

HPLC 测定烈香杜鹃中 6 种黄酮成分的含量及主成分分析

李明珠¹, 宋平顺^{2*}, 赵建邦²

(1. 甘肃省兰州大学药学院, 兰州 730000;

2. 甘肃省药品检验研究院, 甘肃省中药品质与安全评价工程技术研究中心, 兰州 730000)

[摘要] 目的:建立 HPLC 测定烈香杜鹃中芦丁、金丝桃苷、槲皮苷、槲皮素、山柰酚和异鼠李素 6 种黄酮成分的方法,同时应用主成分分析评价其质量。方法:样品经 75% 甲醇超声,采用 C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),乙腈-0.2% 磷酸水为流动相梯度洗脱,流速 1.0 mL·min⁻¹,检测波长 365 nm。结果:芦丁,金丝桃苷,槲皮苷,槲皮素,山柰酚,异鼠李素在 0.009 7~0.194 9, 0.007 1~0.141 6, 0.188 0~3.752, 0.027 1~0.434 0, 0.010 8~0.216 0, 0.005 8~0.116 6 μg 线性范围良好,加样回收率均在 100%~105%, RSD 都 < 3%。结论:HPLC 操作简便、重复性好、结果准确。根据不同化学指标,采用主成分分析可以进行烈香杜鹃质量评价。

[关键词] 烈香杜鹃; 主成分分析; 芦丁; 金丝桃苷; 槲皮苷; 槲皮素; 山柰酚; 异鼠李素

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)08-0081-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015080081

Determination of Content of Six Flavonoids in *Rhododendron anthopogonoides* by HPLC and Principal Component Analysis LI Ming-zhu¹, SONG Ping-shun^{2*}, ZHAO Jian-bang² (1. College of Pharmacy in Lanzhou University, Lanzhou 730000, China; 2. Gansu Institute for Food and Drug Control, Gansu Traditional Chinese Medicine Quality and Safety Evaluation Engineering Research Center, Lanzhou 730000, China)

[Abstract] **Objective:** To establish an HPLC method for the determination of rutin, hyperoside, quercitrin, quercetin, kaempferol and isorhamnetin in *Rhododendron anthopogonoides*, while using principal component analysis to evaluate its quality. **Method:** Samples were extracted with 75% methanol by ultrasound. The separation was performed on a C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) with acetonitrile-0.2% H₃PO₄ as mobile phase in a gradient elution. The flow rate was 1.0 mL·min⁻¹, the wavelength was set at 365 nm. **Result:** Rutin, hyperoside, quercitrin, quercetin, kaempferol, and isorhamnetin have good linearity in the range of 0.009-0.194 9, 0.007 1-0.141 6, 0.188 0-3.752, 0.027 1-0.434 0, 0.010 8-0.216 0, 0.005 8-0.116 6 μg, respectively. The recoveries were 100%-105%, RSD were < 3%. **Conclusion:** The established HPLC method was simple, accurate, reproducible, and reliable. Depending on the chemical indicators, using principal component analysis can be carried out quality assessment for *R. anthopogonoides*.

[Key words] *Rhododendron anthopogonoides*; principal component analysis; rutin; hyperoside; quercitrin; quercetin; kaempferol; isorhamnetin

烈香杜鹃为藏族药“达里”来源之一,具有清热消肿、补肾功效^[1]。烈香杜鹃的药用部位比较混杂,包括叶、花,尚有嫩枝,现行标准通为测定挥发油含量,已经不能适应标准提升要求。烈香杜鹃含有挥发油、黄酮类、三萜类及甾体类、香豆素类等成分,这些成分具有明显的药理药效活性^[2-4]。目前,已

有关于测定烈香杜鹃中挥发油^[5]、槲皮素^[6]、总黄酮类^[7]和 3 种黄酮类成分含量^[8]的报道。本实验旨在对烈香杜鹃标准进行提高研究,采用 HPLC 同时测定芦丁、金丝桃苷、槲皮苷、槲皮素、山柰酚和异鼠李素 6 种成分的含量,并用主成分分析进行评价,为烈香杜鹃的质量评价提供参考。

