

HPLC 同时测定紫斑牡丹花粉中槲皮素、木犀草素、异鼠李素的含量

王斌利¹, 王新娣², 石晓峰^{1,2*}, 张莉霞¹ (1.甘肃中医药大学, 兰州 730030; 2.甘肃省医学科学研究院, 兰州 730050)

摘要: 目的 建立同时测定紫斑牡丹花粉中 3 个黄酮类化合物槲皮素、木犀草素、异鼠李素含量的 RP-HPLC。方法 样品用 25 倍 75% 乙醇回流提取 2 h, 提取液加 15% 盐酸水解 2.5 h; 采用 Agilent Eclipse plus C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 以甲醇-乙腈-0.1% 磷酸(25:13:62)为流动相等度洗脱, 流速: 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长: 360 nm, 柱温 35 ℃。结果 槲皮素、木犀草素和异鼠李素分别在 1.3~26.0, 0.7~14.0, 8.4~168.0 μg·mL⁻¹ 内呈良好的线性关系, 相关系数均≥0.999 9; 加样回收率(n=9)的 RSD 值分别为 99.8%, 100.3%, 100.8%。结论 该方法简单、高效, 可作为紫斑牡丹花粉质量控制的参考。

关键词: 紫斑牡丹花粉; 槲皮素; 木犀草素; 异鼠李素; 含量测定; 高效液相色谱法

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2017)02-0262-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2017.02.023

Simultaneous Determination of Quercetin, Luteolin and Isorhamnetin in Pollen of *Paeonia Rockii* by RP-HPLC

WANG Binli¹, WANG Xindi², SHI Xiaofeng^{1,2*}, ZHANG Lixia¹ (1. Gansu University of TCM, Lanzhou 730030, China; 2. Gansu Academy of Medical Science, Lanzhou 730050, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To develop a RP-HPLC method for simultaneous determination of three flavonoids (quercetin, luteolin, isorhamnetin) in pollen from *Paeonia rockii*. **METHODS** The samples were pretreated, including reflux extraction with 75% ethanol for 2 h (with the ratio of liquor to material of 25:1), and then the extracting solution was hydrolyzed with 15% hydrochloric acid for another 2.5 h. Agilent Eclipse plus C₁₈ column (250 mm×4.6 mm, 5 μm) was adopted. The mobile phase was methanol-acetonitrile-0.1% phosphoric acid (25:13:62) at the flow rate of 1.0 mL·min⁻¹. The detection wavelength was 360 nm and the column temperature was 35 ℃. **RESULTS** Calibration curves were found to be linear in the range of 1.3~26.0 μg·mL⁻¹ for luteolin, 0.7~14.0 μg·mL⁻¹ for quercetin and 8.4~168.0 μg·mL⁻¹ for isorhamnetin. The correlation coefficients were greater or equal to 0.999 9. The average recoveries(n=9) of three flavonoids were 99.8%, 100.3% and 100.8%, respectively. **CONCLUSION** The developed method is simple and efficient, which can be used for quality control of pollen of *Paeonia rockii*.

KEY WORDS: pollen of *paeonia rockii*; quercetin; luteolin; isorhamnetin; content assay; HPLC

紫斑牡丹 *Paeonia rockii* 为毛茛科 Ranunculaceae 芍药属 *Paeonia* 多年生木本植物, 又名甘肃牡丹、西北牡丹, 因其花瓣基部有一个明显的色斑而得名^[1], 是仅次于中原牡丹品种群的第 2 大品种群^[2], 是我国中西部地区的特有中药材和花中珍品, 分布于四川北部、甘肃南部、陕西秦岭中段以西, 被列为国家珍稀濒危三级重点保护植物^[3]。近 10 年来, 紫斑牡丹在我省陇南、天水、定西、临夏、兰州等地广泛种植, 不仅是一种重要的观赏植物, 其根皮作为药用丹皮被甘肃省中药材标准收载, 具有清热凉血, 活血化瘀的功效^[4-5]。我国自公布了油菜花粉、松花粉、向日葵花粉、紫云英花粉、

