

## 金雀花中3种黄酮成分的测定及其指纹图谱的建立

武 钰, 李东雨, 姚 军\*, 程煜凤\*  
(新疆医科大学药学院, 新疆 乌鲁木齐 830054)

**摘要:** 目的 通过 HPLC 法测定金雀花 *Caragana sinica* (Buchoz) Rehd. 中槲皮素、山柰素、异鼠李素的含量, 并建立其指纹图谱。方法 该植物 75% 乙醇提取液的分析采用 Waters C<sub>18</sub> 色谱柱 (150 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相为甲醇-0.4% 磷酸; 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 30 °C; 检测波长 360 nm。再建立 10 批样品的指纹图谱。结果 槲皮素、山柰素、异鼠李素分别在 0.01 ~ 0.1、0.002 5 ~ 0.025、0.002 5 ~ 0.025 mg/mL 范围内线性关系良好, 平均回收率分别为 95.5%、92.3%、95.6%, RSD 分别为 0.62%、0.89%、0.89%。指纹图谱中有 12 个共有峰 (9 号峰为槲皮素, 11 号峰为山柰素, 12 号峰为异鼠李素), 相似度均大于 0.990。结论 提取金雀花时未进行石油醚脱脂可使色谱峰分离度良好, 回收率较高。

**关键词:** 金雀花; 槲皮素; 山柰素; 异鼠李素; 指纹图谱; HPLC

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 1001-1528(2016)10-2204-05

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2016.10.023

## Determination of three flavonoids in *Caragana sinica* and establishment of its fingerprints

WU Yu, LI Dong-yu, YAO Jun\*, CHENG Yu-feng\*  
(College of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, China)

**ABSTRACT:** **AIM** To determine the contents of quercetin, kaempferol and isorhamnetin in *Caragana sinica* (Buchoz) Rehd. by HPLC and to establish its fingerprints. **METHODS** The analysis of 75% ethanol extract of this plant was performed on a 30 °C thermostatic Waters C<sub>18</sub> column (150 mm × 4.6 mm, 5 μm), with the mobile phase comprising of methanol-0.4% phosphoric acid at a flow rate of 1.0 mL/min, and detected wavelength was set at 360 nm. Then the fingerprints of ten batches of samples were established. **RESULTS** Quercetin, kaempferol and isorhamnetin showed good linear relationships within the ranges of 0.01 - 0.1 mg/mL, 0.002 5 - 0.025 mg/mL and 0.002 5 - 0.025 mg/mL, whose average recoveries were 95.5%, 92.3% and 95.6% with the RSDs of 0.62%, 0.89% and 0.89%, respectively. There were twelve common peaks in the fingerprints (Peak 9 was quercetin, Peak 11 was kaempferol, and Peak 12 was isorhamnetin), whose similarities were all more than 0.990. **CONCLUSION** The extraction of *C. sinica* without petroleum degrease can make chromatographic peaks' separation better and recovery rate higher.

**KEY WORDS:** *Caragana sinica* (Buchoz) Rehd.; quercetin; kaempferol; isorhamnetin; fingerprints; HPLC

金雀花又名阿勒泰锦鸡儿、金孔雀, 为豆科蝶形花亚科锦鸡儿属植物锦鸡儿 *Caragana sinica* (Buchoz) Rehd. 的干燥成熟花, 株高 10 ~ 20 cm,

生长于海拔 2 000 ~ 3 000 m, 常生长于山坡向阳处, 具有耐贫瘠土壤、改善土质的优点, 可以在较为恶劣的环境下生长, 而在深厚肥沃湿润的砂质壤

收稿日期: 2016-01-13

基金项目: 新疆维吾尔自治区重大科技专项 (201130105)

作者简介: 武 钰 (1990—), 女, 硕士生, 研究方向为药物分析。Tel: 13201228538, E-mail: 563076127@qq.com

\* 通信作者: 姚 军 (1973—), 男, 博士, 副教授, 研究方向为药物质量标准。Tel: 18999250641, E-mail: xydiaojun@163.com  
程煜凤 (1976—), 女, 硕士, 高级实验师, 研究方向为药物分析。Tel: 15026080886, E-mail: 872716877@qq.com

