

HPLC 法测定玫瑰花中原花青素 B₂ 的含量

彭慧敏¹, 牟宗慧², 刘红燕¹, 丁凤伟¹, 彭艳丽¹

(1. 山东中医药大学药学院, 山东 济南 250355; 2. 山东交通医院, 山东 济南 250031)

[摘要] 目的: 测定不同来源玫瑰花中原花青素 B₂ 的含量。方法: 色谱柱: Phenomenex Luna (250 mm×4.6 mm, 5 μm) C₁₈ 柱; 柱温: 30 ℃; 流速: 1 ml·min⁻¹; 检测波长: 280 nm。流动相条件: 梯度洗脱: A: 2%冰醋酸, B: 甲醇; 0~15 min, 8%~10%B; 15~40 min, 10%B; 40~45 min, 10%~20%B。结果: 原花青素 B₂ 在 51.4~154.2 μg·ml⁻¹ 范围内线性关系良好。回收率为 98.35%(n=5)。结论: 该方法简便、准确、重复性好, 可用于测定玫瑰花原花青素 B₂ 的含量。

[关键词] 玫瑰花; 原花青素 B₂; 高效液相色谱法; 含量测定

[中图分类号] R284.4 [文献标识码] A [文章编号] 1007-659X(2011)02-0180-02

玫瑰花是蔷薇科植物玫瑰 *Rosa rugosa* Thumb. 的干燥花蕾, 具有行气活血、开窍化痰、疏肝醒脾的功效^[1-4]。玫瑰花中含有多种原花青素(PC), 原花青素是一类属于双黄酮衍生物的天然多酚化合物^[5], 它对 70 多种疾病具有直接或间接的预防治疗作用, 具有广泛的生化和药理活性, 具有保护心血管、预防高血压、抗肿瘤、抗辐射、抗突变及美容等作用^[6-8]。国外以原花青素作为主要活性成分的药剂、食品营养补充剂已经深入人们的日常生活^[9]。

《中国药典》2005 版中只对玫瑰花的浸出物、水分、总灰分等常规实验做了规定, 而 2010 版未做任何指标性项目的增加。随着玫瑰花新的药理作用的研究报道, 玫瑰花中原花青素类物质的临床试验研究越来越多, 已经引起了人们的广泛关注。其中二聚体在各类原花青素中分布最广, 抗氧化活性最强, 是最重要的一类。二聚体因 2 个单体的构象或缩合键位不同, 有多种异构体, 现已鉴定的 8 种异构体命名为 B₁~B₈, B₁~B₄ 由 C₄-C₈ 键合, B₅~B₈ 由 C₄-C₆ 键合。在 8 种异构体中原花青素 B₂ 是活性最强的一个二聚体^[10-11]。故本实验运用 HPLC 法对玫瑰花原花青素 B₂ 进行了定量分析, 为玫瑰花质量标准的制定提供一定的参考依据。

1 实验仪器和材料

1.1 仪器 RE-52AA 旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂); UV-752N 紫外分光光度计(上海精密科学仪器有限公司); Agilent1100 高效液相色谱仪; 色谱柱: Phenomenex Luna (250 mm×4.6 mm, 5 μm) C₁₈ 柱; AB-8 型大孔树脂(天津市光复精细化学工业研究所); 电子天平(赛多利斯科学仪器(北京)有限公司)。

1.2 材料 干玫瑰花, 平阴产丰花(经山东中医药

大学药学院生药学教研室彭艳丽教授鉴定为丰花玫瑰花); 原花青素 B₂ 标准品(质量分数 > 95%); 甲醇(一级色谱纯); 实验用水为娃哈哈纯净水; 其余化学试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱: Phenomenex Luna (250 mm×4.6 mm, 5 μm) C₁₈ 柱; 流动相: 2%冰醋酸水溶液-甲醇, 梯度洗脱, 洗脱时间程序见表 1; 进样量: 20 μl; 检测波长: 280 nm; 流速: 1 ml·min⁻¹; 柱温: 30 ℃。色谱图见图 1~2。