荞麦花粉、高粱花粉等可作为药食兼用花粉之后, 花粉作为普通食品得到应有的重视^[6-7]。有关紫斑牡丹花粉的研究目前尚未见文献报道, 为了对其进行开发利用, 本实验采用 HPLC 法同时测定了紫斑牡丹花粉中槲皮素、木犀草素和异鼠李素的含量, 结果表明该方法简单、快速、高效, 可为紫斑牡丹花粉的进一步开发提供技术支撑。

1 仪器与材料

Agilent 1100 型高效液相色谱仪, 四元泵, 可变波长扫描紫外检测器, Agilent 1100 化学工作站, 标准手动进样器(美国安捷伦公司生产), AE260 型万分之一电子天平(瑞士 Mettler Toledo 公司),

基金项目: 兰州市科技计划项目(2016-3-17)

作者简介: 王斌利, 女, 硕士生 Tel: (0931)2302684 E-mail: 1028928175@qq.com *通信作者: 石晓峰, 男, 主任药师 Tel: (0931)2302664 E-mail: shixiaofeng2005@sina.com

CP225D 型十万分之一电子分析天平(德国 Sartorius 公司生产)。

槲皮素对照品(批号: 100081-200907, 含量: 96.5%, 供含量测定用)、异鼠李素对照品(批号: 110860-200608, 供含量测定用)均由中国食品药品检定研究院提供; 木犀草素对照品(贵州迪大生物有限公司, 批号: 491-70-3, 含量 $\geq 98\%$); 甲醇、乙腈为色谱纯, 其他试剂均为分析纯。紫斑牡丹花粉于 2015 年 5 月采自兰州新区中川牡丹园, 其原植物经兰州牡丹园艺开发公司赵潜龙高级工程师鉴定为 *Paeonia rockii* (S. G. Haw et L. A. Lauener) T. Hong et J. J. Li。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 对照品溶液 精密称取槲皮素 6.50 mg、木犀草素 3.50 mg、异鼠李素 10.39 mg, 分别置于 5, 5, 50 mL 量瓶中, 用甲醇溶解并定容, 分别配制成浓度为 1.30, 0.70, 0.21 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的槲皮素、木犀草素、异鼠李素单一对照品储备液。分别精密吸取槲皮素、木犀草素储备液各 0.1 mL, 异鼠李素储备液 4 mL, 置 5 mL 量瓶中, 用甲醇定容, 配制成槲皮素、木犀草素、异鼠李素分别为 26.0, 14.0, 168.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的混合对照品溶液。

2.1.2 供试品溶液 精密称取紫斑牡丹花粉 2 g, 置 100 mL 圆底烧瓶中, 加入 75%乙醇 50 mL, 称重; 回流提取 2 h, 冷却后再称重, 用 75%乙醇补足减失质量, 过滤; 吸取滤液 40 mL 于圆底烧瓶中, 加入 15% HCl 溶液 10 mL, 于水浴锅上回流 2.5 h, 放冷, 转移至 50 mL 量瓶中, 加 75%乙醇定容, 用 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 取续滤液作为供试品溶液。

2.2 色谱条件

Agilent Eclipse plus C_{18} 色谱柱(4.6 mm $\times$ 250 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-乙腈-0.1%磷酸(25:13:62); 流速: 1.0 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$; 检测波长: 360 nm; 柱温: 35 $^{\circ}\text{C}$; 进样量: 20 μL 。

2.3 系统适用性试验 分别精密吸取混合对照品溶液和供试品溶液各 20 μL , 按“2.2”项下色谱条件进样分析, 并记录色谱图, 结果样品中槲皮素、木犀草素和异鼠李素色谱峰的保留时间分别为 16.6, 18.0, 35.6 min。目标峰与其相邻色谱峰的分离度 >1.5 , 理论板数以槲皮素计 $\geq 6\ 000$, 色谱图见图 1。