[收稿日期] 20140722(025)

[第一作者] 李明珠,在读硕士,从事药品质量监督与管理研究, Tel:15095416502, E-mail:zhu1049977929@126.com

[通讯作者] * 宋平顺,主任药师,从事中药化学及质量标准研究, Tel:0931-7633029, E-mail:pingshunsong@163.com

1 材料

2695 型高效液相色谱仪(美国 Waters), KH-250DE 型数控超声波清洗器(昆山禾创超声仪器有限公司), AL204 型 1/10 万电子天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司]。

芦丁、槲皮苷、金丝桃苷、槲皮素、山柰酚、异鼠李素对照品(批号分别为 100080-200707, 111538-200301, 111521-201205, 100081-200907, 100081-200907, 110860-200204)均购于中国食品药品检定研究院,供含量测定用。甲醇为色谱纯,水为高纯水,其他试剂均为分析纯。

收集了青海、甘肃、西藏、河北、安徽等不同产地的 13 批烈香杜鹃 *Rhododendron anthopogonoides* 药材样品,由甘肃省药品检验研究院宋平顺主任药师鉴定。

2 方法及结果

2.1 色谱条件 C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相 0.2% 磷酸水溶液(A)-乙腈溶液(B)梯度洗脱(0~9 min, 83% A; 9~20 min, 83%~73% A; 20~30 min, 73%~53% A; 30~40 min, 53%~40% A; 40~45 min, 40%~83% A),流速 1.0 mL·min⁻¹,检测波长 365 nm,进样量 20 μL。

按照上述色谱条件进行测定,6 种黄酮苷元与其他共存峰得到很好的分离,各成分理论塔板数不低于 7 000,对照品及样品的色谱图见图 1。

匀,得到芦丁 0.048 72 g·L⁻¹, 金丝桃苷 0.071 g·L⁻¹, 槲皮苷 0.093 6 g·L⁻¹, 槲皮素 0.108 6 g·L⁻¹, 山柰酚 0.108 2 g·L⁻¹, 异鼠李素 0.058 32 g·L⁻¹ 的对照品贮备液。分别精密量取芦丁、金丝桃苷、槲皮苷、槲皮素、山柰酚和异鼠李素对照品溶液 2.0, 1.0, 2.0, 2.0, 1.0, 1.0 mL, 置 10 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度得到混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备 分别称取不同产地烈香杜鹃粉末约 0.1 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入 75% 甲醇 25 mL,称重,超声处理 40 min,放凉,再称重,用 75% 甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,临用前过 0.45 μm 滤膜,作为供试品溶液。

2.3 标准曲线及线性范围 精密吸取 2.2.2 项下混合对照品溶液,按 2.1 项下色谱条件,分别进样 1, 2, 5, 10, 15, 20 μL,以峰面积为纵坐标,进样量为横坐标,绘制标准曲线,得到回归方程及线性范围,见表 1。

表 1 烈香杜鹃中 6 种黄酮成分的线性关系

Table 1 Linear relationship of 6 kinds of flavonoids in *Rhododendron athopogonoide*

