

姜洪芳, 石宝骏, 张峰伦, 等. 高效液相色谱法同时测定凤仙花中的萘醌类和黄酮类成分[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(12): 344–346.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2014.12.117

高效液相色谱法同时测定凤仙花中的萘醌类和黄酮类成分

姜洪芳^{1,2}, 石宝骏², 张峰伦², 赵伯涛², 施国新¹, 张卫明^{1,2}

(1. 南京师范大学, 江苏南京 210046; 2. 南京野生植物综合利用研究院, 江苏南京 210042)

摘要:建立反相高效液相色谱, 测定不同花色单瓣凤仙花和多重瓣茶凤仙茎、叶、花中指甲花醌、槲皮素、2-甲氧基-1,4-萘醌、山奈酚含量。采用 Agilent Eclipse XDB-C18 色谱柱, 乙腈-2.5% 乙酸水为流动相, 梯度洗脱进行分离, 检测波长 245 nm。指甲花醌、槲皮素、2-甲氧基-1,4-萘醌、山奈酚在选定浓度范围内线性关系良好, 平均回收率分别为 101.3%、98.93%、101.17%、101.59%, *RSD* 分别为 0.986%、1.96%、2.37%、1.27%, 该方法简单、快速、准确, 可作为凤仙花中萘醌类和黄酮类物质同时测定的方法。

关键词:凤仙花; 萘醌; 黄酮; 高效液相色谱法

中图分类号: O657.7⁺2

文献标志码: A

文章编号: 1002-1302(2014)12-0344-03

凤仙花 (*Impatiens balsamina* L.) 为凤仙花科 (Balsaminaceae) 凤仙花属 (*Impatiens*) 一年生草本植物。凤仙花属共有植物 900 余种, 全球均有分布。凤仙花作为观赏植物在国内外均有种植, 也是该属植物的常见品种, 其花、茎、叶、种子在民间有悠久的药用历史, 被广泛用于治疗腰腿痛、蛇咬伤、鹅掌风、风湿性关节炎、痈疽疮疖、胎衣不下、溃疡日久不愈和经闭腹痛等, 2010 年版《中国药典》记载其种子急性子作为药用部位。凤仙花的化学成分主要有黄酮、萘醌、香豆素、有机酸、花青素和甾醇类, 其中黄酮和萘醌有很强的抗炎、抗菌、抗过敏和抑制 Wnt 信号通道等活性; 据报道指甲花醌和 2-甲氧基-1,4-萘醌是该植物抗细菌和抗真菌的活性成分, 2-甲氧基-1,4-萘醌具有很强的对抗 HepG2 细胞的抗肿瘤活性^[1-3]。国内外已有文献报道, 用高效液相色谱法 (HPLC) 分别定量测定凤仙花中的黄酮和萘醌类成分^[4-7], 但对于 2 类成分含量的同时测定还未见报道, 本研究应用 HPLC 对常见品种单瓣凤仙花和多重瓣茶凤仙在 7 月盛开期的茎、叶、花中指甲花醌、2-甲氧基-1,4-萘醌、槲皮素、山奈酚进行了测定, 为该属植物的开发应用提供技术依据。

1 材料与方法

1.1 材料

高效液相色谱仪 Agilent 1200 HPLC (美国安捷伦公司生产), G1354A 四元泵, G1313A 自动脱气机, G1316 柱温箱,

收稿日期: 2014-07-18

基金项目: 国家科技支撑计划 (编号: 2012BAD36B01)。

作者简介: 姜洪芳 (1974—), 女, 博士研究生, 副研究员, 从事天然产物活性物质应用与开发。E-mail: jhf74@163.com。

通信作者: 张卫明, 研究员, 从事植物活性物质的应用与开发。E-mail: botanyzh@163.com。

G1315B 二极管阵列检测器。KQ-600DE 型超声波清洗器, 江苏省昆山市超声仪器有限公司生产; 高效液相色谱 (HPLC) 分析用甲醇、乙腈为色谱纯 (美国天地); 试验用水为超纯水, 提取用试剂均为分析纯。

对照品包括指甲花醌、2-甲氧基-1,4-萘醌、槲皮素、山奈酚, 均购于中国食品药品检定研究院, 纯度大于 98%。单瓣凤仙花及多重瓣茶凤仙的茎、叶、花均于 2012 年 7 月采自南京, 经南京野生植物研究院张玖教授鉴定为凤仙花 (*Impatiens balsamina* L.)。

