

HPLC 同时测定牛皮杜鹃中 3 种成分的含量及其提取方法的比较

关颖丽^{1,2*}, 何晓燕³, 姚慧敏^{1,2}

- (1. 通化师范学院 制药与食品科学学院, 吉林 通化 134002;
2. 吉林省长白山药用植物研究重点实验室, 吉林 通化 134002;
3. 通化师范学院 生命科学学院, 吉林 通化 134002)

〔摘要〕 目的:建立 HPLC 同时测定长白山牛皮杜鹃中芦丁、槲皮素及山柰酚含量的方法,并比较不同提取方法对其含量的影响。方法:采用 Agilent Eclipse XDB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm);乙腈-0.1% 磷酸水溶液进行梯度洗脱;检测波长为 360 nm,流速为 0.8 mL·min⁻¹,柱温为 30 ℃。结果:芦丁、槲皮素、山柰酚的在一定范围内线性关系均良好;平均加样回收率分别为 99.9% (RSD 1.2%),99.2% (RSD 2.8%),101.8% (RSD 2.3%)。结论:该方法简便、快速、准确可靠。3 种不同提取方法中以超声提取法所得黄酮类含量均最高。可用于长白山牛皮杜鹃的质量控制。

〔关键词〕 牛皮杜鹃; 芦丁; 槲皮素; 山柰酚; 提取方法

〔中图分类号〕 R284.1 〔文献标识码〕 A 〔文章编号〕 1005-9903(2014)22-0100-04

〔doi〕 10.13422/j.cnki.syfjx.2014220100

〔网络出版地址〕 <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20141010.1018.010.html>

〔网络出版时间〕 2014-10-10 10:18

Simultaneous Determination of Three Components in *Rhododendron chrysanthum* by HPLC and Comparison Among Different Extraction Method

GUAN Ying-li^{1,2,*}, HE Xiao-yan³, YAO Hui-min^{1,2}

- (1. College of Pharmaceutical and Food Science, Tonghua Teachers College, Tonghua 134002, China;
2. Key Laboratory of Medicinal Plants in Jilin Changbai Mountain, Tonghua 134002, China;
3. College of Life Science, Tonghua Teachers College, Tonghua 134002, China)

〔Abstract〕 To establish an HPLC method for the simultaneous determination of rutin, quercetin and populnetin in *Rhododendron chrysanthum* from Changbai mountain and compare their contents by different extractive methods. The HPLC equipped with the Agilent Eclipse XDB-C₁₈ column (4.6 mm×250 mm, 5 μm). The mobile phase consisted of acetonitrile and 0.1% phosphoric acid with gradient elution. The detection wave length was set at 360 nm and the flow rate was 0.8 mL·min⁻¹, and the temperature was set at 30 ℃. The linear ranges of rutin, quercetin and populnetin were good, the average recoveries were 99.9% (RSD 1.2%), 99.2% (RSD 2.8%), 101.8% (RSD 2.3%), respectively. The method is simple, quick, accurate and repeatable for quantitative analysis. The supersonic extraction showed the highest content of flavonoids among the three extractive methods. The method can be used for quality control of *R. chrysanthum* from Changbai mountain.

〔Key words〕 *Rhododendron chrysanthum*; rutin; quercetin; populnetin; extractive method

〔收稿日期〕 20140109(009)

〔基金项目〕 吉林省教育厅“十二五”科学技术研究项目(吉教科合字[2012]第 360 号)

〔通讯作者〕 * 关颖丽,副教授,硕士,从事生药有效成分的分离鉴定及生物活性研究,Tel:15944586169, E-mail:guanyingli7151@126.com

牛皮杜鹃又称牛皮茶、高山茶等,主产于吉林省长白山,是长白山生态系统的主要建种之一^[1]。其具有收敛、强心、抗菌等功效,在民间常用于治疗关节炎,同时具有快速补充能量、扶正固本的作用^[2],是一种极具开发潜力的医药及保健品资源。牛皮杜鹃主要含有黄酮类及单宁酸类化合物^[3-4]。研究表明黄酮类成分具有抗炎、抗菌、抗氧化等活性,与牛皮杜鹃的功效具有密切的相关性。而目前国内外对牛皮杜鹃化学成分的研究甚少。为了更好地对其质量进行控制,本文采用 HPLC 同时测定长白山牛皮杜鹃中芦丁、槲皮素及山柰酚的含量,并比较不同提取方法对其含量的影响。

1 仪器与试剂

牛皮杜鹃药材,采自于吉林省长白山,经通化师范学院生命科学学院周繇教授鉴定为杜鹃花科植物牛皮杜鹃 *Rhododendron chrysanthum*,取其茎叶,干燥粉碎,备用。

