

HPLC测定红凤菜提取物的总黄酮含量及对提取方法的评价

任冰如, 吕 寒, 陈 剑, 梁呈元, 吴菊兰, 李维林*

(江苏省中国科学院植物研究所(南京中山植物园), 江苏省药用植物研究开发中心,
江苏省抗糖尿病药物筛选技术服务中心, 江苏 南京 210014)

摘 要: 为了解从红凤菜新鲜茎叶中所得提取物的有效成分含量以及提取方法的分离效果, 在提取过程的不同阶段取样得到6个不同提取物, 测定其总黄酮含量。首先对提取物进行酸解, 再用高效液相色谱法测定槲皮素和山柰酚的含量, 根据所测样品中黄酮类成分的组折算为总黄酮含量。结果显示, 经过大孔树脂和聚酰胺2次柱层析后, 所得提取物的总黄酮质量分数达到84.8%, 重结晶得到的2个结晶物总黄酮质量分数分别为97.1%和99.7%。可见, 采用乙醇提取-大孔树脂柱层析-聚酰胺柱层析-重结晶的方法可有效地从红凤菜新鲜茎叶中提取纯化总黄酮。

关键词: 红凤菜; 高效液相色谱法; 总黄酮; 槲皮素; 山柰酚

Total Flavonoids Determined by HPLC in Extracts of *Gynura bicolor* DC.

REN Bing-ru, LÜ Han, CHEN Jian, LIANG Cheng-yuan, WU Ju-lan, LI Wei-lin*

(Jiangsu Center for Research & Development of Medicinal Plants, Jiangsu Provincial Service Center for Antidiabetic Drugs Screening, Institute of Botany, Jiangsu Province and Chinese Academy of Sciences/Nanjing Botanical Garden Mem. Sun Yat-Sen., Nanjing 210014, China)

Abstract: Six samples collected at different stages during the separation of total flavonoids from crude extracts of the fresh stems and leaves of *Gynura bicolor* DC. were analyzed for total flavonoid contents. After undergoing acid hydrolysis, the crude extracts were determined for quercetin and kaempferol by high-performance liquid chromatography (HPLC). The amount of total flavonoids was calculated based on the measured flavonoid compounds. After sequential column chromatographies on macroporous resin and polyamide, the total flavonoid content of purified products was 84.8%, and further recrystallization formed two products containing 97.1% and 99.7% total flavonoids, respectively. In conclusion, the process involving ethanol extraction, separation by sequential column chromatographies on macroporous resin and polyamide and recrystallization offers an effective way to purify total flavonoids from the fresh stems and leaves of *Gynura bicolor* DC.

Key words: *Gynura bicolor* DC.; high-performance liquid chromatography (HPLC); total flavonoids; quercetin; kaempferol

中图分类号: Q819

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2014)12-0160-05

doi:10.7506/spkx1002-6630-201412032

红凤菜(*Gynura bicolor* DC.)为菊科菊三七属植物^[1], 别名血皮菜、观音菜、观音苋、紫背天葵等, 原产于我国南方各地, 全草入药, 作为传统民间药, 具有凉血止血、清热消肿的功效^[2], 近年来, 人们发现红凤菜具有明确的降血糖作用^[3]。由于红凤菜含有丰富的营养成分^[4-5]又有一定的保健功能, 目前我国多个地区均有栽培和销售, 作为保健蔬菜为人们所利用。

为了有效地开发利用红凤菜, 前人对其活性成分进行了研究, 结果显示红凤菜含有黄酮类物质^[6-9], 而黄

酮类成分多具有保护心血管、抗肿瘤、抗糖尿病、抗氧化、抗炎、抗病毒等作用^[10], 因此, 从红凤菜中提取黄酮类成分具有重要意义。

卓敏^[6]、吕寒^[7]、陈剑^[9]采用硅胶、聚酰胺、凝胶柱层析等分离手段, 从红凤菜中分离得到单体化合物, 并通过理化性质分析、波谱数据鉴定等方法确定了化合物的结构, 吕寒^[8]、陈剑^[9]又用液相色谱-质谱联用(Liquid chromatography-mass spectrometry, LC-MS)技术研究