土中生长更佳,其中阿勒泰锦鸡儿分布于阿勒泰、吉木乃等地,生长于阿尔泰山坡灌丛中<sup>[1-3]</sup>。金雀花的花和根均可入药,春季采花晒干,夏秋季挖根,直接洗净晒干或先除去木心切片后晒干,后者具有滋阴强壮、活血调经、祛风利湿、清肺健脾功效,而前者祛风活血,止咳化痰,滋阴健脾,在具有药用价值的同时,还有着观赏价值,是开发前景较大的野生资源<sup>[4-5]</sup>。

金雀花的主要成分包括黄酮、甾醇、萜、生物碱类,其中黄酮类是该植物的主要药效成分<sup>[6]</sup>。本实验采用 HPLC 法测定金雀花中 3 种黄酮类化合物槲皮素、山柰素、异鼠李素的含有量,并首次建立其指纹图谱,可对该药材进行质量控制。

## 1 仪器与试剂

1.1 仪器 Agilent 1220 LC 二元泵高效液相色谱仪; KQ-500DE 数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); BS110S 电子分析天平(北京赛多利斯天平有限公司); HH-S4 数显恒温水浴锅(金坛市医疗仪器厂)。

1.2 药品与试剂 槲皮素(批号 100081-201408)、山柰素(批号 110861-201310)、异鼠李素(批号 110860-201109)对照品均购自中国食品药品检定研究院。甲醇为色谱纯(美国 Fisher Scientific); 磷酸为优级纯(成都市科龙化工试剂厂); 乙醇为分析纯(天津市富宇精细化工有限公司)。10 批金雀花药材均购自于新疆阿勒泰地区,经新疆医科大学帕丽达·阿不力孜教授鉴定为正品,具体见表 1。

表 1 样品信息

Tab. 1 Informantion of samples

编号	采集地区	采集时间	样品编号
1	阿勒泰地区小东沟乡	2011 年 5 月	20110501
2	阿勒泰地区阿巴公乡	2011 年 5 月	20110502
3	阿勒泰地区小东沟乡	2012 年 6 月	20120603
4	阿勒泰地区小东沟乡	2012 年 5 月	20120504
5	阿勒泰地区小东沟乡	2013 年 5 月	20130505
6	阿勒泰地区阿巴公乡	2013 年 5 月	20130506
7	阿勒泰地区小东沟乡	2013 年 6 月	20130607
8	阿勒泰地区阿巴公乡	2013 年 6 月	20130608
9	阿勒泰地区小东沟乡	2014 年 5 月	20140509
10	阿勒泰地区阿巴公乡	2014 年 5 月	20140510

## 2 含有量测定

2.1 色谱条件 Waters C<sub>18</sub> 色谱柱(150 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相为甲醇-0.4% 磷酸(48:52); 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 30 °C; 检测波长 360 nm; 进样量 10 μL。

2.2 对照品溶液的制备 精密称取干燥至恒重的槲皮素、山柰素、异鼠李素对照品各 10 mg, 置于 10、10、50 mL 棕色量瓶中, 甲醇溶解并定容, 摇匀, 即得各对照品贮备液。精密量取 5.00、1.25、6.25 mL, 置于同一 25 mL 棕色量瓶中, 甲醇定容, 即得槲皮素、山柰素、异鼠李素质量浓度分别为 0.20、0.05、0.05 mg/mL 的混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备 称取金雀花约 10 g, 粉碎, 过 60 目筛, 精密称取粉末 1.0 g, 置于圆底烧瓶中, 加入 50 mL 75% 乙醇回流提取 1.5 h, 过滤, 残渣重复操作一次, 合并过滤液, 蒸干, 50 mL 甲醇-25% HCl (4:1) 溶解残渣, 回流水解 1.5 h, 过滤, 甲醇-25% HCl (4:1) 定容, 置于 50 mL 棕色量瓶中, 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 即得。