Agilent 1100 型高效液相色谱仪(四元梯度泵、在线脱气机、自动进样器、柱温箱、紫外检测器、Chemstation 色谱工作站),Sartorius 型电子分析天平 CP225D, KQ-500 型超声波清洗器(昆山市超声波仪器有限公司)。

芦丁对照品(批号 100080-200707),槲皮素对照品(批号 100081-200907),山柰酚对照品(批号 110861-201209),均购自于中国食品药品检定研究院。水(娃哈哈纯净水),乙腈(色谱纯),甲醇、磷酸均为分析纯。

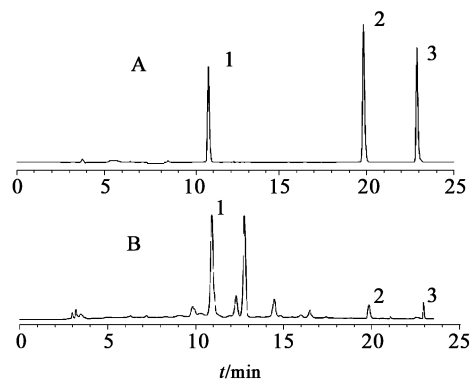
2 方法与结果

2.1 色谱条件 Agilent Eclipse XDB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm),流动相乙腈(A)-0.1%磷酸水溶液(B),梯度洗脱(0~15 min, 15% A; 15~25 min, 35% A),检测波长 360 nm,流速 0.8 mL·min⁻¹,柱温 30℃。理论板数按芦丁计应不小于 2 000。见图 1。

2.2 对照品溶液的制备 分别精密称取芦丁、槲皮素、山柰酚对照品适量,用甲醇溶解并定容。制成质量浓度分别为 132.8 mg·L⁻¹的芦丁、78.1 mg·L⁻¹的槲皮素、51.4 mg·L⁻¹的山柰酚对照品溶液,备用。

2.3 供试品溶液的制备

2.3.1 超声提取法 取药材粉末 0.5 g,精密称定,置于具塞锥形瓶中,精密加入 50 mL 的 70% 乙醇,称定质量,超声提取 30 min(功率为 500 W,频率为 40 kHz),取出放冷,再称定质量,用 70% 乙醇补足



1. 芦丁; 2. 槲皮素; 3. 山柰酚

图 1 混合对照品(A)、超声提取法的牛皮杜鹃样品(B)的 HPLC

试品溶液 1, 备用。

2.3.2 连续回流提取法 取药材粉末 0.5 g,精密称定,置于索氏提取器中,加入 50 mL 的 70% 乙醇,连续回流 2 h 取出,过滤,滤液浓缩至干。用 70% 乙醇溶解并定容至 50 mL 量瓶中。摇匀,微孔滤膜过滤,取续滤液作为供试品溶液 2, 备用。

2.3.3 水煎煮法 取药材粉末 0.5 g,精密称定,加水 100 mL,加热煎煮 40 min,过滤。药渣重复此操作 1 次,合并滤液,浓缩至干。用 70% 乙醇溶解并定容至 50 mL 量瓶中。摇匀,微孔滤膜过滤,取续滤液作为供试品溶液 3, 备用。

2.4 线性关系考察 分别精密吸取芦丁、槲皮素、山柰酚对照品 1, 0.5, 0.5 mL, 混匀后定容至 10 mL 量瓶中。分别精密吸取混合对照品溶液 1, 5, 10, 15, 20 μL, 按上述色谱条件依次注入高效液相色谱仪中,分别测定对照品的峰面积。以进样量(X , μg)为横坐标,峰面积(Y)为纵坐标,分别绘制标准曲线,得回归方程。其中芦丁的回归方程为: $Y = 10\,423X - 8.33$ ($r = 0.999\,8$);槲皮素的回归方程为: $Y = 27\,964X + 5.87$ ($r = 0.999\,9$);山柰酚的回归方程为: $Y = 32\,297X - 6.75$ ($r = 0.999\,8$)。结果表明,芦丁在 0.013 3 ~ 0.266 μg、槲皮素在 0.003 91 ~ 0.078 1 μg、山柰酚在 0.002 57 ~ 0.051 4 μg 线性关系均良好。

2.5 精密度试验 精密吸取混合对照品溶液 20 μL,在上述色谱条件下连续进样 6 次,记录峰面积,计算得芦丁、槲皮素、山柰酚的 RSD 分别为 1.1%, 0.1%, 1.1%, 表明仪器精密度良好。

