

HPLC 测定藏药樱草杜鹃中金丝桃苷、 槲皮苷和槲皮素的含量

黄宇, 兰莎, 张艺*, 曾建强, 苏锦松

(成都中医药大学民族医药学院, 成都 611137)

[摘要] 目的: 建立藏药樱草杜鹃中金丝桃苷、槲皮苷和槲皮素含量的 HPLC 测定方法, 为药材质量控制与评价提供参考。方法: 采用 HPLC, Welch Ultimate XB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 柱温 30 °C, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 进样量 10 μL, 检测波长 350 nm, 流动相 A 乙腈-甲醇(5:1)-B 0.1% 甲酸, 二元梯度洗脱。结果: 3 种成分在 70 min 内达到良好分离, 金丝桃苷、槲皮苷和槲皮素线性范围分别为 4.41 ~ 88.20 mg·L⁻¹ ($r=0.9996$), 2.94 ~ 58.80 mg·L⁻¹ ($r=0.9996$), 1.485 ~ 29.70 mg·L⁻¹ ($r=0.9996$); 加样回收率分别为 103.37% (RSD 1.67%), 98.07% (RSD 1.41%), 100.19% (RSD 1.20%)。结论: 方法操作简单、结果准确、重复性较好, 可作为藏药樱草杜鹃质量控制的有效方法之一。

[关键词] 藏药; 樱草杜鹃; 含量测定; 金丝桃苷; 槲皮苷; 槲皮素

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)14-0117-04

[doi] 10.11653/syfy2013140117

Determination of Hyperosid, Quercetrin and Quercetin in *Rhododendron Primulaeflorum* by HPLC

HUANG Yu, LAN Sha, ZHANG Yi*, ZENG Jian-qiang, SU Jin-song

(College of Ethnic Medicine, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China)

[Abstract] **Objective:** To establish an HPLC method for determining the content of hyperoside, quercitrin and quercetin in *Rhododendron Primulaeflorum*, and to lay the foundation for the quality control and/or quality evaluation of *R. primulaeflorum*. **Method:** A high-performance liquid chromatography equipped a Welch Ultimate XB-C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) column with UV detection was used. The mobile phase consisted of

[收稿日期] 20130201(018)

[基金项目] 国家自然科学基金(30960507); 四川省教育厅创新团队项目(11TD004)

[第一作者] 黄宇, 在读硕士研究生, 从事藏药药效物质基础与资源利用研究, Tel: 15928961236, E-mail: xiaohuangdoudou12@163.com

[通讯作者] * 张艺, 博士, 研究员, 从事中药、民族药药效物质基础研究, Tel: 028-61800274, E-mail: 9006zmy@sina.com

[6] 马洁, 彭建明, 吴志红. 国产草果化学成分研究进展 [J]. 中国中医药信息杂志, 2005, 12(9): 97.

[7] 闵勇, 张薇, 姚立华, 等. 云南省不同产地草果叶中挥发油化学成分研究 [J]. 安徽农业科学, 2011, 39(6): 3298.

[8] 何前松, 冯泳, 彭全才, 等. GC-MS 分析臭常山根、茎及叶中主要挥发性成分 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(9): 83.

[9] 邵帅, 严铭铭, 毕胜男, 等. 小飞蓬挥发性化学成分的 GC-MS 分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18

(8): 116.

[10] 史小娟, 潘心禾, 张新风, 等. 柳叶腊梅叶挥发性成分的提取及 GC-MS 分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(9): 129.

[11] Starkenmann C, Mayenzet F, Brauchli R, et al. Structure elucidation of a pungent compound in black cardamom: *Amomum tsao-ko* Crevost et Lemarié (Zingiberaceae) [J]. J Agric Food Chem, 2007, 55: 10902.

