

刺玫叶中金丝桃苷和总黄酮含量的测定

钟方丽, 王晓林*, 孙晓雨, 王建刚
(吉林化工学院化学与制药工程学院, 吉林 吉林 132022)

摘要: 目的: 建立测定刺玫叶中金丝桃苷和总黄酮含量的方法。方法: 以芦丁为对照品, 采用紫外分光光度法于418nm测定总黄酮含量; 采用高效液相色谱法测定金丝桃苷含量, 采用Shim-pack VP-ODS C₁₈色谱柱(150mm×4.6mm, 5μm), 流动相为甲醇-0.5%磷酸(45:55, V/V)溶液, 检测波长为360nm, 流速为1.0mL/min, 柱温40℃。结果: 总黄酮在0.02~0.12mg/mL ($R^2=0.9996$)、金丝桃苷在9.60~57.60μg/mL ($R^2=0.9993$)质量浓度范围内呈良好线性关系; 总黄酮和金丝桃苷平均回收率分别为100.87%和100.36%, RSD分别为2.79%和2.26%。结论: 所建立的方法快速、准确、操作简便, 适用于刺玫叶中金丝桃苷和总黄酮的含量测定。

关键词: 刺玫叶; 总黄酮; 金丝桃苷; 芦丁; 高效液相法; 紫外分光光度法

Determination of Hyperoside and Total Flavonoids in Leaves of *Rosa davurica* Pall.

ZHONG Fang-li, WANG Xiao-lin*, SUN Xiao-yu, WANG Jian-gang
(School of Chemistry and Pharmaceutical Engineering, Jilin Institute of Chemical Technology, Jilin 132022, China)

Abstract: Objective: To establish methods for the determination of total flavonoids and hyperoside in leaves of *Rosa davurica* Pall.. Methods: Total flavonoids were quantified spectrophotometrically at 418 nm using rutin as reference substance. For the determination of hyperoside by HPLC, the chromatographic separation was performed on a Shim-pack VP-ODS C₁₈ column (150 mm × 4.6 mm, 5 μm) using a mobile phase composed of CH₃OH-0.5% H₃PO₄ (45:55, V/V) at a flow rate of 1.0 mL/min, and the column temperature and detection wavelength were 40 °C and 360 nm, respectively. Results: The linear ranges of total flavonoids and hyperoside were 0.02–0.12 mg/mL ($R^2 = 0.9996$) and 9.60–57.6 μg/mL ($R^2=0.9993$), respectively. The average recovery rates of total flavonoids and hyperoside were 100.87% and 100.36% with RSD of 2.79% and 2.26%, respectively. Conclusion: The developed methods are rapid, accurate, simple and suitable for the determination of total flavonoids and hyperoside in leaves of *Rosa davurica* Pall.

Key words: leaves of *Rosa davurica* Pall.; total flavonoids; hyperoside; rutin; high performance liquid chromatography (HPLC); UV spectrophotometric method

中图分类号: TQ244.2

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2013)02-0231-05

山刺玫(*Rosa davurica* Pall.)系蔷薇科蔷薇属植物, 其花、果、根均可入药^[1], 具有预防和治疗心脑血管疾病的作用、抗肿瘤作用、增强免疫系统作用、抗衰老及保肝的作用^[2-3]。山刺玫的果实是一种经济价值极高的野生果类, 可以作果酱、果酒、提取橘黄色染料, 山刺玫的花可以制玫瑰酱或提香精, 山刺玫的种子能榨油, 山刺玫的叶能制成茶叶, 天然植物山刺玫是一种不可多得的食、药同源的宝贵资源, 刺玫果中总黄酮的提取、分离与分析已有研究^[4-6], 相关文献^[7-8]也报道了刺玫果中黄酮类化合物金丝桃苷和槲皮素的含量测定方法, 但山刺玫果实的资源远远少于山刺玫叶, 而针对山刺玫叶的研究比较少, 为了充分开发利用山刺玫叶, 本实验对刺玫叶

