

RP-HPLC-DAD 法快速测定沙棘叶中 6 种黄酮成分

惠人杰¹, 何 旭¹, 刘静怡¹, 冯 静¹, 曾 帅¹, 冯柏年^{1,2*}

(¹江南大学药学院,无锡 214122; ²江苏艾凡生物医药有限公司,无锡 214122)

摘要 采用 RP-HPLC-DAD 法同时测定沙棘叶中 6 种黄酮的含量,包括:儿茶素、芦丁、杨梅素、槲皮素、山柰酚和异鼠李素。沙棘叶经石油醚脱脂后,由乙醇水溶液提取得沙棘叶黄酮粉末。样品经由 Shimadzu C₁₈ (150 mm × 2.1 mm, 5 μm) 色谱柱分离,以甲醇-水 (0.1% 磷酸) (60:40) 为流动相,以 1.0 mL/min 的流速等度洗脱,柱温 40 °C,检测波长分别为:儿茶素 208 nm, 芦丁 257 nm, 杨梅素 373 nm, 槲皮素 371 nm, 山柰酚 367 nm, 异鼠李素 371 nm;进样量为 20 μL。10 min 之内,各成分实现基线分离,6 种黄酮成分在 0.47 ~ 30.00 μg/mL 范围内,线性均良好。通过精密度、稳定性和加样回收率等在内的方法学验证,证实方法稳定、准确。所建立的分析方法简便、快捷,可用于沙棘叶中 6 种黄酮含量的快速测定。

关键词 沙棘叶; RP -HPLC-DAD; 黄酮; 快速测定

中图分类号 R917 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2017)06-0696-09

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20170610

引用本文 惠人杰, 何旭, 刘静怡, 等. RP-HPLC-DAD 法快速测定沙棘叶中 6 种黄酮成分 [J]. 中国药科大学学报, 2017, 48(6):696–700.
Cite this article as: HUI Renjie, HE Xu, LIU Jingyi, et al. Rapid determination of six flavonoids from seabuckthorn leaves by RP-HPLC-DAD [J]. J China Pharm Univ, 2017, 48(6):696–700.

Rapid determination of six flavonoids from seabuckthorn leaves by RP-HPLC-DAD

HUI Renjie¹, HE Xu¹, LIU Jingyi¹, FENG Jing¹, ZENG Shuai¹, FENG Bainian^{1,2*}

¹School of Pharmaceutical Science, Jiangnan University, Wuxi 214122; ²Jiangsu Alpha Biopharmaceuticals, Inc., Wuxi 214122, China

Abstract To establish a rapid determination method of six flavonoids: catechin, rutin, myricetin, quercetin, kaempferol and isorhamnetin, from seabuckthorn leaves by RP-HPLC-DAD. The seabuckthorn leaves were first degreased by petroleum ether, extracted by ethanol, and determined by RP-HPLC-DAD. The six flavonoids were separated and eluted by a Shimadzu C₁₈ (150 mm × 2.1 mm, 5 μm) column with methanol-water (0.1% phosphoric acid) (60:40) at a flow rate of 1.0 mL/min. The detection wavelength were as follow: catechin 208 nm, rutin 257 nm, myricetin 373 nm, quercetin 371 nm, kaempferol 367 nm, and isorhamnetin 371 nm, respectively. The injection volume was 20 μL. The contents of the six flavonoids were in the range of 0.47 to 30.00 μg/mL with good linearity. The validation of the method, including precision, stability and recovery rate, was acceptable. The established method can be used for fast determination of the content of six flavonoids in seabuckthorn leaves.

Key words seabuckthorn leaves; RP-HPLC-DAD; flavonoids; rapid determination

This study was supported by the National Natural Science Foundation of Jiangsu Province (No. BK20140136)

沙棘 (*Hippophae rhamnoides* Linn.) 为胡颓子科酸刺属的灌木或小乔木,别名醋柳、黑刺、酸刺、其察日嘎纳(蒙名)、达普(藏名)、吉汗(维吾尔名)^[1],主要分布在亚洲和欧洲。沙棘的各个组

织,特别是浆果,在中国西藏、蒙古和中东地区被用于传统药品^[2]。自 1977 年起,沙棘便被列入了《中华人民共和国药典》,之后在历版的中国药典中均有收录^[3]。除沙棘果之外,沙棘的各个部位