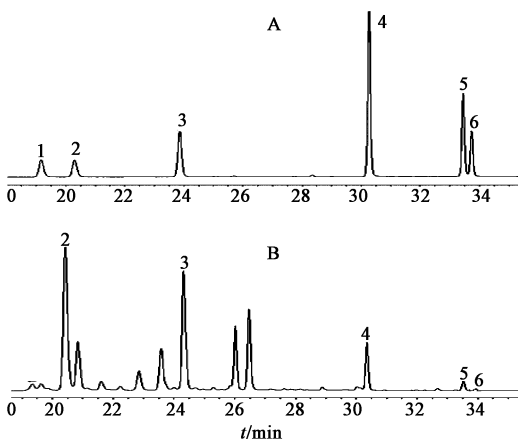
化合物	回归方程	R ²	线性范围/μg
芦丁	$Y = 1.5 \times 10^6 X + 4\ 343.4$	0.999 4	0.009 7 ~ 0.194 9
金丝桃苷	$Y = 2.2 \times 10^6 X + 15\ 622$	0.999 6	0.007 1 ~ 0.141 6
槲皮苷	$Y = 1.8 \times 10^6 X + 3\ 864.4$	0.999 6	0.018 8 ~ 0.375 2
槲皮素	$Y = 4.0 \times 10^6 X + 9\ 006.2$	0.999 9	0.027 1 ~ 0.434 0
山柰酚	$Y = 4.0 \times 10^6 X + 1\ 965.6$	0.999 9	0.010 8 ~ 0.216 0
异鼠李素	$Y = 4.2 \times 10^6 X + 864.99$	0.999 9	0.005 8 ~ 0.116 6

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度试验 取 2.2.2 项下配好的 6 种混合对照品溶液,按 2.1 项下的色谱条件,连续进样 6 次,测得峰面积。结果芦丁、金丝桃苷、槲皮苷、槲皮素、山柰酚和异鼠李素的峰面积的 RSD 分别为 0.3%, 0.8%, 0.4%, 1.9%, 0.2%, 0.4%, 表明仪器精密度良好。

2.4.2 重复性试验 取 11 号样品 0.1 g 共 6 份,精密称定,按 2.2.3 项下的方法进行溶液制备,按 2.1 项下的色谱条件进行测定。结果芦丁、金丝桃苷、槲皮苷、槲皮素、山柰酚和异鼠李素的峰面积的 RSD 分别为 1.5%, 1.4%, 2.0%, 1.5%, 1.9% 和 1.4%, 各化合物 RSD 均 < 3%。

2.4.3 稳定性试验 精密称取同一份烈香杜鹃粉末 0.1 g,按照 2.2.2 项下方法制成供试品溶液,分



A. 混合对照品; B. 样品; 1. 芦丁; 2. 金丝桃苷; 3. 槲皮苷; 4. 槲皮素; 5. 山柰酚; 6. 异鼠李素

图 1 烈香杜鹃 HPLC

Fig. 1 HPLC chromatogram of *Rhododendron anthopogonoides*

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液 精密称取干燥至恒重的芦丁、金丝桃苷、槲皮苷、槲皮素、山柰酚、异鼠李素适量,分别置 50 mL 量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇

别在 0, 2, 6, 10, 15, 20 h 后按 2.1 项下的色谱条件测定。芦丁, 金丝桃苷, 槲皮苷, 槲皮素, 山柰酚和异鼠李素的峰面积 RSD 分别为 1.7%, 0.3%, 2.4%, 0.6%, 1.4%, 2.1%, 表明 6 种成分在 24 h 内稳定性良好。

2.4.4 加样回收试验 称取 11 号样品粉末 6 份, 各 0.05 g, 分别依次精密加入芦丁、金丝桃苷、槲皮苷、槲皮素、山柰酚和异鼠李素对照品储备液 0.7, 5, 0.1, 0.5, 0.1, 0.04 mL, 按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液, 测定并计算回收率和 RSD。结果见表 2。