了红凤菜提取物的化学成分, 现有的研究资料表明, 红

收稿日期: 2013-09-25

基金项目: 江苏省产学研联合创新资金项目(BY2012213); 江苏省科技基础设施建设计划-科技公共服务平台项目(BM2011117)

作者简介: 任冰如(1964—), 女, 研究员, 博士, 研究方向为植物资源的研究与开发。E-mail: renbingru@263.net

*通信作者: 李维林(1966—), 男, 研究员, 博士, 研究方向为植物资源学。E-mail: lwlcnbg@mail.cnbg.net

凤菜所含的黄酮类成分主要有:槲皮素、芦丁、异槲皮苷、槲皮苷、山柰酚、山柰酚-3-*O*- β -*D*-吡喃葡萄糖基(6 $\rightarrow$ 1)- α -*L*-鼠李糖苷和高车前苷,可见红凤菜黄酮类物质主要由槲皮素、山柰酚及以槲皮素或山柰酚为苷元的黄酮苷组成。

已有2项发明专利^[11-12]公开了红凤菜总黄酮提取物的制备方法,但发明人均未采用高效液相色谱法测定提取物的总黄酮含量,专利所提及的有效成分总黄酮的含量比较粗略或未提及总黄酮的含量水平。

关于红凤菜总黄酮含量的测定,目前文献报道的均用比色法^[11,13-14],但该法专属性较差^[15]。由于植物中的黄酮类物质是由多种苷元及其糖苷组成的混合物,成分复杂多样,难以直接测定每种化合物的含量,因此人们通常将总黄酮进行水解,测定水解液中的苷元含量,再用系数换算成总黄酮含量^[16-20]。

本实验采用乙醇提取-大孔树脂柱层析-聚酰胺柱层析-重结晶的方法,从红凤菜新鲜茎叶中提取分离总黄酮,在提取分离的不同阶段采集样品,得到几种提取物,经过LC-MS定性检测,确定了这些提取物中的黄酮类成分均为以槲皮素或山柰酚为苷元的黄酮苷。

为了更准确地测定红凤菜提取物中的总黄酮含量,本实验参考钱大玮等^[17]的方法,将所得到的不同提取物样品进行水解,以槲皮素和山柰酚为对照品,采用高效液相色谱(high-performance liquid chromatography, HPLC)法进行检测,得到水解液中槲皮素和山柰酚的含量,再根据前期LC-MS实验所确定的样品中黄酮苷的种类及其分子质量,确定换算系数,最终计算出样品的总黄酮含量。

通过定量检测在不同分离阶段得到的提取物,可以清楚地了解提取分离过程中黄酮类成分的富集和纯化情况,从而有效地指导提取纯化工艺的建立,同时,用HPLC法可更好地确定总黄酮含量,为红凤菜总黄酮提取物的产品开发提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

红凤菜于2003年7月引自重庆,凭证标本号0648614,凭证标本保存于江苏省中国科学院植物研究所标本馆;新鲜茎叶于2012年9月采自江苏省中国科学院植物研究所实验苗圃。

NKA大孔树脂 天津南开和成科技有限公司; 100~200目聚酰胺粉末、聚酰胺薄膜 浙江省台州市路桥四甲生化塑料厂。

乙醇(分析纯,纯度95%) 南京化学试剂有限公司; 甲醇(色谱纯) 美国Tedia公司; 山柰酚对照

品(批号110861-200808,纯度95.9%)、槲皮素对照品(批号100081-200907,纯度96.5%) 中国食品药品检定研究院。

1.2 仪器与设备

EL204电子天平 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司; 3000高效液相色谱仪 美国戴安公司。