[责任编辑 顾雪竹]

acetonitrile and methanol (5:1) (A) and 0.1% formic acid in water (B) with gradient elution. The column temperature was kept at 30 °C and the flow rate was 1.0 mL·min⁻¹. The detection wavelength was set at 350 nm. **Result:** The good separation of three compounds was achieved within 70 min. The linear range of hyperoside, quercitrin and quercetin were 4.41-88.20 mg·L⁻¹ ($r=0.9996$), 2.94-58.80 mg·L⁻¹ ($r=0.9996$), 1.485-29.70 mg·L⁻¹ ($r=0.9996$) respectively. The average recovery were 103.37% (RSD 1.67%), 98.07% (RSD 1.4%), 100.19% (RSD 1.20%) respectively. **Conclusion:** This method is simple, accurate with good reproducibility and stability. It can be used as effective methods for quality control of *R. primulaeflorum*.

[**Key words**] Tibetan Medicine; *Rhododendron primulaeflorum* Bur. et Franch; determination; hyperosid; quercitrin; quercetin

樱草杜鹃是常用藏药“达里”基原植物之一,始载于《月王药诊》,以花和叶入药^[1-3]。樱草杜鹃具有清热消肿、止咳化痰等作用,主要用于气管炎、消化不良、胃下垂等病^[4]。现代藏医药著作《甘露本草明镜》及现代医学研究发现,其根茎部、叶、花都具有一定的祛痰、镇咳、平喘等药理活性,临床上常作为治疗慢性支气管炎和冠心病的药物,极具潜在的开发价值^[4-5]。近年来,国内药学工作者主要集中对樱草杜鹃的挥发油、黄酮类等化学成分研究上,其抗氧化活性研究还很少^[6-9]。课题组前期研究发现,槲皮苷、槲皮素和金丝桃苷为樱草杜鹃抗氧化活性的有效成分^[10]。因此,本文建立了同时测定藏药樱草杜鹃中金丝桃苷、槲皮苷和槲皮素含量的 HPLC 方法,可为樱草杜鹃药材质量标准的制定和质量评价提供科学依据。

1 材料

樱草杜鹃样品 3 批,其中 2 批分别于 2011 年 6 月采自四川省甘孜康定县雅加埂垭口(海拔 3 850 m,批次 201201)和贡嘎山乡(海拔 4 100 m,批次 201202),1 批于 2011 年 6 月由西藏藏医学院提供(批次 201203)。经成都中医药大学教授贾敏如鉴定,均为杜鹃花科植物樱草杜鹃 *Rhododendron primulaeflorum* Bur. et Franch。

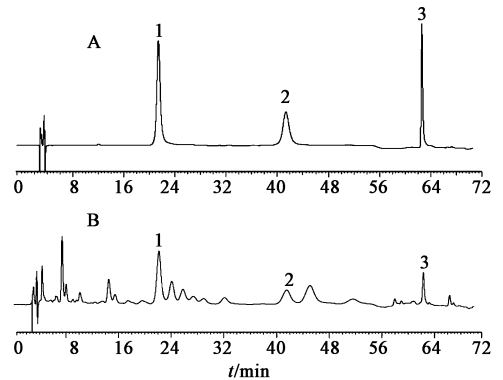
高效液相色谱仪(TECHCOMP LC 2050 Organizer, TECHCOMP LC 2130 Pump, TECHCOMP LC 2061 Column Heater, TECHCOMP LC 2030 UV Detector, 上海天美科学仪器有限公司), Welch Ultimate XB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm)(Welch 公司), Sartorius BP121s 型电子天平(北京赛多利斯科学仪器有限公司), ULUP-1-10T 型超纯水器(成都超纯科技有限公司), CQ-250 型超声波清洗器(上海必能信公司)。