2.6 重复性试验 取同一批牛皮杜鹃药材粉末约 0.5 g,按 2.3.1 项方法平行制备供试品溶液 6 份,分别进样 20 μL,记录峰面积。计算得芦丁、槲皮素、山柰酚的 RSD 分别为 1.3%, 1.8%, 1.2%, 表明

重复性良好。

2.7 稳定性试验 精密吸取同一供试品溶液 20 μL,分别在 0,2,4,8,12,24 h 进样,记录峰面积,计算得芦丁、槲皮素、山柰酚的 RSD 分别为 1.0% ,1.1% ,2.0% ,表明在 24 h 内供试品的稳定性良好。

表 1 芦丁、槲皮素、山柰酚的加样回收率试验(*n* = 6)

成分名称	称样量/g	样品中量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
芦丁	0.508	0.499 0	0.531 2	1.031	100.2	99.1	1.2
	0.501	0.492 5	0.531 2	1.035	102.1		
	0.508	0.498 9	0.531 2	1.032	100.4		
	0.504	0.495 0	0.531 2	1.020	98.8		
	0.506	0.498 1	0.531 2	1.027	99.6		
	0.506	0.496 2	0.531 2	1.019	98.4		
槲皮素	0.501	0.013 2	0.015 6	0.029 0	101.3	99.2	2.8
	0.504	0.012 1	0.015 6	0.028 2	103.2		
	0.505	0.013 0	0.015 6	0.028 1	96.8		
	0.504	0.013 2	0.015 6	0.028 4	97.4		
	0.506	0.013 4	0.015 6	0.029 2	101.3		
	0.507	0.013 8	0.015 6	0.028 7	95.5		
山柰酚	0.502	0.010 7	0.010 3	0.020 8	98.1	101.8	2.3
	0.502	0.010 5	0.010 3	0.021 1	102.9		
	0.503	0.010 3	0.010 3	0.021 0	103.9		
	0.507	0.010 7	0.010 3	0.020 9	99.0		
	0.505	0.010 5	0.010 3	0.021 2	103.8		
	0.503	0.010 7	0.010 3	0.021 3	102.9		

2.9 样品含量测定 精密吸取按 2.3 项方法制备的牛皮杜鹃供试品溶液 1,2,3 各 20 μL,按上述色谱条件进行测定,计算各供试品中芦丁、槲皮素、山柰酚的含量,结果见表 2 所示。

表 2 不同提取方法的牛皮杜鹃中芦丁、槲皮素、山柰酚的质量分数(*n* = 3) mg·g⁻¹

不同提取方法	芦丁	槲皮素	山柰酚
超声提取法	0.983	0.026	0.021
连续回流提取法	0.757	0.025	0.016
水煎煮法	0.709	0.023	0.008

3 讨论

3.1 色谱条件的优化 本文考察了 250,285,338,360 nm 共 4 种不同吸收波长的光谱,结果显示在 360 nm 处 3 种黄酮类成分均有较好的吸收。在流动相的优化方面,先后试用了不同比例的乙腈-0.4% 甲酸、乙腈-0.1% 磷酸、甲醇-0.1% 磷酸、甲醇-水,从分离情况和出峰时间等综合分析,最终选择乙

2.8 加样回收试验 取已知含量的牛皮杜鹃药材粉末约 0.5 g,共 6 份,于每份中加入一定量的对照品溶液,按 2.3.1 项方法制备供试品溶液,分别进样 20 μL,记录峰面积。计算平均回收率。结果表明各对照品回收均良好。见表 1。

腈-0.1% 磷酸水溶液梯度洗脱,分离效果理想,出峰时间适当。

3.2 样品提取方法考察 本文选用了 3 种常用的传统提取方法。对于超声提取法及连续回流提取法所用的提取溶剂,先后比较了 50% ,70% ,95% 乙醇的提取效果。结果表明 70% 的乙醇提取效率最高。同时对 3 种提取方法的提取时间、溶剂用量等因素也进行了考察,最终确定了上述操作方法。

3.3 测定结果分析 本文首次建立了 HPLC 同时测定长白山牛皮杜鹃中芦丁、槲皮素及山柰酚含量的方法,此法简便、快速、结果准确可靠、重复性好。结果表明 3 种提取方法中以超声提取所得 3 种黄酮类成分整体含量最高,其中芦丁的含量最高。同时在色谱图中还有一个主要色谱峰未得到成分鉴定,将有待于进一步研究。