### 2.4 方法学考察

2.4.1 线性关系 精密吸取对照品溶液 0.5、1、2、3、4、5 mL, 置于 10 mL 棕色量瓶中, 流动相定容, 在“2.1”项色谱条件下测定, 以进样量为横坐标(X), 峰面积为纵坐标(Y)进行回归。结果, 槲皮素、山柰素、异鼠李素分别在 0.01 ~ 0.1、0.002 5 ~ 0.025、0.002 5 ~ 0.025 mg/mL 范围内线性关系良好, 回归方程分别为  $Y = 763\ 670\ 393X - 5\ 674\ 735$  ( $r = 0.999\ 1$ )、 $Y = 703\ 179\ 144X - 1\ 260\ 797$  ( $r = 0.999\ 1$ )、 $Y = 749\ 366\ 540X - 1\ 627\ 734$  ( $r = 0.999\ 6$ )。

2.4.2 精密度试验 取同一份对照品溶液, 在“2.1”项色谱条件下测定, 日内连续进样 5 次, 连续测定 5 d, 测得槲皮素、山柰素、异鼠李素日内峰面积 RSD 分别为 0.1%、0.2%、0.28%, 日间峰面积 RSD 分别为 3.0%、3.0%、2.9%, 表明仪器精密度良好。

2.4.3 重复性试验 精密称取同一批药材粉末 5 份, 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 在“2.1”项色谱条件下测定, 测得槲皮素、山柰素、异鼠李素含有量 RSD 分别为 1.57%、1.74%、1.89%, 表明该方法重复性良好。

2.4.4 稳定性试验 取同一份供试品溶液, 于 0、4、8、12、24 h 进样测定, 测得槲皮素、山柰素、异鼠李素峰面积 RSD 分别为 2.22%、4.95%、2.51%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.4.5 加样回收率试验 精密称取含有量已知的同一批药材粉末 6 份, 每份 1.0 g, 加入混合对照品溶液 2 mL (槲皮素、山柰素、异鼠李素质量浓度分别为 0.40、0.12、0.09 mg/mL), 按“2.3”项下方法

制备供试品溶液，计算回收率，结果见表2~4。

表2 槲皮素加样回收率试验结果 (n=6)

Tab. 2 Results of recovery tests for quercetin (n=6)

原有量/ mg	加入量/ mg	测得量/ mg	回收率/ %	平均回收 率/%	RSD/ %
0.811 6	0.800	1.570 2	94.90		
0.800 2	0.800	1.568 3	96.02		
0.805 0	0.800	1.575 1	96.29	95.50	0.62
0.810 6	0.800	1.570 8	95.09		
0.810 8	0.800	1.577 2	95.85		
0.802 3	0.800	1.562 3	95.02		

表3 山柰素加样回收率试验结果 (n=6)

Tab. 3 Results of recovery tests for kaempferol (n=6)

原有量/ mg	加入量/ mg	测得量/ mg	回收率/ %	平均回收 率/%	RSD/%
0.231 6	0.240	0.451 0	91.11		
0.237 8	0.240	0.458 9	92.09		
0.221 5	0.240	0.444 4	92.29	92.30	0.89
0.225 0	0.240	0.449 7	93.21		
0.243 8	0.240	0.464 4	92.05		
0.245 9	0.240	0.469 4	93.31		

表4 异鼠李素加样回收率试验结果 (n=6)

Tab. 4 Results of recovery tests for isorhmnetin (n=6)

原有量/ mg	加入量/ mg	测得量/ mg	回收率/ %	平均回收 率/%	RSD/%
0.188 2	0.180	0.357 1	94.10		
0.182 1	0.180	0.354 8	95.98		
0.187 1	0.180	0.360 4	96.45	95.60	0.89
0.180 1	0.180	0.351 3	95.13		
0.181 9	0.180	0.354 4	95.90		
0.183 5	0.180	0.356 2	96.02		

2.5 含有量测定 对10批样品进行含有量测定，每批测3次，结果见表5。

表5 含有量测定结果 (n=3)

Tab. 5 Results of content determination (n=3)

编号	槲皮素/%	山柰素/%	异鼠李素/%
1	0.072 6	0.021 4	0.017 1
2	0.113 1	0.030 3	0.020 8
3	0.108 8	0.028 9	0.020 3
4	0.117 5	0.031 5	0.021 5
5	0.116 5	0.031 1	0.021 2
6	0.081 2	0.024 4	0.018 3
7	0.075 5	0.022 6	0.017 5
8	0.078 4	0.023 3	0.017 8
9	0.125 3	0.033 8	0.022 3
10	0.121 1	0.032 4	0.021 8

