

HPLC 法同时测定龙眼花中 3 种黄酮类化合物含量*

梁洁**,余靓,柳贤福,孙正伊

(广西中医药大学药学院 南宁 530001)

摘要:目的:建立 HPLC 测定广西不同产地龙眼花药材中槲皮素、木犀草素和山奈素含量的方法。方法:Hypersil C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为甲醇-0.2%磷酸(47:53),流速 1.0 mL·min⁻¹,柱温 30℃,检测波长 360 nm。结果:槲皮素、木犀草素和山奈素分别在 0.18~2.88 μg、0.059~0.944 μg 和 0.024~0.384 μg 之间呈良好的线性关系($r=0.999\ 9$),平均加样回收率分别为 100.06%、99.77%、98.67%,RSD 分别为 1.72%、1.18%、1.99%($n=9$)。结论:该方法简便可靠,快速,重复性好,可用于龙眼花药材的质量控制。

关键词:龙眼花 槲皮素 木犀草素 山奈素 HPLC

doi: 10.11842/wst.2013.07.015 中图分类号:R284.1 文献标识码:A

龙眼花为无患子科龙眼属植物龙眼(*Dimocarpus longan* Lour.)的花,为广西、福建等地民间传统用药,具有清热利水功效,主治淋症、糖尿病、血丝虫病、白带等疾病^[1]。龙眼花主要有鞣质、酚酸类、黄酮类及挥发油等成分^[2~5],其中黄酮类化合物是龙眼花的主要化学成分^[6]。本实验建立 HPLC 法同时测定龙眼花中槲皮素、木犀草素和山奈素 3 种黄酮类化合物的含量,并测定其在广西不同产地的含量,为龙眼花质量标准的建立提供依据。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Agilent 1100 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司);LG 16-W 型高速离心机(北京医用离心机厂);B3500S-MT 超声清洗仪(上海必能信超声有限公司);Millipore Simplicity-185 超纯水仪(美国密里博公

司);BP211D 电子分析天平(德国赛多利斯)。

1.2 试药

槲皮素对照品(中国药品生物制品检定所,批号:100081-200406);木犀草素对照品(四川省维克奇生物科技有限公司,批号:10032);山奈素对照品(中国药品生物制品检定所,批号:100861-200606);甲醇(色谱纯,美国 Fisher 公司);水为超纯水。广西不同产地龙眼花,经广西中医药大学中药鉴定教研室滕建北副教授鉴定为 *Dimocarpus longan* Lour. 的花,其余所用试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Hypersil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm);流动相为甲醇-0.2%磷酸(47:53);检测波长 360 nm;流速 1.0 mL·min⁻¹;柱温 30℃;进样量 10 μL。在该色谱条件下样品中槲皮素、木犀草素和山奈素与其他组分能够达到基线分离,与相邻色谱峰分离度>

收稿日期:2013-01-24

修回日期:2013-01-30

* 2009 年度广西高校优秀人才资助计划([2009]62 号)龙眼花药材降血糖药效物质基础的研究,负责人:梁洁;广西省自然科学基金委青年基金项目(2010GXNSFB013071)广西龙眼叶降血糖药效物质基础的研究,负责人:梁洁。

** 通讯作者:梁洁,副教授,博士,硕士生导师,主要研究方向:中药质量分析。

1.5 槲皮素、木犀草素和山奈素理论板数 $\geq 5\ 000$ 。色谱图见图 1。

2.2 对照品溶液的制备

精密称取经 P_2O_5 减压干燥 36 h 槲皮素对照品 9.00 mg、木犀草素对照品 2.95 mg 和山奈素对照品 1.20 mg, 置 25 mL 容量瓶中, 加甲醇适量使溶解并定容至刻度, 摇匀, 制得浓度为 $0.360\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的槲皮素、 $0.118\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 木犀草素和 $0.048\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 山奈素混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备

取龙眼花药材粉末约 1g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇-盐酸(4:1)混合溶液 20 mL, 密塞, 称定重量, 超声提取 40 min, 放冷, 再称定重量, 用甲醇-盐酸(4:1)混合溶液补足减失的重量, 摇匀, 滤过, 取续滤液作为供试品溶液。

