。目前对于凤仙透骨草的研究主要集中在花(尤其是白色花瓣)及其种子急性子的化学成分及药理作用方面, 其他药物部位的研究则很少。笔者以凤仙花的干燥茎为研究对象, 采用 HPLC 测定其中具有代表性的黄酮类成分, 建立凤仙透骨草质量控制的有效方法。

**[收稿日期]** 20120201(007)

**[第一作者]** 田振坤, 教授, 博士生导师, 从事中药新药开发研究, Tel: 82193007, E-mail: tzkoffice@hljucm.net

**[通讯作者]** \* 王建明, 教授, 博士生导师, 从事中药现代给药系统研究, Tel: 13904635231, E-mail: wangjianming@hljucm.net

## 1 材料

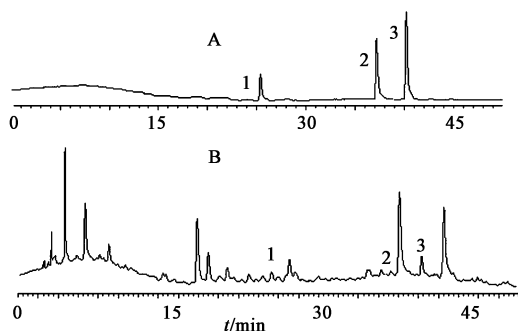
美国 Waters 2695 高效液相色谱仪(包括四元梯度泵、在线真空脱气机、自动进样器、柱温箱、2998 二极管阵列检测器), Empower 色谱工作站; KQ5200E 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司), JA2003 型精密电子天平(良平仪器厂)。

药材采摘于黑龙江中医药大学药用植物园,经本校药学院王振月教授鉴定为凤仙花科凤仙花属植物凤仙透骨草。芦丁(供含量测定用,批号 100080-200707)、槲皮素(供含量测定用,批号 100080-200406)和山奈酚(供含量测定用,批号 110861-200808)由中国药品生物制品检定所提供。

乙腈为色谱纯(美国 Fisher 公司),水为娃哈哈纯净水(杭州娃哈哈集团有限公司),其余试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

**2.1 色谱条件及系统适应性**<sup>[3-4]</sup> Diamonsil C<sub>18</sub> (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱,以乙腈-0.1% 乙酸水溶液(2:98)为流动相进行线性梯度洗脱(0~30 min,乙腈 2%~70%;30~50 min,乙腈 70%~90%)。柱温 30℃,检测波长 260 nm,流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>,进样量 20 μL。在此色谱条件下,对照品溶液、供试品溶液的色谱图见图 1。



A. 混合对照品;B. 供试品;1. 芦丁;2. 槲皮素;3. 山奈酚

图 1 凤仙透骨草 HPLC

**2.2 对照品溶液的制备** 精密称取经五氧化二磷干燥过夜的芦丁对照品 5 mg,槲皮素对照品 4 mg,山奈酚对照品 3 mg,加甲醇分别定容在 10 mL 量瓶中,分别吸取芦丁对照品 0.5 mL,槲皮素对照品 0.125 mL,山奈酚对照品 0.35 mL 用甲醇定容在 5 mL 量瓶中,制得每 1 mL 含芦丁 51.2 μg,槲皮素 87.8 μg,山奈酚 79.4 μg 的混合对照品溶液。

**2.3 供试品溶液的制备**<sup>[5]</sup> 取本品 1.5 g,精密称定,置索氏提取器中,加 150 mL 石油醚(30~60℃)回流提取至无色,冷却后,弃去石油醚提取液,并挥去药渣中的石油醚,于药渣中加 50 mL 甲醇超声提

