

HPLC法同时测定不同产地满山红中 4种黄酮成分的含量*

梁泰刚, 孟旭鹏, 赵承孝, 班树荣, 李青山**

(山西医科大学药学院, 太原 030001)

摘要 目的: 建立同时测定满山红药材中金丝桃苷、槲皮素、山柰酚和杜鹃素含量的高效液相色谱方法。方法: 采用 Agilent Zorbax SB C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 150 mm, 5 μm); 流动相为甲醇 (A) - 0.2% 磷酸水溶液 (B), 梯度洗脱 (0~20 min 35% A → 60% A; 20~40 min 60% A → 70% A), 流速 0.8 mL · min⁻¹; 检测波长为 360 nm (0~29 min 测定金丝桃苷、槲皮素和山柰酚) 和 299 nm (29~40 min 测定杜鹃素); 柱温 25 °C。结果: 金丝桃苷、槲皮素、山柰酚和杜鹃素线性范围分别为 6.40~160.0 μg · mL⁻¹ (r = 0.9995), 3.33~83.33 μg · mL⁻¹ (r = 0.9993), 0.80~20.0 μg · mL⁻¹ (r = 0.9998), 2.67~66.67 μg · mL⁻¹ (r = 0.9996); 金丝桃苷、槲皮素、山柰酚和杜鹃素回收率 (n = 3) 分别为 96.5% ~ 99.2% (RSD 为 1.2% ~ 1.6%), 96.6% ~ 98.9% (RSD 为 0.9% ~ 2.8%), 96.4% ~ 101.7% (RSD 为 2.0% ~ 2.9%), 95.9% ~ 100.4% (RSD 为 0.4% ~ 2.2%)。结论: 该方法简便快速, 结果准确可靠, 可用于中药满山红的质量控制。

关键词: 高效液相色谱法; 满山红; 金丝桃苷; 槲皮素; 山柰酚; 杜鹃素

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2010)02-0279-03

HPLC simultaneous determination of four flavonoids in *Rhododendron dauricum* L.*

LIANG Tai-gang MEN Xu-peng ZHAO Cheng-xiao BAN Shu-rong LI Qing-shan**

(School of Pharmaceutical Science, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China)

Abstract Objective To establish an HPLC method for simultaneous determination of hyperoside, quercetin, kaempferol and farrerol in *Rhododendron dauricum*. **Methods** The separation was performed on an Agilent Zorbax SB C₁₈ column (4.6 mm × 150 mm, 5 μm) by gradient elution (0~20 min, 35% A → 60% A; 20~40 min 60% A → 70% A) using methanol (A) and 0.2% phosphoric acid (B) as the mobile phase. The flow rate was 0.8 mL · min⁻¹; The detection wavelength was 360 nm (0~29 min) for hyperoside, quercetin, kaempferol and 299 nm (29~40 min) for farrerol with column temperature at 25 °C. **Results** The linear ranges of hyperoside, quercetin, kaempferol and farrerol was 6.40~160.0 μg · mL⁻¹ (r = 0.9995), 3.33~83.33 μg · mL⁻¹ (r = 0.9993), 0.80~20.0 μg · mL⁻¹ (r = 0.9998), and 2.67~66.67 μg · mL⁻¹ (r = 0.9996), respectively. The average recoveries (n = 3) was 96.5% - 99.2% with RSD of 1.2% - 1.6%, 96.6% - 98.9% with RSD of 0.9% - 2.8%, 96.4% - 101.7% with RSD of 2.0% - 2.9%, 95.9% - 100.4% with RSD of 0.4% - 2.2% respectively. **Conclusion** The method is simple, accurate and can be used for quality control of *Rhododendron dauricum*.

