

# 对2010年版《中国药典》山楂叶中总黄酮含量测定方法的商榷<sup>△</sup>

王肖<sup>1\*</sup>, 吴国成<sup>2</sup>, 李赛颖<sup>2</sup>, 沈莹<sup>2</sup>, 李艳春<sup>2</sup>, 潘海峰<sup>1#</sup> (1.承德医学院河北省中药研究与开发重点实验室, 河北承德 067000; 2.承德御室金丹药业有限公司, 河北承德 067000)

中图分类号 R284.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)35-3309-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.35.14

**摘要** 目的:探讨2010年版《中国药典》山楂叶中总黄酮含量的测定方法。方法:以芦丁为对照品,用紫外-可见分光光度法测定山楂叶中总黄酮的含量,并结合高效液相色谱法考察山楂叶中总黄酮含量测定方法的准确性。结果:B环无邻二酚羟基结构的黄酮类化合物,采用芦丁显色紫外-可见分光光度法测定总黄酮含量误差较大,也不是总黄酮含量测定的专属方法。结论:芦丁显色紫外-可见分光光度法测定山楂叶中总黄酮含量的方法值得商榷,建议将芦丁显色法和高效液相色谱法结合起来测定,这样会更科学、准确。

**关键词** 山楂叶;芦丁;总黄酮;紫外-可见分光光度法;高效液相色谱法;中国药典;商榷

## Discussion about the Method for Content Determination of Flavonoids in *Crataegi Folium* Stated in 2010 Edition of *Chinese Pharmacopoeia*

WANG Xiao<sup>1</sup>, WU Guo-cheng<sup>2</sup>, LI Sai-ying<sup>2</sup>, SHEN Ying<sup>2</sup>, LI Yan-chun<sup>2</sup>, PAN Hai-feng<sup>1</sup> (1.Hebei Key Laboratory of TCM R&D, Chengde Medical University, Hebei Chengde 067000, China; 2.Chengde Yushi Jindan Pharmaceutical Co., Ltd., Hebei Chengde 067000, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To discuss the method for the content determination of flavonoids in *Crataegi Folium* in *Chinese Pharmacopoeia* (2010 edition). METHODS: Using rutin as control, the content of flavonoids in *Crataegi Folium* was determined by ultraviolet-visible spectrophotometry, and the accuracy of the method was investigated by combined with HPLC. RESULTS: There were big error to determine the flavonoids content of structure without adjacent diphenol hydroxyl in B benzene ring by the ultraviolet-visible spectrophotometry, and it was also not the exclusive method. CONCLUSIONS: It is questionable to determine the content of total flavonoids in *Crataegi Folium* by the rutin colorimetric ultraviolet-visible spectrophotometry. So we suggest to use the method of rutin colorimetric method combined with HPLC. It is more scientific and accurate.

**KEY WORDS** *Crataegi Folium*; Rutin; Total flavonoids; Ultraviolet-visible spectrophotometry; HPLC; *Chinese Pharmacopoeia*; Discussion

2005、2010年版《中国药典》(一部)中山楂叶的总黄酮含量测定方法均采用芦丁显色法<sup>[1]</sup>。近几十年来,《中国中药杂志》《中草药》《中成药》等杂志中与总黄酮含量测定有关的论文多数也沿用此法。其基本原理为:黄酮类化合物多具有



结构。这类化合物在亚硝酸钠碱性溶液中,能与Al<sup>3+</sup>产生高灵敏度的橙红色配合物。另外,芦丁易得、价格低廉,也能在上述条件下显色,所以常以芦丁为对照品,采用紫外-可见分光光度法测定其含量<sup>[2]</sup>。此方法所需要的仪器简单、操作快捷方便,因此每年都有一定数量的论文或研究报告采用此法来考察总黄酮的提取工艺<sup>[3-4]</sup>等。但是,笔者在实验中发现,采用芦丁显色法得到的结果与采用高效液相色谱(HPLC)法得到的结果不一致,HPLC法在对已知成分的定性与定量方面更准确。因此,笔者认为药典中对山楂叶总黄