取 20 min,放冷,滤过,挥干,用甲醇溶解并定容在 5 mL 的量瓶中,摇匀,过 0.45 μm 微孔滤膜,取续滤液,即得。

**2.4 线性关系** 精密量取一定量混合对照品溶液,用甲醇稀释成梯度浓度。吸取不同质量浓度混合对照品溶液 10 μL,分别进样,以进样量为横坐标、峰面积为纵坐标进行线性回归,相关组分的回归方程、回归系数、线性范围见表 1。

表 1 芦丁、槲皮素和山奈酚的回归方程、相关系数、线性范围

组分	回归方程	r	线性范围 /10 <sup>-2</sup> μg
芦丁	$Y = 24\ 987\ 553.0134X + 6\ 051.266\ 7$	0.999 9	1.024 ~ 6.144
槲皮素	$Y = 10\ 929\ 742.922\ 2X + 3\ 584.333\ 3$	0.999 9	0.439 ~ 2.634
山奈酚	$Y = 16\ 978\ 699.391\ 5X - 5\ 955.849\ 5$	0.999 9	1.111 6 ~ 6.669 6

**2.5 精密度试验** 吸取芦丁 51.2 mg·L<sup>-1</sup>,槲皮素 87.8 mg·L<sup>-1</sup>,山奈酚 79.4 mg·L<sup>-1</sup>的混合对照品溶液 10 μL,按照上述色谱条件,连续进样 6 次。测得芦丁峰面积的 RSD 1.87%,槲皮素峰面积的 RSD 1.43%,山奈酚峰面积的 RSD 0.42%。结果表明,所用仪器精密度良好。

**2.6 重复性试验** 精密称取凤仙透骨草粗粉 6 份,按 2.3 项下方法制备供试品溶液,照上述色谱条件进样分析,测得芦丁、槲皮素和山奈酚的 RSD 分别为 1.05%,1.55%,1.13%,结果表明,其重复性较好。

**2.7 稳定性试验** 取供试品溶液,分别于配制后 0,2,4,8,10,12,24 h 进样 20 μL,记录峰面积,结果芦丁、槲皮素和山奈酚的 RSD 分别为 0.95%,1.49%,0.72%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

**2.8 加样回收率试验**<sup>[6-7]</sup> 准确称取已知含量的凤仙透骨草样品 6 份,每份约 0.75 g,分别加入芦丁、槲皮素和山奈酚对照品适量,按 2.3 项下方法制备供试品溶液,测得芦丁、槲皮素和山奈酚的平均回收率分别为 98.71%,98.96%,98.89%,RSD 分别为 2.13%,2.34%,2.38%,结果见表 2。

**2.9 样品的测定** 称取凤仙透骨草 1.5 g,精密称定,共取 3 份,按 2.3 项下方法制备供试品溶液,分别进样 20 μL,记录峰面积,用外标两点法分别计算芦丁、槲皮素和山奈酚的含量。结果其含量平均值分别为 0.104 3,0.277 5,0.270 7 μg·g<sup>-1</sup>,RSD 分别为 2.51%,1.75%,1.98%。

## 3 讨论

**3.1 检测波长的选择** 在 210~400 nm 进行全波长扫描,结果发现在 260 nm 处基线较平稳,且色谱

表 2 芦丁、槲皮素、山奈酚加样回收率测定

组分	取样量/g	样品中含量/ $\mu\text{g}$	加入量/ $\mu\text{g}$	测得量/ $\mu\text{g}$	回收率/%	平均值/%	RSD/%
芦丁	0.752 1	1.965 0	1.024 0	3.0102	102.07	98.89	2.05
	0.746 3	1.949 9	1.024 0	2.981 3	100.72		
	0.761 4	1.989 3	1.024 0	2.986 4	97.37		
	0.757 1	1.978 1	1.024 0	2.984 7	98.30		
	0.763 2	1.994 0	1.024 0	2.985 5	96.83		
	0.755 3	1.973 4	1.024 0	2.977 3	98.26		
	0.752 1	1.284 1	0.663 4	1.922 7	96.26		
0.746 3	1.274 2	0.663 4	1.923 9	97.93			
0.761 4	1.299 9	0.663 4	1.949 9	97.98			
0.757 1	1.292 6	0.663 4	1.960 5	100.68			
0.763 2	1.303 0	0.663 4	1.954 4	98.19			
0.755 3	1.289 5	0.663 4	1.948 1	99.28			
0.752 1	3.685 3	1.786 5	5.445 6	98.53	98.48	1.89	
0.746 3	3.656 9	1.786 5	5.413 3	98.32			
0.761 4	3.730 9	1.786 5	5.450 9	96.28			
0.757 1	3.709 8	1.786 5	5.531 1	101.95			
0.763 2	3.739 7	1.786 5	5.481 8	97.51			
0.755 3	3.701 0	1.786 5	5.456 5	98.26			