中总黄酮和金丝桃苷的含量测定方法进行研究, 拟建立刺玫叶中总黄酮和金丝桃苷的含量测定方法, 为刺玫叶的进一步研究与开发提供一定的参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

刺玫叶采自吉林市丰满区白山乡, 经吉林化工学院药系鉴定为蔷薇科蔷薇属植物山刺玫(*Rosa davurica* Pall.)的叶。

金丝桃苷、芦丁对照品 中国食品药品检定研究院; 甲醇(色谱纯) 天津大茂化学试剂公司; 水为重蒸馏水; 其余所用试剂均为分析纯。

收稿日期: 2011-08-04

作者简介: 钟方丽(1970—), 女, 教授, 博士, 主要从事食品及天然药物开发研究。E-mail: fanglizhong@sina.com

*通信作者: 王晓林(1969—), 男, 副教授, 硕士, 主要从事天然产物有效成分的提取及纯化工艺研究。

E-mail: wangxiaolin69@eyou.com



1.2 仪器与设备

LC-20AB型液相色谱仪、SPD-M20A二极管阵列检测器、Shim-pack VP-ODS C_{18} 色谱柱(150mm×4.6mm, 5 μ m) 日本岛津仪器有限公司; BP211D 型电子天平德国Sartorius公司; RT-08手提式高速中药粉碎机 大德乐机械有限公司; JBT/CYCL型超声波药品处理机 济宁金百特电子有限责任公司; 752N紫外-可见分光光度计上海精密科学仪器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 金丝桃苷含量的测定

精密称取干燥至恒质量的金丝桃苷对照品2.4mg, 加甲醇溶解并定容至25mL容量瓶, 摇匀, 即得质量浓度为0.096mg/mL的金丝桃苷对照品溶液^[9]。

称取刺玫叶粉末1.0g, 加25mL 50%乙醇溶液, 超声(350W, 35kHz)提取30min, 过滤, 收集提取液, 滤渣加入25mL 50%乙醇溶液, 重复提取2次, 过滤, 合并3次提取液, 过滤, 转移至100mL 容量瓶中并用50%乙醇溶液稀释至刻度, 摇匀, 用微孔滤膜(0.45 μ m)过滤, 取续滤液作为样品溶液^[10]。

色谱条件: Shim-pack VP-ODS C_{18} (4.6mm×150mm, 5 μ m)色谱柱; 流动相: 甲醇-0.5%磷酸溶液(45:55, V/V); 流速: 1.0mL/min; 柱温: 40℃; 进样量: 20 μ L; 检测波长: 360nm。

1.3.2 总黄酮含量的测定

精密称取在120℃干燥至恒质量的芦丁20.0mg, 置100mL容量瓶中, 加入60%乙醇溶液超声使其溶解, 放冷并稀释至刻度^[11], 摇匀, 即得1mL含无水芦丁0.20mg的芦丁对照品溶液。样品溶液制备方法同1.3.1节中样品溶液制备方法。以芦丁为对照品, 采用紫外-分光光度法于418nm波长处测定含量。

1.3.3 制备方法对金丝桃苷含量的影响

称取刺玫叶粉末适量, 料液比为1:25(g/mL), 加入50%乙醇溶液超声提取2次, 每次分别提取30、40min, 过滤, 滤液合并并定容至50mL容量瓶中, 微孔滤膜滤过, 取续滤液作为样品溶液, 进样20 μ L, 记录色谱图。将所得提取液测得的金丝桃苷峰面积对应提取时间作图。固定其他条件, 分别考察提取时间(20、30、40min)、提取次数(1、2、3、4次)、料液比(1:20、1:25、1:30)对金丝桃苷含量的影响。