表 2 烈香杜鹃中 6 种成分的加样回收率试验

Table 2 Recovery test of six constituent of *Rhododendron anthopogonoides*

成分	称样量 /mg	样品中量 /μg	加入量 /μg	测得量 /μg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%	成分	称样量 /mg	样品中量 /μg	加入量 /μg	测得量 /μg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
芦丁	50.2	32.8	34.1	67.1	100.6	100.6	0.8	槲皮素	50.2	51.1	54.3	105.4	100.0	101.2	1.0
	49.7	32.5	34.1	67.1	101.4				49.7	50.6	54.3	105.2	100.5		
	50.4	32.9	34.1	67.0	100.0				50.4	51.3	54.3	107.1	102.7		
	50.1	32.7	34.1	66.8	100.2				50.1	51.0	54.3	106.3	101.8		
	50.8	33.2	34.1	67.9	101.8				50.8	51.7	54.3	107.2	102.2		
	50.5	33.0	34.1	67.0	99.7				50.5	51.5	54.3	105.9	100.2		
金丝桃苷	50.2	339.6	355.0	701.3	101.9	101.0	1.0	山柰酚	50.2	7.6	10.8	18.5	100.9	101.4	1.1
	49.7	336.2	355.0	699.7	102.4				49.7	7.6	10.8	18.7	102.7		
	50.4	340.9	355.0	695.9	100.0				50.4	7.7	10.8	18.7	101.8		
	50.1	338.9	355.0	698.2	101.2				50.1	7.7	10.8	18.5	100.0		
	50.8	343.6	355.0	701.8	100.9				50.8	7.8	10.8	18.9	102.7		
	50.5	341.6	355.0	695.9	99.7				50.5	7.7	10.8	18.5	100.0		
槲皮苷	50.2	8.2	9.4	17.6	100.0	101.0	0.9	异鼠李素	50.2	1.2	2.3	3.5	100.0	100.6	0.7
	49.7	8.1	9.4	17.7	102.1				49.7	1.2	2.3	3.5	100.1		
	50.4	8.2	9.4	17.8	102.1				50.4	1.3	2.3	3.6	101.2		
	50.1	8.2	9.4	17.7	101.0				50.1	1.2	2.3	3.5	100.5		
	50.8	8.3	9.4	17.7	100.0				50.8	1.3	2.3	3.6	101.9		
	50.5	8.3	9.4	17.8	101.1				50.5	1.3	2.3	3.6	100.0		

2.5 样品测定 分别取 13 种不同产地不同部位的烈香杜鹃约 0.1 g, 精密称定, 按 2.2.2 项下的方法

进行处理, 并按 2.1 项下的色谱条件进样 20 μL, 结果见表 3。

表 3 不同产地的烈香杜鹃黄酮含量 (n=3)

Table 3 Flavonoids content of *Rhododendron athopogonoides* in different places (n=3)

产地及部位	芦丁	金丝桃苷	槲皮苷	槲皮素	山柰酚	异鼠李素
甘南 1/花、叶	0.559	7.945	1.464	0.476	0.065	0.007
夏河/老枝	0.030	1.330	0.106	0.523	0.063	0.052
青海 1/叶、花	0.593	7.265	0.197	0.891	0.186	0.011
榆中 1/叶	0.115	6.699	4.051	1.069	0.229	0.016
榆中 3/花	0.221	13.643	4.809	0.430	0.043	0.008
榆中 2/嫩枝	0.126	2.265	0.225	0.800	0.093	0.086
甘南 2/花	0.185	2.318	8.299	0.320	0.020	0.003
天祝/老枝	0.024	1.090	0.155	0.393	0.055	0.047
西藏/枝	0.068	0.757	0.075	0.273	0.011	0.007
碌曲/花、叶	0.571	9.698	2.677	0.461	0.066	0.006
安徽/叶、枝	0.654	6.765	0.164	1.019	0.153	0.025
青海 2/花	0.519	6.432	0.146	0.681	0.134	0.010
河北/叶	0.045	2.479	1.815	0.155	0.002	0.001

2.6 主成分分析 利用 SPSS 17.0 对表 3 中 6 种黄酮类成分进行主成分分析,根据累计贡献率大于 85% 原则,见表 4。前 3 个主成分的累计贡献率达到 88.675%,故选前 3 个主成分来概括样品信息。

表 4 主成分的特征根、方差贡献率及累计贡献率

Table 4 Characteristic root, variance contribution rate and cumulative contribution rate of principal component

成分	特征根	方差贡献率/%	累计贡献率/%
1	2.576	42.927	42.927
2	1.905	31.757	74.684
3	0.839	13.991	88.675