均含有多种活性物质^[4],而沙棘叶中的多酚含量尤其高^[5-6],具有很高的经济价值,近年来也被开发功能食品,进入了大众的生活。而沙棘作为西部防风治沙的主要经济作物,种植广泛,沙棘叶原料丰富,市场前景广阔。深入开发沙棘叶的经济价值,尤其是其药用价值,则需要开发简便、快捷、全面的分析方法,对沙棘叶的药用成分进行更为精准有效的分析。

黄酮类化合物是多酚类物质的一种,也是沙棘的主要活性成分之一。沙棘黄酮具有抗氧化^[7]、改善高血脂、预防血栓形成^[8]、消炎^[9]、保护细胞^[10]、治疗糖尿病^[11]等作用。目前已经报道的沙棘主要黄酮成分有槲皮素(quercentin)、山柰酚(kaempferol)、异鼠李素(isorhamnetin)等。Rösch

等^[12]从沙棘果渣提取物中分离出4种黄酮醇苷,卫罡^[13]用HPLC方法同时测定沙棘黄酮粉中槲皮素、山柰酚和异鼠李素3种成分含量。而区别于其他部位,沙棘叶中的黄酮种类繁多,成分复杂,简单的总黄酮检测结果不能准确提供黄酮种类和含量的变化。而目前已有的分类黄酮检测方法能同时测定的黄酮种类较少,难以覆盖沙棘叶黄酮的全部主要成分。本研究以沙棘叶为样本,通过建立对儿茶素(catechin)、芦丁(rutin)、杨梅素(myricetin)、槲皮素、山柰酚和异鼠李素这6种黄酮的快速分析方法,实现对沙棘叶中黄酮种类和含量的全面监测,为现有沙棘产品,尤其是沙棘叶相关产品的质控及可能的药效配伍研究提供了参考依据。

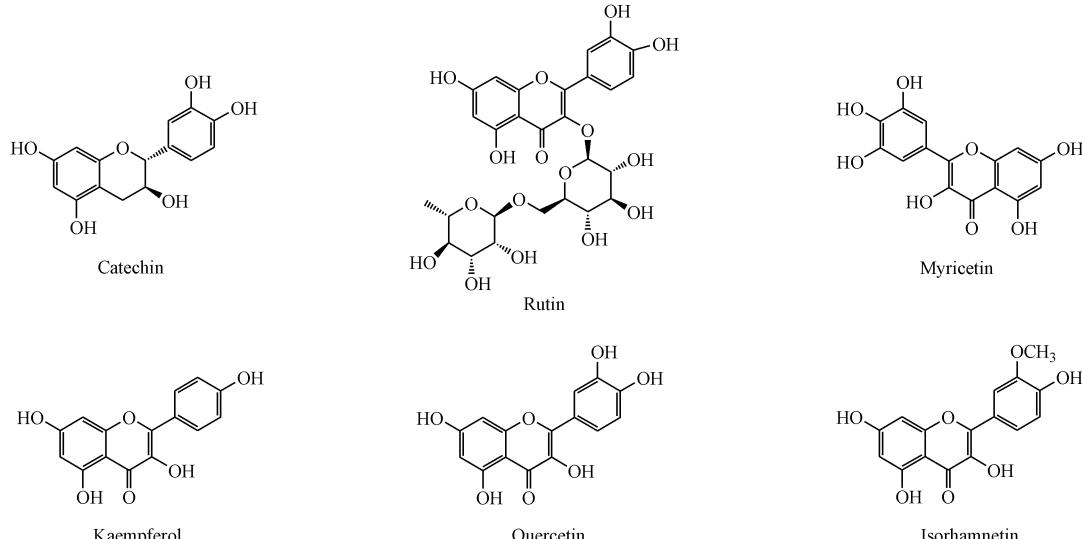


Figure 1 Chemical structures of catechin, rutin, myricetin, quercetin, kaempferol and isorhamnetin