2.4 线性关系考察

精密吸取槲皮素、木犀草素和山奈素混合对照品溶液 0.5、1、2、4、6、8 mL, 分别置于 10 mL 量瓶中, 加入甲醇定容至刻度, 摇匀, 分别取上述 6 个不

同浓度的对照溶液 10 μL 注入液相色谱仪进行分析, 以进样量(X)为横坐标, 峰面积(Y)为纵坐标绘制标准曲线, 得到槲皮素回归方程为: $Y=3\ 552.0X+42.3$, $r=0.999\ 9$; 木犀草素回归方程为: $Y=1\ 466.3X+0.6$, $r=0.999\ 9$; 山奈素回归方程为: $Y=7\ 242.2X-17.2$, $r=0.999\ 9$ 。结果表明, 槲皮素在 $0.18\sim 2.88\ \mu\text{g}$ 范围内, 木犀草素在 $0.059\sim 0.944\ \mu\text{g}$ 范围内, 山奈素在 $0.024\sim 0.384\ \mu\text{g}$ 范围内与峰面积成良好线性关系。

2.5 精密度实验

精密吸取槲皮素、木犀草素和山奈素混合对照品溶液 10 μL , 连续进样 6 次, 计算峰面积的 RSD 分别为 0.52%、0.74%、0.99%, 表明仪器精密度良好。

2.6 稳定性实验

取同一供试品溶液, 分别于 0、2、6、10、16、24 h 各进样 10 μL , 测定槲皮素、木犀草素和山奈素的峰面积, RSD 分别为 0.66%、0.87%、0.88%, 表明样品溶液在 24 h 内稳定。

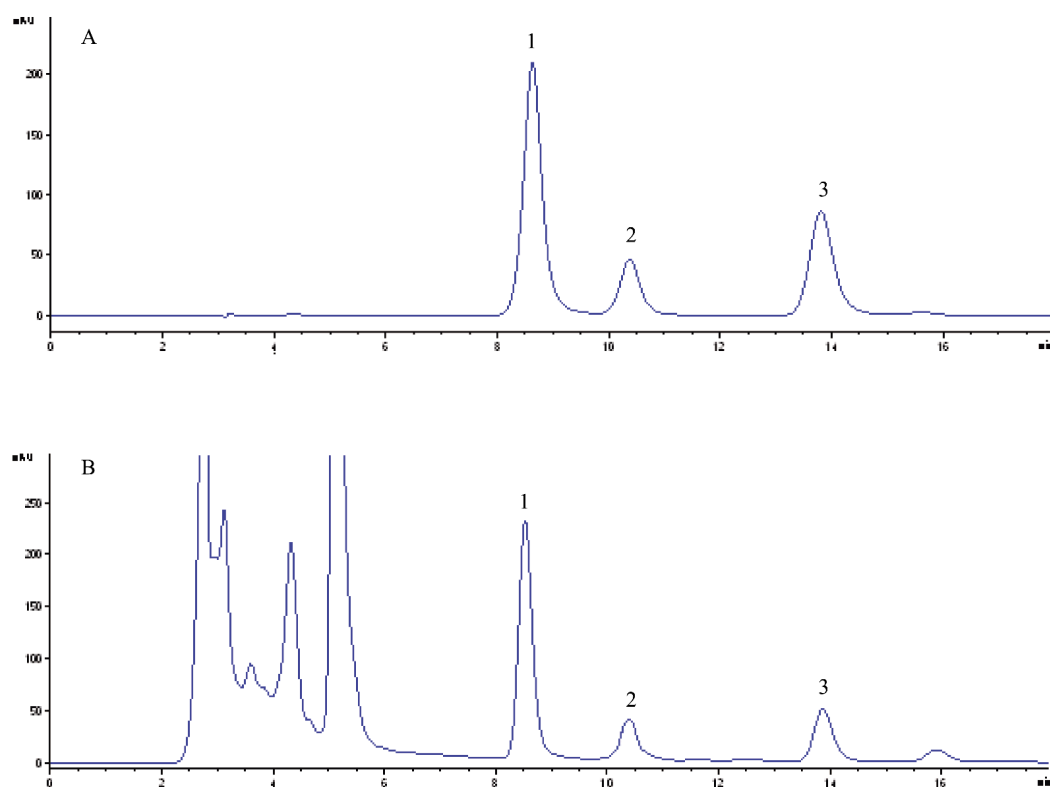


图 1 混合对照品(A)和供试品(B)的 HPLC 色谱图
注: 1. 槲皮素 2. 木犀草素 3. 山奈素。

2.7 重复性实验

取同一样品 6 份 ,按供试品溶液制备方法进行制备 ,按上述色谱条件测定 ,进样 10 μL ,槲皮素、木犀草素和山奈素含量的 RSD 分别为 0.67%、0.87%和 0.86% ,表明方法重复性良好。