1.3 方法

1.3.1 红凤菜总黄酮的提取和分离方法

红凤菜新鲜茎叶,用体积分数95%乙醇冷浸提取,提取液减压浓缩,冷沉去杂,取清液上NKA大孔树脂,依次用2倍床体积的体积分数为0%、30%、50%、70%、95%乙醇-水溶液洗脱,收集洗脱液,得到体积分数30%乙醇溶液部分为样品1,体积分数50%乙醇溶液部分为样品2,体积分数70%乙醇溶液部分为样品3,取体积分数50%乙醇溶液洗脱液,减压浓缩至无醇味,再进行聚酰胺柱层析,依次用2倍床体积的体积分数为0%、30%、50%、70%、95%乙醇溶液洗脱,收集洗脱液,每留份1/10柱床体积,减压浓缩,用聚酰胺薄层层析检识黄酮类化合物,以 V (正丁醇): V (乙酸): V (水)=4:1:5为展开剂,质量浓度1 g/100 mL的 $AlCl_3$ -乙醇溶液为显色剂,留取有黄酮反应的部分,在室温放置直到黄酮结晶物充分析出,过滤,将母液合并干燥,得到样品4,同时得到不同馏分的结晶即样品5和样品6。以上样品在水浴上蒸干后研磨成均匀粉末,55℃烘干至恒质量,置于干燥器中保存。

1.3.2 红凤菜总黄酮含量的测定方法

1.3.2.1 对照品溶液制备

精密称取槲皮素对照品7.16 mg,山柰酚对照品7.15 mg,分别用甲醇定容至25 mL,得到对照品贮备液,取槲皮素对照品溶液0.25 mL、山柰酚对照品溶液0.25 mL,混匀后定容到5 mL,得混合对照品溶液,考虑对照品的纯度,计算得溶液中槲皮素的质量浓度为13.82 μ g/mL,山柰酚的质量浓度为13.71 μ g/mL。

1.3.2.2 供试品溶液制备

精密称取待测样品2.50 mg左右,精密加入25 mL V (甲醇): V (25% HCl水溶液)=4:1的溶液,待样品溶解后,在93℃水浴上回流1 h,冷却后用甲醇定容到50 mL,得到黄酮苷的酸解液,用于HPLC测定。

1.3.2.3 色谱条件

色谱柱: Welch Material XB- C_{18} 柱(4.5 mm $\times$ 250 mm, 5 μ m); 以 V (甲醇): V (0.4%磷酸水溶液)=55:45为流动相,检测波长为360 nm,流速1 mL/min,柱温30℃,样品进样量10 μ L。

LC-MS的条件为Agilent Zorbax SB- C_{18} 柱(4.6 mm $\times$ 100 mm, 1.8 μ m); 流速0.5 mL/min,柱温25℃,进样量5.0 μ L,以乙腈(A)和0.1%

甲酸-水(B)为流动相梯度洗脱: 0~30 min: 5%~40%A, 30~40 min: 40%~100%A, 40~45 min: 100%~5%A, 紫外波长采集数据范围为200~400 nm, 检测波长为360 nm。

1.3.3 方法学考察

对方法的线性范围、精密度、稳定性、重复性、回收率进行考察。其中加样回收率计算公式如下:

$$\text{加样回收率}/\% = \frac{\text{测得值} - \text{样品已知含量}}{\text{加入的对照品含量}} \times 100$$

2 结果与分析

2.1 方法学考察

2.1.1 线性范围考察

取混合对照品溶液, 分别进样5、10、15、20、25、30 μL , 进行HPLC测定, 记录峰面积, 以进样量(x , μg)对峰面积积分值(y)进行线性回归, 得槲皮素的回归: $y=0.029\ 5x+0.000\ 3$ ($r=0.999\ 4$), 在0.069 1~0.414 6 μg 范围内呈线性相关; 山柰酚的回归方程为: $y=0.020\ 8x+0.001\ 5$ ($r=0.999\ 7$), 在0.068 6~0.413 3 μg 范围内呈线性相关。

