

## 不同产地不同采收期紫花杜鹃药材中黄酮类成分的含量测定\*

李川晶<sup>1</sup>, 南敏伦<sup>2</sup>, 赫玉芳<sup>2,3</sup>, 白雪<sup>1</sup>, 张家贺<sup>4</sup>, 赵昱玮<sup>2,\*</sup>, 赵全成<sup>1,2\*\*</sup>

(1. 吉林农业大学, 长春 130118; 2. 吉林省中医药科学院, 长春 130012;

3. 长春中医药大学, 长春 130117; 4. 吉林吉春制药股份有限公司, 长春 136504)

**摘要 目的:** 建立高效液相色谱法测定不同产地、不同采收期紫花杜鹃药材中芸香苷、金丝桃苷、槲皮苷、槲皮素的含量及动态变化规律。**方法:** 采用 ACE C<sub>18</sub> (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱; 流动相为 0.2% 磷酸水溶液-乙腈, 梯度洗脱; 检测波长 254 nm; 流速 1.0 mL · min<sup>-1</sup>; 柱温 30 °C。**结果:** 芸香苷线性范围为 0.020 2~0.202 μg (r=0.999 6), 平均回收率 (n=6) 为 98.7% (RSD=1.1%); 金丝桃苷线性范围为 0.043 2~0.432 μg (r=0.999 9), 平均回收率 (n=6) 为 98.9%; 槲皮苷线性范围为 0.120 6~1.206 μg (r=0.999 5), 平均回收率 (n=6) 为 99.0%; 槲皮素线性范围为 0.008 2~0.082 μg (r=0.999 0), 平均回收率 (n=6) 为 98.7%。不同产地的紫花杜鹃药材中槲皮素、金丝桃苷、槲皮苷、芸香苷含量差异较大, 罗定地区含量最高。**结论:** 该方法操作简单、准确, 重复性好, 适合于紫花杜鹃中黄酮类成分的含量测定研究, 为紫花杜鹃寻找更佳产地及采收期提供了科学依据。

**关键词:** 紫花杜鹃; 产地; 采收期; 黄酮类成分; 高效液相色谱法; 含量测定

中图分类号: R 917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793 (2019) 09-1689-05

doi: 10.16155/j.0254-1793.2019.09.20

## Determination of flavonoids in Folium et Cacumen Rhododendri Mariae from different habitats and at different harvest time\*

LI Chuan-jing<sup>1</sup>, NAN Min-lun<sup>2</sup>, HE Yu-fang<sup>2,3</sup>, BAI Xue<sup>1</sup>, ZHANG Jia-he<sup>4</sup>,  
ZHAO Yu-wei<sup>2</sup>, ZHAO Quan-cheng<sup>1,2\*\*</sup>

(1. Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China; 2. Jilin Institute of Traditional Chinese Medicine,

Changchun 130012, China; 3. Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, China;

4. Jilin Jichun Pharmaceutical Limited by Share Ltd., Changchun 136504, China)

**Abstract Objective:** To establish an HPLC method for the determination of rutin, hyperoside, quercetin and quercetin in Folium et Cacumen Rhododendri Mariae from different habitats and at different harvest time, and to observe their dynamic changes. **Methods:** The analysis was carried out on an ACE C<sub>18</sub> (250 mm × 4.60 mm, 5 μm), and the mobile phase consisted of acetonitrile-0.2% phosphoric acid aqueous with gradient elution. The column temperature was maintained at 35 °C, the flow rate was 1 mL · min<sup>-1</sup> and the detection wavelength was set at 254 nm. **Results:** The linear

\* 吉林省科学发展计划项目 (合同编号: 2018021019YY)