1.2 HPLC 分析条件

Agilent Eclipse XDB-C₁₈ 分离柱 (4.6 mm × 150 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-2.5% 醋酸水, 梯度洗脱条件: 0~10 min, 25:75; 10~20 min, 32:68; 20~35 min, 25:75, 流速 1.0 mL/min, 进样量 20 μL, 柱温为 25 °C, DAD 检测器, 检测波长 245、250、280、360 nm。

1.3 对照品溶液的制备

分别称取指甲花醌、2-甲氧基-1,4-萘醌、槲皮素、山奈酚对照品 10 mg, 精确称定, 甲醇溶解并定容, 稀释成浓度为 50、40、25、12.5、10、6.25、3.12 μg/mL 的溶液, 经 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 供 HPLC 测定, 并绘制每种物质的标准曲线。

1.4 供试品溶液的制备

称取样品粉末 (50 °C 烘干 12 h, 磨碎过 40 目筛) 5.0 g, 精确称定, 加入 55% 乙醇水溶液 80 mL, 室温浸泡 2 h, 超声提取 1 h, 定容至 100 mL, 滤液经 0.45 μm 的微孔滤膜过滤, 供 HPLC 测定。

2 结果与分析

2.1 标准品与样品的 HPLC 测定

在“1.2”节色谱条件下, 样品中指甲花醌、槲皮素、2-甲

[9] Du D, Wang L M, Shao Y Y, et al. Functionalized graphene oxide as a nanocarrier in a multienzyme labeling amplification strategy for ultrasensitive electrochemical immunoassay of phosphorylated p53 (S392) [J]. Analytical Chemistry, 2011, 83(3): 746–752.

[10] Teng Y Q, Zhang X A, Fu Y, et al. Optimized ferrocene-functionalized ZnO nanorods for signal amplification in electrochemical immunoassay of *Escherichia coli* [J]. Biosensors and Bioelectronics, 2011, 26(12): 4661–4666.

氧基-1,4 萘醌、山奈酚色谱峰的保留时间与对照品一致,4 种成分的色谱峰均能得到较好的分离,样品其他成分对欲测成分的测定无干扰(图 1)。

2.2 线性关系分析

将不同梯度浓度的混合对照品溶液分别进样,进样量为 20 μL,以峰面积 *y* 为纵坐标,进样质量浓度 *x* (μg/mL) 为横坐标绘制标准曲线,结果见表 1。

2.3 精密度试验

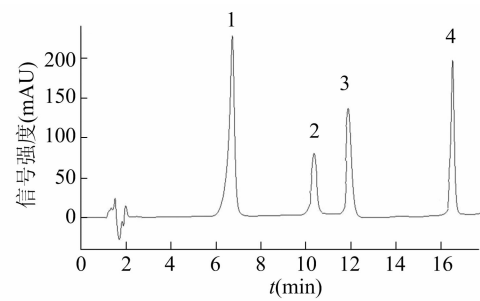
准确吸取 25 μg/mL 指甲花醌、2-甲氧基-1,4 萘醌、槲皮素、山奈酚混合对照品溶液 20 μL,按照“2.3”节建立的方法进行检测,重复测定 3 次,记录保留时间和峰面积,计算各个化合物的相对标准差(*RSD*),均小于 1.5%(表 2),表明仪器精密度良好。

2.4 重复性试验

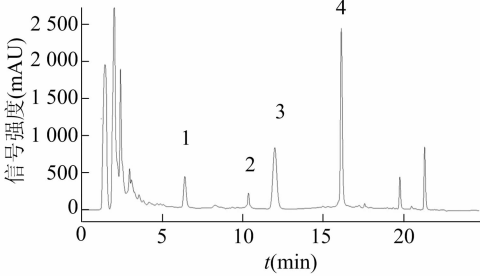
精确称取红色凤仙花叶子粉末 5.002 3 g,共 5 份,按照“2.2”节方法制备供试品溶液,再按照“2.3”节建立的方法进行检测,重复测定 3 次,记录各化合物峰面积,计算得到各化合物含量的 *RSD* 为 1.15%~2.37%(表 3),表明该方法的重现性良好。