2.1.2 精密度考察

吸取混合对照品10 μL , 在上述色谱条件下连续进样5次, 测得槲皮素峰面积的平均值为4.608, 相对标准偏差(relative standard deviation, RSD) 3.62% ($n=5$), 山柰酚为5.902, RSD 1.78% ($n=5$)。

2.1.3 稳定性考察

取样品4, 按上述色谱条件, 分别于0、2、6、8、13 h时间点进样10 μL 。结果显示, 槲皮素、山柰酚的RSD分别为1.33% ($n=5$)和0.61% ($n=5$), 说明供试品溶液在13 h内稳定。

2.1.4 重复性考察

取样品4, 共5份, 分别按照1.3.2.2节方法制备供试品溶液, 按上述色谱条件测定, 计算槲皮素、山柰酚的含量, 结果槲皮素的平均质量分数为15.27%, RSD 3.70% ($n=5$), 山柰酚的平均质量分数为30.93%, RSD 2.88% ($n=5$), 表明本方法重复性良好。

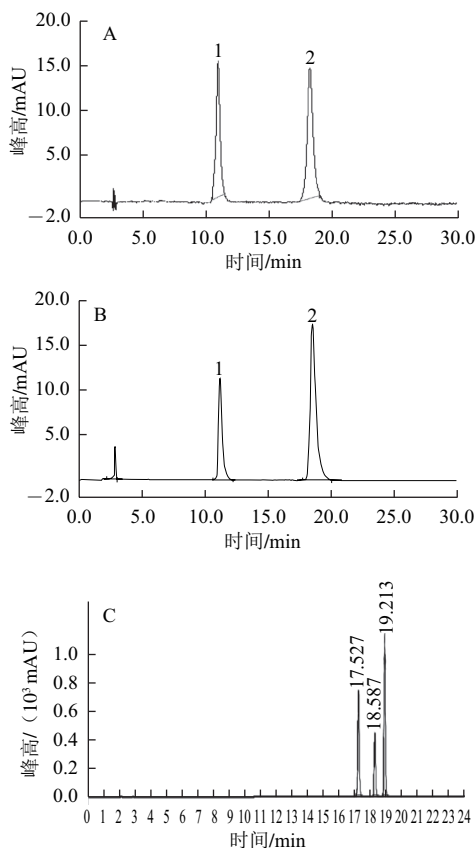
2.1.5 回收率考察

精密称取约2.5 mg已知含量的样品4各3份, 分别加入1.3.2.1节配制的槲皮素和山柰酚对照品贮备液各2 mL, 按1.3.2.2节方法制备供试品溶液, 按上述色谱条件测定, 计算槲皮素、山柰酚的含量。槲皮素的加样回收率为99.9% (RSD 1.9%), 山柰酚的加样回收率为104.1% (RSD 3.8%)。

2.2 样品含量测定

取1.3.1节中得到的样品1~6, 精密称取约2.5 mg,

按1.3.2.2节方法制备供试品溶液, 按上述色谱条件测定。



A.混合对照品; B.样品5水解后; C.样品5水解前; 1.槲皮素; 2.山柰酚。

图1 红凤菜总黄酮提取物的HPLC-MS检测

Fig.1 HPLC of total flavonoids in extracts from *Gynura bicolor* DC.