1 材料

1.1 药材与试剂

沙棘叶(新疆金之源生物科技有限责任公司,采摘日期2016年4月,存放于江南大学药学院);黄酮对照品:儿茶素(批号:H1603040,纯度>98%)、杨梅素(批号:L1623059,纯度>98%)、山柰酚(批号:B1704013,纯度>98%)、异鼠李素(批号:K1624002,纯度>98%)均购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司;槲皮素(批号:LI40Q05,纯度>98%)、芦丁(批号:LTC0Q20,纯度>98%)购自百灵威科技有限公司。甲醇为色谱纯(美国Tedia公司);乙醇、石油醚、磷酸、盐酸均为市售分

析纯,水为自制超纯水。

1.2 仪器

LC-20AT高效液相色谱仪(日本岛津公司);ACM-L超细粉碎机(青岛微纳粉体机械有限公司);DT-200B电子天平(常熟市佳衡天平仪器有限公司);BSA124S精密电子天平[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司];PURIST UV超纯水系统(上海乐枫生物科技有限公司)。

2 方法与结果

2.1 沙棘叶黄酮提取物的制备

经前期实验优化^[14],获得沙棘叶黄酮的最优提取条件:取沙棘叶10 g,粉碎烘干,加石油醚80

mL,于70℃下回流搅拌2 h,抽滤并挥干石油醚。残渣用70%乙醇回流提取2 h,重复3次,料液比为1:16。合并续滤液,挥干乙醇并冻干,得沙棘叶黄酮粉末。

2.2 溶液制备

2.2.1 对照品溶液的制备 分别精密称取儿茶素、芦丁、杨梅素、槲皮素、山柰酚、异鼠李素对照品各5.0 mg,各置于25 mL量瓶中,加甲醇定容至刻度,摇匀,得到6种质量浓度均为200 μg/mL的黄酮对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备 称取沙棘叶黄酮粉末50 mg,分别置于250 mL三口烧瓶中,加入甲醇20 mL,摇匀,再加入25%的HCl溶液20 mL,氮气球保护,90℃下加热回流1 h,待溶液冷却至室温后过滤,续滤液转移至50 mL量瓶中,用甲醇定容至刻度,即得供试品溶液。

2.3 色谱条件

选用Shimadzu C₁₈(150 mm×2.1 mm,5 μm)色谱柱;流动相为甲醇-0.1%磷酸(60:40);流速为1.0 mL/min;二极管阵列多波长检测,儿茶素的检测波长为208 nm,芦丁的检测波长为257 nm,杨梅素的检测波长为373 nm,槲皮素的检测波长为371 nm,山柰酚的检测波长为367 nm,异鼠李素的检测波长为371 nm;柱温40℃;进样量为20 μL,混合对照品及样品色谱图见图2。在10 min的检测时间内,6种黄酮(儿茶素、芦丁、杨梅素、槲皮素、山柰酚、异鼠李素)均实现基线分离。各成分出峰时间分别为1.59,2.22,2.83,3.97,5.69,6.15 min,且分离度良好,表明该方法可用于黄酮的快速分离。

检测。

2.4 方法学考察

2.4.1 线性关系考察 分别精密吸取各对照品溶液1.5 mL,混合均匀后加甲醇定容至10 mL。采用倍数稀释法进行稀释,得到质量浓度分别为30.00,15.00,7.50,3.75,1.88,0.94,0.47,0.23 μg/mL的系列混合对照品溶液。按照“2.3”项下色谱条件,每个样品检测3次,记录峰面积。以峰面积为纵坐标(y),以溶液中各黄酮的质量浓度为横坐标(x),绘制标准曲线。结果如表1所示,6种黄酮对照品在对应线性范围内相关系数(r)均大于0.999 4,表明该方法线性关系良好。

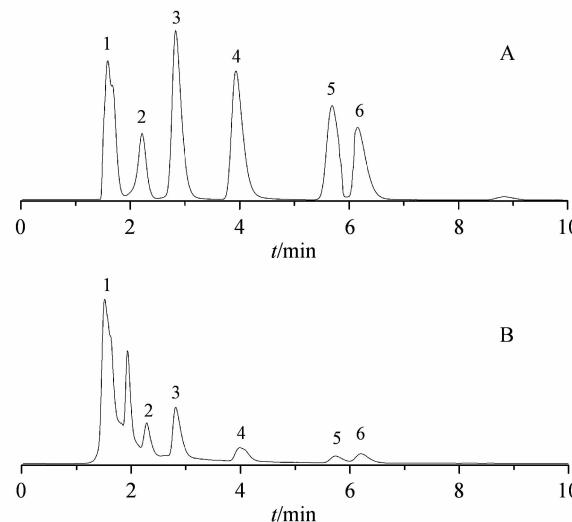


Figure 2 HPLC chromatograms (208 nm) of mixed reference substances (A) 7.5 μg/mL; seabuckthorn leaf flavonoids extract (B), extract condition: 70% ethanol extracted for 2 h with the ratio of material to liquid at 1:16. (1: Catechin, 2: Rutin, 3: Myricetin), 4: Quercetin), 5: Kaempferol and 6: Isorhamnetin)