表 1 线性梯度洗脱的时间程序				
时间(t/min)	0	15	40	45
甲醇(%)	8	10	10	20
2%冰醋酸(%)	92	90	90	80

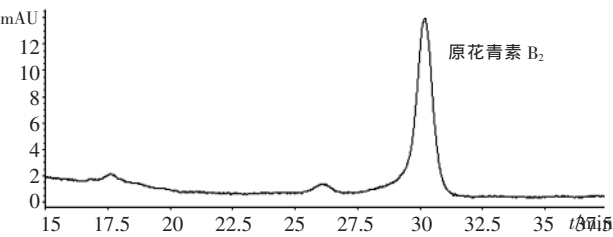


图 1 标准品的 HPLC 图谱

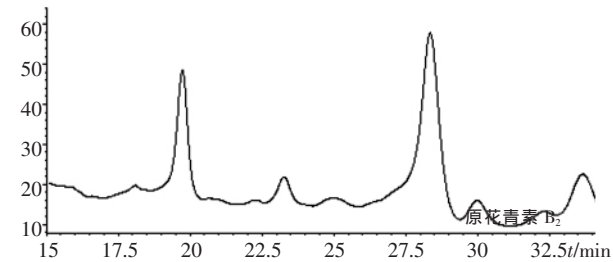


图 2 玫瑰花的 HPLC 图谱

2.2 实验方法

2.2.1 对照品溶液的制备 精密称取原花青素 B₂ 标准品 5.14 mg, 置 10 ml 的容量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 配制成 514 μg·ml⁻¹ 的原花青素 B₂ 的标准储备液, 再精密吸取 1 ml、1.5 ml、2 ml、2.5 ml、

[收稿日期] 2010-06-12
[基金项目] 山东省自然科学基金项目(ZR2009CM106)
[作者简介] 彭慧敏(1983-), 女, 山东菏泽人, 2008 年硕士研究生, 研究方向: 生药质量控制及品质评价。
[通讯作者] 彭艳丽(1956-), 教授, E-mail: pyl567@163.com。

3 ml 的原花青素 B₂ 的标准储备液, 用甲醇稀释到 10 ml, 配成 51.4 μg·ml⁻¹、77.1 μg·ml⁻¹、102.8 μg·ml⁻¹、128.5 μg·ml⁻¹、154.2 μg·ml⁻¹ 的原花青素 B₂ 的标准溶液, 用装有 0.22 μm 微孔滤膜的滤器进行过滤, 弃去初滤液, 即得。

2.2.2 样品溶液的制备 精密称取 1.0 g 玫瑰花粉末, 以 60%乙醇作为溶剂, 以 40:1 的液料比, 在 30 ℃条件下超声提取 10 min, 抽滤, 低温减压蒸发浓缩, 浓缩液溶于蒸馏水得原花青素 B₂ 粗提物。然后在处理好的 AB-8 型大孔树脂的层析柱 (20 cm×1 cm) 上样, 上样量为 25 ml, 上样后先用 3BV 的蒸馏水洗至洗脱液无色, 再用 3BV40%的乙醇洗脱, 洗脱速度为 1 ml·min⁻¹, 收集洗脱液, 将洗脱液低温旋转蒸发浓缩, 将洗脱液蒸干后用甲醇稀释溶解定容到 10 ml, 制成经大孔树脂吸附纯化后的玫瑰花原花青素 B₂ 的提取物。用装有 0.22 μm 微孔滤膜的滤器进行过滤, 弃去初滤液, 备用。

2.2.3 标准曲线及线性范围 取上述标准系列溶液各 20 μl 进样, 测得峰面积, 以原花青素 B₂ 标准品的峰面积 (Y) 对于浓度 (X) 进行回归, 得标准曲线为: $Y=5.3277X+5.9613$, $R_2=0.9998$ 。在 51.4 ~ 154.2 μg·ml⁻¹ 范围内, 对照品浓度与峰面积呈良好线性关系, 见图 3。

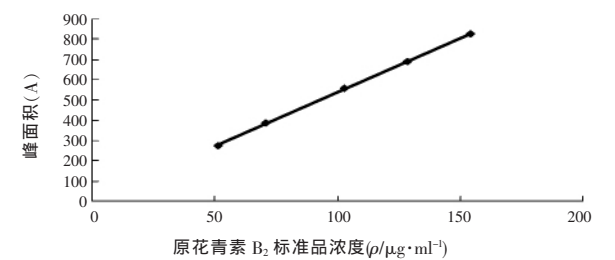


图 3 原花青素 B₂ 标准曲线图

2.2.4 精密度试验 取上述标准溶液 (102.8 μg·ml⁻¹), 重复进样 5 次, 测得其峰面积, $RSD=0.29\%$ 。测定结果表明精密度良好。

2.2.5 重复性试验 取制备好的样品溶液的续滤液 20 μl 连续进样 5 次, 测得峰面积, $RSD=1.47\%$ 。测定结果表明重复性良好。

2.2.6 稳定性试验 取上述对照品溶液 (102.8 μg·ml⁻¹), 分别于 0 h、2 h、4 h、8 h、12 h, 测定 1 次, 计算其峰面积的 $RSD(n=5)$ 为 0.49%。结果表明对照品在 12 h 内稳定性较好。