在本实验中, 采用聚酰胺薄层层析, 样品1未检测到黄酮类成分, 进一步将样品1酸解, 进行HPLC测定, 也未检测到槲皮素和山柰酚。

图1表示供试品的高效液相色谱图。以样品5为例, 图1C为样品酸水解之前用LC-MS检测的峰图, 共有3个吸收峰, 保留时间17.527 min为槲皮素-3-O- β -D-吡喃葡萄糖- α -L-鼠李糖苷的出峰时间, 其相对分子质量为610; 保留时间18.587 min为山柰酚-3-O-半乳糖- α -L-鼠李糖苷的出峰时间, 其相对分子质量为594; 保留时间19.213 min为山柰酚-3-O-葡萄糖- α -L-鼠李糖苷的出峰时间, 其相对分子质量也是594。图1B为样品酸水解之后的图谱, 只有2个吸收峰, 分别为槲皮素和山柰酚。其余的样品2、3、4和6水解后也都只有2个吸收峰, 说明红凤菜总黄酮提取物的黄酮苷元为槲皮素和山柰酚。

根据2.1.1节得到的回归方程计算供试品酸水解后的槲皮素和山柰酚的含量, 结果如表1所示。

为了更客观地表示不同提取物的总黄酮含量, 应将测得的苷元含量转换为其水解之前的黄酮苷含量。陈剑^[9]及本研究的LC-MS实验结果表明, 样品2的黄酮类成分由

以槲皮素为苷元的槲皮素糖苷和以山柰酚为苷元的山柰酚糖苷组成,其中槲皮素糖苷又有2种不同的相对分子质量,即槲皮素-3-*O*- β -D-吡喃葡萄糖- α -L-鼠李糖苷和槲皮素-3-*O*-半乳糖- α -L-鼠李糖苷(相对分子质量610)、槲皮素-3-*O*-半乳糖苷和槲皮素-3-*O*- β -D-葡萄糖苷(相对分子质量464),由于难以确定不同相对分子质量的槲皮素糖苷在样品中所占的比例,因此暂定取两者的平均值来估算槲皮素糖苷的相对分子质量,即 $(610+464)/2=537$,因为槲皮素的相对分子质量为302,所以将槲皮素换算成槲皮素糖苷的系数为 $537/302=1.78$ 。同样,山柰酚糖苷也有2种不同的相对分子质量,即山柰酚-3-*O*-半乳糖- α -L-鼠李糖苷和山柰酚-3-*O*-葡萄糖- α -L-鼠李糖苷(相对分子质量594)、山柰酚-3-*O*-半乳糖苷和山柰酚-3-*O*- β -D-葡萄糖苷(相对分子质量594),取两者的平均值估算山柰酚糖苷的相对分子质量,即 $(594+448)/2=521$,山柰酚的相对分子质量为286,将山柰酚换算成山柰酚糖苷的系数为 $521/286=1.82$ 。

表1 HPLC法测定红凤菜提取物的总黄酮含量
Table 1 Contents of total flavonoids in extracts from *Gynura bicolor* DC. by HPLC

样品 编号	称样质 量/mg	槲皮素 质量/mg	槲皮素糖苷 含量/%	槲皮素糖苷 质量分数/%	山柰酚 质量/mg	山柰酚糖苷 含量/%	山柰酚糖苷 质量分数/%	总黄酮 质量分数/%
1	2.55	未检出			未检出			
2	2.62	0.172	6.6	11.7	0.316	12.1	22.0	33.7
3	2.71	0.024	0.9		0.112	4.1		
4	3.06	0.478	15.6	27.8	0.957	31.3	57.0	84.8
5	3.27	0.584	17.9	36.1	0.906	29.3	61.0	97.1
6	2.33	0.778	33.4	51.4	0.719	30.8	48.3	99.7

样品4的黄酮类成分与样品2相同,因此采用与之相同的换算系数进行折算。即将槲皮素换算成槲皮素糖苷的系数为1.78,将山柰酚换算成山柰酚糖苷的系数为1.82。

样品5的黄酮类成分由相对分子质量为610的槲皮素-3-*O*- β -D-吡喃葡萄糖- α -L-鼠李糖苷、相对分子质量为594的山柰酚-3-*O*-半乳糖- α -L-鼠李糖苷和山柰酚-3-*O*-葡萄糖- α -L-鼠李糖苷组成,因此,将槲皮素换算成槲皮苷的系数为 $610/302=2.02$,将山柰酚换算成山柰酚苷的系数为 $594/286=2.08$ 。