\*\* 通信作者 Tel: (0431) 86058683, 13604306786; E-mail: 773686245@qq.com

第一作者 Tel: 18844146643; E-mail: 424306163@qq.com

ranges of rutin, hyperoside, quercetin and quercetin were 0.020 2–0.202  $\mu\text{g}$  ( $r=0.999\ 6$ ), 0.043 2–0.432  $\mu\text{g}$  ( $r=0.999\ 9$ ), 0.120 6–1.206  $\mu\text{g}$  ( $r=0.999\ 5$ ) and 0.008 2–0.082  $\mu\text{g}$  ( $r=0.999\ 0$ ) with average recoveries ( $n=6$ ) of 98.7%, 98.9%, 99.0% and 98.7%, respectively. The contents of rutin, hyperoside, quercetin and quercetin in Folium et Cacumen Rhododendri Mariae from different habitats were quite different, and the content in sample from Luoding was the highest. **Conclusion:** The method is simple, rapid for determination the contents of flavonoids in Folium et Cacumen Rhododendri Mariae, and can be used as a basis for finding better habitat and gathering periods of Folium et Cacumen Rhododendri Mariae.

**Keywords:** Folium et Cacumen Rhododendri Mariae; habitat; harvest time; flavonoids; HPLC; determination of content

紫花杜鹃为杜鹃花科植物紫花杜鹃 (*Rhododendron mariae* Hance) 的干燥叶或带叶嫩枝<sup>[1]</sup>, 味微辛、性微温, 广泛分布于广东省岭南、罗定、高要, 云南丽江以及四川宝兴等地区。紫花杜鹃包含挥发油、黄酮、有机酸、萜类、酚类、鞣质等活性成分<sup>[2]</sup>, 其中黄酮类成分药用效果显著<sup>[3]</sup>。研究表明, 紫花杜鹃的黄酮类物质具有祛痰止咳、杀菌消炎、镇痛的效果<sup>[4-5]</sup>, 故在单方和中药复方制剂中都有广泛的应用。目前以紫花杜鹃入药的中成药很多, 如紫花杜鹃片、紫花杜鹃胶囊、祛痰止咳颗粒、祛痰止咳胶囊等, 临床上对慢性支气管炎有显著的治疗效果<sup>[6]</sup>。紫花杜鹃药材的质量控制方法研究较少, 《中华人民共和国药典》1977年版及卫生部颁布的中药材标准均无紫花杜鹃药材的鉴别方法和具体含量测定方法, 文献报道只是对紫花杜鹃中槲皮素的含量进行了测定<sup>[7-8]</sup>, 导致市售紫花杜鹃的质量参差不齐, 从而影响药材的有效利用及中成药的质量。本研究针对以上情况, 采集5个产地15批不同采收期的紫花杜鹃药材进行比较研究, 采用HPLC法对黄酮类成分中含有广泛生理活性的槲皮苷、金丝桃苷、槲皮素、芸香苷进行含量测定<sup>[9-13]</sup>, 为严格把控紫花杜鹃药材的质量, 使其资源更合理地应

用, 以及对该药材更深入的开发研究提供有效依据。

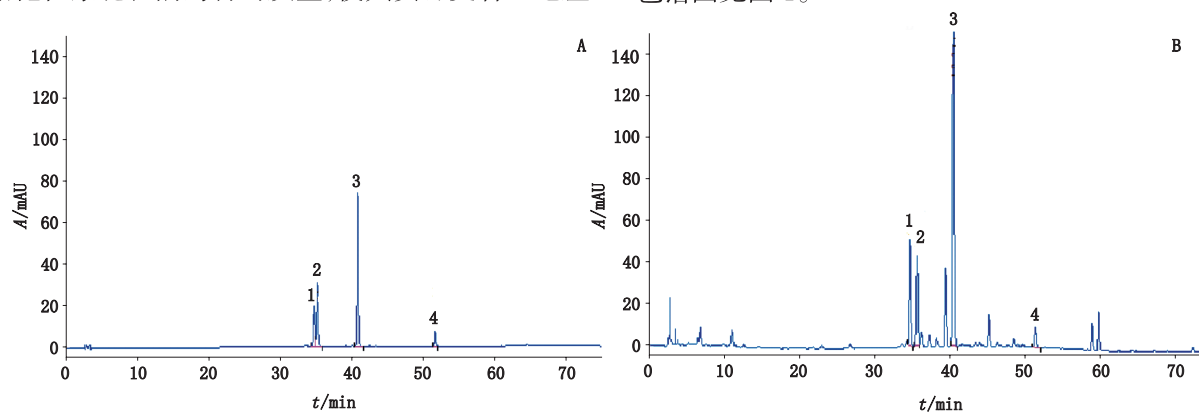
## 1 仪器与试药

**1.1 仪器** Agilent 1220 高效液相色谱仪 (安捷伦公司); BS 124S 十万分之一电子天平 (Sartorius 公司); KQ-250B 型超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司)。