Key words HPLC; *Rhododendron dauricum* L.; hyperoside; quercetin; kaempferol; farrerol

满山红为杜鹃花科植物兴安杜鹃 *Rhododendron dauricum* L. 的干燥叶^[1], 具有止咳、祛痰之功效, 用于治疗急、慢性支气管炎, 哮喘等病症, 其化学成分主要有黄酮、萜类和挥发油等^[2]。本课题组前期药理学研究表明^[3], 满山红总黄酮具有明显的抗炎、止咳、祛痰等作用, 属于活性有效部位, 因而有必要

对黄酮类化合物进行质量控制。目前国内对满山红的质量研究主要集中在对杜鹃素进行含量测定^[4,5], 尚未见到对多种黄酮化合物如金丝桃苷、槲皮素、山柰酚和杜鹃素同时测定的相关报道。本文采用高效液相色谱法对不同产地满山红中金丝桃苷、槲皮素、山柰酚和杜鹃素进行了含量测定, 为全

* 山西省科技攻关项目 (NO. 2006031201-01); 山西医科大学青年基金资助项目 (NO. 2006011)

** 通讯作者 Tel (0351) 4690322; E-mail qingshan@yahoo.com

面控制其质量奠定基础。

1 仪器和试剂

LC-10AT_{vp}液相色谱仪, SPD-10A_{vp}检测器(日本 SHIMADZU 公司); UV-260紫外可见分光光度计(日本 SHIMADZU 公司); N2000 色谱工作站(浙江大学智达信息工程有限公司)。金丝桃苷对照品(批号 1521-200202)、槲皮素对照品(批号 10081-9905)、杜鹃素对照品(批号 110850-200604)均购自中国药品生物制品检定所, 山柰酚(纯度大于 99%)对照品购自 Sigma 公司; 甲醇为色谱纯; 水为重蒸水; 其余试剂均为分析纯; 满山红药材采自黑龙江、吉林、辽宁等地, 经山西医科大学药学院高建平教授鉴定为杜鹃花科植物兴安杜鹃 *Rhododendron dauricum* L. 的干燥叶。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 混合对照品储备液 精密称取对照品金丝桃苷、槲皮素、山柰酚和杜鹃素适量, 加甲醇配制成浓度分别为 320、68、40、133 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的混合溶液, 即得。

2.1.2 供试品溶液 精密称取干燥至恒重的满山红粉末(60目)约 1 g 于具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 25 mL, 称重, 冷浸 1 h 后, 超声(150 W, 40 kHz)提取 40 min 放冷, 补足失重, 摇匀, 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

2.2 色谱条件 色谱柱: Agilent Zorbax SB C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇(A) - 0.2% 磷酸水溶液(B), 梯度洗脱(0~20 min, 35% A → 60% A; 20~40 min, 60% A → 70% A), 流速 0.8 mL·min⁻¹; 检测波长: 360 nm(0~29 min 测定金丝桃苷、槲皮素和山柰酚)和 299 nm(29~40 min 测定杜鹃素); 柱温: 25 °C; 进样量: 20 μL 。对照品及样品色谱图见图 1。

2.3 线性关系考察 精密量取混合对照品储备液 0.2、0.4、1、2、3、4、5 mL, 分别置 10 mL 量瓶中, 加甲醇-水(80:20)定容, 摇匀, 配制成系列浓度混合对照品溶液。按上述色谱条件, 分别进样 20 μL , 记录色谱峰面积, 以峰面积(Y)为纵坐标, 浓度 X($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)为横坐标, 进行线性回归, 得金丝桃苷、槲皮素、山柰酚和杜鹃素的标准曲线回归方程分别为:

$$Y = 4.79 \times 10^3 X - 2.25 \times 10^3 \quad r = 0.9995$$

$$Y = 1.02 \times 10^3 X - 1.76 \times 10^3 \quad r = 0.9993$$

$$Y = 9.96 \times 10^2 X + 1.68 \times 10^2 \quad r = 0.9998$$

$$Y = 1.55 \times 10^3 X - 2.27 \times 10^3 \quad r = 0.9996$$

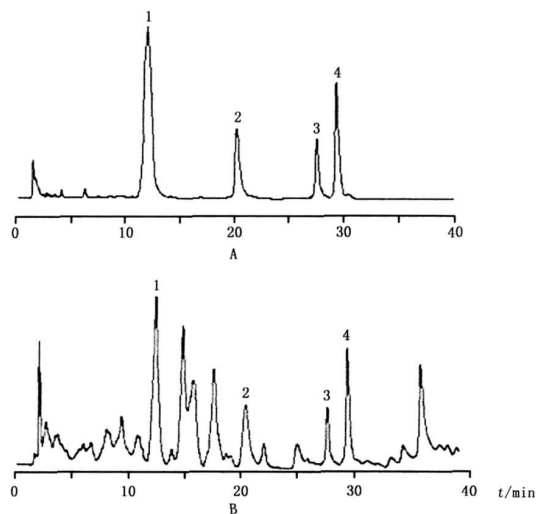


图 1 对照品(A)及黑龙江齐齐哈尔产样品(B)色谱图

Fig 1 Chromatograms of chemical reference substances(A) and sample from Qiqihar Heilongjiang(B)

1. 金丝桃苷(hyperoside) 2. 槲皮素(queretin) 3. 山柰酚(kaempferol) 4. 杜鹃素(farferol)

金丝桃苷在 6.4~160.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 槲皮素在 3.33~83.33 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 山柰酚在 0.80~20.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 杜鹃素在 2.67~66.67 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 范围内线性关系良好。

2.4 精密度试验 取混合对照品溶液, 按上述色谱条件, 连续进样 6 次, 记录色谱峰面积, 计算金丝桃苷、槲皮素、山柰酚和杜鹃素峰面积的 RSD 分别为 1.1%, 0.8%, 1.6%, 1.2%。

2.5 重复性试验 精密称取同一批黑龙江齐齐哈尔产满山红样品粉末 6 份, 各约 1.0 g 照“2.1.2”项下方法制备供试品溶液, 测定金丝桃苷、槲皮素、山柰酚和杜鹃素的含量, 计算各组分含量平均值分别为 0.220%, 0.051%, 0.030%, 0.096%; RSD 分别为 1.7%, 2.3%, 1.8%, 2.6%。

2.6 稳定性试验 取供试品溶液, 分别于配制后 0、2、4、8、12、24、48 h 进样 20 μL , 记录峰面积, 结果金丝桃苷、槲皮素、山柰酚和杜鹃素峰面积的 RSD 分别为 1.6%, 1.1%, 1.8%, 2.3%, 表明供试品溶液在 48 h 内稳定。

2.7 加样回收率试验 精密称取已测知含量的黑龙江齐齐哈尔产满山红样品粉末 9 份, 每份约 0.5 g 分别精密加入金丝桃苷对照品储备液 3 mL、槲皮素对照品储备液 4 mL、山柰酚和杜鹃素对照品储备液 5 mL, 按“2.1.2”项下方法操作, 制备所需溶液, 进样测定并计算加样回收率, 结果见表 1。

表 1 回收率测定结果 (n = 3)
Tab 1 Recovery of HPLC assay

组分 (component)	加入量 (added amount)	平均回收率 (average recovery)	RSD /%
	/mg	%	
金丝桃苷 (hyperoside)	0.960	96.5	1.2
	1.28	99.2	1.4
	1.60	97.2	1.6
槲皮素 (quercetin)	0.204	98.6	2.6
	0.272	96.9	0.9
	0.340	98.9	2.8
山柰酚 (kaempferol)	0.120	101.7	2.6
	0.160	96.4	2.0
	0.200	98.1	2.9
杜鹃素 (farrerol)	0.399	100.4	2.2
	0.532	95.9	0.4
	0.665	96.5	1.6

2.8 样品含量测定 取不同产地满山红样品,按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液。精密吸取对照品混合液(金丝桃苷、槲皮素、山柰酚和杜鹃素浓度分别为 64.0、13.6、8.00、26.7 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)和供试品溶液各 20 μL ,注入液相色谱仪,照上述色谱条件分析测定,外标法计算满山红中各组分的含量,结果见表 2。