Table 1 Calibration curves of six flavonoids from seabuckthorn leaves

Component	Linear range/(μg/mL)	Linear equation	r	LOD/(μg/mL)	LOQ/(μg/mL)
Catechin	0.23-60.00	$y = 1.281 \times 10^5 x + 1.020 \times 10^5$	0.999 6	0.106	0.200
Rutin	0.47-60.00	$y = 1.355 \times 10^4 x + 2.740 \times 10^4$	0.999 6	0.223	0.446
Myricetin	0.23-60.00	$y = 3.271 \times 10^4 x - 2.734 \times 10^3$	0.999 9	0.086	0.203
Quercetin	0.47-30.00	$y = 3.750 \times 10^4 x - 9.514 \times 10^3$	0.999 4	0.220	0.450
Kaempferol	0.47-30.00	$y = 3.804 \times 10^4 x - 5.124 \times 10^3$	0.999 7	0.223	0.446
Isorhamnetin	0.23-30.00	$y = 3.838 \times 10^4 x - 3.240 \times 10^3$	0.999 8	0.106	0.446

2.4.2 定量限(LOQ)和检测限(LOD)考察 取混合对照品溶液1 mL,逐级稀释,按2.3项下色谱条件进行检测,以信噪比S/N=3判断检测限,以S/N=10判断定量限,求得各组分的定量限和检测限,结果如表1所示。

2.4.3 精密度考察 取低(0.23 μg/mL)、中(15.00 μg/mL)、高(30.00 μg/mL)3个质量浓度的供试品溶液,分别在“2.3”项所述色谱条件下重复进样6次,记录峰面积,计算日内精密度。另取3份供试品溶液,同法测定,连续测定3天,记录峰

面积,计算日间精密度。结果如表2所示,日间及日内精密度考察RSD均小于2%,表明该检测方法精密度良好。

Table 2 Precision of six flavonoids by HPLC

Component	c/($\mu\text{g/mL}$)	Intra-day precision/%	Inter-day precision/%
Catechin	0.23	1.48	0.57
	15.00	1.67	1.32
	30.00	1.77	1.69
Rutin	0.23	0.86	1.94
	15.00	0.75	0.76
	30.00	0.76	1.93
Myricetin	0.23	1.66	1.73
	15.00	0.95	0.67
	30.00	0.73	1.07
Quercetin	0.23	0.54	0.72
	15.00	0.43	0.46
	30.00	0.77	0.48
Kaempferol	0.23	0.80	1.71
	15.00	0.37	1.12
	30.00	0.33	1.54
Isorhamnetin	0.23	1.01	1.86
	15.00	0.40	0.51
	30.00	0.89	0.59

2.4.4 稳定性考察 取同批沙棘叶样品,平行提取并制备6份供试品溶液,并依据“2.3”项下色谱条件,分别在0,2,4,6,8,10,12 h进样测定,记录峰面积。结果显示,儿茶素、芦丁、杨梅素、槲皮素、山柰酚、异鼠李素的峰面积RSD(%)分别为:0.30,1.44,0.83,1.51,1.27和1.49,表明样品溶液在12 h内稳定。

2.4.5 重复性考察 取同批沙棘叶样品,平行提取并制备6份供试品溶液,并依据“2.3”项下色谱条件进行检测,记录峰面积,计算样品中黄酮含量。所测数据以每克生料中所含黄酮含量(mg)表示,沙棘叶样品中儿茶素、芦丁、杨梅素、槲皮素、山柰酚、异鼠李素平均含量($n=6$)分别为19.1,14.2,15.3,2.9,2.3,2.6 mg/g,RSD(%)分别为1.59,1.66,0.6,1.31,1.65和0.6。