1.3.4 制备方法对黄酮含量的影响

称取刺玫叶粉末各2.5、2.0g, 分别加入50mL 50%乙醇溶液, 均连续超声提取5次, 并把上述两种不同质量的原料每次的提取液分别定容于50mL容量瓶作为样品溶液。吸取1mL样品溶液于10mL容量瓶中, 加入2mL 1mol/L三氯化铝溶液, pH5.2 醋酸-醋酸钠缓冲溶液1mL, 用50%乙醇溶液稀释到刻度, 放置40℃水浴中加热显色15min, 以样品

溶液为空白试剂, 测定吸光度, 探索料液比和提取次数对黄酮含量的影响。

称取1.0g刺玫叶粉末, 加入25mL 50%乙醇溶液于50mL锥形瓶中, 超声提取30min, 过滤并保留滤液, 重复提取2次, 合并滤液定容至100mL容量瓶, 摇匀, 吸取1mL样品溶液于10mL容量瓶中, 加入2mL 1mol/L三氯化铝溶液, pH5.2醋酸-醋酸钠缓冲溶液1mL, 用50%乙醇溶液稀释到刻度, 放置40℃水浴中分别加热显色10、15、20、25、30min, 以样品溶液为空白试剂, 测定吸光度, 探索水浴中的显色时间对黄酮含量测定的影响。

2 结果与分析

2.1 金丝桃苷含量的测定

2.1.1 检测波长的选择

文献报道金丝桃苷在355^[12]、360^[13]、363nm^[14]等波长处有最大吸收。通过实验比较, 在上述3个波长处^[7]金丝桃苷的峰面积值和分离度分别为19004.8、19529.4、19386.3和3.570、3.952、3.901, 根据实验结果和参考文献确定360nm为检测波长。

2.1.2 流动相条件的选择

本实验对流动相进行了选择^[15-16], 分别考察甲醇-0.5%磷酸(45:55, V/V)、甲醇-0.4%乙腈(17:83, V/V)、甲醇-水-冰醋酸(48:52:1, $V/V/V$)对刺玫叶中金丝桃苷的分离度。结果流动相为甲醇-0.4%乙腈(17:83, V/V)时峰型较差, 出峰时间太短为3.185min, 无法将金丝桃苷与其他成分有效分离; 流动相为甲醇-水-冰醋酸(48:52:1, $V/V/V$)时出峰时间为10.698min, 分离度为2.526; 流动相为甲醇-0.5%磷酸(45:55, V/V)时出峰时间为17.132min, 分离度为3.952, 峰型较好, 故选择甲醇-0.5%磷酸溶液(45:55, V/V)为流动相。

2.1.3 线性范围

吸取金丝桃苷对照品溶液1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0mL, 分别置10mL容量瓶中^[17], 加入60%乙醇溶液定容至刻度, 摇匀, 制得系列对照品溶液。分别吸取20 μ L, 注入液相色谱仪, 记录峰面积, 以对照品溶液进样量为横坐标, 峰面积为纵坐标绘制标准曲线, 回归方程为: $Y=25144.5686X+159.1334$, $R^2=0.9993$, 结果表明金丝桃苷进样质量浓度在9.60~57.60 μ g/mL范围内呈良好线性关系。将上述金丝桃苷对照品溶液继续稀释, 制得不同质量浓度的对照品溶液, 进行HPLC分析, 直到信噪比为3时, 记录所进样品的质量浓度, 即为该方法的检出限^[18]。本方法所测检出限为0.0384mg/mL。

2.1.4 精密度实验

吸取质量浓度为0.0480mg/mL的金丝桃苷对照品溶液, 按1.3.1节中的色谱条件, 连续进样6次^[19], 每次进样

20μL, 记录金丝桃苷的峰面积, 结果金丝桃苷的RSD为1.29%, 结果表明精密度良好, 结果见表1。

表 1 精密度实验结果

Table 1 Precision of the HPLC method for determination of hyperoside

序号	1	2	3	4	5	6
保留时间/min	16.893	16.912	16.858	16.863	16.858	16.893
峰面积	25041.699	25109.400	25534.602	25038.100	25785.299	25015.852