注:芦丁加入量均为 1.024 0  $\mu\text{g}$ ;槲皮素加入量均为 0.663 4  $\mu\text{g}$ ;山奈酚加入量均为 1.786 5  $\mu\text{g}$ 。

峰较多,峰形较好,同时芦丁、槲皮素、山奈酚的分离度较高。

**3.2 流动相的选择** 因所选择的紫外吸收波长较低,故选择以甲醇-0.1%磷酸为流动相,但实际检测中色谱图基线不平稳,且混合对照品中相关峰出现严重的肩峰,考虑到是否由于凤仙透骨草中的一些酸类成分的羧基发生了电离而导致出现肩峰,故调整了磷酸的浓度,分别改为 0.2%、0.3%、0.4% 的磷酸,但肩峰现象仍未消除,后改用 0.1% 乙酸,峰形较好,但基线不是特别稳定,最终确定以乙腈-0.1% 乙酸为流动相,芦丁、槲皮素峰和山奈酚峰可以达到基线分离,峰形对称,分离度良好。

**3.3 采用 HPLC 同时测定凤仙透骨草中的芦丁、槲皮素和山奈酚含量**,说明上述 3 种成分不仅仅存在于凤仙花中,且所建立的方法简便可行、重复性好、结果可靠,为凤仙透骨草中黄酮类成分的质量控制提供了重要依据。

**3.4 鉴于芦丁分解与其加热温度有一定的相关性<sup>[9]</sup>**,故本试验中供试品溶液的制备采用甲醇超声提取,避免了热效应。

**3.5 根据全草的高效液相色谱图可知**,除了上述 3 种成分外,还有很多未知色谱峰,且该 3 种成分的总含量也较低。为了对其他色谱峰对应的物质进行定性,我们在后续试验中采用了硅胶柱、ODS 反相柱、制备型 HPLC 对未知成分进行分离,更进一步的单

体分离和结构鉴定还在进行中。

[参考文献]

[1] 南京药学院《中草药学》编写组. 中草药学[M]. 南京:江苏人民出版社,1976:633.

[2] 鞠培俊,孔德云,李晓波. 凤仙花化学成分及药理作用研究进展[J]. 沈阳药科大学学报,2007,24(5):320.

[3] 胡芳,陆兔林,毛春芹,等. HPLC 法测定岩黄连生物总碱中脱氢卡维丁、盐酸巴马汀和盐酸小檗碱的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(7):70.

[4] 朱玲英,钱士辉,沈红,等. 凤仙透骨草药材高效液相指纹图谱研究[J]. 时珍国医国药,2011,22(6):1444.

[5] 蒋立娣,宣贵达,吴好好,等. 桑叶提取物中槲皮素和山萘酚的含量测定[J]. 浙江大学学报:理学版,2009,36(6):705.

[6] 郝治湘,刘玉芬,周丽华,等. 反相高效液相色谱法测定凤仙花中芦丁、槲皮素和山奈酚的含量[J]. 化工时刊,2006,20(10):42.

[7] 涂波,汪志勇. 当归补血汤颗粒中黄芪甲苷和黄芪多糖的含量测定[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(18):115.

[8] 光琴,周亚球. HPLC 测定罗布麻叶中总黄酮的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(3):103.

[9] 赵宇新. 芦丁分解速度与加热温度的相关性[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(18):101.

[责任编辑 顾雪竹]