

# HPLC法同时测定三叶青块根中6个黄酮类成分的含量<sup>Δ</sup>

李彩凤<sup>1,2,3\*</sup>, 胡欣<sup>3</sup>, 金鹏飞<sup>3</sup>, 李清<sup>1</sup>, 孙淑竹<sup>1</sup>, 毕开顺<sup>1#</sup>, 付宏征<sup>2</sup>(1.沈阳药科大学药学院, 沈阳 110016; 2.北京大学医学部天然药物及仿生药物国家重点实验室, 北京 100191; 3.北京医院药学部, 北京 100730)

中图分类号 R284.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)13-1755-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.13.06

**摘要** 目的:建立同时测定三叶青块根中芦丁、异槲皮苷、山柰酚-3-*O*-芸香糖苷、紫云英苷、槲皮素和山柰酚含量的方法。方法:采用高效液相色谱(HPLC)法。色谱柱为Alliance SilGreen C<sub>18</sub>,流动相为0.2%磷酸水溶液-乙腈溶液(梯度洗脱),流速为1.0 mL/min,柱温为35℃,检测波长为360 nm,进样量为15 μL。结果:芦丁、异槲皮苷、山柰酚-3-*O*-芸香糖苷、紫云英苷、槲皮素和山柰酚的检测质量浓度线性范围分别为21.77~217.77、12.37~123.75、13.23~132.31、4.63~46.30、5.75~57.50、3.36~33.66 μg/mL( $r$ 均=0.999 9);检测限分别为0.217 8、0.123 8、0.066 2、0.046 3、0.191 7、0.112 3 μg/mL;定量限分别为0.435 6、0.247 5、0.165 4、0.154 3、0.575 0、0.421 2 μg/mL;精密性( $n=6$ )、稳定性(24 h,  $n=7$ )、重复性( $n=6$ )试验的RSD均≤3.20%;平均加样回收率分别为96.23%、86.88%、97.51%、97.67%、97.50%、87.46%,RSD分别为1.85%、1.90%、1.84%、1.87%、1.25%、2.01%( $n=9$ )。结论:该方法快速、简便,可用于同时测定三叶青块根中芦丁、异槲皮苷、山柰酚-3-*O*-芸香糖苷、紫云英苷、槲皮素和山柰酚的含量。

**关键词** 三叶青;芦丁;异槲皮苷;山柰酚-3-*O*-芸香糖苷;紫云英苷;槲皮素;山柰酚;含量测定;高效液相色谱法

## Simultaneous Determination of 6 Flavonoids in the Roots of *Tetragium hemsleyanum* by HPLC

LI Caifeng<sup>1, 2, 3</sup>, HU Xin<sup>3</sup>, JIN Pengfei<sup>3</sup>, LI Qing<sup>1</sup>, SUN Shuding<sup>1</sup>, BI Kaishun<sup>1</sup>, FU Hongzheng<sup>2</sup> (1.College of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China; 2.State Key Lab of Natural and Biomimetic Drugs, Peking University Health Science Center, Beijing 100191, China; 3.Dept. of Pharmaceutical Sciences, Beijing Hospital, Beijing 100730, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To establish a method for simultaneous determination of rutin, isoquercitrin, kaempferol-3-*O*-rutinoside, daunorubicin, quercetin and kaempferol in the roots of *Tetragium hemsleyanum*. METHODS: HPLC method was adopted. The determination was performed on Alliance SilGreen C<sub>18</sub> column with mobile phase consisted of 0.2% phosphoric acid solution-acetonitrile solution (gradient elution) at the flow rate of 1.0 mL/min. The detection wavelength was 360 nm and the column temperature was at 35 °C. The sample size was 15 μL. RESULTS: The linear range of rutin, isoquercitrin, kaempferol-3-*O*-rutinoside, daunorubicin, quercetin and kaempferol were 21.77-217.77, 12.37-123.75, 13.23-132.31, 4.63-46.30, 5.75-57.50, 3.36-33.66 μg/mL (all  $r=0.999 9$ ), respectively. limit of detection of them were 0.217 8, 0.123 8, 0.066 2, 0.046 3, 0.191 7, 0.112 3 μg/mL, respectively. limit of quantitation of them were 0.435 6, 0.247 5, 0.165 4, 0.154 3, 0.575 0, 0.421 2 μg/mL, respectively. RSDs of precision ( $n=6$ ), stability (24 h,  $n=7$ ) and reproducibility tests ( $n=6$ ) were lower than 3.20%. The average recoveries of them were 96.23%, 86.88%, 97.51%, 97.67%, 97.50%, 87.46%, RSDs were 1.85%, 1.90%, 1.84%, 1.87%, 1.25%, 2.01% ( $n=9$ ), respectively. CONCLUSIONS: The method is fast and simple, and could be applied for simultaneous determination of rutin, isoquercitrin, kaempferol-3-*O*-rutinoside, daunorubicin, quercetin and kaempferol in the roots of *T. hemsleyanum*.