酮的含量测定方法值得商榷。

### 1 材料

#### 1.1 仪器

1200型HPLC仪,包括G1322A真空在线脱气机、G1311A四元泵、G1316A柱温箱、G1315D二极管阵列检测器、G1329A标准型自动进样器(美国安捷伦科技公司);Chemstation色谱工作站(美国安捷伦科技公司);紫外-可见分光光度计(惠普HP-8453);HC-2062高速离心机(合肥科大创新股份有限公司);KQ-700型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);AG-245型十万分之一电子分析天平(瑞士梅特勒-托利多公司)。

#### 1.2 试剂

牡荆素鼠李糖苷(批号:111668-200602)、芦丁(批号:100080-200707),均购自中国药品生物制品检定院,纯度均>99%,供含量测定用;牡荆素葡萄糖苷(批号:A0513),纯度>98%,购自成都曼思特生物科技有限公司,供含量测定用;甲醇、乙腈为色谱纯(Fisher Scientific,美国);水为娃哈哈纯净水,其他试剂均为分析纯。

#### 1.3 药材

本课题组所用山楂叶50%乙醇提取物,由承德御室金丹药业有限公司提供。

△基金项目:承德市科学技术研究与发展计划项目(No. 20101312)

\* 硕士研究生。研究方向:中药分析。电话:0314-2291186。E-mail:wangxiao881105@163.com

# 通信作者:副主任药师,硕士。研究方向:中药质量标准及中药分析。电话:0314-2291186。E-mail:phf2301@163.com

## 2 方法与结果

### 2.1 样品制备

将山楂叶50%乙醇提取物用水分散后,分别用氯仿、水饱和和正丁醇萃取,水饱和和正丁醇部分上聚酰胺柱,依次用水和10%、20%、30%、50%、70%、90%的甲醇溶液洗脱,收集20%、30%、50%甲醇提取液,蒸干,备用。

### 2.2 芦丁显色法测定总黄酮含量<sup>[1]</sup>

2.2.1 标准曲线的制备 精密称取于120℃干燥至恒重的芦丁对照品25 mg,置于50 ml量瓶中,加乙醇适量,超声处理使之溶解,放冷,加乙醇至刻度,摇匀。精密吸取20 ml,置于50 ml量瓶中,加水至刻度,摇匀,即得对照品溶液(每1 ml含无水芦丁0.2 mg)。精密量取对照品溶液1、2、3、4、5、6 ml,分别置于25 ml量瓶中,各加水至6 ml,加5%亚硝酸钠溶液1 ml,摇匀,放置6 min,加10%硝酸铝溶液1 ml,摇匀,放置6 min,加氢氧化钠试液10 ml,再加水至刻度,摇匀,放置15 min,以相应试剂为空白,按照紫外-可见分光光度法,在500 nm的波长处测定吸光度。以吸光度为纵坐标(y),浓度(x)为横坐标,绘制标准曲线。得标准曲线方程 $y=9.7083x-0.0082$ ( $r=0.9998$ )。

2.2.2 供试品溶液的制备 取样品0.15 g,精密称定,置于具塞锥形瓶中,精密加入稀乙醇25 ml,密塞,摇匀,超声处理,放置3 h以上,滤过;精密量取续滤液2 ml,置于25 ml量瓶中,用水稀释至刻度,摇匀,作为供试品溶液。

2.2.3 精密密度试验 精密吸取“2.2.1”项下对照品溶液2 ml,共6份,按“2.2.1”项下标准曲线的制备方法,自“加水至6 ml”起依法测定吸光度,RSD值为1.9%,低于3%,表明精密密度良好。

2.2.4 重复性试验 取20%甲醇提取物6份,每份0.15 g,精密称定,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.2.1”项下标准曲线的制备方法,自“加水至6 ml”起依法测定吸光度,RSD值为1.5%,低于3%,表明试验重复性良好。