样品6的总黄酮由相对分子质量为464的槲皮素-3-*O*-半乳糖苷和槲皮素-3-*O*- β -D-葡萄糖苷、相对分子质量为448的山柰酚-3-*O*-半乳糖苷和山柰酚-3-*O*- β -D-葡萄糖苷组成,因此,将槲皮素换算成槲皮苷的系数为 $464/302=1.54$,将山柰酚换算成山柰酚苷的系数为 $448/286=1.57$ 。

样品3因得量少且薄层层析检识的黄酮类反应较弱,故未作LC-MS检测,无法确定黄酮苷的换算系数。

根据以上不同样品的换算系数,分别将测得的槲皮素和山柰酚含量折算成槲皮素糖苷和山柰酚糖苷的含

量。2种黄酮苷的含量之和即为样品的总黄酮含量,红凤菜不同提取物的总黄酮含量如表1所示。

样品1~3是红凤菜的醇提取物经过NKA大孔树脂柱层析后收集的不同部分,样品1为体积分数30%乙醇洗脱部分,未检出黄酮成分;样品2为体积分数50%乙醇洗脱部分,其槲皮素的质量分数为6.6%,山柰酚的质量分数为12.1%,换算成总黄酮的质量分数为33.7%;样品3为体积分数70%乙醇洗脱部分,其槲皮素的质量分数为0.9%,山柰酚的质量分数为4.1%。由此可见,采用NKA大孔树脂柱层析,红凤菜总黄酮主要存在于体积分数50%乙醇洗脱部分;红凤菜总黄酮中,其苷元山柰酚的含量明显高于槲皮素。

样品4是样品2经过聚酰胺柱层析得到的总黄酮部分,其总黄酮的质量分数为84.8%;样品5是聚酰胺柱层析后析出的总黄酮结晶,其总黄酮的质量分数为97.1%;另一份结晶即样品6总黄酮的质量分数为99.7%。可见,聚酰胺柱层析可有效地分离纯化样品2中的总黄酮,使红凤菜总黄酮的纯度大幅提高,进一步对洗脱物重结晶,可使总黄酮含量再次提高。

3 讨论

用聚酰胺薄层层析和HPLC均未在样品1中检出黄酮类成分,说明NKA大孔树脂柱层析可有效地去除样品中的非黄酮成分,达到纯化黄酮的目的。

LC-MS检测结果表明,样品2、样品4、样品5、样品6的总黄酮主要以槲皮素和山柰酚的糖苷形式存在,因此,本实验采用槲皮素和山柰酚为对照品,测定红凤菜提取物中的总黄酮含量,将样品2~6加入盐酸进行水解,水解液中只出现槲皮素和山柰酚的吸收峰,进一步验证了红凤菜总黄酮的苷元为槲皮素和山柰酚。

样品2、3为红凤菜的乙醇提取物经第一次柱层析得到的分离物,2个样品中山柰酚含量均高于槲皮素,提示红凤菜原料中黄酮苷元山柰酚的含量高于槲皮素。

关于总黄酮含量的测定,文献资料多引用其他文献的转换系数进行计算^[16-20],本研究更直接地计算了将槲皮素转换为槲皮素糖苷、山柰酚转换为山柰酚糖苷的转换系数。其中样品5和样品6为重结晶产物,化学成分较为简单,槲皮素糖苷、山柰酚糖苷的相对分子质量都只有一种,转换系数的计算较为简便;但样品2和样品4的化学成分较多,难以确定各成分所占的比例,故暂定取2种黄酮苷的相对分子质量的平均值来计算转换系数。本研究较准确地计算了红凤菜不同提取物中的总黄酮含量。