2.5 稳定性试验

供试品溶液于配制后 4、10、14、24 h 分别进样,记录峰面



A. 混合对照品



1—指甲花醌; 2—槲皮素; 3—2-甲氧基-1,4萘醌; 4—山奈酚

B. 凤仙花样品

图1 不同混合对照品及凤仙花样品HPLC的测定

表 1 凤仙花中不同化合物的线性方程

化合物	质量浓度 (μg/mL)	保留时间 (min)	线性方程	相关系数
指甲花醌	3.25~52.00	6.6	$y=98.21x+83.96$	0.997
槲皮素	7.00~56.00	10.5	$y=40.30x-258.10$	0.997
2-甲氧基-1,4 萘醌	3.625~58.000	12.1	$y=94.36x-13.34$	0.998
山奈酚	3.625~58.000	16.4	$y=57.37x+31.05$	0.994

表 2 凤仙花中不同化合物的保留时间和峰面积精密度

化合物	保留时间		峰面积	
	均值 (min)	<i>RSD</i> (%)	均值	<i>RSD</i> (%)
指甲花醌	6.8	0.45	2 986	0.87
槲皮素	10.7	0.62	1 238	1.23
2-甲氧基-1,4 萘醌	12.3	0.66	2 784	1.16
山奈酚	16.5	0.83	1 610	1.35

注:*n*=3。

积,结果峰面积 *RSD* 分别为指甲花醌 1.35%、槲皮素 2.36%、2-甲氧基-1,4 萘醌 2.53%、山奈酚 2.36%,表明样品在 24 h 内稳定。

2.6 加标回收率

精确称取已知含量的红色凤仙花的叶子 3 份,按照

表 4 红色凤仙花叶子的回收率试验结果

化合物	回收率 (%)			<i>RSD</i> (%)
	第 1 天	第 2 天	第 3 天	
指甲花醌	100.21±1.35	102.13±1.23	101.56±1.15	101.30±0.99
槲皮素	96.73±1.28	99.58±1.52	100.48±2.32	98.93±1.96
2-甲氧基-1,4 萘醌	98.57±1.07	101.73±1.61	103.21±0.96	101.17±2.37
山奈酚	100.26±1.85	101.72±2.18	102.79±1.56	101.59±1.27

注:*n*=3。

表 3 红色凤仙花叶子中不同化合物的含量

化合物	含量均值 (%)	<i>RSD</i> (%)
指甲花醌	0.204 8	1.15
槲皮素	0.074 6	1.87
2-甲氧基-1,4 萘醌	0.078 3	2.37
山奈酚	0.083 2	2.16

注:*n*=5。

“2.2”节方法制备供试品溶液,分别加入 50、25、12.5 μg/mL 指甲花醌、槲皮素、2-甲氧基-1,4 萘醌、山奈酚混合对照品溶液,按样品测定项下方法进行操作,每个浓度每天测定 3 次,连续测定 3 d,取其平均值,计算回收率(表 4)。

2.7 样品测定

按照“2.2”节及“2.3”节的方法操作,测定不同凤仙花样品的指甲花醌、槲皮素、2-甲氧基-1,4 萘醌、山奈酚峰面

积,按照“表 1”中的标准方程计算出各种化合物的含量,结果见表 5。

表 5 凤仙花中萘醌及黄酮化合物含量

凤仙花 花样	化合物含量(%)											
	指甲花醌			2-甲氧基-1,4 萘醌			槲皮素			山奈酚		
	茎	叶	花	茎	叶	花	茎	叶	花	茎	叶	花
白色	0.201	0.690	0.258	0.061	0.081	0.836	0.046	0.175	0.133	0.053	0.368	0.714
紫色	0.832	0.214	0.321	0.194	0.045	0.258	0.031	0.141	0.131	0.096	0.177	0.653
红色	0.117	0.207	0.236	0.182	0.080	0.626	0.055	0.073	0.158	0.074	0.076	0.603
粉紫色	0.071	0.342	0.302	0.004	0.042	0.632		0.087	0.135	0.028	0.102	0.362
多重花瓣	0.484	0.090	0.337	0.084	0.006	0.135	0.061	0.067	0.100	0.128	0.189	0.765