**1.2 试药** 对照品槲皮素 (批号 100081-200406)、槲皮苷 (批号 111538-200302)、金丝桃苷 (批号 111521-200305)、芸香苷 (批号 100080-200306) 均购自中国食品药品检定研究院; 水为娃哈哈纯净水; 其他试剂均为分析纯。实验所用紫花杜鹃药材 (编号 1~15) 于 2017 年 4 月至 6 月采自不同产地, 由吉林省中医药科学院赵全成教授鉴定均为正品。

## 2 方法与结果

**2.1 色谱条件** 色谱柱为 ACE C<sub>18</sub> (250 mm × 4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ); 流动相 A 相为 0.2% 磷酸水, B 相为乙腈溶液, 梯度洗脱 (0~15 min, 90%A; 15~25 min, 90%A → 85%A; 25~35 min, 85%A → 80%A; 35~50 min, 80%A → 70%A; 50~60 min, 70%A → 65%A; 60~70 min, 65%A → 60%A); 流速为 1.0 mL · min<sup>-1</sup>; 检测波长为 254 nm; 柱温为 30 °C; 进样量为 10  $\mu\text{L}$ 。色谱图见图 1。



1. 芸香苷 (rutin) 2. 金丝桃苷 (hyperoside) 3. 槲皮苷 (quercetin) 4. 槲皮素 (quercetin)

图 1 对照品 (A) 及样品 (B) 高效液相色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of reference substances (A) and sample (B)

**2.2 对照品溶液的制备** 精密称取对照品芸香苷 10.10 mg、金丝桃苷 10.80 mg、槲皮苷 10.05 mg 和槲皮素 5.15 mg, 分别置 50 mL 量瓶中, 用甲醇溶解并定容至刻度, 得单一对照品储备液; 分别精密量取芸香苷对照品储备液 0.5 mL, 金丝桃苷对照品储备液 1.0 mL, 槲皮苷对照品储备液 3.0 mL, 槲皮素对照品储备液 0.4 mL, 置同一 10 mL 量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 制得每 1 mL 含芸香苷 0.010 1 mg、金丝桃苷 0.021 6 mg、槲皮苷 0.060 3 mg 和槲皮素 0.004 1 mg 的混合对照品溶液。

**2.3 供试品溶液的制备** 取样品(过 40 目筛) 0.5 g, 精密称定, 置 50 mL 量瓶中, 加入甲醇约 40 mL, 超声(功率 250W, 频率 40 kHz) 提取 30 min, 放至室温, 用甲醇定容至刻度, 摇匀, 滤过, 即得。

**2.4 线性关系考察** 分别精密量取混合对照品溶液 2、4、8、12、16、20 μL 进样测定, 以峰面积  $Y$  为纵坐标, 进样量  $X$  (μg) 为横坐标, 绘制标准曲线, 计算回归方程。芸香苷、金丝桃苷、槲皮苷、槲皮素的回归方程分别为

$$Y=2.638 \times 10^3 X-1.73 \quad r=0.999 \ 6$$

$$Y=3.209 \times 10^3 X-3.54 \quad r=0.999 \ 9$$

$$Y=2.100 \times 10^3 X+11.43 \quad r=0.999 \ 5$$

$$Y=4.079 \times 10^3 X-3.77 \quad r=0.999 \ 0$$

线性范围分别为 0.020 2~0.202 μg、0.043 2~0.432 μg、0.120 6~1.206 μg、0.008 2~0.082 μg, 各成分进样量与峰面积呈线性关系。