各变量对 3 个主成分的贡献可通过主成分系数向量(表 5)和散点图(图 2)来表示,对主成分 1 贡献最大的是山柰酚 X_5 ,对主成分 2 贡献最大的是异鼠李素 X_6 ,而对主成分 3 贡献率最大的是槲皮苷 X_3 ,其次是槲皮素 X_4 。

表 5 主成分的因子负荷

Table 5 Load factor of principal component

变量	主成分		
	1	2	3
芦丁 X_1	0.775	-0.315	-0.436
金丝桃苷 X_2	0.684	-0.565	-0.054
槲皮苷 X_3	-0.167	-0.675	0.683
槲皮素 X_4	0.853	0.411	0.302
山柰酚 X_5	0.859	0.311	0.282
异鼠李素 X_6	-0.115	0.874	0.094

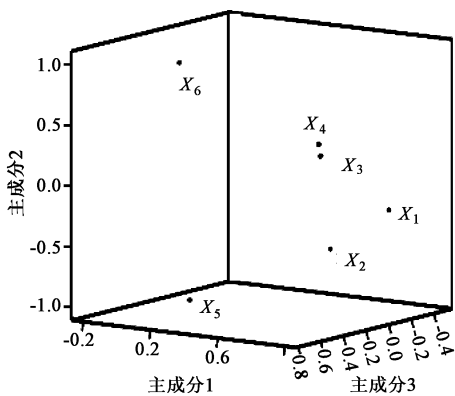


图 2 主成分散点

Fig. 2 Principal component scatter plot

根据主成分算法^[9],得到 13 批样品的主成分得分值(F 值)及排序情况,见表 6。

表 6 样品主成分得分值及排序

Table 6 Score values and sorting of Samples main ingredient

No.	F_1	F_2	F_3	F	排序
1	-0.78	-0.40	-0.24	-0.49	11
2	-0.41	1.34	-0.50	0.18	5
3	1.97	-0.89	-0.54	0.48	4
4	3.51	-0.96	0.85	1.31	1
5	-1.08	0.15	0.65	-0.33	9
6	0.44	3.35	-0.07	1.24	2
7	-1.11	-0.27	2.52	-0.20	8
8	-0.84	1.10	-0.54	-0.08	7
9	-1.48	-1.40	-0.93	-1.21	12
10	-0.84	-0.13	0.19	-0.37	10
11	1.78	0.12	-0.37	0.74	3
12	0.76	-0.83	-0.65	-0.03	6
13	-1.90	-1.46	-0.38	-1.32	13

3 讨论

3.1 供试品溶液处理方法的选择 在前期试验阶段,分别用过 20% 盐酸甲醇(1:5)、70% 乙醇、75% 甲醇,经过 1 h 索氏提取回流^[10]和 40 min 超声处理等方法,结果发现各成分的含量比例相差不大。最后决定采用 75% 甲醇,超声 40 min。此方法既容易过滤又节省时间。

3.2 流动相的选择 本试验分别考察流动相为甲醇-0.2% 磷酸水(60:40)、乙腈-0.2% 磷酸水(60:40)和甲醇-0.2% 磷酸水、乙腈-0.2% 磷酸水不同梯度洗脱^[11],结果发现按 2.1 项下的比例,各种成分峰分离的比较好且峰型很好。

3.3 主成分分析 F 值的排序可以代表样品质量的好坏,排序越靠前,其所含的 6 种黄酮的综合含量就越高,排名 1,3,4 的样 4,11,3 的测定部位都是叶,说明烈香杜鹃叶中有效成分综合含量较高,排名第 2 的样 6 测定部位是茎,而其他样 2,8,9 也是测定的茎中黄酮的含量,但排名较靠后,原因可能是样 6 是新采集的嫩枝,而其他样品则是放置时间较长的老枝,也可能是生长地域不同,导致含量有差异。

在表 3 中,就单个黄酮类成分看,烈香杜鹃中金丝桃苷的含量相对于其他 5 种成分较高,但在主成分分析中却得不到体现。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国卫生部药品标准. 藏药分册[S]. 北京: 中华人民共和国卫生部,