

# HPLC 测定急性子中总黄酮的含量

鞠成国\*, 王巍, 赵焕君, 刘威

(辽宁中医药大学药学院, 辽宁大连 116600)

**[摘要]** 目的:建立 HPLC 测定急性子中总黄酮含量的方法。方法:采用 Eclipse XDB-C<sub>18</sub> 柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm); 流动相甲醇-0.4% 磷酸水(55:45), 检测波长 365 nm, 柱温 30 °C, 流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>。结果:槲皮素、山柰酚、异鼠李素的线性范围分别为 0.111 2~0.556 0( $r=0.999 4$ ), 0.007 711~0.023 23( $r=0.999 4$ ), 0.006 69~0.033 45 μg ( $r=0.999 2$ ); 平均加样回收率分别为 98.5% (RSD 1.3%,  $n=6$ ), 97.3% (RSD 1.7%,  $n=6$ ), 97.6% (RSD 1.6%,  $n=6$ )。结论:该方法准确度高,重复性好,可用于急性子中总黄酮的含量测定。

**[关键词]** 急性子;总黄酮;槲皮素;山柰酚;异鼠李素;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)01-0077-03

## Determination of Total Flavonoids in the Seeds of *Impatiens balsamina* by HPLC

JU Cheng-guo\*, WANG Wei, ZHAO Huan-jun, LIU Wei

(School of Pharmacy, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 11660, China)

**[Abstract]** **Objective:** To develop a HPLC method for the determination of total flavonoids in the seeds of *Impatiens balsamina*. **Method:** An Eclipse XDB-C<sub>18</sub> column (4.6 mm × 150 mm, 5 μm) was used at 30 °C with the mobile phase of methanol-0.4% phosphoric acid (55:45). The detection wavelength was 365 nm and the flow rate was set at 1.0 mL·min<sup>-1</sup>. **Result:** The linear response range for quercetin, kaempferol and isorhamnetin were 0.111 2-0.556 0 μg ( $r=0.999 4$ ), 0.007 711-0.023 23 μg ( $r=0.999 4$ ) and 0.006 69-0.033 45 μg ( $r=0.999 2$ ) respectively. The average recoveries were 98.5% (RSD 1.3%,  $n=6$ ), 97.3% (RSD 1.7%,  $n=6$ ) and 97.6% (RSD 1.6%,  $n=6$ ). **Conclusion:** The method could be used for determination of total flavonoids of the seeds of *I. balsamina*.

**[Key words]** *Impatiens balsamina*; total flavonoids; quercetin; kaempferol; isorhamnetin; HPLC

急性子为凤仙花科植物凤仙花 *Impatiens balsamina* L. 的干燥成熟种子,始载于《救荒本草》,具有破血、软坚、消积的功效,用于治疗癥瘕痞块、经闭、噎膈等症<sup>[1]</sup>,为临床治疗食道癌的常用药<sup>[2]</sup>。急性子中含有多种黄酮类化合物<sup>[3]</sup>,现代药理研究证明黄酮类化合物在抗氧化、抗癌、防癌、抑制脂肪氧化酶等方面具有显著效果。本试验旨在建立急性子中总黄酮的含量测定方法,为急性子药材抗肿瘤的有效物质研究及其新药开发提供理论基础。

### 1 仪器与试剂

ALC-110.4 型电子天平(德国艾科勒),HS6150 型超声波清洗器(宁波新芝生物科技有限公司),U3010 型紫外-可见分光光度计(日本日立公司),Agilent 1100 系列高效液相色谱仪(美国安捷伦科技有限公司)。槲皮素(100080-200406)、山柰酚(0861-200002)、异鼠李素(110860-200407)购自中国药品生物制品检定所,急性子药材分别于 2008 年 11 月收集于江苏无锡(S1)、安徽六安(S2)、福建三明(S3)、辽宁抚顺(S4)、安徽亳州(S5)、河北安国(S6)、河南郑州(S7)、辽宁沈阳(S8)、苏州太湖(S9)、云南昆明(S10)、浙江杭州(S11),经辽宁中医药大学翟延君教授鉴定为凤仙花科植物凤仙花