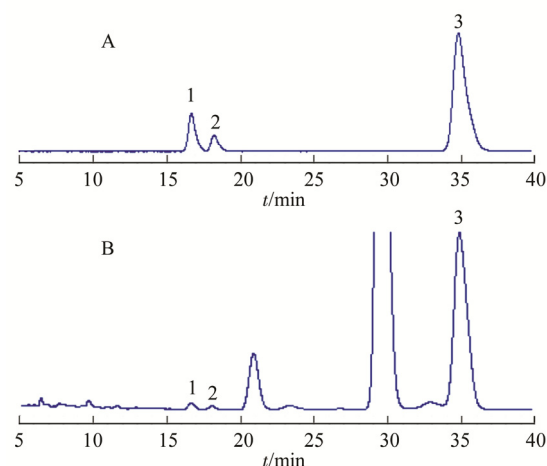


图 1 高效液相色谱图

A-对照品; B-样品; 1-槲皮素; 2-木犀草素; 3-异鼠李素。

Fig. 1 HPLC chromatograms

A-reference substance; B-sample; 1-quercetin; 2-luteolin 3-isorhamnetin.

精密吸取混合对照品溶液 20 μL , 按“2.2”项下色谱条件连续进样 6 次。测得槲皮素、木犀草素和异鼠李素峰面积的 RSD 值分别为 0.38%, 1.10%, 0.63%; 保留时间的 RSD 值分别为 1.10%, 0.94%, 1.01%。结果表明, 该仪器精密度良好。

2.4 线性关系考察

精密吸取“2.1”项下混合对照品溶液 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mL, 分别置于 1 mL 量瓶中, 用甲醇定容, 摇匀, 配制成系列浓度的混合对照品溶液, 依上述色谱条件, 分别进样 20 μL 进行测定, 以槲皮素、木犀草素和异鼠李素的峰面积(Y)为纵坐标, 浓度(X, $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)为横坐标, 绘制标准曲线。得到槲皮素、木犀草素和异鼠李素的线性回归方程分别为 $Y=58.65X-7.878\ 2(r=0.999\ 9)$ 、 $Y=59.73X+0.264\ 5(r=0.999\ 9)$ 、 $Y=66.46X-56.034\ 6(r=0.999\ 9)$ 。结果表明三者浓度分别在 1.3~26.0, 0.7~14.0 和 8.4~168.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内呈良好线性关系。

2.5 稳定性试验

精密吸取同一供试品溶液, 按“2.2”项下色谱条件, 分别于 0, 2, 4, 6, 8, 12, 24 h 进样 20 μL , 测定峰面积。结果槲皮素、木犀草素和异鼠李素峰面积的 RSD 值分别为 0.76%, 2.92%, 1.12%。表明紫斑牡丹花粉样品溶液在 24 h 内稳定。

2.6 重复性试验

精密称取同批紫斑牡丹花粉 6 份, 各 2 g。按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.2”项

下色谱条件进行含量测定。结果槲皮素、木犀草素和异鼠李素的平均含量分别为 0.166, 0.055, 3.275 mg·g⁻¹, RSD 分别为 2.11%, 2.73%, 2.29%, 表明本方法重复性良好。

2.7 加样回收试验

取“2.6”项下已测知含量的紫斑牡丹花粉 1 g, 共 9 份, 精密称定, 分别置 100 mL 圆底烧瓶中, 分别精密加入槲皮素、木犀草素、异鼠李素对照品适量, 按照“2.1.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.2”项下色谱条件进样测定各待测成分的量, 计算回收率, 结果见表 1。槲皮素、木犀草素和异鼠李素的平均回收率($n=9$)分别为 99.8%, 100.3%, 100.8%, RSD 分别为 2.78%, 2.66%, 2.36%。

表 1 紫斑牡丹花粉中 3 种黄酮回收试验结果($n=9$)
Tab. 1 Recoveries of the three flavonoids in pollen of *paeonia rockii*($n=9$)

