

HPLC 同时测定锦绣杜鹃四种黄酮类成分的含量

张 梅¹, 潘大仁^{2*}

(1. 闽江学院 化工系, 福建 福州 350108; 2. 福建农林大学 生命科学学院, 福建 福州 350002)

摘 要: 在建立高效液相色谱法(HPLC)同时, 测定锦绣杜鹃中金丝桃苷、异槲皮苷、槲皮苷、槲皮素 4 种黄酮类化合物的含量。采用 Waters C18 (4.6 mm×250 mm, 5 μm) 反相色谱柱, 甲醇(B) 和水(A) 为流动相, 梯度洗脱程序为: 0~24 min, 31%~42% B; 24~30 min, 42%~50% B; 30~35 min, 50%~60% B; 35~40 min, 60% B; 检测波长 356 nm, 流速为 0.7 mL·min⁻¹, 柱温 30 ℃。结果显示锦绣杜鹃中 4 种黄酮类化合物达到了较好的分离, 其中平均回收率分别为 97.73%、101.71%、98.70%、104.28%; RSD 分别为 2.25%、1.31%、1.82%、2.81% (n=5), 说明该分析方法简便、准确、重现性好, 适合于锦绣杜鹃中黄酮类化合物含量的测定, 其中锦绣杜鹃中黄酮类成分在 4 月份达到最大值。

关键词: HPLC; 锦绣杜鹃; 黄酮类化合物; 含量测定

中图分类号: Q946.83 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-7461(2013)01-0119-04

Simultaneous Determination of Four Flavonoids in the Leaves of *Rhododendron pulchrum* by HPLC

ZHANG Mei¹, PAN Da-ren^{2*}

(1. Department of Chemistry and Chemical Engineering, Minjiang University, Fuzhou, Fujian 350108, China;
2. College of Life Science, Fujian Agricultural and Forestry Universities, Fuzhou, Fujian 350002, China)

Abstract: The objective of this study was to establish a HPLC method for simultaneous determination of 4 kinds of flavonoids (quercetin-3-galactoside, quercetin-3-glucoside, quercitrin, and quercetin) in the leaves of *Rhododendron pulchrum*. The following system was found to be optimum for the analysis: Waters C18 column (4.6 mm×250 mm, 5 μm) by gradient elution with mobile phase A (water) and B (methanol): 0-24 min, 31%-42% B; 24-30 min, 42%-50% B; 30-35 min, 50%-60% B; 35-40 min, 60% B. The detection wavelength was 356 nm, and the rate flow was 0.7 mL/min with column temperature at 30℃. Under these conditions, 4 types of flavonoids could be well separated. The average recovery of 4 types of flavonoids (quercetin-3-galactoside, quercetin-3-glucoside, quercitrin, and quercetin) were 97.73%, 101.71%, 98.70% and 104.28%, and the relative standard deviations of the method were 2.25%, 1.31%, 1.82% and 2.81% (n=5), respectively. The method was accurate and sensitive, which could be used for the determination of flavonoids in the leaves of *R. pulchrum*. The contents of flavonoids were in the highest levels in april.

Key words: HPLC; *Rhododendron pulchrum*; flavonoids; content determination

杜鹃花属植物除了具有极高的欣赏价值外, 还具有较高的药用价值, 在医药、食品等具有广阔的开发应用前景。其中黄酮类化合物是杜鹃属植物中具有较高的天然生物活性的一类化合物^[1], 大量研究

收稿日期: 2012-04-07 修回日期: 2012-05-09

基金项目: 福建省教育厅重点学科项目(OB08B005); 福建省教育厅科技项目(JB12164)。

作者简介: 张梅, 女, 博士, 讲师, 主要研究方向: 植物生物化学。E-mail: zhangmei11@163.com

* 通信作者: 潘大仁, 男, 博士, 教授, 博士生导师, 主要研究方向: 生物技术。E-mail: pandaren@yahoo.com.cn

表明杜鹃类黄酮具有祛痰、止咳、镇痛、抗菌消炎以及对心血管系统的作用,因此杜鹃属植物中的类黄酮是一类具有较高开发价值的物质^[2-3]。锦绣杜鹃(*Rhododendron pulchrum*)^[4]为全国各地广为栽培的品种,是一种优良的黄酮类化合物的潜在资源,因而有必要对锦绣杜鹃黄酮类化合物进行系统研究。目前采用 HPLC 测定满山红^[5]、樱山杜鹃^[6]、凉山杜鹃^[7]、葎草^[8]等黄酮化合物含量已见报道,但有关同时测定锦绣杜鹃中多种黄酮类化合物的报道尚少。本文在前期运用液质联用技术鉴定栽培杜鹃叶中黄酮类化合物的主要成分的基础上^[9],进一步运用 HPLC 技术对其主要黄酮类成分进行测定,观察杜鹃黄酮类化合物主要成分在不同生长时期含量的动态变化,为确定杜鹃的最佳采收期以及药材原料和制剂的质量提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 仪器