**2.5 精密度试验** 取供试品溶液(2 号样) 10 μL, 连续进样 6 次, 记录峰面积并计算, 芸香苷、金丝桃苷、槲皮苷、槲皮素峰面积的 RSD 分别为 0.95%、0.54%、0.72%、1.0%, 表明仪器的精密度良好。

**2.6 重复性试验** 精密量取供试样品(2 号样) 6 份, 按照“2.3”项下方法制备供试品溶液, 按色谱条件规定进样测定其峰面积, 计算芸香苷、金丝桃苷、槲皮苷及槲皮素的含量分别为 0.147%、0.265%、0.894%、0.020%, RSD 分别为 0.93%、0.57%、0.69%、1.0%, 表明该方法重复性良好。

**2.7 稳定性试验** 取供试品(2 号样), 按照“2.3”项下方法制备供试品溶液, 分别于 2、4、8、16、24、48 h 进行测定, 记录峰面积, 计算芸香苷、金丝桃苷、槲皮苷及槲皮素的含量, 结果芸香苷、金丝桃苷、槲皮苷、槲皮素含量的 RSD 分别为 0.91%、0.56%、0.69%、1.0%, 表明供试品溶液在 48 h 内稳定。

**2.8 加样回收率试验** 精密称量已知含量的供试品(2 号样) 6 份, 各 0.25 g, 分别加入适量的对照品, 按“2.3”项下方法制备供试溶液并进样测定, 计算回收率和 RSD, 结果见表 1。回收率良好。

表 1 加样回收率实验结果 (n=6)

Tab. 1 Results of recovery rate test

化合物 (compound)	取样量 (sample)/g	样品含量 (content)/mg	加入量 (added)/mg	测得量 (found)/mg	回收率 (recovery)/%	平均回收率 (mean recovery)/%	RSD/%
芸香苷 (rutin)	0.250 3	0.366 8	0.367 2	0.729 2	98.7	98.7	1.1
	0.250 1	0.366 5	0.367 2	0.729 1	98.8		
	0.250 6	0.367 2	0.367 2	0.723 6	97.1		
	0.250 2	0.366 7	0.367 2	0.728 4	98.5		
	0.250 4	0.366 9	0.367 2	0.735 5	100.4		
	0.250 1	0.366 5	0.367 2	0.729 7	98.9		
金丝桃苷 (hyperoside)	0.250 3	0.663 3	0.664 0	1.314 6	98.2	98.9	1.0
	0.250 1	0.662 8	0.664 0	1.317 7	98.6		
	0.250 6	0.664 1	0.664 0	1.320 6	98.9		
	0.250 2	0.663 0	0.664 0	1.330 8	100.6		
	0.250 4	0.663 6	0.664 0	1.323 5	99.4		
	0.250 1	0.662 8	0.664 0	1.312 3	97.8		
槲皮苷 (quercetin)	0.250 3	2.237 7	2.239 0	4.443 2	98.5	98.9	1.1
	0.250 1	2.235 9	2.239 0	4.469 3	99.7		
	0.250 6	2.240 4	2.239 0	4.430 9	97.8		
	0.250 2	2.236 8	2.239 0	4.482 1	100.2		
	0.250 4	2.238 6	2.239 0	4.474 5	99.9		
	0.250 1	2.235 9	2.239 0	4.421 6	97.6		
槲皮素 (quercetin)	0.250 3	0.049 8	0.049 7	0.099 0	99.0	98.7	1.3
	0.250 1	0.049 8	0.049 7	0.098 7	98.4		
	0.250 6	0.049 9	0.049 7	0.099 9	100.6		
	0.250 2	0.049 8	0.049 7	0.098 5	97.9		
	0.250 4	0.049 9	0.049 7	0.098 0	96.8		
	0.250 1	0.049 8	0.049 7	0.099 1	99.2		

2.9 样品含量测定 取不同产地和不同采收期的紫花杜鹃样品,按“2.3”项下方法制备供试品溶液,进

样分析,测定芸香苷、金丝桃苷、槲皮苷及槲皮素的峰面积并计算含量,结果见表2。

表2 不同产地不同采收期紫花杜鹃中黄酮类化合物的含量测定 ( $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ,  $n=3$ )

Tab. 2 Determination of flavonoids in Folium et Cacumen *Rhododendri Mariae* from differet habitans and at different harvest times