2.1.5 稳定性实验

称取干燥的刺玫叶粉末适量, 按照1.3.1节中的方法制备样品溶液, 室温下放置, 分别于0、1、2、3、4h进样20μL, 记录色谱图, 结果金丝桃苷的峰面积RSD为1.01%, 表明样品溶液在4h内稳定。实验结果见表2。

表 2 稳定性实验数据

Table 2 Stability of the HPLC method for determination of hyperoside

放置时间/h	0	1	2	3	4
保留时间/min	17.198	16.898	16.832	16.865	16.032
峰面积	21235.199	21017.301	20733.400	20731.699	20909.400

2.1.6 重复性实验

称取同一批号的药材粉末5份, 每份各1.0g, 按1.3.1节中方法制备5份样品溶液, 各进样20μL, 进行测定, 结果金丝桃苷的峰面积RSD为1.83%, 结果表明方法有良好的重复性。实验结果见表3。

表 3 重复性实验数据

Table 3 Repeatability of the HPLC method for determination of hyperoside

序号	1	2	3	4	5
保留时间/min	17.198	16.698	16.732	16.765	16.765
峰面积	21235.199	20335.801	20511.801	20856.400	21100.400

2.1.7 加标回收率实验

精密称取5份已知含量(4.222mg/g)的样品0.08g, 每份精密加入0.096mg/mL金丝桃苷对照品溶液3.8mL, 按照1.3.1节中的方法制备样品溶液, 定容到10mL容量瓶中, 微孔滤膜滤过, 按上述色谱条件各进样20μL, 记录峰面积, 计算回收率, 金丝桃苷的平均回收率为100.36%, RSD为2.26%。结果见表4。

表 4 加标回收率实验结果

Table 4 Recovery of the HPLC method for determination of hyperoside

取样量/g	样品含量/mg	对照品加入量/mg	测得总量/mg	回收率/%
0.0804	0.3395	0.3648	0.6958	97.65
0.0809	0.3416	0.3648	0.7163	102.71
0.0801	0.3382	0.3648	0.7116	102.36
0.0802	0.3386	0.3648	0.6978	98.46
0.0805	0.3399	0.3648	0.7070	100.63

2.1.8 样品测定

分别取对照品溶液, 样品溶液各20μL, 注入液相色谱

仪, 按1.3.1节中的色谱条件测定, 记录色谱图, 结果见图1。

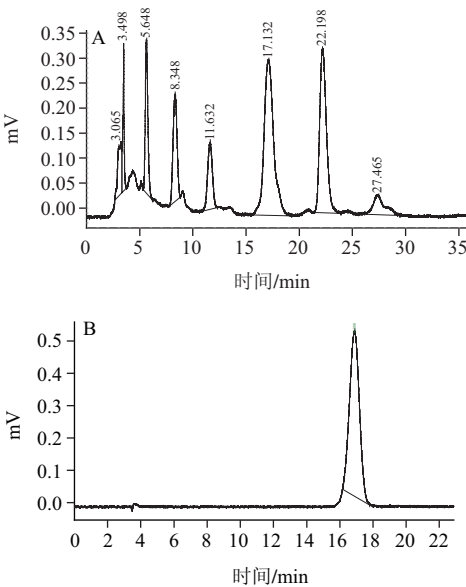


图 1 样品溶液(A)与金丝桃苷对照品溶液(B)的色谱图比较
Fig.1 HPLC chromatograms of sample solution (A) and hyperoside reference substance solution (B)

称取3批干燥的刺玫叶粉末适量, 按上述色谱条件各进样20μL, 记录峰面积, 计算含量, 结果3批刺玫叶中金丝桃苷的含量分别为4.036、4.229、4.362mg/g, 平均含量为4.209mg/g。