美国 Waters2965 高效液相色谱仪,型号为 2996 的紫外检测器、FY135 中草药粉碎机、BS124S 型电子天平、3200 IH 型超声波清洗器、5840R-T 台式高速冷冻离心机、冰箱、烘干箱等。

1.2 材料

芦丁、金丝桃苷、槲皮苷、异槲皮苷、槲皮素对照品均购于南京 TCM 中药研究所,甲醇为色谱纯(德国 Merck 公司),水为超纯水(娃哈哈,浙江杭州),无水乙醇、石油醚、硝酸铝、亚硝酸钠、氢氧化钠等其余所用试剂均为分析纯,HPLC 中所需的溶液均经 0.22 μm 微孔滤膜过滤。锦绣杜鹃叶采自福建农林大学校园,55 $^{\circ}\text{C}$ 烘干,粉碎后过 60 目筛,备用。

2 结果与分析

2.1 色谱条件^[10]

Waters C18 色谱柱(4.6 mm \times 250 mm,5 μm);流动相 B 相为甲醇,流动相 A 相为水(含 0.1% 甲酸);梯度洗脱程序:0~24 min,31%~42% B;24~30 min,42%~50% B;30~35 min,50%~60% B;35~40 min,60% B;柱温 30 $^{\circ}\text{C}$;流速:0.7 mL \cdot min⁻¹;检测波长 356.1 nm;进样量 20 μL ,标准品和样品的色谱图如图 1~图 2。

2.2 样品溶液的制备^[11]

准确称取 0.4 g 锦绣杜鹃叶粉末,置于 10 mL 离心管中,加入约 8 mL 石油醚(60~90 $^{\circ}\text{C}$)超声 10 min 萃取,8 000 r \cdot min⁻¹ 离心 5 min,弃去上清液,再加 8 mL 石油醚萃取,弃去上清液,脱脂,让其挥干。石油醚挥干后的样品加 8 mL 40% 甲醇水溶液

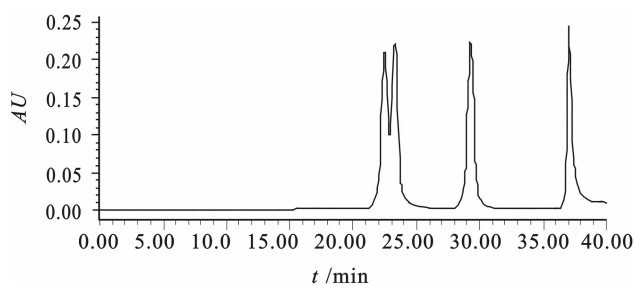


图 1 标准品 HPLC 色谱图

Fig 1 HPLC chromatogram of the standard samples

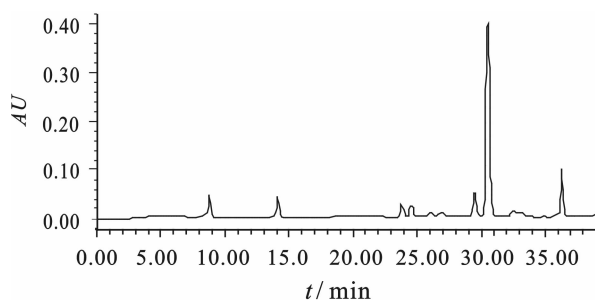


图 2 杜鹃样品 HPLC 色谱图

Fig 2 HPLC chromatogram of the flavonoids extraction

在 50 $^{\circ}\text{C}$ 下超声 40 min,8 000 r \cdot min⁻¹ 离心 5 min,吸取上清液,0.22 μm 滤膜过滤,备用。