**KEYWORDS** *Tetragium hemsleyanum*; Rutin; Isoquercitrin; Kaempferol-3-*O*-rutinoside; Daunorubicin; Quercetin; Kaempferol; Content determination; HPLC

三叶青即葡萄科崖爬藤属植物三叶崖爬藤(*Tetragium hemsleyanum* Diels et Gilg.),又名金线吊葫芦、蛇附子、石老鼠,全草均可入药,以地下块根药用效果最

好,具有清热解毒、活血散结、消炎止痛、祛风化痰、理气健脾等功效,常用于小儿高热惊厥、痢疾、支气管炎、肺炎、咽喉炎、肝炎、病毒性脑膜炎、毒蛇咬伤、扁挑体炎、跌打损伤等疾病的治疗<sup>[1]</sup>。现代药理学研究发现,三叶青具有抗肿瘤、抗病毒、抗炎、保肝、解热、镇痛以及免疫调节等药理作用<sup>[2]</sup>。为了更好地开发利用三叶青资源,需对三叶青中的主要成分进行质量控制。目前,从三叶

Δ 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81303216)

\* 硕士研究生。研究方向:药物分析。E-mail: 1004884354@qq.com

# 通信作者:教授,博士生导师。研究方向:中药现代化。E-mail: kaishunbi.syphu@gmail.com

青中发现的化学成分包括黄酮类、酚酸类、三萜类、甾类、二苯乙烯类、鞣质类等<sup>[3-5]</sup>。相关研究采用高效液相色谱串联四极杆飞行时间质谱法(HPLC-Q-TOF-MS)或超高效液相色谱串联三重四级杆质谱法(UPLC-MS/MS)法来测定三叶青中的化学成分<sup>[6-7]</sup>,但此类仪器价格昂贵,难以普及。另有研究采用HPLC法测定三叶青中化学成分的含量,但所测成分较少<sup>[8-10]</sup>。为了更好地控制三叶青的质量,本研究选择三叶青中具有抗肿瘤活性<sup>[11]</sup>的黄酮类成分芦丁、异槲皮苷、山柰酚-3-*O*-芸香糖苷、紫云英苷、槲皮素和山柰酚作为质控成分,建立HPLC法同时测定三叶青中这6个黄酮类成分的含量,以期三叶青质量标准的制订提供参考。

## 1 材料

### 1.1 仪器

Alliance e2695 HPLC 仪(美国沃特世公司);MS-204TS 电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司);KQ-500E 台式超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);K-210 旋转蒸发仪(瑞士布琦公司)。

### 1.2 药品与试剂

三叶青药材从浙江省台州市当地药农购入(批号:20171012、20171020、20171107),经北京大学医学部药学院天然药物化学系付宏征教授鉴定为真品;芦丁对照品(批号:201832,纯度:98.21%)、异槲皮苷对照品(批号:201807,纯度:97.26%)、山柰酚-3-*O*-芸香糖苷对照品(批号:201805,纯度:96.63%)、紫云英苷对照品(批号:201815,纯度:99.33%)、槲皮素对照品(批号:201819,纯度:97.94%)、山柰酚对照品(批号:201814,纯度:98.69%)均购自中国食品药品检定研究院;甲醇、乙腈均为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