**[收稿日期]** 20101222(007)

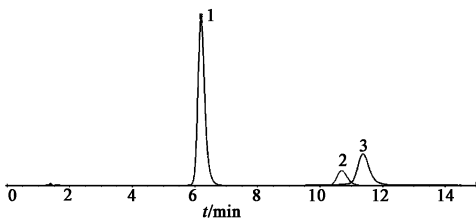
**[通讯作者]** \*鞠成国,从事中药学研究, Tel: 0411-87586011,

E-mail: ww\_101737@126.com

*I. balsamina* 的干燥成熟种子。

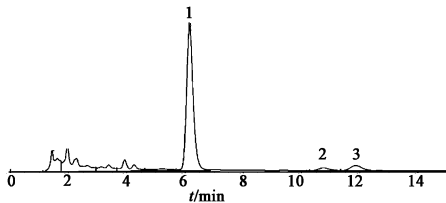
## 2 方法与结果

**2.1 色谱条件与系统适用性** 色谱柱 Eclipse XDB-C<sub>18</sub>(4.6 mm × 150 mm, 5 μm), 流动相甲醇-0.4% 磷酸水 (55:45), 检测波长 365 nm, 柱温 30 °C, 流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>。在此条件下, 样品中槲皮素、山柰酚和异鼠李素与相邻组分均分离度良好。见图 1, 2。



1. 槲皮素; 2. 山柰酚; 3. 异鼠李素

图 1 对照品 HPLC



1. 槲皮素; 2. 山柰酚; 3. 异鼠李素

图 2 急性子药材 HPLC

**2.2 对照品溶液制备** 分别精密称取干燥至恒重的槲皮素、山柰酚、异鼠李素对照品适量, 加甲醇溶解, 并经适当稀释, 制成浓度分别为 0.055 6, 0.001 936, 0.002 23 g·L<sup>-1</sup> 的溶液, 备用。

**2.3 供试品溶液制备** 取急性子药材适量, 去除杂质, 适当粉碎, 取 5 g, 精密称定, 置于圆底烧瓶中, 加 40 mL 甲醇, 回流提取 1 h, 提取液滤过, 蒸干, 以 30 mL 甲醇分次溶解, 转移至另一圆底烧瓶中, 加浓度为 5 mol·L<sup>-1</sup> 的 HCl 5 mL, 于 80 °C 水浴水解 60 min, 水解液适当浓缩, 以甲醇定容至 25 mL 量瓶中, 作为供试品溶液。

**2.4 测定法** 分别精密吸取槲皮素对照品溶液 5 μL, 山柰酚、异鼠李素对照品溶液及供试品溶液各 10 μL, 注入高效液相色谱仪, 测定色谱峰面积。

### 2.5 方法学考察

**2.5.1 线性范围考察** 分别精密吸取 2.2 项下的槲皮素对照品溶液 (2, 4, 6, 8, 10 μL)、山柰酚对照品溶液 (4, 6, 8, 10, 12 μL) 及异鼠李素对照品溶液 (3, 6, 9, 12, 15 μL), 注入高效液相色谱仪, 按 2.1 项下条件测定。以对照品进样量为横坐标, 色谱峰面积为纵坐标, 分别进行线性回归。结果槲皮素、山

柰酚和异鼠李素的回归方程分别为  $Y = 4\,472.1X + 44.187$  ( $r = 0.999\,4$ ),  $Y = 2\,752.8X - 1.249\,3$  ( $r = 0.999\,4$ ) 和  $Y = 2\,594.9X + 0.42$  ( $r = 0.999\,2$ ), 表明槲皮素在 0.111 2 ~ 0.556 0 μg、山柰酚在 0.007 711 ~ 0.023 23 μg、异鼠李素在 0.006 69 ~ 0.033 45 μg 均具良好线性关系。