2.2.5 稳定性试验 在室温条件下,取20%甲醇提取物供试品溶液2 ml,按“2.2.1”项下标准曲线的制备方法,自“加水至6 ml”起依法处理后放置0、20、40、60、90 min时测定吸光度,RSD值为1.3%,低于3%,表明样品溶液在90 min内稳定性良好。

2.2.6 样品测定 按“2.2.1”项下标准曲线的制备方法,自“加水至6 ml”起依法测定吸光度,从标准曲线上读出20%、30%、50%甲醇提取物供试品溶液的浓度,计算即得,结果见表1。

表1 不同方法测定山楂叶提取物中黄酮类化合物的含量( $n=3$ )

Tab 1 The contents of flavonoids in Crataegi Folium extract by different determination method( $n=3$ )

样品	HPLC法测得牡荆素葡萄糖苷含量,%	HPLC法测得牡荆素鼠李糖苷含量,%	芦丁显色法测得总黄酮含量,%
20%甲醇提取物	16.900	25.330	10.43
30%甲醇提取物	7.590	38.660	10.95
50%甲醇提取物	0.430	5.150	41.56

### 2.3 HPLC法测定牡荆素葡萄糖苷和牡荆素鼠李糖苷含量

2.3.1 色谱条件<sup>[5]</sup> 色谱柱:Agilent ZORBAX SB-C<sub>18</sub>(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:A为0.5%甲酸水溶液,B为乙腈,梯度洗脱(0~18 min,10%~18%B;18~24 min,18%~18%B;24~50 min,18%~35%B;50~65 min,35%~60%B);检测波长:340 nm;流速:1.0 ml/min;柱温:30℃;进样量:10 μl。

2.3.2 对照品溶液的制备 取牡荆素葡萄糖苷、牡荆素鼠李

糖苷各20 mg,精密称定,置于25 ml量瓶中,60%乙醇溶解定容,制成每1 ml含0.8 mg的混合对照品溶液,作为贮备液,备用。色谱见图1。

2.3.3 供试品溶液的制备 取样品50 mg,精密称定,置于50 ml量瓶中,加60%乙醇溶解并稀释至刻度,离心10 min(离心半径8 cm 12 000 r/min),上清液用0.45 μm滤膜过滤,续滤液作为供试品溶液,色谱见图2。

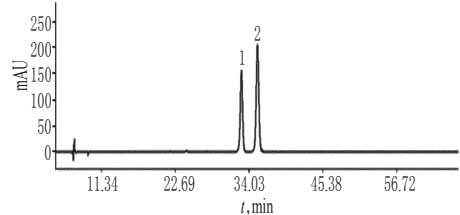


图1 对照品的HPLC图

1.牡荆素葡萄糖苷;2.牡荆素鼠李糖苷

Fig 1 HPLC chromatograms of substance control

1.vitexin-glucoside;2.vitexin-rhamnoside

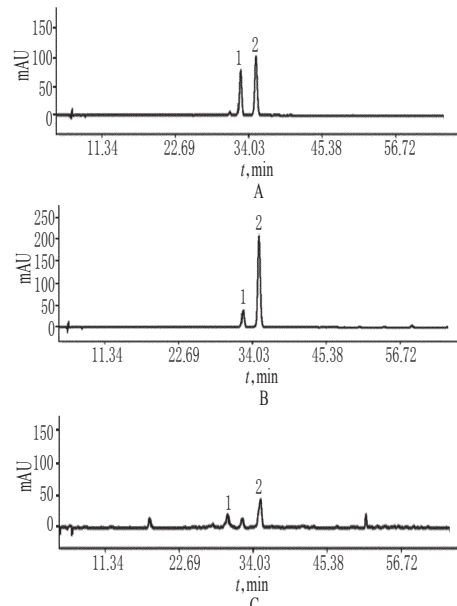


图2 20%、30%、50%甲醇提取物的HPLC图

A.20%甲醇提取物;B.30%甲醇提取物;C.50%甲醇提取物;1.牡荆素葡萄糖苷;2.牡荆素鼠李糖苷

Fig 2 HPLC chromatograms of 20%,30% and 50% methanol extraction

A.20% methanol extraction; B.30% methanol extraction; C.50% methanol extraction; 1.vitexin-glucoside; 2.vitexin-rhamnoside