2.2 总黄酮含量的测定

2.2.1 检测波长的选择

吸取样品溶液、芦丁对照品溶液各1mL于10mL容量瓶中, 加入2mL 1mol/L的三氯化铝溶液, pH5.2的醋酸-醋酸钠缓冲溶液1mL, 加入60%乙醇溶液稀释到刻度, 摇匀, 放置40℃水浴中加热显色15min^[20], 以样品溶液为空白试剂, 在300~500nm范围内进行波长扫描, 样品溶液和对照品溶液在418nm处均有最大吸收, 由此确定检测波长为418nm。

2.2.2 线性范围

吸取芦丁对照品溶液1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0mL分别放置于10mL容量瓶中, 各加入2mL 1mol/L三氯化铝溶液, 1mL醋酸-醋酸钠缓冲溶液(pH5.2), 分别用60%乙醇溶液稀释至刻度, 摇匀, 放置40℃水浴中加热显色15min, 以60%乙醇溶液为空白试剂, 在418nm处测吸光度, 以对照品质量浓度C(mg/mL)为横坐标, 吸光度(A)为纵坐标, 绘制标准曲线。回归方程: $A = 28.58929C - 0.02933$, $R^2 = 0.9996$ 。结果表明芦丁进样质量浓度在0.02~0.12mg/mL范围内呈良好的线性关系。

2.2.3 精密度实验

精密吸取2.2.2节中质量浓度0.06mg/mL的芦丁对照品

溶液，连续测定6次吸光度，记录数据，RSD为0.51%，结果表明精密度良好。

2.2.4 稳定性实验

称取干燥的刺玫叶粉末5.0g，置50mL锥形瓶中，按1.3.2节中方法制备样品溶液，分别于0、30、60、90、120min进行测定，记录吸光度，结果表明样品溶液在实验条件下60min内基本稳定，可满足测定要求。

2.2.5 重复性实验

称取同一批号干燥的刺玫叶粉末5份，每份1.0g，按1.3.2节中方法制备5份样品溶液，测定其吸光度，RSD为1.39%，说明此方法重复性较好。

2.2.6 加标回收率实验

称取5份已知含量(16.941mg/g)的刺玫叶粉末，每份0.5g，精密称定，每份加入芦丁对照品8.5mg，按照1.3.2节中方法制备样品溶液，测定吸光度，计算回收率，芦丁的平均回收率为100.87%，RSD为2.79%。结果表明总黄酮回收率良好，方法准确性较高，具有可行性。具体结果见表5。

表5 加标回收率实验结果
Table 5 Recovery of the spectrophotometric method for determination of total flavonoids

取样量/g	样品含量/mg	对照品加入量/mg	测得总量/mg	回收率/%
0.5056	8.565	8.50	16.766	96.48
0.5054	8.562	8.61	17.606	102.04
0.5038	8.535	8.53	17.046	99.78
0.5020	8.504	8.50	17.221	102.55
0.5062	8.576	8.59	17.466	103.50

2.2.7 样品测定

称取3批干燥的刺玫叶样品各1.0g，置于50mL锥形瓶中，按1.3.2节中方法制备样品溶液，测定吸光度，结果3批刺玫叶中总黄酮的含量分别为16.537、16.158、16.127mg/g，平均含量为16.274mg/g。

2.3 制备方法对金丝桃苷和黄酮含量的影响

2.3.1 制备方法对金丝桃苷含量的影响

2.3.1.1 提取时间

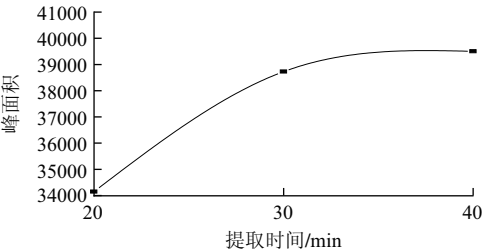


图2 提取时间对金丝桃苷提取效果的影响
Fig.2 Effect of extraction time on the extraction efficiency of hyperoside