样品编号 (sample No.)	产地 (habitat)	采收期 (harvest time)	芸香苷 (rutin)	金丝桃苷 (hyperoside)	槲皮苷 (quercitin)	槲皮素 (quercetin)
1	广东岭南 (Lingnan, Guangdong)	2017-04	1.324	2.325	7.658	0.175
2	广东罗定 (Luoding, Guangdong)	2017-04	1.465	2.869	8.940	0.199
3	广东高要 (Gaoyao, Guangdong)	2017-04	1.122	2.650	7.965	0.148
4	云南丽江 (Lijiang, Yunnan)	2017-04	0.658	1.325	3.985	0.125
5	四川宝兴 (Baoping, Sichuan)	2017-04	0.852	1.568	4.295	0.106
6	广东岭南 (Lingnan, Guangdong)	2017-05	1.444	2.559	7.958	0.190
7	广东罗定 (Luoding, Guangdong)	2017-05	1.582	2.996	9.204	0.213
8	广东高要 (Gaoyao, Guangdong)	2017-05	1.250	2.795	8.215	0.172
9	云南丽江 (Lijiang, Yunnan)	2017-05	0.702	1.499	4.052	0.138
10	四川宝兴 (Baoping, Sichuan)	2017-05	0.896	1.698	4.895	0.126
11	广东岭南 (Lingnan, Guangdong)	2017-06	1.385	2.426	7.725	0.185
12	广东罗定 (Luoding, Guangdong)	2017-06	1.501	2.990	9.052	0.210
13	广东高要 (Gaoyao, Guangdong)	2017-06	1.204	2.770	8.025	0.168
14	云南丽江 (Lijiang, Yunnan)	2017-06	0.715	1.498	4.152	0.140
15	四川宝兴 (Baoping, Sichuan)	2017-06	0.905	1.890	5.205	0.142

### 3 讨论

3.1 分析方法确定 由于紫花杜鹃中成分具有多样性,单一浓度甲醇-水、乙腈-水不能将有效成分峰理想分离,所以经过多次试验择优,本实验以乙腈-0.2%磷酸水溶液为流动相,采用梯度洗脱,样品中芸香苷、金丝桃苷、槲皮苷、槲皮素达到基线分离;采用254 nm为检测波长,使样品中的目标峰和杂质峰完全分离;由于芸香苷、金丝桃苷、槲皮苷、槲皮素为黄酮类的低极性化合物,故选用不同浓度乙醇和甲醇对提取溶剂进行考察,结果表明甲醇提取效果更好;同时采用超声和回流2种提取方法对提取方法进行了考察,实验结果表明,两者提取效率接近,无明显差别,考虑到超声提取操作简单,故此选择超声提取;提取时间考察结果表明,在30 min内目标化合物已充分溶解。

3.2 结果分析 本实验对不同产地和不同采收期的紫花杜鹃干燥叶及嫩枝中的芸香苷、金丝桃苷、槲皮

苷、槲皮素进行含量测定,通过实验看出,不同产地的芸香苷、金丝桃苷、槲皮苷、槲皮素含量明显不同,同一采收期药材广东罗定的含量最高,云南丽江的含量最低,5月份槲皮苷变化最为明显。不同采收期实验结果表明,广东3个地区的5月份采收的紫花杜鹃中4个成分的含量最高,云南丽江及四川宝兴6月份采收的紫花杜鹃中4个成分的含量最高,推测可能由于地区间的差异,使开花期延后所致,说明紫花杜鹃在花开始开放还未完全开放时有效成分的含量最高,可以为紫花杜鹃的采收期的确定奠定基础。

本研究采用建立的含量测定方法对含紫花杜鹃药材的中成药进行4个黄酮成分的含量测定研究,实验结果表明,本方法适合于含紫花杜鹃药材的中成药的含量测定,其分离度、耐用性等均符合规定。本实验结果可以为紫花杜鹃药材的质量控制研究奠定基础。