乙腈(色谱纯), 甲醇(色谱纯), 其他试剂均为分析纯。

金丝桃苷(批号 111521-201004)、槲皮素(批号 100081-200907)由中国药品生物制品检定所提供,槲皮苷对照品(实验室自制,纯度 >95%)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Welch Ultimate XB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 柱温 30 °C, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 进样量 10 μL, 检测波长 350 nm, 流动相 A 乙腈-甲醇(5:1)-B 0.1% 甲酸, 梯度洗脱(0~50 min, 18% A; 50~55 min, 18%~35% A; 55~65 min, 35%~50% A; 65~70 min, 50%~100% A)。按照上述色谱条件进行测定,结果显示金丝桃苷、槲皮苷、槲皮素 3 种黄酮成分与其他共存峰分离度均 >1.5, 分离度良好(见图 1)。



A. 对照品; B. 供试品; 1. 金丝桃苷; 2. 槲皮苷; 3. 槲皮素

图 1 樱草杜鹃样品 HPLC

2.2 对照品溶液的制备 取金丝桃苷、槲皮苷、槲皮素对照品适量,精密称定,分别置 50 mL 量瓶中,用甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,分别制成 0.2 g·L⁻¹ 对照品溶液,备用。分别精密吸取上述对照品溶液各 4.5, 3.0, 1.5 mL, 置 10 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,滤过,即得混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液制备 取样品粉末 0.5 g, 精密称定,置圆底烧瓶中,加甲醇 20 mL, 称定质量,水浴回流 30 min, 冷却,再次称定质量,以甲醇补足减失质

量,滤过,取续滤液,过 0.45 μm 微孔滤膜,作为供试品溶液。

2.4 线性范围考察 分别精密吸取 2.2 项对照品储备液 0.5, 1.0, 2.0, 5.0, 8.0, 10.0 mL 置 10 mL 量瓶中,用甲醇稀释至刻度,摇匀,即得系列浓度混合对照品溶液。取各系列浓度混合对照品溶液在上述色谱条件下进行 HPLC 分析,以各对照品溶液的浓度 ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) 为横坐标,以各成分色谱峰面积 (Y) 为纵坐标,绘制标准曲线,得回归方程分别为 $Y_{\text{金丝桃苷}} = 20\,363X - 27\,566$ ($r = 0.999\,6$), $Y_{\text{槲皮苷}} = 17\,431X - 10\,232$ ($r = 0.999\,6$), $Y_{\text{槲皮素}} = 28\,636X - 19\,251$ ($r = 0.999\,6$)。线性范围依次为 4.41 ~ 88.20, 2.94 ~ 58.80, 1.485 ~ 29.70 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

2.5 精密度试验 精密吸取 2.4 线性范围的考察项下对照品溶液各 10 μL ,连续进样 6 次,测定峰面积,计算 RSD。金丝桃苷、槲皮苷、槲皮素精密度

RSD 分别为 0.10%, 1.86%, 1.44%, 其 RSD 均 $< 2\%$,表明该仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验 取同一份供试品溶液分别放置,于 0, 2, 4, 6, 8, 12, 24 h 重复进样,测定金丝桃苷、槲皮苷、槲皮素的峰面积,其 RSD 分别是 1.42%, 1.62%, 1.78%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.7 重复性试验 取同一批次樱草杜鹃药材粉末,按 2.3 方法制备供试品溶液 6 份,平行测定,结果金丝桃苷、槲皮苷、槲皮素含量的 RSD 分别为 1.50%, 1.60%, 1.61%, 表明方法的重复性较好。

2.8 加样回收率 取同一批已知含量的樱草杜鹃样品粉末 0.25 g,共 6 份,置具塞锥形瓶中,分别加入金丝桃苷、槲皮苷、槲皮素对照品适量,照 2.3 方法制备,依法测定,并按公式计算各对照品的平均加样回收率和 RSD,结果见表 1。

表 1 樱草杜鹃加样回收率试验 ($n = 6$)