2.3 混合标准溶液的配制

精密称取标准品金丝桃苷、异槲皮苷、槲皮苷、槲皮素各 10 mg,分别用 40% 甲醇溶解并定容于 50 mL 容量瓶,摇匀,制成浓度为 0.2 mg \cdot mL⁻¹ 的储备液。分别量取各储备液 2~10 mL 容量瓶,40% 甲醇定容并摇匀,制成浓度为 0.04 mg \cdot mL⁻¹ 的混合标准溶液,0.22 μm 滤膜过滤,备用。

2.4 检测波长的选择

选用 200~400 nm 区间对 4 个杜鹃黄酮提取液中待测黄酮成分进行波长扫描,发现 4 个黄酮成分在紫外波段均具有 2 个吸收峰,其中金丝桃苷、异槲皮苷、槲皮苷波长分别为 256.3 和 356.1 nm 范围,槲皮素 2 个吸收峰波长分别在 255.1 和 370.2 nm 范围。波长选在 256.3 和 356.1 nm 4 种成分均有较大吸收峰,并且不需进行波长切换,可以实现对 4 个有效成分含量的同时测定。从 256.3 和 356.1 nm 的 HPLC 色谱图可以看出在 356.1 nm 处获得的图谱杂质峰干扰少,各黄酮峰峰形较好,灵敏度较高,所以波长选择 356.1 nm 较好。

2.5 线性关系分析

对制备的混合标准溶液进行进样,进样体积分别为 1、2、5、10、15、20、25、30、40、50 μL ,按色谱条件测定,每个浓度重复 3 次,取峰面积平均值。以峰面积 y 为纵坐标,进样量 $x(\mu\text{g})$ 为横坐标,进行线性

回归,得回归方程分别为:金丝桃苷: $y = 3\,918\,181.62x - 39\,816.34$, $R^2 = 0.999\,6$,线性范围 $0.04 \sim 0.80\,\mu\text{g}$;异槲皮苷: $y = 4\,199\,254.46x - 39\,639.41$, $R^2 = 0.999\,5$,线性范围 $0.04 \sim 0.80\,\mu\text{g}$;槲皮苷: $y = 4\,743\,411.29x - 64\,789.51$, $R^2 = 0.999\,6$,线性范围 $0.20 \sim 2.00\,\mu\text{g}$;槲皮素: $y = 3\,845\,075.60x - 84\,293.55$, $R^2 = 0.999\,7$,线性范围 $0.04 \sim 1.00\,\mu\text{g}$ 。

2.6 精密度试验

取配制好的混合标准品溶液,重复进样 6 次,每次进样体积为 $20\,\mu\text{L}$ 。各标准品平均峰面积 RSD 为:金丝桃苷 0.54%,异槲皮苷 0.87%,槲皮苷 1.05%,槲皮素 0.61%,表明该仪器精密度良好。

2.7 重复性试验

精密称取同一批杜鹃叶粉末 6 份,进样分析金丝桃苷、异槲皮苷、槲皮苷、槲皮素的含量,结果 RSD 分别为 1.69%、1.73%、1.88%、2.12%,说明该方法重复性较好。

2.8 稳定性试验

同一样品溶液分别在 1、2、4、8、12 h,进样 $20\,\mu\text{L}$,测定金丝桃苷、异槲皮苷、槲皮苷、槲皮素含量,考察其稳定性,结果标准差(RSD)分别为 0.62%、0.93%、0.81%、0.94%,说明从杜鹃中提取的样品在 12 h 内稳定性较好。

2.9 加样回收率试验

称取已知含量的杜鹃叶样品 5 份,分别精密加入不同量的金丝桃苷、异槲皮苷、槲皮苷及槲皮素标准品,按供试液制备方法制备,加样回收供试液,并按样品测定方法进行测定,计算回收率。金丝桃苷平均回收率为 97.73%,RSD 为 2.25%;异槲皮苷平均回收率为 101.71%,RSD 为 1.31%;槲皮苷平均回收率为 98.70%,RSD 为 1.82%;槲皮素平均回收率为 104.28%,RSD 为 2.81%,结果说明该测定方法测定结果准确。

2.10 样品含量测定结果

称取不同采收时间的杜鹃叶粉末,按 2.2 的方法制备样品溶液,再按 2.1 的色谱条件,分别进样 $20\,\mu\text{L}$,所得杜鹃各黄酮化合物的峰面积代入相应的回归方程,计算样品含量(表 1)。