### 3 HPLC 指纹图谱建立

3.1 色谱条件 Waters C<sub>18</sub> 色谱柱 (150 mm × 4.6 mm, 5 μm); 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 30 °C; 检测波长 360 nm; 进样量 10 μL; 流动相甲

醇-0.4% 磷酸，梯度洗脱 (0 ~ 20 min, 68 : 32 → 52 : 48; 20 ~ 40 min, 52 : 48; 40 ~ 50 min, 52 : 48 → 68 : 32); 所有组分均在 50 min 内被洗脱。

### 3.2 方法学考察

3.2.1 精密度试验 取同一批供试品溶液，连续进样6次，测得各主要色谱峰相对保留时间和相对峰面积比值的RSD均小于3.0%，表明仪器精密度良好。

3.2.2 稳定性试验 取同一批供试品溶液，于0、4、8、12、24 h 进样测定，测得各主要色谱峰相对保留时间和相对峰面积比值的RSD均小于3.0%，表明供试品溶液在24 h 内稳定性良好。

3.2.3 重复性试验 取同一批金雀花药材6份，每份1.0 g，测得各主要色谱峰相对保留时间和相对峰面积比值的RSD均小于3.0%，表明该方法重复性良好。

### 3.3 实验结果

3.3.1 参照峰的选择 根据所得指纹图谱 (图1)，选择12个主要共有特征峰。其中，9号峰为槲皮素，11号峰为山柰素，12号峰为异鼠李素。参考文献 [7-10]，将9号峰设定为参照峰，并将其作为内参比峰，具体见图2。