2.4.6 加样回收率 精密称定9份已测定含量的沙棘叶黄酮粉末,分别加入相当于已知黄酮含量80%、100%、120%的混合对照品溶液,按照“2.2.2”项下条件,分别制备低、中、高3个浓度的加样溶液3份,测定6种黄酮的含量,计算加样回收率。得沙棘叶中儿茶素、芦丁、杨梅素、槲皮素、山柰酚、异鼠李素的加样回收率(%)分别为

(101.42±2.23)、(102.18±6.7)、(99.69±5.8)、(109.36±4.5)、(113.62±5.1)和(110.27±7.9),表明该检测方法的加标回收率均相对较高,可适用于沙棘叶中的黄酮检测。

2.5 沙棘叶黄酮含量测定

取6棵不同沙棘树上采集的沙棘叶样品,分别平行提取并制备2份供试品溶液。依据“2.3”项下色谱条件进行检测,每份溶液进样3次,记录峰面积,并依据“2.4.1”项下各标准曲线,计算样品中不同黄酮的含量。结果见表3。沙棘叶黄酮以儿茶素、杨梅素和芦丁3种黄酮成分为主。结果显示,在相同的采摘季节中,黄酮的种类和含量变化不明显。

Table 3 Component determination of seabuckthorn leaves samples (mg/g)

No.	Catechin	Rutin	Myricetin	Quercetin	Kaempferol	Isorhamnetin
1	19.09	13.53	14.59	2.60	1.96	2.43
2	17.51	15.71	16.57	2.58	2.30	2.63
3	20.41	14.35	15.19	2.47	2.02	2.54
4	18.12	13.97	11.64	2.50	2.49	2.72
5	19.53	14.53	13.63	2.48	2.39	2.41
6	18.99	16.33	16.63	2.49	1.94	2.88

3 讨论

3.1 黄酮成分的选择和提取

沙棘叶中黄酮类物质成分复杂,功效众多,参考沙棘黄酮已有文献报道及本课题组LC-MS的分析结果,选取了儿茶素、芦丁、杨梅素、槲皮素、山柰酚、异鼠李素这6种黄酮作为检测对象,实现了沙棘叶中6种黄酮的同时定性/定量分析。相较于以往的总黄酮含量分析,RP-HPLC-DAD法所得的分类黄酮分析结果更为灵敏、精确、全面。

由于6种黄酮的理化性质差异明显,本实验还对提取溶质(60%、70%、80%乙醇)、提取时间(1 h、1.5 h、2 h)、提取次数(1次、2次、3次)、料液比(1:8、1:16、1:24)这4个主要因素进行了正交实验考察,确定了沙棘叶黄酮的最优提取方案:70%乙醇回流提取2 h,重复3次,料液比为1:16。该条件下,沙棘叶中黄酮的提取效率最高。

3.2 检测波长的选择

本文共涉及6种不同的黄酮成分检测,经紫外分析,发现各黄酮具有不同的最大紫外吸收波长,若采用单一波长测定,无法实现对6种黄酮的同时

准确测定。因此,本研究采用RP-HPLC-DAD法检测,利用二极管阵列检测器,选取各黄酮成分的最大紫外吸收波长作为各自对应的检测波长,有效提高了分类黄酮的检测灵敏度和准确度,保证了检测结果的准确性和全面性。

3.3 流动相的选择及条件确定

实验选用甲醇-磷酸水体系作为流动相,通过改变有机相比例和磷酸浓度,综合分析不同条件下6种黄酮的出峰时间和分离度,最终确认使用甲醇-0.1%磷酸水(60:40)为分离条件。该流动相体系下,可实现6种黄酮在10 min内的快速有效分离,并完成6种黄酮的定性和定量检测。该方法简便、快捷、适用范围广,可为企业生产的快速质控、样品监测等提供有效的参考。

4 结 论

中药材中活性成分的鉴别不仅可以帮助实现产品的精确质控,还可以为活性成分的药效功能研究提供有效数据支持。沙棘叶中黄酮类物质成分复杂,功效众多,本研究所开发的沙棘叶黄酮的RP-HPLC-DAD定量分析方法简便、快捷、高效,可对沙棘叶中的分类黄酮进行精确定量分析,有助于确认黄酮种类含量变化及相应的药效作用机制,并开展相关中药配伍研究,为中药材的进一步开发和研究提供思路。