牛皮杜鹃在我国分布甚狭,主要生长于长白山的岳桦林下和高山冻原上,属于长白山苔原带海拔 1 950 ~ 2 650 m 生物量最大的物种。其抗寒耐风能

大黄等 5 味中药及单体成分对临床多重耐药菌的抑制作用

彭苑霞¹, 刘晓强², 温玲玲¹, 詹若挺¹, 陈蔚文¹, 徐晖^{1*}
(1. 广州中医药大学 中药资源科学与工程研究中心, 岭南中药资源科学教育部重点实验室, 广州 510006;
2. 中山大学 孙逸仙纪念医院, 广州 510006)

[摘要] 目的:研究大黄、丁香、蒲公英、姜黄、金银花 5 味中药及大黄素、芦荟大黄素、丁香酚、咖啡酸、绿原酸和姜黄素对临床多重耐药菌的抑制作用。方法:用微量稀释法测定各药物的最小抑菌浓度(MIC)。记录细菌连续 24 h 的吸光度 A_{595} , 绘制生长曲线,用聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分析细菌可溶性蛋白质。结果:大黄的抑菌效果显著, MIC 在 6.25 ~ 12.50 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$; 丁香的抑菌谱最广, 对所有实验菌株均有抑菌作用, MIC 在 3.13 ~ 25.00 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 蒲公英、金银花和姜黄在本实验中未见抑菌活性; 6 种单体药物在实验中对铜绿假单胞菌均没有抑菌效果; 大黄素、芦荟大黄素和丁香酚对金黄色葡萄球菌的抑菌效果优于其他临床耐药菌株; 大黄素的抑菌效果显著, MIC 在 1.95 ~ 15.63 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$; 芦荟大黄素的抑菌效果稍弱, MIC 在 2.34 ~ 75.00 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$; 丁香酚是唯一对鲍曼不动杆菌有抑菌活性的单体化合物, MIC 在 5.32 ~ 10.64 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$; 姜黄素、咖啡酸、绿原酸在实验中未显示抑菌活性。大黄素作用下, 金黄色葡萄球菌的生长及可溶性蛋白表达发生明显改变。结论:大黄和丁香以及大黄素和芦荟大黄素、丁香酚对金黄色葡萄球菌等多种临床多重耐药菌具有显著的抑制效果。大黄素、芦荟大黄素和丁香酚分别是大黄和丁香发挥抑菌作用的主要成分, 其具体作用机制有待于深入研究。

[关键词] 单体化合物; 抑菌活性; 临床多重耐药菌
[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)22-0103-05
[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014220103

Antibacterial Activities of Five Chinese Medicines of Rhei Radiset Rhizoma and Their Chemical Constituents Against Multidrug-resistant Clinical Bacteria Isolates

PENG Yuan-xia¹, LIU Xiao-qiang², WEN Ling-ling¹, ZHAN Ruo-ting¹, CHEN Wei-wen¹, XU Hui^{1*}
(1. Research Center of Chinese Herbal Resource Science and Engineering, Key Laboratory of

[收稿日期] 20140103(006)
[第一作者] 彭苑霞, 硕士, 从事中药抗菌作用机制研究, Tel:13533051283, E-mail:13533051283@163.com
[通讯作者] * 徐晖, 博士, 研究员, 从事中药分析和微生物分子生物学研究, Tel:020-39358331, E-mail:zyfxsherry@gzhtcm.edu.cn

力很强,具有很好的保持水土的生态功能,对维持生态平衡起重要作用^[2]。目前国内外学者已经开展了有关的长白山牛皮杜鹃组培快繁及初步驯化栽培的实验研究^[5]。但若要真正充分对其进行资源保护及合理开发利用,则必须对其进行化学成分的深入研究,以利于质量控制。因此本文的研究结果可为长白山牛皮杜鹃的开发利用提供一定的理论依据。

[参考文献]

[1] 栾志慧,邵殿坤,杨丽娟,等. 不同海拔长白山牛皮杜鹃叶片适应性结构的对比分析[J]. 北方园艺, 2013, 17(19):80.

[2] 于盼盼. 牛皮杜鹃对环境变化的响应及基因表达差异的初步研究[D]. 吉林:吉林大学, 2011.
[3] 于秋艳,宗成文,赵金伟,等. 长白山牛皮杜鹃组培苗与野生苗药用成分含量分析[J]. 湖北农业科学, 2010, 49(11):2892.
[4] 于秋艳. 牛皮杜鹃组培快繁技术及有效成分研究[D]. 延吉:延边大学, 2010.
[5] 徐颖,金灿,宗成文,等. 长白山牛皮杜鹃组培快繁及初步驯化栽培研究[J]. 江苏农业科学, 2010, (2):47.

[责任编辑 邹晓翠]