2.8 加样回收率实验

取 9 份已知含量的龙眼花药材粉末各 0.5 g ,精密称定。分别加入槲皮素、木犀草素、山奈素对照品适量 ,按供试品溶液制备方法制备 ,按上述色谱条件进样 10 μL ,测定槲皮素、木犀草素和山

奈素的含量。槲皮素平均回收率为 100.06% ,RSD 为 1.72% ;木犀草素平均回收率为 99.77% ,RSD 为 1.18% ;山奈素平均回收率为 98.67% ,RSD 为 1.99% ,表明该方法可靠 ,准确度高。结果见表 1。

2.9 样品的测定

取不同产地龙眼花药材 ,按供试品溶液制备方法制备 ,每个产地药材平行 3 份溶液 ,在上述色谱条件下各进样 10 μL ,测定 ,计算样品中槲皮素、木犀草素和山奈素的含量 ,结果见表 2。

表 1 槲皮素、木犀草素和山奈素加样回收率(n=9)

测定成分	称样量(g)	样品含量(mg)	加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	平均回收率(%)	RSD (%)
槲皮素	0.500 3	1.245 7	0.971	2.235 1	101.89	100.06	1.72
	0.501 2	1.248 0	0.971	2.241 3	102.29		
	0.500 7	1.246 7	0.971	2.220 1	100.25		
	0.500 6	1.246 5	1.252	2.515 6	101.37		
	0.500 1	1.245 2	1.252	2.490 6	99.47		
	0.501 3	1.248 2	1.252	2.495 6	99.63		
	0.500 9	1.247 2	1.440	2.657 9	97.97		
	0.500 2	1.245 5	1.440	2.693 4	100.55		
	0.500 7	1.246 7	1.440	2.645 6	97.15		
木犀草素	0.500 3	0.645 4	0.523	1.163 5	99.06	99.77	1.18
	0.501 2	0.646 5	0.523	1.166 9	99.50		
	0.500 7	0.645 9	0.523	1.174 5	101.07		
	0.500 6	0.645 8	0.661	1.321 1	102.16		
	0.500 1	0.645 1	0.661	1.297 3	98.67		
	0.501 3	0.646 7	0.661	1.303 9	99.43		
	0.500 9	0.646 2	0.785	1.432 6	100.18		
	0.500 2	0.645 3	0.785	1.418 9	98.55		
	0.500 7	0.645 9	0.785	1.425 5	99.31		
山奈素	0.500 3	0.185 1	0.162	0.349 7	101.60	98.67	1.99
	0.501 2	0.185 4	0.162	0.342 7	97.10		
	0.500 7	0.185 3	0.162	0.345 2	98.70		
	0.500 6	0.185 2	0.184	0.362 2	96.20		
	0.500 1	0.182 0	0.184	0.365 7	99.84		
	0.501 3	0.185 5	0.184	0.363 6	96.80		
	0.500 9	0.185 3	0.221	0.403 7	98.82		
	0.500 2	0.185 1	0.221	0.409 3	101.45		
	0.500 7	0.185 3	0.221	0.400 9	97.56		

表 2 广西不同产地龙眼花药材含量测定结果($n=3$)

编号	来源	槲皮素含量($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	木犀草素含量($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	山柰素含量($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)
1	贺州	2.461 1	1.284 7	0.364 2
2	南宁	2.492 9	1.290 8	0.366 5
3	玉林	2.529 0	1.314 4	0.396 4
4	钦州	2.429 7	1.257 3	0.365 4
5	贵港	2.361 9	1.284 9	0.345 0
6	柳州	2.483 2	1.233 8	0.365 2
7	北海	2.501 7	1.301 1	0.366 1
8	梧州	2.222 7	1.284 8	0.313 0
9	崇左	2.436 1	1.216 2	0.324 4
10	百色	2.453 1	1.237 3	0.356 5