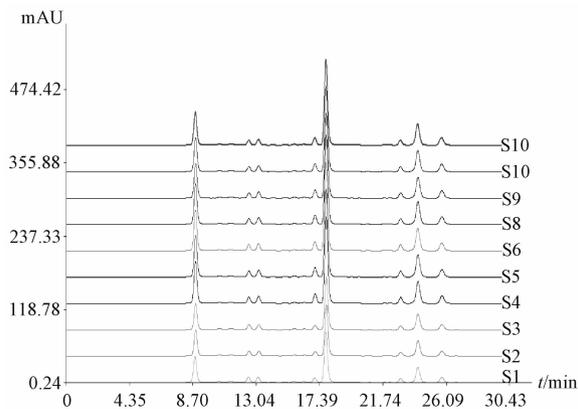


图1 10批样品 HPLC 指纹图谱

Fig. 1 HPLC fingerprints of ten batches of samples

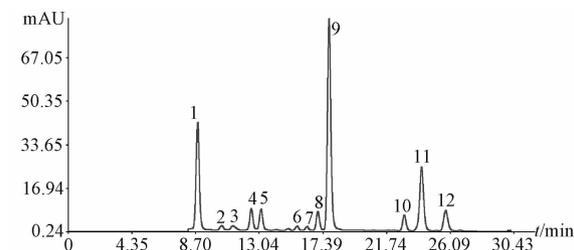


图2 HPLC 指纹图谱共有峰

Fig. 2 Common peaks of HPLC fingerprints

3.3.2 相对保留时间 选择槲皮素色谱峰保留时间作为参照,测得共有峰相对保留时间的RSD均小于1.0%,符合指纹图谱相关要求,具体见表6。

3.3.3 相对峰面积 选择槲皮素色谱峰峰面积作

为参照,计算共有峰相对峰面积,结果见表7。由表7和图1可知,HPLC指纹图谱的重复性较好,但共有峰相对峰面积有一定差异。

表6 共有峰相对保留时间

Tab. 6 Relative retention time of common peaks

峰号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	RSD/%
1	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0
2	0.59	0.59	0.59	0.59	0.59	0.59	0.59	0.59	0.59	0.59	0
3	0.63	0.63	0.63	0.63	0.63	0.63	0.63	0.63	0.63	0.63	0
4	0.70	0.70	0.70	0.70	0.70	0.70	0.70	0.70	0.70	0.70	0
5	0.74	0.74	0.74	0.74	0.74	0.75	0.74	0.74	0.74	0.74	0.42
6	0.88	0.88	0.88	0.88	0.88	0.87	0.88	0.88	0.88	0.88	0.36
7	0.92	0.92	0.92	0.92	0.92	0.91	0.92	0.92	0.92	0.92	0.34
8	0.96	0.96	0.96	0.96	0.96	0.95	0.96	0.96	0.98	0.96	0.77
9	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0
10	1.29	1.28	1.29	1.29	1.29	1.28	1.29	1.29	1.29	1.29	0.33
11	1.35	1.35	1.35	1.35	1.35	1.35	1.35	1.35	1.35	1.35	0
12	1.45	1.44	1.44	1.45	1.45	1.44	1.45	1.45	1.44	1.44	0.36

表7 共有峰相对峰面积

Tab. 7 Relative peak areas of common peaks

峰号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
1	0.51	0.50	0.48	0.47	0.46	0.45	0.46	0.40	0.39	0.48
2	0.05	0.05	0.04	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03
3	0.06	0.07	0.06	0.04	0.04	0.04	0.04	0.05	0.04	0.05
4	0.13	0.12	0.11	0.09	0.09	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08
5	0.13	0.13	0.12	0.10	0.10	0.09	0.09	0.09	0.09	0.09
6	0.04	0.04	0.04	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
7	0.04	0.04	0.04	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03
8	0.10	0.10	0.10	0.11	0.11	0.11	0.11	0.10	0.10	0.10
9	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
10	0.10	0.09	0.09	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.07	0.07
11	0.38	0.38	0.37	0.32	0.33	0.33	0.33	0.32	0.32	0.32
12	0.14	0.14	0.14	0.13	0.13	0.13	0.13	0.14	0.13	0.13

3.3.4 共有峰面积比值 对10批样品进行测定,测得共有峰面积比值均在90%~95%之间,符合指纹图谱相关规定。

3.3.5 指纹图谱相似度 采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2004年A版)进行测定,测得10批样品的相似度分别为0.993、0.994、0.995、0.998、0.998、0.999、0.999、0.994、0.993、0.992,表明该指纹图谱稳定,重复性好。

## 4 讨论

4.1 不同提取方法的考察 程煜凤等<sup>[11]</sup>采用石油醚脱脂后,再进行乙醇回流。但本实验发现,经石油醚脱脂后,槲皮素、山柰素和异鼠李素含有量的损失较大,回收率仅80%左右,这可能是因为在石油醚脱脂过程中,3种成分有少量溶解,故本实验未进行石油醚脱脂,色谱峰分离度良好,而且提

取方法回收率较高。

4.2 不同水解时间的考察 本实验对不同水解时间和方式进行了考察,发现室温下水解时样品的稳定性很差。再考察了1、1.5、2 h<sup>[12-15]</sup>回流水解时间,发现回流水解1.5 h后,样品稳定性良好,水解较完全,故本实验采用该方式处理。

4.3 含有量差异的原因 程煜凤等<sup>[11]</sup>所研究的金雀花采自阿勒泰地区清河县和富蕴县,两个县地理位置相差较远;本实验样品均采自新疆阿勒泰市阿巴公乡和小东沟乡,两个乡相邻,这可能是由于采集地不同,导致金雀花中黄酮含有量的差异。

## 参考文献:

[1] 余正文,杨占南,乙引. 贵州金雀花抑菌活性主要成分测定[J]. 贵州农业科学, 2006(5): 26-27.