2.3.4 线性关系考察。精密量取“2.3.2”项下对照品贮备液5 ml,置于10 ml量瓶中,甲醇定容,摇匀,作为2号溶液。按倍比稀释法制备3、4、5、6号溶液。分别进样10 μl,按“2.3.1”项下色谱条件测定峰面积。以浓度为横坐标(x),以峰面积为纵坐标(y),进行线性回归,得标准曲线方程为 $y_{\text{牡荆素葡萄糖苷}}=79532x-22.39$ ( $r=0.9999$ ),线性范围为0.025~0.80 mg/ml; $y_{\text{牡荆素鼠李糖苷}}=85619x-56.96$ ( $r=0.9999$ ),线性范围为0.025~0.800 mg/ml。

2.3.5 精密密度试验 精密吸取“2.3.2”项下对照品溶液10 μl,按“2.3.1”项下色谱条件连续进样6次,分别测定峰面积,计算牡荆素葡萄糖苷、牡荆素鼠李糖苷的RSD值,结果分别为

1.7%、1.3%，均低于3%，表明精密度良好。

2.3.6 重复性试验 取20%甲醇提取物6份，每份50 mg，精密称定，按“2.3.3”项下方法制备供试品溶液，按“2.3.1”项下色谱条件进行测定，计算牡荆素葡萄糖苷、牡荆素鼠李糖苷的RSD值，结果分别为1.2%、1.4%，均低于3%，表明试验重复性良好。

2.3.7 稳定性试验 在室温条件下，取20%甲醇提取物供试品溶液适量，按“2.3.1”项下色谱条件分别于0、4、8、12、16、24 h不同时间点进样测定，计算牡荆素葡萄糖苷、牡荆素鼠李糖苷的RSD值，结果分别为0.8%、0.7%，均低于3%，表明样品溶液在24 h内稳定性良好。

2.3.8 加样回收率试验 取已知含量的20%甲醇提取物6份，每份25 mg，精密称定，分别精密加入对照品牡荆素葡萄糖苷、牡荆素鼠李糖苷相当于25 mg 20%甲醇提取物所含的量，按“2.3.3”项下方法制备供试品溶液，按“2.3.1”项下色谱条件测定，计算回收率，结果见表2。

表2 2种黄酮类成分的加样回收率试验结果

Tab 2 Results of recovery tests of two flavonoids ingredients

黄酮成分	称样量, mg	样品中含量, mg	加入量, mg	测得量, mg	回收率, %	$\bar{x}$ , %	RSD, %
牡荆素葡萄糖苷	25.00	4.078	4.000	8.021	98.58	97.99	0.51
	25.02	4.323	4.000	8.248	98.13		
	25.01	4.193	4.000	8.098	97.63		
	25.01	4.288	4.000	8.183	97.36		
	25.02	4.305	4.000	8.209	97.60		
	25.01	4.223	4.000	8.169	98.65		
牡荆素鼠李糖	25.00	6.355	6.400	12.72	99.45	100.10	0.74
	25.02	6.283	6.400	12.69	100.1		
	25.01	6.325	6.400	12.72	99.92		
	25.01	6.298	6.400	12.67	99.56		
	25.02	6.353	6.400	12.76	100.1		
	25.01	6.363	6.400	12.87	101.7		

2.3.9 样品含量测定 按“2.3.3”项下方法制备20%、30%、50%甲醇提取物的供试品溶液，按“2.3.1”项下色谱条件测定牡荆素葡萄糖苷、牡荆素鼠李糖苷的含量，结果见表1。

### 3 讨论

由以上试验数据可知，20%、30%甲醇提取物中主要含有牡荆素葡萄糖苷和牡荆素鼠李糖苷，HPLC法测定的两者之和远高于用芦丁显色法测得的总黄酮数据。可见，HPLC法测定