指甲花醌含量在凤仙花的叶、花中较高,多数集中在 0.2%~0.7% 之间,在紫色凤仙花的茎中含量最高,为 0.832%,多重瓣茶凤仙的茎中含量为 0.484%;2-甲氧基-1,4 萘醌普遍分布在花中,以白色凤仙花中为最高,达 0.836%;可见,萘醌类在植株中的总量以白色凤仙花最高,为 2.127%,紫色凤仙花位居第 2,为 1.864%,多重瓣茶凤仙最低,为 1.136%。槲皮素主要分布在叶和花中,以白色凤仙花的叶子为最多,达 0.175%;山奈酚主要分布在各色凤仙花的叶和花中,多重瓣茶凤仙含量最高,达 0.765%,白色凤仙花中为 0.714%;以槲皮素和山奈酚为代表的黄酮类物质在植株中的总量以白色凤仙花最高,达 1.489%,多重瓣茶凤仙花和紫色凤仙花分别为 1.310%、1.229%,粉紫色凤仙花最低,为 0.714%。

3 讨论与结论

3.1 提取溶剂的优化

为了使供试品溶液获得最佳的提取率,参照文献[4-7],应用 HPLC 法比较水、55% 乙醇、95% 乙醇、乙酸乙酯室温下对红色凤仙花叶子浸泡提取的指甲花醌、2-甲氧基-1,4 萘醌、槲皮素、山奈酚的含量,以 55% 乙醇溶液为溶剂能够将 4 种物质最大量地提取出来。

3.2 HPLC 检测波长的选择

由于指甲花醌、2-甲氧基-1,4 萘醌、槲皮素、山奈酚的最大吸收波长不完全一致,如指甲花醌、2-甲氧基-1,4 萘醌最大吸收波长为 250、280、350 nm,其中 350 nm 处的吸光度比较弱,槲皮素最大吸收波长为 255、370 nm,山奈酚最大吸收波长为 266、367 nm^[5-7],在 HPLC 分析中,DAD 检测器设置了 245、250、280、360 nm 多通道检测模式,结果表明,4 个化合物在 245 nm 处的峰面积均高于其他波长处的峰面积,所以选择 245 nm 作为液相色谱分析的检测波长,从而提高了检测方法的灵敏度。

3.3 HPLC 流动相的确定

通过 HPLC 分析条件的筛选,有利于在最短的时间内将

复杂组份完全分离,特别是有多多个样品需要分析时。用甲醇-水、乙腈-水对凤仙花的叶子提取物进行分析,结果显示乙腈-水分离效果优于甲醇-水,缩短了分离时间,将 2.5% 醋酸加入到水中,可以将欲分离的萘醌类物质与黄酮类物质达到基线分离,同时进行定量测定。

从总体来看,白色凤仙花的萘醌类和黄酮类物质含量较高,国外大量研究也是围绕白色凤仙花开展的,但紫色、粉紫色及多重瓣茶凤仙中也含有较高的活性物质,可以作为药用植物进行研究与应用。生长环境、采收时间、种植资源等因素都会影响植物次生代谢产物的含量,可以利用能增加次生代谢产物的有利因素,进行组织培养,增加次生代谢产物的含量。

本试验建立了 HPLC 同时测定凤仙花中指甲花醌、2-甲氧基-1,4 萘醌、槲皮素、山奈酚含量的方法,该方法可同时测定萘醌、黄酮 2 类成分,可用于凤仙花药材的质量控制。

参考文献:

[1] 鞠培俊,孔德云,李晓波. 凤仙花化学成分及药理作用研究进展[J]. 沈阳药科大学学报,2007,24(5):320-324.
[2] 苏秀芳,蓝金. 凤仙花的化学成分及药理活性研究进展[J]. 广西民族师范学院学报,2010,27(3):13-15.
[3] 胡喜兰,朱慧,刘存瑞,等. 凤仙花的化学成分研究[J]. 中成药,2003,25(10):833-834.
[4] 郝治湘,刘玉芬,周丽华. 反相高效液相色谱法测定凤仙花中芦丁、槲皮素和山奈酚的含量[J]. 化工时刊,2006,20(10):42-43,49.
[5] 胡喜兰,韩照祥,刘玉芬,等. 凤仙花不同提取物中山奈酚的测定[J]. 分析实验室,2007,26(5):33-35.
[6] Lobstein A, Brenne X, Feist E, et al. Quantitative determination of naphthoquinones[J]. Phytochemical Analysis,2001,12:202-205.
[7] Sakunphueak A, Panichayupakaranant P. Simultaneous determination of three naphthoquinones in the leaves of *Impatiens balsamina* L. by reversed-phase high-performance liquid chromatography[J]. Phytochemical Analysis,2010,21(5):444-450.