3 讨论

本实验考察浸渍法、超声提取、加热回流提取和索氏提取的提取效果,结果表明超声提取和回流提取的槲皮素、木犀草素和山柰素的提取效率无明显差别。考虑到回流提取过程比较繁琐,且提取时间较长,故本实验采用超声提取。考察乙腈-水系统、甲醇-水系统、甲醇-0.2%磷酸系统、乙腈-0.2%磷酸系统,结果以甲醇-0.2%磷酸系统(47:53)为流动相分离效果最好。槲皮素、木犀草素和山柰素最大吸收波长分别为 372 nm、351 nm 和 367 nm,综合 3 种成分并查阅文献发现在 360 nm 波长处 3 种成分吸收较好,灵敏度高,故选取 360 nm 为检测波长^[7,8]。

广西玉林产的龙眼花中槲皮素、木犀草素和山柰素含量最高,分别达到 $2.529 0 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 、 $1.314 4 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 、 $0.396 4 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$,实验结果表明,不同来源的龙眼花中槲皮素、木犀草素和山柰素含量存在一定差异。本实验采用超声提取法,首次采用 HPLC 法同

时测定龙眼花中槲皮素、木犀草素和山柰素的含量,该方法精密度高,稳定性好,重复性高,为龙眼花的质量控制提供重要的参考。

参考文献

- 1 国家中医药管理局《中华本草》编委会.中华本草(13 卷).上海:上海科学技术出版社,1999.
- 2 江苏新医学院.中药大辞典(第 2 版)(上册).上海:上海科学技术出版社,2006.
- 3 梁洁,甄汉深,韦志英,等.广西产龙眼花化学成分预试研究.广西中医学院学报,2009,12(3):52~53.
- 4 梁洁,王雯慧,朱小勇,等.超临界 CO_2 流体萃取法与水蒸气蒸馏法提取龙眼花挥发油化学成分的研究.安徽农业科学,2010,38(16):8414~8416.
- 5 梁洁,王雯慧,李耀华,等.广西产龙眼花挥发油成分 GC-MS 分析.中药材,2010,33(8):1270~1273.
- 6 梁洁,零璐瑶,柳贤福,等.UV 法测定广西不同产地龙眼花药材中的总黄酮.华西药理学杂志,2010,25(5):605~606.
- 7 杨燕飞.HPLC 测定金胆片中山柰素和槲皮素的含量.中成药,2005,27(11):1263~1265.
- 8 王锦军,张秀梅,黄兆文.RP-HPLC 法同时测定鸡冠花中槲皮素、木犀草素和山柰素的含量.西北药理学杂志,2008,23(6):354~356.

HPLC Determination of Three Kinds of Flavonoids Content in Flowers of *Dimocarpus Longan* Lour.

Liang Jie, Yu Jing, Liu Xianfu, Sun Zhengyi

(School of Pharmacy, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530001, China)

Abstract: This study was aimed to create a method for content determination of quercetin, luteolin and kaempferol

in flowers of *Dimocarpus longan* Lour. from different habitats of *Guangxi* province by HPLC. The samples were separated on the Hypersil C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) which was eluted with methanol–0.2% phosphoric acid solution (47:53) with detective wavelength at 360 nm, flow rate at 1.0 mL·min⁻¹, and column temperature at 30℃. The results showed that this method had a good linear relationship within the range of 0.18 to 2.88 μg for quercetin, 0.059 to 0.944 μg for luteolin, and 0.024 to 0.384 μg for kaempferol ($r = 0.9999$). The average recovery rate was 100.06% ($RSD = 1.72\%$), 99.77% ($RSD = 1.18\%$) and 98.67% ($RSD = 1.99\%$, $n = 9$), respectively. It was concluded that this method is simple, rapid, reliable and with good repeatability, which can be used in the quality control of flowers of *Dimocarpus longan* Lour.

Keywords: Flowers of *Dimocarpus longan* Lour., quercetin, luteolin, kaempferol, HPLC

(责任编辑 叶丽萍 张志华, 责任译审 王 晶)