3 结论与讨论

3.1 色谱条件的优化

为了得到较好的 HPLC 分离条件,本试验分别对洗脱方式、流动相、体积流量进行了优化。由于样品中都是以槲皮素为苷元的黄酮苷类化合物,各成分的结构较为相似,尤其是金丝桃苷和异槲皮苷

表 1 不同采收期锦绣杜鹃叶黄酮类成分含量

Table 1 Contents of flavonoid components in the leaves of *R. pulchrum* in different harvest time $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$

采收日期	金丝桃苷	异槲皮苷	槲皮苷	槲皮素
2010-09-15	0.446	0.431	4.237	0.721
2010-10-15	0.397	0.381	3.929	0.662
2010-11-15	0.303	0.211	2.259	0.426
2010-12-15	0.256	0.203	2.242	0.363
2011-01-15	0.255	0.201	2.017	0.357
2011-02-15	0.296	0.253	3.974	0.488
2011-03-15	0.350	0.262	5.464	0.698
2011-04-15	0.678	0.464	7.405	1.690
2011-05-15	0.513	0.441	6.845	1.917
2011-06-15	0.379	0.435	6.403	1.683
2011-07-15	0.427	0.330	5.583	1.282
2011-08-15	0.466	0.423	3.399	0.609

分子量、结构均相似,等度洗脱时,2 种成分基本上重叠在一起,无法分离,因此采用了梯度洗脱的方式。黄酮类化合物为酚酸类化合物,容易造成拖尾峰,在流动相中加入 0.1%甲酸,较好地消除了峰的拖尾现象。较高的体积流量影响各峰的分离度,并增加柱压,体积流量较慢又造成保留时间延长,峰形展宽,综合考虑确定体积流量为 $0.7\,\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 。结果表明甲醇-0.1%甲酸溶液为流动相进行梯度洗脱,得到的色谱峰峰型、数目、各峰分离度均较为理想,可使 4 种黄酮类成分在较短的时间内较好分离,满足测定需要。

3.2 样品测定结果

锦绣杜鹃叶 4 种主要黄酮类成分中槲皮苷含量最大,其次为槲皮素,最少为异槲皮苷,说明槲皮苷是杜鹃叶的主要黄酮类成分。锦绣杜鹃叶 4 种主要成分含量呈现出一定的季节性变化规律,即一进入春季,各种黄酮类成分含量均大幅度增加,并且均在 4 月中旬达到最大量。其中槲皮苷在 4 月达到为 $7.405\,\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$,占当月 4 种黄酮成分总量的 72.34%,5 月开始缓慢下降,到 8 月时大幅度下降,只有 $3.399\,\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$,含量不到 4 月的 1/2,但 9 月又有所回升,1 月达到年度最低水平。而异槲皮苷最高含量为 $0.464\,\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$,1 月份最低只有 $0.201\,\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。这可能是因为 3-6 月份是植物生长高峰期,杜鹃叶各黄酮含量均表现出较高水平,在福建 7、8 月是一年中气温最高时期,杜鹃叶中各黄酮含量受到抑制,表现出较低水平。而后进入 9 月,黄酮含量又有所回升,11 月天气变冷,黄酮含量大幅度下降,这可能与杜鹃的生长习性有关。

参考文献:

[1] 吴福建,李凤兰,黄凤兰,等. 杜鹃花研究进展[J]. 东北农业大学学报,2008,39(1):139-144.

WU F J, LI F L, HUANG F L, *et al.* Research progress on *Rhododendron*[J]. *Journal of Northeast Agricultural University*, 2008, 39(1): 139-144. (in Chinese)

[2] 范一菲, 王云海, 张建华, 等. 杜鹃花总黄酮对在体大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用及其机制[J]. *中草药*, 2008, 39(2): 240-244.

FAN Y F, WANG Y H, ZHANG J H, *et al.* Protection and mechanism of total flavones from *Rhododendron sim sii* on myocardial ischemia-reperfusion in jury rats[J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2008, 39(2): 240-244. (in Chinese)

[3] 宋小平, 陈志武, 张建华. 杜鹃花总黄酮的镇痛作用研究[J]. *山东医药*, 2007, 47(14): 14-16.

SONG X P, CHEN Z W, ZHANG J H. Analgesic effects of total flavones of *Rhododendron* and its mechanisms[J]. *Shandong Medical Journal*, 2007, 47(14): 14-16. (in Chinese)

[4] 福建省科学技术委员会. 福建植物志[M]. 福州: 福建科学技术出版社, 1989: 235-237.