## 参考文献

- [1] 中华人民共和国药典 1977 年版. 一部[S]. 1977: 581  
ChP 1977. Vol I [S]. 1977: 581
- [2] 徐礼荣, 沙世炎. 中草药有效成分分析法. 上册[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1984: 218  
XU LL, SHA SY. Analysis of Effective Components of Chinese Herbal Medicine [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1984: 218
- [3] GUO Q, LI Y, BAO Y, *et al.* Five new compounds from *Rhododendron mariae* Hance [J]. *J Asia Nat Prod Res*, 2014, 16(1): 1
- [4] RUXANDRA P, BRIGITTE K. The genus *Rhododendron*: an ethnopharmacological and toxicological review [J]. *J Ethnopharmacol*, 2013, 147(1): 42
- [5] 张梅, 潘大仁. 杜鹃属植物黄酮类化合物的研究进展 [J]. 海峡科学, 2012, 29(5): 3  
ZHANG M, PAN DR. Research progress on flavonoids of *Rhododendron* [J]. *Straits Sci*, 2012, 29(5): 3
- [6] 中国医学科学院药物研究所. 中药志 I [M]. 第 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 1993: 278  
Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences. Chinese Medicine Record I [M]. 2nd Ed. Beijing: People's Medical Publishing House, 1993: 278
- [7] 卢文彪, 曾元儿. HPLC 法测定紫花杜鹃胶囊中槲皮素的含量 [J]. 湖南中医药导报, 2002, 8(3): 133  
LU WB, ZENG YE. Determination of quercetin in *Rhododendron mariae* Hance capsules by HPLC [J]. *Hunan Guiding J Tradit Chin Med Pharmacol*, 2002, 8(3): 133
- [8] 曾玉珺, 黄健. HPLC 法测定紫花杜鹃片中槲皮素的含量 [J]. 中国实用医药, 2008, 3(2): 44  
ZENG YJ, HUANG J. Determination of quercetin in *Rhododendron mariae* Hance tablet by HPLC [J]. *China Pract Med*, 2008, 3(2): 44
- [9] 黄辉强, 冯毅凡, 芮雯, 等. 紫花杜鹃中黄酮类成分的 UPLC/Q-TOF-MS 分析 [J]. 中国中药杂志, 2009, 34(7): 875  
HUANG HQ, FENG YF, RUI W, *et al.* Analysis of flavonoids in *Rhododendron mariae* by UPLC/Q-TOF-MS [J]. *China J Chin Mater Med*, 2009, 34(7): 875
- [10] 范适. 不同产地、不同采收期及不同部位叶下珠药材柯里拉京含量的比较研究 [J]. 南华大学学报(自然科学版), 2016, 30(3): 98  
FAN S. Comparative study of contents of corilagin in *Phyllanthus urinaria* L. from different habitats, different harvest time, different parts [J]. *J Nanhua Univ (Nat Sci)*, 2016, 30(3): 98
- [11] 曾建伟, 吴锦忠, 林忠宁, 等. HPLC 测定不同产地佛手中橙皮苷的含量 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(19): 97  
ZENG JW, WU JZ, LIN ZN, *et al.* Determination of hesperidin in *Fructus Citris Sarcodactylis* from different provenances by HPLC [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*, 2012, 18(19): 97
- [12] 姚雪莲, 裴彩云, 王宗权. 不同产地、不同采收期黄芪药材及饮片毛蕊异黄酮葡萄糖苷及芒柄花素含量测定 [J]. 药物分析杂志, 2012, 32(5): 797  
YAO XL, PEI CY, WANG ZQ. Determination of calycosin-7-O- $\beta$ -D-glucoside and formononetin in crude drugs and slices of astragalus from different habitats and gathering periods [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2012, 32(5): 797
- [13] 吴拾保, 覃玉梅, 袁铭铭, 等. HPLC 法同时测定不同产地蔓性千斤拔中 5 个异黄酮成分的含量 [J]. 药物分析杂志, 2016, 36(11): 1988  
WU SB, QIN YM, YUAN MM, *et al.* HPLC simultaneous determination of five isoflavone chemical components in the roots of *Moghania philippinens* from different habitats [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2016, 36(11): 1988

(本文于 2018 年 7 月 17 日收到)