成分	No.	样品量/g	样品含量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
金丝桃苷	1	0.250 7	0.702 0	0.705 6	1.435 8	104.00	103.37	1.67
	2	0.250 3	0.700 1	0.705 6	1.437 9	104.46		
	3	0.250 4	0.701 1	0.705 6	1.426 1	102.74		
	4	0.250 3	0.700 8	0.705 6	1.435 8	104.16		
	5	0.250 8	0.702 2	0.705 6	1.408 8	100.14		
	6	0.250 2	0.700 6	0.705 6	1.439 5	104.73		
槲皮苷	1	0.250 7	0.351 0	0.352 8	0.698 7	98.56	98.07	1.41
	2	0.250 3	0.350 4	0.352 8	0.688 8	95.91		
	3	0.250 4	0.350 6	0.352 8	0.702 1	99.64		
	4	0.250 3	0.350 4	0.352 8	0.699 6	98.97		
	5	0.250 8	0.351 1	0.352 8	0.693 2	96.96		
	6	0.250 2	0.350 3	0.352 8	0.697 4	98.39		
槲皮素	1	0.250 7	0.235 7	0.257 4	0.495 1	100.81	100.19	1.20
	2	0.250 3	0.235 3	0.257 4	0.490 1	99.01		
	3	0.250 4	0.235 4	0.257 4	0.494 3	100.61		
	4	0.250 3	0.235 3	0.257 4	0.494 4	100.65		
	5	0.250 8	0.235 8	0.257 4	0.497 3	101.61		
	6	0.250 2	0.235 2	0.257 4	0.488 6	98.44		

2.9 样品含量测定 取 3 批次樱草杜鹃干燥药材粉末按 2.3 方法制备,在上述色谱条件下进行分析,用外标法计算金丝桃苷、槲皮苷与槲皮素的含量。结果见表 2。

3 讨论

3.1 流动相选择 在流动相的选择上,参考相关文

表 2 样品中金丝桃苷、槲皮苷与槲皮素含量的测定 %

药材批次	金丝桃苷	槲皮苷	槲皮素
201201	0.285	0.138	0.095
201202	0.256	0.048	0.062
201203	0.265	0.613	0.040

献^[11-16],以乙腈-甲醇(5:1)作为有机相,分别考察了 0.2% 甲酸、0.2% 磷酸、0.1% 甲酸作为水相对金丝桃苷、槲皮苷、槲皮素 3 种成分色谱峰分离度的影响。结果以乙腈-甲醇(5:1)作为有机相,0.1% 甲酸作为水相时,3 种成分的色谱峰对称因子和分离度好,理论塔板数高,符合 HPLC 测定药材含量的要求,所以最终选定乙腈-甲醇(5:1)-0.1% 甲酸作为样品测定的流动相。

3.2 提取方法选择 本文比较了不同的提取方法(回流、超声),不同提取时间(15,30,45 min),不同提取溶媒(60%,80%,100% 甲醇)和溶媒用量(20,40,60 mL),发现采用回流提取 30 min,提取溶剂为 100% 甲醇 20 mL 时,3 种黄酮类成分提取率较高。

HPLC 同时测定樱草杜鹃金丝桃苷、槲皮苷、槲皮素 3 种黄酮类成分含量测定的方法,简便快速,稳定可靠,重复性好,回收率高。由表 2 可知,樱草杜鹃 3 个批次中金丝桃苷、槲皮苷的含量相对较高,槲皮素的含量相对较低。另外,西藏藏医学院提供的药材中的槲皮苷含量远高于其他 2 个样品,其药材主要是花,叶很少,而雅加埂、贡嘎山所采樱草杜鹃花、枝、叶都有,以叶居多,因此本文推测槲皮苷成分可能主要以花中含量最高,但因本实验所搜集的样品批次较少,需要进一步研究证实。

[参考文献]

[1] 中华人民共和国药典委员会. 中华人民共和国卫生部药品标准. 藏药. 第一册[S]. 北京:化学工业出版社,1995:78.
[2] 江伯阳著. 毗卢遮那,韩文海译. 月王药诊(藏文)[M]. 北京:民族出版社,1985:253.
[3] 李雪峰,金慧子,陈刚,等. 藏药达里的化学成分及药