化合物	样品含量/ mg	加入量/ mg	测得量/ mg	回收率/ %	RSD/ %
槲皮素	0.167	0.083	0.247	96.4	2.78
	0.167	0.083	0.249	98.8	
	0.166	0.083	0.251	102.4	
	0.166	0.169	0.333	98.8	
	0.166	0.169	0.339	102.4	
	0.166	0.169	0.343	104.7	
	0.167	0.249	0.414	99.2	
	0.166	0.249	0.408	97.2	
	0.167	0.249	0.411	98.0	
木犀草素	0.055	0.028	0.082	96.5	2.66
	0.055	0.028	0.084	103.6	
	0.055	0.028	0.083	98.2	
	0.055	0.049	0.104	99.6	
	0.055	0.049	0.103	98.1	
	0.055	0.049	0.106	104.1	
	0.055	0.084	0.141	102.4	
	0.055	0.084	0.138	98.8	
	0.055	0.084	0.140	101.2	
异鼠李素	3.277	1.575	4.788	96.0	2.36
	3.277	1.575	4.881	101.8	
	3.276	1.575	4.852	100.1	
	3.276	3.276	6.581	100.9	
	3.276	3.276	6.692	104.3	
	3.278	3.276	6.632	102.4	
	3.276	4.830	8.203	102.0	
	3.276	4.830	8.042	98.7	
	3.277	4.830	8.141	100.7	

2.8 定量限

取对照品溶液用甲醇逐步稀释、进样。当信噪比为 10 时, 槲皮素、木犀草素、异鼠李素的定量限分别为 2.48, 1.93, 7.02 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

2.9 检测限

取定量限浓度的对照品溶液再用甲醇逐步稀释、进样。当信噪比为 3 时, 槲皮素、木犀草素、异鼠李素的检测限分别为 1.56, 0.55, 1.93 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

2.10 耐用性试验

2.10.1 不同柱温 精密吸取供试品溶液和对照品溶液, 分别将柱温设定为 25, 30, 35 $^{\circ}\text{C}$ (其他条件不变)进行含量测定。测得槲皮素、木犀草素、异鼠李素的平均含量分别为 0.165, 0.054, 3.206 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$, RSD 值分别为 0.35%, 2.15%, 0.87%。表明在其他条件不变的前提下, 柱温的微小变化对样品的含量测定和色谱峰分离均无明显的影响。

2.10.2 不同流速 精密吸取供试品溶液和对照品溶液, 分别将流速设定为 0.9, 1.0, 1.1 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ (其他条件不变)进行含量测定。测得槲皮素、木犀草素、异鼠李素的平均含量分别为 0.166, 0.055, 3.256 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$, RSD 值分别为 0.92%, 2.79%, 1.34%。表明在其他条件不变的前提下, 流速的微小变化对样品的含量测定和色谱峰分离均无明显的影响。

2.11 样品含量测定

精密称取 3 批紫斑牡丹花粉 2 g, 按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液各 3 份, 进样测定, 以外标法计算含量。结果见表 2。

表 2 样品的含量测定结果($n=3$)
Tab. 2 Results of the content determination of sample($n=3$)
 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$

样品批号	槲皮素	木犀草素	异鼠李素
20150514001	0.166	0.054	3.205
20150514002	0.165	0.056	3.306
20150514003	0.169	0.054	3.321

3 讨论

3.1 检测波长的选择

根据文献报道^[8-11], 可知黄酮类化合物的检测波长为 255, 360, 370 nm。本实验分别对槲皮素、木犀草素和异鼠李素对照品溶液在 200~500 nm 进行全波长扫描, 结果显示槲皮素在 260, 370 nm、木犀草素在 210, 360 nm、异鼠李素在 360 nm 波长处有最大吸收; 考虑到紫斑牡丹花粉中所含的成分复杂, 兼顾 3 个目标成分的最大吸收波长的同时, 为达到提高被测成分高效液相色谱色峰响应值和分离度的要求, 本研究采用 360 nm 作为检测波长。

3.2 色谱条件的选择

本实验分别考察了不同比例的甲醇-磷酸水和乙腈-磷酸水流动相系统,各成分与杂质均没有得到良好的分离,遂考虑甲醇-乙腈-磷酸水流动相系统,发现其分离效果较好,进而优选确定甲醇-乙腈-0.1%磷酸(25:13:62)作为流动相。按照优化后的色谱条件,3种黄酮类成分色谱峰的分离度较好,可满足同时测定的要求。