由图2可知，30、40min提取的金丝桃苷量相差不多，所以选择提取时间为30min。

2.3.1.2 超声次数

由于第4次已不能检测出金丝桃苷，故只将第1、2、3次提取液测得的金丝桃苷峰面积对应超声次数作图，见图3。结果表明，超声提取3次，刺玫叶中的金丝桃苷几乎提取完全。

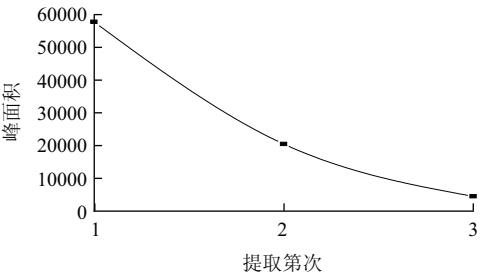


图3 提取次数对金丝桃苷提取效果的影响
Fig.3 Effect of number of repeated extractions on the extraction efficiency of hyperoside

2.3.1.3 料液比

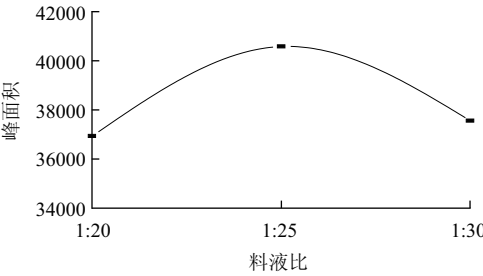


图4 料液比对金丝桃苷提取效果的影响
Fig.4 Effect of material/liquid ratio on the extraction efficiency of hyperoside

图4表明，料液比1:25的测得金丝桃苷含量最高，即提取效率最好，因此选用料液比1:25进行提取。

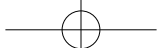
2.3.2 制备方法对总黄酮含量的影响

2.3.2.1 料液比和提取次数

表6 料液比1:20和1:25时提取次数对总黄酮含量的影响
Table 6 Effect of material/liquid ratio on results of determination of total flavonoids

料液比		提取第次				
		1	2	3	4	5
1:20	吸光度	1.120	0.510	0.258	0.135	0.088
	总黄酮的量/mg	20.10	9.43	5.03	2.87	2.05
	占总量百分比/%	50.91	23.89	12.74	7.27	5.19
1:25	吸光度	1.410	0.312	0.133	0.046	0.026
	总黄酮的量/mg	25.173	5.970	2.839	1.137	0.968
	占总量百分比/%	69.41	16.46	7.83	3.63	2.67

表6表明，当料液比为1:20时，第5次提取所得提取液中的总黄酮的量仍占总量的5.19%，说明此料液比相对较小，尚不能将黄酮提取完全。而当料液比为1:25时，第5次提取所得提取液中的总黄酮的量仅占总量的



2.67%，所以从节省能源和黄酮提取效率等因素综合考虑，选择料液比为1:25，用50%乙醇溶液超声提取3次，每次30min，此时提取总黄酮的量约占总量的94%，即药材中的总黄酮提取相对较完全。

2.3.2.2 水浴显色时间

表7表明，水浴温度40℃条件下，水浴显色15min后吸光度变化很小，比较稳定，故选择水浴中显色时间为15min。

表 7 水浴显色时间对总黄酮含量的影响
Table 7 Effect of water bath heating time for color development on results of determination of total flavonoids

显色时间/min	10	15	20	25	30
吸光度	0.436	0.456	0.457	0.457	0.490

3 结 论

本实验分别采用HPLC、UV法对刺玫叶中金丝桃苷、总黄酮的含量测定进行了相关的探索，为进一步开发和综合利用刺玫叶提供了理论依据，本实验建立的含量测定方法操作合理简便，方法精密度高，重复性及线性关系良好，回收率较好，可为刺玫叶的质量控制提供了研究基础。