4 结论

采用体积分数95%乙醇提取-NKA大孔树脂柱层析-聚酰胺柱层析-重结晶的工艺流程,可有效地从红凤菜新鲜

茎叶中分离得到总黄酮, 经过2次柱层析后产品中的有效成分总黄酮的质量分数可达到84.8%, 若进一步采用重结晶方法纯化, 产品中总黄酮的质量分数可达到97.1%和99.7%。该工艺能耗低、操作简便、产品纯度高, 可用于工厂化生产。

参考文献:

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志: 第七十七卷: 第一分册[M]. 北京: 科学出版社, 1999: 310-316.
- [2] 江苏新医学院. 中药大辞典: 上[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1977: 988-989.
- [3] 江苏省中国科学院植物研究所. 一种红凤菜蛋白提取物及其制备方法与应用: 中国, ZL 201210200771.6[P]. 2013-10-09.
- [4] 任冰如, 汪洪江, 梁呈元, 等. 4种野生蔬菜的氨基酸含量及其营养价值评价[J]. 植物资源与环境学报, 2004, 13(3): 55-56.
- [5] 汪泓江, 梁呈元, 卓敏胡勇, 等. *Gynura*属3个野生蔬菜营养成分的比较及评价[J]. 中国野生植物资源, 2004, 23(5): 48-49.
- [6] 卓敏, 吕寒, 任冰如, 等. 红凤菜化学成分研究[J]. 中草药, 2008, 39(1): 30-32.
- [7] 吕寒, 裴咏萍, 李维林. 红凤菜黄酮类化学成分的研究[J]. 中国现代应用药学, 2010, 27(7): 613-614.
- [8] 吕寒, 裴咏萍, 李维林, 等. 红凤菜中黄酮类化合物的高效液相色谱与多级质谱联用分析[J]. 时珍国医国药, 2011, 22(11): 2582-2583.
- [9] 陈剑. 红凤菜、白子菜的降血糖活性成分研究[D]. 南京: 中国药科大学, 2013: 156-179.
- [10] 吴立军. 天然药物化学[M]. 4版. 北京: 人民卫生出版社, 2004: 173-216.
- [11] 江苏省中国科学院植物研究所. 一种红凤菜总黄酮提取物的制备方法: 中国, 201010611189.X[P]. 2010-12-29.
- [12] 苏州宝泽堂医药科技有限公司. 一种从新鲜红凤菜中提取紫色素及总黄酮的方法: 中国, 201110218685.3[P]. 2011-08-02.
- [13] 吴菊兰, 李维林, 汪洪江, 等. 红凤菜和白子菜总黄酮含量的动态变化[J]. 植物资源与环境学报, 2009, 18(4): 79-81.
- [14] 裴咏萍, 李维林, 张涵庆. 大孔树脂对红凤菜总黄酮的吸附分离特性研究[J]. 时珍国医国药, 2010, 21(1): 8-9.
- [15] 郭亚健, 范莉, 王晓强, 等. 关于 $\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3\text{-NaOH}$ 比色法测定总黄酮方法的探讨[J]. 药物分析杂志, 2002, 22(2): 97-99.
- [16] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部[M]. 2005年版. 北京: 化学工业出版社, 2005: 220.
- [17] 钱大玮, 鞠建明, 朱玲英, 等. 不同树龄银杏叶在不同季节中总黄酮和总内酯的含量变化[J]. 中草药, 2002, 33(11): 1025-1027.
- [18] 文红梅, 王业盈, 彭国平, 等. HPLC法测定蒲黄中总黄酮的含量[J]. 现代中药研究与实践, 2006, 20(3): 41-44.
- [19] 鞠成国, 王巍, 赵焕君, 等. HPLC测定急性子中总黄酮的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(1): 77-79.
- [20] 王靖, 邹雨佳, 唐华澄, 等. 高效液相色谱法(HPLC)测定银杏黄酮含量[J]. 食品工业科技, 2006, 27(3): 184-185.