表 2 样品含量测定结果 (% , n = 3)
Tab 2 Results of determination of samples

样品 (sample)	金丝桃苷 (hyperoside)	槲皮素 (quercetin)	山柰酚 (kaempferol)	杜鹃素 (farrerol)
黑龙江齐齐哈尔 (Qiqihar) Heilongjiang)	0.220	0.051	0.030	0.096
黑龙江佳木斯 (Jiamusi) Heilongjiang)	0.267	0.068	0.034	0.108
黑龙江哈尔滨 (Harbin) Heilongjiang)	0.204	0.040	0.028	0.089
辽宁沈阳 (Shenyang, Liaoning)	0.213	0.064	0.022	0.076
辽宁抚顺 (Fushun, Liaoning)	0.284	0.073	0.036	0.117
吉林长春 (Changchun, Jilin)	0.191	0.049	0.020	0.083
吉林松原 (Songyuan, Jilin)	0.236	0.072	0.029	0.114
吉林四平 (Siping, Jilin)	0.215	0.063	0.039	0.091

3 讨论

3.1 供试品溶液制备方法的确定 本实验考察了不同浓度甲醇、乙醇等溶剂的提取效率,同时比较了

不同的提取方法(超声、回流),并对提取时间及提取溶剂的量进行了优化,结果发现采用 25 mL 甲醇超声提取 40 min 效果最好。

3.3 检测波长的选择 由于金丝桃苷、槲皮素和山柰酚在 360 nm 附近有最大吸收,而杜鹃素的吸收波长位于 299 nm,在上述色谱条件下金丝桃苷、槲皮素和山柰酚的保留时间在 29 min 之前,杜鹃素的保留时间在 29 min 之后,为提高方法灵敏度、减少干扰,本实验设定程序变化检测波长 0~ 29 min 为 360 nm, 29~ 40 min 为 299 nm。

3.4 流动相的选择 曾尝试采用甲醇-水、甲醇-醋酸水溶液、乙腈-醋酸水溶液等体系进行等度洗脱,但均难以达到 4 种组分在短时间内完全分离,而选用甲醇-0.2% 磷酸水溶液进行线性梯度洗脱,可使 4 种成分在较短的时间内完全分离,满足测定需要。

3.5 小结 本实验建立了同时测定满山红中 4 种黄酮类成分含量的方法,为系统评价满山红的质量提供理论依据。由测定结果可知,各产地满山红样品中,金丝桃苷与杜鹃素的含量较高,而山柰酚的含量相对较低。

参考文献

- 1 ChP(中国药典). 2005 Vol I (一部): 251
- 2 FU X iao- li(付晓丽). Study on the chemical composition of *Rhododendron Dauricum* L (满山红叶中化学成分的研究): [Dissertation of Master's Degree(硕士学位论文)]. Taiyuan(太原): Shanxi Medical University(山西医科大学), 2006. 45
- 3 ZHAO Cheng- xiao(赵承孝). The pre-clinical pharmacological and pharmacological study *Rhododendron dauricum* L. dropping pill(满山红滴丸的临床前药理学和主要药效学研究): [Dissertation of Master's Degree(硕士学位论文)]. Taiyuan(太原): Shanxi Medical University(山西医科大学), 2007. 37
- 4 PAN X in(潘馨). Determination of farrerol and quercetin in *Folium Rhododend Daurici* by HPLC (HPLC 测定满山红中杜鹃素、槲皮素的含量). *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 2002 37(11): 62
- 5 LI H u(李辉), LUO Zhong- shu(罗中枢), NU Feng(牛锋), et al. Determination of farrerol in leaves of *Rhododendron dauricum* and its preparation Q inbaohong capsule by RP-HPLC (RP-HPLC 法测定满山红叶及其制剂中杜鹃素含量). *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2002 33(2): 34

(本文于 2009 年 6 月 20 日修改回)