的结果较准确，所以采用芦丁显色法测定总黄酮含量，误差较大。

通过查阅文献<sup>[9]</sup>笔者发现有类似报道：芦丁之所以能与亚硝酸钠-硝酸铝-氢氧化钠试剂（简称“亚硝酸钠硝酸铝试剂”）发生反应显红色，于500 nm波长左右有最大吸收，并不是因为芦丁是黄酮类化合物，而是因为芦丁的结构中B环有邻二酚羟基。而对于B环无邻二酚羟基的黄酮类化合物，如牡荆素葡萄糖苷、牡荆素鼠李糖苷、橙皮苷等并不与亚硝酸钠硝酸铝试剂反应生成红色，在500 nm波长左右无吸收或吸收较弱；另外，具有邻二酚羟基的非黄酮类化合物如咖啡酸、绿原酸等与亚硝酸钠硝酸铝试剂反应也能显红色，并在波长500 nm左右有最大吸收或吸收较强。因此，用芦丁显色法测定所有黄酮类成分含量是不科学的，也不是专属的方法。

由此，笔者认为，2010年版《中国药典》山楂叶、山楂叶提取物项下的总黄酮含量测定方法值得商榷。近年来，笔者对山楂叶的HPLC指纹图谱进行了系统研究，标定15个共有峰，其中7种成分已得到确认并能准确定量<sup>[6]</sup>，建议牡荆素、牡荆素葡萄糖苷、牡荆素鼠李糖苷采用HPLC法测定，其他黄酮类成分采用芦丁显色法测定，将HPLC法测得的3种成分含量与芦丁显色法测得的结果相加，得到的总黄酮含量更准确、可靠。

### 参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典：一部[S]. 2010年版. 北京：中国医药科技出版社，2010：30、372.
- [2] 梁生旺. 中药制剂分析[M]. 2版. 北京：中国中医药出版社，2011：335-336.
- [3] 徐金龙，张红梅，徐秀泉. 响应面分析法优化牡丹皮中总黄酮的提取工艺[J]. 中国药房，2011，22(27)：2 536.
- [4] 王领弟，李艳荣，张晓锋，等. 山楂叶指纹图谱研究[J]. 中国实验方剂学杂志，2011，17(19)：74.
- [5] 郭亚建，范莉，王晓强，等. 关于NaNO<sub>2</sub>-Al(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-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.
- [6] 潘海峰，王领弟，李艳荣，等. HPLC测定山楂叶中7种成分的含量[J]. 中药材，2012，35(6)：925.

(收稿日期：2012-11-23 修回日期：2013-06-21)

## 全国卫生援外工作暨援外医疗队派遣50周年会议在京召开

本刊讯 2013年8月15日，全国卫生援外工作暨援外医疗队派遣50周年会议在京召开。国家卫生和计划生育委员会主任李斌出席会议并作重要讲话，人力资源社会保障部副部长杨志明宣读了《关于表彰全国援外医疗工作先进集体和先进个人的决定》，外交部副部长翟隽、商务部国际贸易谈判副代表俞建华分别发表讲话。

李斌指出，党中央、国务院对卫生援外暨援外医疗队派遣工作高度重视，并作出一系列重要指示。2013年3月30日，习近平总书记在访问刚果(布)期间，亲切看望中国援外医疗队并发表重要讲话，首次精辟总结了崇高的中国医疗队精神，这就是“不畏艰苦，甘于奉献，救死扶伤，大爱无疆”。

李斌要求，要充分认识到援外医疗队工作的重大历史和现实意义。半个世纪以来，我国连续派出具有较高业务素质的医疗卫生人员承担援外医疗任务，为提高非洲人民的健康水平作出了重大贡献，有力推动了我国与非洲国家的友好合作，为树立我国良好的国际形象发挥了重要作用。广大援外医疗队员以高度负责的态度、高尚的医德和精湛的医疗技术，赢得了受援国政府和人民的高度评价，先后有1 000余名医疗队队员获得受援国政府颁发的各种嘉奖，有50名医疗队队员献出了宝贵的生命。中国援外医疗队队员卓有成效的工作和优秀表现，增进了我国与发展中国家的深厚情谊。