**2.5.2 精密度考察** 取同一供试品溶液 (S11), 连续进样 6 次, 分别记录槲皮素、山柰酚和异鼠李素的色谱峰面积, 计算 RSD, 分别为 0.55%, 0.71%, 1.2%。表明仪器精密度良好。

**2.5.3 稳定性考察** 取同一供试品溶液 (S11), 分别在制备后 0, 2, 4, 6, 8, 10 h 时测定, 记录相应色谱峰面积, 计算 RSD, 分别为 1.1%, 0.79%, 1.1%。表明 10 h 内测定, 样品稳定性良好。

**2.5.4 重复性考察** 取急性子药材 (S11) 6 份, 按供试品溶液制备方法操作, 并测定, 分别计算槲皮素、山柰酚、异鼠李素的平均含量及相应的 RSD。结果 3 者平均含量分别为 0.110 2, 0.006 4, 0.009 1 mg·g<sup>-1</sup>, RSD 分别为 0.84%, 2.5%, 1.9%, 表明方法重复性良好。

**2.5.5 回收率考察** 取急性子药材 (S11) 6 份, 每份 2.5 g, 精密称定, 再分别精密加入混合对照品溶液 (槲皮素质量浓度为 0.270 1 g·L<sup>-1</sup>、山柰酚质量浓度为 0.016 33 g·L<sup>-1</sup>、异鼠李素质量浓度为 0.021 45 g·L<sup>-1</sup>) 1 mL, 按供试品溶液制备方法操作, 并测定, 计算各自的回收率, 结果表明 3 种成分的回收率均在 95.0% ~ 105.0%, RSD 亦符合相关规定。结果见表 1。

**2.6 样品含量测定** 取 11 个不同产地急性子药材, 按供试品溶液制备方法操作, 分别注入高效液相色谱仪测定, 记录色谱峰面积, 通过系数转换法<sup>[4]</sup> 计算总黄酮的含量。结果见表 2。

## 3 讨论与结论

**3.1 供试品溶液制备方法考察**<sup>[5-6]</sup> 试验中比较了甲醇和乙醇对总黄酮的提取效果, 结果甲醇的提取效率明显高于乙醇。将经甲醇提取得到的总黄酮进行酸水解, 首先考察了水解用酸, 比较了盐酸和硫酸的水解效果, 结果盐酸水解效率较高。然后分别对盐酸浓度、水解温度、水解时间等因素进行考察, 最后得到加入 5 mol·L<sup>-1</sup> HCl 5 mL, 80 °C 水浴水解 60 min, 总黄酮水解效果最佳。

**3.2 总黄酮含量计算方法的确立**<sup>[7-10]</sup> 急性子中的黄酮类成分主要由槲皮素、山柰酚、异鼠李素及各自的苷组成, 由于各种黄酮苷的对照品不易得, 因此

表1 急性子中3种成分加样回收率考察

成分	药材中 含量/mg	加入量 /mg	实测量 /mg	平均回收率 /%	回收率 /%	RSD /%
槲皮素	0.275 6	0.270 1	0.541 1	98.3	98.5	1.3
	0.275 1	0.270 1	0.543 0	99.2		
	0.275 7	0.270 1	0.539 9	97.8		
	0.275 3	0.270 1	0.546 2	100.3		
	0.274 8	0.270 1	0.541 4	98.7		
	0.275 6	0.270 1	0.536 0	96.4		
山柰酚	0.016 01	0.016 33	0.032 27	99.6	97.3	1.7
	0.015 98	0.016 33	0.031 64	95.9		
	0.016 01	0.016 33	0.031 94	97.5		
	0.015 99	0.016 33	0.031 57	95.4		
	0.015 96	0.016 33	0.031 78	96.9		
	0.016 01	0.016 33	0.032 12	98.7		
异鼠李素	0.022 76	0.021 45	0.043 29	95.7	97.6	1.6
	0.022 71	0.021 45	0.043 86	98.6		
	0.022 77	0.021 45	0.043 30	95.7		
	0.022 73	0.021 45	0.044 08	99.5		
	0.022 69	0.021 45	0.043 67	97.8		
	0.022 76	0.021 45	0.043 87	98.4		