3.3 供试品溶液制备方法的选择

本实验以3种黄酮含量为指标通过单因素试验分别逐一筛选了提取溶剂、提取时间、盐酸浓度及水解时间,最后确定以75%的乙醇回流提取2h,再加15%的盐酸水解2.5h的方法来制备供试品溶液。

3.4 紫斑牡丹花粉的利用

花粉是有花植物雄蕊中的雄性生殖细胞,其中包含着孕育新生命所必需的全部营养物质^[12];而不同的植物花粉中所含营养成分及其含量均有所差异,目前业已有8种花粉作为新食品资源得到开发^[6-7]。文献报道^[13],牡丹花粉中含有大量可以促进健康、增加肌体防御能力的天然活性物质,包括80多种酶、黄酮类化合物、激素、核酸和有机酸等,因此,对紫斑牡丹花粉进行深入研究和开发利用具有很大的前景。

3.5 小结

通过以上试验表明,本研究采用HPLC测定紫斑牡丹花粉中3种黄酮类成分的含量,方法简便,结果准确,重复性较好,主成分与各个杂质分离度较好,且专属性较好;紫斑牡丹花粉中黄酮类成分主要为槲皮素、木犀草素和异鼠李素及

其苷,其苷元的含量依次为异鼠李素>槲皮素>木犀草素;该结果为紫斑牡丹花粉进一步开发利用提供了科学依据。

REFERENCES

- [1] LI X L, LI P P, YUE H. Advances of the study on *Paeonia rockii* [J]. Northern Horticulture(北方园艺), 2007(5): 129-130.
- [2] 何登文. 紫斑牡丹的研究概况[J]. 甘肃中医, 2005, 18(3): 34.
- [3] 李子璇, 秦公伟, 何建华, 等. 紫斑牡丹种仁种皮中脂肪酸组成比较分析[J]. 种子, 2010, 29(1): 34-36.
- [4] 甘肃省卫生厅. 关于颁布《第四批24种中药材质量标准(试行)》的通知[S]. 1996: 58.
- [5] 杨树声, 宋平顺, 罗兴平, 等. 紫斑牡丹各部位中丹皮酚和芍药苷的含量分析[J]. 西北药学杂志, 2001, 16(3): 108-109.
- [6] WANG K F. Research on efficacy of 8 pollen in China [J]. J Bee(蜜蜂杂志), 2010, 30(12): 5-9.
- [7] 李彬彬. 卫生部公布第三批药食两宜名单[J]. 江苏调味副食品, 1999(3): 23.
- [8] LIAO H B, SHI X J, LIU T, et al. RP-HPLC simultaneous determination of three glycosyl flavones in *Abelmoschus esculentus* L. [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2012, 32(12): 2194-2197.
- [9] YU F. Simultaneous determination of isoquercetin, morin, quercetin, luteolin and apigenin in *Limonium sinense* (Girard) Kuntze by RP-HPLC [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2014, 34(4): 632-635.
- [10] FU Q R, LIU S J, WANG H, et al. Simultaneous determination of eight flavonoids in *Polygonum aviculare* L. by RP-HPLC-UV [J]. Chin Pharm Sci, 2014, 23(3): 170-176.
- [11] LUO M N, ZHAO L, LIU X, et al. HPLC determination of quercetin, luteolin and apigenin in *Lamiophlomis rotata* (Benth.) Kudo and its capsules [J]. Chin J Pharm Anal, 2006, 26(12): 1773-1776.
- [12] 毛礼米, 王开发. 我国花粉资源应用及其研究进展[J]. 自然杂志, 1997, 20(5): 271-275.
- [13] MENG Q H. Study on separation, antioxidant and anti-fatigue capacity of flavonoids from peony Testa [D]. HaErbin: Northeast Forestry University(东北林业大学), 2013.

收稿日期: 2016-05-31