参考文献：

[1] 白宝兰. 刺玫果粉的研制[J]. 吉林工程技术师范学院学报, 2004, 20(3): 16-18.
[2] 陈帅, 钟方丽, 祝波. 刺玫果药理学研究进展[J]. 吉林化工学院学报, 2011, 28(5): 31-32.
[3] KIM H M, PARK Y A, LEE E J, et al. inhibition of immediatetype

allergic reaction by *Rosa davurica* Pall. in a murine model[J]. Journal of Ethnopharmacology, 1999, 67(1): 53-60.
[4] 钟方丽, 陈帅, 关晓侠. 微波法提取刺玫果总黄酮工艺研究[J]. 江苏农业科学, 2010(6): 449-451.
[5] 庄志军, 钟方丽, 杨英杰, 等. 刺玫果中总黄酮的提取与分析工艺研究[J]. 中成药, 2007, 29(9): 1394-1395.
[6] KUANG Haixue. Chemical constituents of pericarps of *Rosa davurica* Pall.[J]. Chem Pharm Bull, 1989, 37(8): 2232.
[7] 钟方丽, 王晓林, 敬采月. 高效液相色谱法测定刺玫果中金丝桃苷的含量[J]. 食品科学, 2010, 31(24): 281-284.
[8] 王晓林. 高效液相色谱法测定刺玫果中槲皮素的含量[J]. 食品工业科技, 2011, 32(4): 370-372.
[9] 陆珞, 关键, 蔡恩博, 等. 星点设计-效应面法优选短梗五加叶中金丝桃苷的提取工艺[J]. 食品科学, 2010, 31(18): 46-49.
[10] 邵璟, 狄留庆, 谢新, 等. HPLC法测定不同产地刺五加叶中绿原酸和金丝桃苷含量[J]. 中国中医药信息杂志, 2009, 16(10): 41-43.
[11] 钟方丽, 王晓林, 安媛, 等. 返魂草中总黄酮提取工艺研究[J]. 中国医院药学杂志, 2008, 19(1): 1937-1939.
[12] 李东锋, 赵军, 王建华. 高效液相色谱法测定山楂中金丝桃苷的含量[J]. 新疆医科大学学报, 2008, 31(12): 1679-1680.
[13] 赵艳普. HPLC测定照山白浸膏片中金丝桃苷的含量[J]. 中成药, 2008, 30(3): 455-457.
[14] 胡伟, 陈飞虎, 吴繁荣. HPLC法测定鬼针草药材中金丝桃苷的含量[J]. 安徽医科大学学报, 2008, 43(6): 712-713.
[15] 张俊松, 王晓利, 罗谦, 等. HPLC测定贯叶连翘及提取物中伪金丝桃素和金丝桃苷的含量[J]. 中成药, 2006, 28(5): 709-711.
[16] 李月, 程岚, 康廷国. 高效液相色谱法测定山楂叶提取物中金丝桃苷的含量[J]. 时珍国医国药, 2006, 17(3): 372-373.
[17] 陈岳蓉, 刘海青. 反相高效液相色谱法测定地榆中金丝桃苷的含量[J]. 时珍国医国药, 2008, 19(2): 455-456.
[18] 薛峰, 李晨, 江沛, 等. 高效液相色谱法测定蛋鸭组织中的类胡萝卜素[J]. 食品科学, 2011, 32(14): 185-189.
[19] 郑一敏, 胥秀英, 傅善权, 等. HPLC测定金荞麦中的金丝桃苷[J]. 华西药理学杂志, 2008, 23(6): 724-725.
[20] 马陶陶, 张群林, 李俊. 三氯化铝比色法测定中药总黄酮方法的探讨[J]. 时珍国医国药, 2008, 28(22): 54-56.