表2 不同产地样品含量测定  $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 

样品	槲皮素	山柰酚	异鼠李素	总黄酮苷
S1	0.126 8	0.006 8	0.011 4	0.363 8
S2	0.148 9	0.006 2	0.011 3	0.417 5
S3	0.103 8	0.005 5	0.009 3	0.297 4
S4	0.096 1	0.005 5	0.008 9	0.277 1
S5	0.169 7	0.011 1	0.012 2	0.484 3
S6	0.117 0	0.005 1	0.008 1	0.326 8
S7	0.081 2	0.009 6	0.005 6	0.242 3
S8	0.101 0	0.005 7	0.010 3	0.293 4
S9	0.059 7	0.003 8	0.004 8	0.171 3
S10	0.085 1	0.005 0	0.008 2	0.246 4
S11	0.110 2	0.006 4	0.009 1	0.315 3

将总黄酮类成分进行水解,将苷转化为苷元,然后测定各苷元的含量,再通过苷与相应苷元的分子量关系,通过系数转换,最终计算得到总黄酮的含量。试

验中发现,在急性子总黄酮中,槲皮素及其苷的含量明显高于另2种苷元及其苷的含量,因此在总黄酮含量计算时,为了计算方便,采用公式:总黄酮含量=(槲皮素含量+山柰酚含量+异鼠李素含量) $\times 2.51$ 。

总黄酮的含量测定方法目前应用较多的是紫外-可见分光光度法,由于这种方法专属性较差,因此误差较大。本试验中将急性子总黄酮进行酸水解,然后分别测定槲皮素、山柰酚、异鼠李素3种苷元的含量,通过系数转换法,得到总黄酮的含量,方法专属性强,重复性好,测定结果准确。本试验中还发现,在急性子总黄酮中槲皮素及其苷的含量较山柰酚、异鼠李素及其苷的含量要高得多,这也为急性子药材的进一步开发利用提供了实验依据。

### [参考文献]

- [1] 中国药典.一部[S].2010;247.
- [2] 陈玉龙,司富春.中医药治疗食道癌方药分析[J].时珍国医国药,2008,19(2):401.
- [3] 田利焕.急性子化学成分研究及甙体氯化的研究[D].郑州:郑州大学,2007;5.
- [4] 刘素艳,杨宇春,赵宏,等.银杏总黄酮含量的HPLC测定[J].中国医药工业杂志,1999,30(11):513.
- [5] 杜安全,王先荣,周正华,等.银杏叶总黄酮苷的HPLC法分析水解条件[J].安徽医药,2001,5(3):164.
- [6] 左小川,李建萍,曾晓瑜.醋柳黄酮的水解条件研究[J].中国药业,2008,17(15):23.
- [7] 王淑君,候薇,张天政,等.HPLC法测定银杏叶缓释胶囊中总黄酮的含量[J].中草药,2004,35(2):163.
- [8] 曾里,曾凡骏,王威,等.几种HPLC法测定银杏总黄酮的比较研究[J].食品研究与开发,2008,29(6):85.
- [9] 牛迎凤,邵赞,赵晓辉,等.RP-HPLC测定几种花类药材黄酮含量[J].中国中药杂志,2008,33(18):85.
- [10] 杨书良.HPLC测定双果胶囊中总黄酮的含量[J].中国中药杂志,2004,29(6):586.

[责任编辑 蔡仲德]