2.2.7 回收率 准确加入已知浓度原花青素 B₂ 标准品 2.5 ml, 再准确加入相同浓度的原花青素 B₂ 标准品 2 ml, 甲醇定容至 10 ml, 用装有 0.22 μm 微孔滤膜的滤器进行过滤, 弃去初滤液, 取 20 μl 续滤液以备进样, 测得峰面积, 代入回归方程, 求得相对应的原花青素 B₂ 的浓度。结果平均回收率为 98.35%, $RSD=1.24\%(n=5)$ 。

2.2.8 样品含量测定 各样品按 2.2.2 项下制备

成供试液, 按 2.1 色谱条件下测定其峰面积, 利用标准曲线计算样品中原花青素 B₂ 的含量, 结果见表 2。

表 2 样品测定结果

编号	品种名称	产地	采收时间	原花青素 B ₂ (%)
1	平阴一号	平阴玫瑰研究所种质资源圃	2008-05	0.058
2	平阴二号	平阴玫瑰研究所种质资源圃	2008-05	0.088
3	平阴三号	平阴玫瑰研究所种质资源圃	2008-05	0.077
4	平阴四号	平阴玫瑰研究所种质资源圃	2008-05	0.079
5	平阴十一号	平阴玫瑰研究所种质资源圃	2008-05	0.075
6	平阴十二号	平阴玫瑰研究所种质资源圃	2008-05	0.075
7	丰花	平阴县玫瑰镇西胡村	2008-05	0.108
8	传统	平阴县玫瑰镇西胡村	2008-05	0.096
9	紫枝	平阴县玫瑰镇西胡村	2008-05	0.033
10	大红花	定陶县黄店镇朱庄村	2008-05	0.057
11	单县	单县莱河镇帅楼村	2008-05	0.042

3 讨论

本实验运用 HPLC 法对玫瑰花原花青素提取物进行了定性定量分析。结果显示: 玫瑰花原花青素提取物中存在原花青素 B₂, 且分析了山东产地的 11 个品种的玫瑰花含量, 其中丰花的含量最高, 紫枝的含量最低。结果为: 标准曲线为 $Y=5.3277X+5.9613$, $R_2=0.9998$, 在标准品浓度为 51.4 ~ 154.2 μg·ml⁻¹ 范围内, 线性关系良好。回收率为 98.35%($n=5$)。最低检出限为 3.212 μg·ml⁻¹, 结果显示该方法适合用于分析玫瑰花原花青素提取物。为今后考察各产地和全国范围内的玫瑰花原花青素 B₂ 的质量标准提供了理论依据和实验参考资料。

[参考文献]

[1] 李斌, 宣景宏, 孟宪军. 玫瑰的价值及玫瑰花精油的开发前景[J]. 北方园艺, 2005(4): 58-59.

[2] 胡静. 玫瑰花总原花青素的分离纯化及分析[D]. 浙江: 浙江大学药学院, 2006.

[3] 葛尔宁. 玫瑰花和月季花中槲皮苷含量的 HPLC 法测定[J]. 浙江中医药大学学报, 2007, 31(2): 207-208.

[4] 金敬宏. 玫瑰的综合开发[J]. 中国野生植物资源, 2000, 19(6): 21-24.

[5] 温普红, 王晓玲, 杨得锁. 葡萄籽中花色素的分离研究[J]. 精细化工, 2001, 18(4): 218-219.

[6] 赵超英, 姚小曼. 葡萄籽提取物原花青素的营养保健功能[J]. 中国食品卫生杂志, 2000, 12(6): 38-41.

[7] 余莹, 栗武, 魏东芝. 原花青素体外清除自由基活性的研究[J]. 华东理工大学学报, 2002, 28(3): 318-320.

[8] 凌智群, 张晓辉, 谢笔钧, 等. 原花青素的药理学研究进展[J]. 中国药理学通报, 2002, 18(1): 9-12.

[9] 苏蕾. 原花青素保健功能研究概述[J]. 山东师范大学学报: 自然科学版, 2007, 22(3): 113-114.

[10] 陈召桂, 卢艳花, 魏东芝. HPLC 测定葡萄籽提取物中原花青素 B₂ 的含量[J]. 中成药, 2007, 29(11): 1545-1547.

[11] 步文磊, 王茵. 原花青素的生物活性及作用机制研究进展[J]. 国外医学·卫生学分册, 2007, 34(5): 311-315.