[5] 梁泰刚, 孟旭鹏, 赵承孝, 等. HPLC 法同时测定不同产地满山红中 4 种黄酮成分的含量[J]. *药物分析杂志*, 2010, 30(2): 279-281.

LIANG T G, MEN X P, ZHAO C X, *et al.* HPLC simultaneous determination of four flavonoids in *Rhododendron dauricum* L. [J]. *Chin. J. Pharm. Anal.*, 2010, 30(2): 279-281. (in Chinese)

[6] 边清泉. HPLC 法测定凉山杜鹃花中芦丁、槲皮素的含量[J]. *西南科技大学学报*, 2004, 19(4): 84-89.

BIAN Q Q. Determination of rutin and quercetin in *Rhododendron liangshanium* LS. by HPLC[J]. *Journal of Southwest University of Science and Technology*, 2004, 19(4): 84-89. (in Chinese)

[7] 曹伟国, 陶燕铎, 张丹, 等. 葎草中总黄酮与木犀草素含量的季节动态变化[J]. *西北林学院学报*, 2010, 25(6): 134-137.

CAO W G, TAO Y D, ZHANG D, *et al.* Seasonal variation of total flavonoids and luteolin in *Humulus scandens*[J]. *Journal of Northwest Forestry University*, 2010, 25(6): 134-137. (in Chinese)

[8] 张梅, 潘大仁, 周以飞, 等. 液-质联用分析锦绣杜鹃中黄酮类成分[J]. *安徽农业科学*, 2012, 40(9): 5211-5213.

ZHANG M, PAN D R, ZHOU Y F, *et al.* Analysis of flavonoids in the leaves of *Rhododendron pulchrum* Sweet. by HPLC- MS[J]. *Journal of Anhui Agri. Sci.*, 2012, 40(9): 5211-5213. (in Chinese)

[9] 冯珂, 赵鑫, 郑丽玲, 等. 3 种鼠尾草属植物有效成分分析[J]. *西北林学院学报*, 2010, 25(6): 140-143.

FENG K, ZHAO X, ZHENG L L, *et al.* Analysis of active ingredients in three *Salvia* plants[J]. *Journal of Northwest Forestry University*, 2010, 25(6): 140-143. (in Chinese)

[10] 张梅, 潘大仁, 周以飞, 等. BP 神经网络结合正交试验优选锦绣杜鹃总黄酮的提取工艺[J]. *信阳师范学院学报: 自然科学版*, 2011, 24(2): 261-264.

ZHANG M, PAN D R, ZHOU Y F, *et al.* Optimization of extraction process of flavonoids in *Rhododendron pulchrum* Sweet. based on artificial neural network combined with orthogonal Experiment[J]. *Journal of Xinyang Normal University: Natural Science Edition*, 2011, 24(2): 261-264. (in Chinese)

(上接第 118 页)

[11] 潘丽君, 陈锦权. 试验设计与数据处理[M]. 南京: 东南大学出版社, 2008.

[12] 胡明明, 张国文, 何力. 响应面法优化超声提取花生壳多酚[J]. *南昌大学学报: 理科版*, 2011, 35(3): 241-246.

HU M M, ZHANG G W, HE L. Optimization of ultrasonic extraction of polyphenols from peanut shell by response surface methodology[J]. *Journal of Nanchang University: Natural Science Edition*, 2011, 35(3): 241-246. (in Chinese)

[13] AGHAIE E, PAZOUKI M, HOSSEINI M R, *et al.* Response surface methodology (RSM) analysis of organic acid production for Kaolin beneficiation by *Aspergillus niger*[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2009, 147: 245-251.

[14] 朱珠, 冷进松. 响应面分析法优化仙人掌黄酮提取工艺[J]. *食品科学*, 2011, 31(22): 185-189.

ZHU Z, LENG J S. Optimization of extraction for cactus flavonoids by response surface methodolgy[J]. *Food Science*, 2011, 31(22): 185-189. (in Chinese)

[15] 姚新武, 刘长霞, 张鹏. 响应面法优化龙胆苦苷脂质体的复乳法制备工艺[J]. *北京化工大学学报: 自然科学版*, 2012, 39(2): 68-73.

YAO X W, LIU C X, ZHANG P. Optimization of the multiple emulsion formulation of gentiopicroside liposome using response surface methodology[J]. *Journal of Beijing University of Chemical Technology: Natural Science Edition*, 2012, 39(2): 68-73. (in Chinese)