- [2] 张小玲, 薛庆中, 金 川. 金雀花营养成分分析[J]. 园艺学报, 2004, 31(4): 504-505.
- [3] 徐 新, 巴哈尔古丽·黄尔汗. 哈萨克药志: 1卷[M]. 北京: 民族出版社, 2009: 21-23.
- [4] 周 刚, 吕庆红. 牡丹皮不同部位有效成分含量测定及指纹图谱化学成分研究[J]. 中国中药杂志, 2008, 33(18): 2070-2074.
- [5] 文 燕, 张 明, 廖志华, 等. 半夏药材 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中药材, 2008, 31(4): 32-35.
- [6] 杨申明, 王 波, 王振吉, 等. 金雀花总黄酮提取工艺优化及抗氧化性研究[J]. 浙江农业学报, 2015, 27(2): 278-284.
- [7] 孙 莲, 严寒信, 姑再努尔·阿布力孜. 桑枝中黄酮类的 HPLC 指纹图谱的研究[J]. 新疆医科大学学报, 2014, 37(3): 312-314.
- [8] 潘 涛, 欧阳波, 肖作奇. 高效液相色谱法同时测定产康乐颗粒中4种成分含量及指纹图谱[J]. 中国医院药学杂志, 2015, 35(13): 1191-1195.
- [9] 罗 曼, 周 兰, 申 璀, 等. 银翘解毒丸特征图谱初步研究[J]. 中成药, 2012, 34(11): 2162-2166.
- [10] 李宛蓉, 桂双英, 王举涛, 等. 不同产地大血藤药材指纹图谱研究及红景天苷和绿原酸的含量测定[J]. 安徽中医药大学学报, 2014, 33(6): 82-85.
- [11] 程煜凤, 王 丹, 李 莉. 金雀花的薄层鉴别及黄酮类化合物的含量测定[J]. 新疆医科大学学报, 2013, 36(8): 1094-1097.
- [12] 张 芳, 孙希芳, 张永清, 等. 金银花药材的 HPLC 指纹图谱及绿原酸、木犀草苷含量的同时测定[J]. 四川农业大学学报, 2014, 32(2): 154-159.
- [13] 刘 杰, 张 虹, 白红丽, 等. 红河野生金雀花中金属元素含量分析[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(21): 12861-12862.
- [14] 张 妮, 穆淑珍, 王家胜, 等. 金雀花提取物正丁醇沉淀部分化学成分研究[J]. 林产化学与工业, 2015, 35(3): 121-124.
- [15] 李婷婷, 舒志衡, 于 良, 等. 不同产地黄芪 HPLC/DAD 指纹图谱及主要黄酮成分含量测定[J]. 中国医院药学杂志, 2015, 35(17): 1182-1187.

## 黄连中 10 种重金属元素含量的不确定度评定

张颖婷, 林燕翔, 罗 轶, 谢培德, 陆敏仪  
(广西食品药品检验所, 广西南宁 530021)

**摘要:** 目的 评定黄连 *Coptis chinensis* Franch. 中 10 种重金属元素含有量的不确定度。方法 黄连粉碎后加硝酸和氢氟酸消解, 电感耦合等离子体质谱 (ICP-MS) 法测定其中 10 种重金属元素的含有量, 评定所得结果的不确定度。结果 Cr、Mn、Co、Ni、Cu、As、Cd、Ba、Tl、Pb 的不确定度分别为 0.28、14、0.054、0.20、2.1、0.017、0.10、3.3、0.009 4、0.33 mg/kg, 其质量浓度是不确定度的主要来源。结论 黄连标准曲线绘制过程中应选择较大量程的移液器, 并减少稀释步骤, 以提高准确性。

**关键词:** 黄连; 重金属元素; 不确定度; ICP-MS

中图分类号: R284.1

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2016)10-2208-08

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2016.10.024

## Uncertainty evaluation of contents of ten heavy metal elements in *Coptis chinensis*

ZHANG Ying-ting, LIN Yan-xiang, LUO Yi, XIE Pei-de, LU Min-yi

(Guangxi Institute for Food and Drug Control, Nanning 530021, China)

**ABSTRACT:** **AIM** To evaluate the uncertainties of contents of ten heavy metal elements in *Coptis chinensis* Franch. **METHODS** After being grinded, *C. chinensis* was added with nitric acid and hydrofluoric acid for digestion. The contents of ten heavy metal elements were determined by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS), then the uncertainties of obtained results were evaluated. **RESULTS** The uncertainties of Cr,

收稿日期: 2016-01-11

基金项目: 国家科技重大专项课题 (2014ZX09304307-002)

作者简介: 张颖婷 (1984—), 女, 主管药师, 从事中药质量分析。Tel: (0771) 5828468, E-mail: zhangyingting2005@126.com