相较于沙棘果和沙棘籽中较为稳定的黄酮含量水平,沙棘叶中的黄酮含量可能随采摘季节发生剧烈变化^[15],因此对于沙棘叶的质控要求更高,检测需求更多。运用快速有效的检测方法,对沙棘叶中的黄酮成分进行监控,可实现对沙棘叶的精确质控,对于沙棘叶相关产品的生产和推广都具有重要意义。

参 考 文 献

- [1] Liu R, Zhang C. Advances in the research of the chemical components of seabuckthorn[J]. *J Shanxi Datong Univ (Nat Sci Edition)*[山西大同大学学报(自然科学版)], 2009, 25(2):43–44, 54.
- [2] Guliyev VB, Gul M, Yildirim A. *Hippophae rhamnoides* L.: chromatographic methods to determine chemical composition, use in traditional medicine and pharmacological effects[J]. *J Chromatogr B*, 2004, 812(1/2):291–307.
- [3] Chinese Pharmacopoeia Commission. *Chinese Pharmacopoeia: part I*(中华人民共和国药典)[S]. Beijing: China Medical Science Press, 2015:184–185.
- [4] Liu Y, Lian YS, Wang YL, et al. Review of research and development and significant effect of *Hippophae rhamnoides*[J]. *Chin J Chin Materia Medica*(中国中药杂志), 2014, 39(9):1547–1552.
- [5] Yogendra Kumar MS, Tirpude RJ, Maheshwari DT, et al. Antioxidant and antimicrobial properties of phenolic rich fraction of seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) leaves *in vitro*[J]. *Food Chem*, 2013, 141(4):3443–3450.
- [6] Pallavi B, Chandresh V, Kanika K, et al. *In vitro* evaluation of antidiabetic and antioxidant activity of seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) leaves[J]. *J Med Plant Res*, 2015, 9(35):929–932.
- [7] Bao M, Lou Y. Flavonoids from seabuckthorn protect endothelial cells (EA. hy926) from oxidized low-density lipoprotein induced injuries via regulation of LOX-1 and eNOS expression[J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2006, 48(1):834–841.
- [8] Cheng J, Kondo K, Suzuki Y, et al. Inhibitory effects of total flavones of *Hippophae rhamnoides* L. on thrombosis in mouse femoral artery and *in vitro* platelet aggregation. [J]. *Life Sci*, 2003, 72(20):2263–2271.
- [9] Ganju L, Padwad Y, Singh R, et al. Anti-inflammatory activity of seabuckthorn(*Hippophae rhamnoides*) leaves[J]. *Int J Immunopharmacol*, 2005, 5(12):1675–1684.
- [10] Geetha S, Ram MS, Sharma SK, et al. Cytoprotective and antioxidant activity of seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) flavones against tert-butyl hydroperoxide-induced cytotoxicity in lymphocytes. [J]. *J Med Food*, 2009, 12(1):151–158.
- [11] Zhou JY, Zhou SW, Du XH, et al. Protective effect of total flavonoids of seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides*) in simulated high-altitude polycythemia in rats[J]. *Molecules*, 2012, 17(10):11585–11597.
- [12] Rösch D, Krumbein A, Mügge, et al. Structural investigations of flavonol glycosides from sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides*) pomace by NMR spectroscopy and HPLC-ESI-MSⁿ[J]. *J Agric Food Chem*, 2004, 52(13):4039–4046.
- [13] Wei G, Hou X. HPLC method in determining the content of quercetin, kaempferide and isorhamnetin in seabuckthorn flavone powder[J]. *Global Seabuckthorn Res Dev*(国际沙棘研究与开发), 2014, 12(2):22–24.
- [14] Hui R, Feng J, Ling M, et al. Multicriteria comprehensive assessment on the optimization of extraction technology of *Hippophae rhamnoides* Linn. flavonoids from leaves and seeds[J]. *China Pharm*(中国药房), accepted.
- [15] Du L, Zhang H, Xiao W, et al. Comparative determination of total flavonoids in seabuckthorn leaves from 10 species by RP-HPLC [C]. *The Fifth Shanghai International Conference on Traditional Chinese Medicine and Natural Medicine*. 2012:281–285.