理作用研究进展[J]. 天然产物研究与开发,2008,20(6):1125.
[4] 嘎玛群培. 甘露本草明镜(藏文)[M]. 拉萨:西藏人民出版社,1993:82.
[5] 兰莎,张海伟,冯冠榕,等. 藏药樱草杜鹃的本草考证及现代研究进展[C]. 2011 年全国藏医药学术研讨会,2011:431.
[6] 李兆琳,薛敦澜,陈耀祖,等. 樱草杜鹃挥发油化学成分的研究[J]. 天然产物研究与开发,1991,3(2):11.
[7] 张雯洁,李忠琼,余珍,等. 樱草杜鹃的挥发油成分[J]. 药物分析杂志,1997,17(6):386.
[8] 吴奶珠,吴娟,颜仁龙,等. 藏药樱草杜鹃挥发油的 GC-MS 分析. 药物分析杂志,2010,30(10):1909.
[9] 李雪峰,金慧子,陈刚,等. 樱草杜鹃中的黄酮类化合物. 天然产物研究与开发,2009,21:612.
[10] 冯冠榕. 藏药“达里”抗氧化有效成分研究[D]. 成都:成都中医药大学. 2011.
[11] 梁珊珊,赵亮,张海,等. 优化的 HPLC-DAD 法同时测定罗布麻中 4 种黄酮类成分的含量[J]. 第二军医大学学报,2011,32(7):759.
[12] 石芸,池玉梅,谈献和,等. 黄蜀葵花 HPLC 指纹图谱及金丝桃苷、槲皮素含量测定研究[J]. 西北药学杂志,2011,26(6):399.
[13] 栗建明,侯惠婵,隆颖. 紫花杜鹃药材质量标准研究[J]. 今日药学,2011,21(4):229.
[14] 于静,邓雁如,陈奇,等. HPLC 测定金银花及金芪降糖片中 6 种成分的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(19):57.
[15] 潘雯婷,张丽艳,谢宇,等. 主成分及聚类分析法对不同产地头花蓼的综合质量评价[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(10):153.
[16] 林海霞,王书林,王砚,等. HPLC 测定竹叶柴胡中黄酮类成分的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(15):76.

[责任编辑 顾雪竹]

欢迎订阅 2014 年《中国中医药信息杂志》

《中国中医药信息杂志》是由国家中医药管理局主管、中国中医科学院中医药信息研究所主办的中医药学术期刊。本刊立足于行业报道的前沿,关注相关的政策动态,跟踪报道中医药重大课题,及时分析报道中医药的新政策、新技术、新发明、新成果、新疗法,努力使信息的选择与表达方式能够充分体现中医药发展水平,为广大读者提供一流的信息服务。

《中国中医药信息杂志》1994 年创刊,2002 年,被中国科学技术信息研究所的“中国科技论文统计源期刊”收录,成为中国科技核心期刊。随着期刊影响力的不断提升,已被波兰《哥白尼索引》、美国《化学文摘》、美国《乌利希期刊指南》、《世界卫生组织西太平洋地区医学索引》及英国《农业与生物科学研究中心文摘》、英国《全球健康》等国际检索系统收录。

《中国中医药信息杂志》是中医药行业一本独具特色的学术期刊,其内容较全面地反映了我国中医药发展水平。主要栏目有:中医动态、中医药发展论坛、专题论坛、改革与管理、中医药信息学、研究与进展、论著、实验研究、流行病学调查、质量标准研究、制剂与工艺、中药研究与开发、临床报道、专家经验、临证心得、思路与方法、中医教育、医院药学等。

《中国中医药信息杂志》为月刊,大 16 开国际开本,112 页,国内外公开发售,每册定价 10 元,全年 120 元。国内邮发代号:82-670;国外代号:M4564。也可直接汇款至本刊编辑部订阅。地址:北京市东直门内南小街 16 号《中国中医药信息杂志》编辑部 邮编:100700 电话:010-64014411-3278 E-mail:Lxx@mail.cintcm.ac.cn