色谱柱:Waters Alliance SilGreen C<sub>18</sub>(150 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:0.2% 磷酸水溶液(A)-乙腈溶液(B),梯度洗脱;柱温:35 ℃;流速:1.0 mL/min;检测波长:360 nm;进样量:15 μL。梯度洗脱程序见表1。

表1 梯度洗脱程序

Tab 1 Gradient elution procedure

时间, min	A, %	B, %
0	85	15
10	77	23
15	70	30
20	50	50
22	85	15
25	85	15

### 2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液 分别精密称取芦丁、异槲皮苷、山柰酚-3-*O*-芸香糖苷、紫云英苷、槲皮素和山柰酚对照品适量,置于不同量瓶中,加甲醇溶解制成质量浓度均为1.0 mg/mL的对照品贮备液;精密移取6种对照品贮备液适量,混合制成含有芦丁、异槲皮苷、山柰酚-3-*O*-芸香糖苷、紫云英苷、槲皮素和山柰酚质量浓度分别为217.77、123.75、132.31、46.30、57.50、33.66 μg/mL的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 取三叶青块根适量,粉碎,精密称取三叶青粉末约4.0 g,置于100 mL锥形瓶中,加甲醇50 mL,密塞,称质量,超声(功率:200 W,频率:40 kHz)60 min,放冷至室温,称质量,用甲醇补足减失的质量,滤过,滤液用旋转蒸发器蒸干(40 ℃),用甲醇转移并定容至2 mL量瓶中,0.22 μm微孔滤膜滤过,取续滤液作为供试品溶液。

### 2.3 方法学考察

2.3.1 专属性试验 取混合对照品溶液和供试品溶液适量,按“2.1”项下色谱条件进样分析,记录色谱图。结果,芦丁、异槲皮苷、山柰酚-3-*O*-芸香糖苷、紫云英苷、槲皮素和山柰酚各峰之间分离度良好,分离度均>1.5,理论板数以芦丁峰计>40 000。高效液相色谱图见图1。

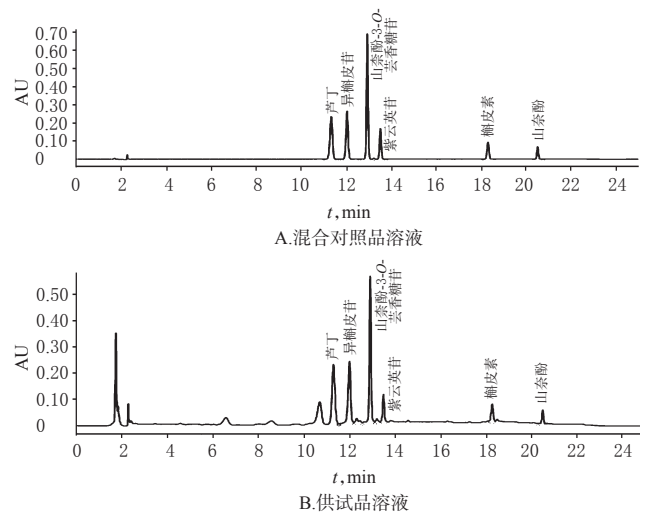


图1 高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms

2.3.2 线性关系考察 分别取混合对照品溶液1.0、2.0、3.0、5.0、10.0 mL,置于10 mL量瓶中,用甲醇定容至刻度,制成系列质量浓度混合对照品溶液,按“2.1”项下色谱条件进样分析,记录色谱图,以峰面积为纵坐标(y)、各成分质量浓度为横坐标(x)进行线性回归。结果,6个黄酮类成分在各检测质量浓度范围内线性关系均良好,6个黄酮类成分的线性关系结果见表2。

2.3.3 检测限与定量限试验 取“2.2.1”项下混合对照

表2 6个黄酮类成分的线性关系结果(n=6)

Tab 2 Linear relationship of 6 flavonoids(n=6)

成分	回归方程	线性范围, μg/mL	r
芦丁	y=27 544x-23 812	21.77~217.77	0.999 9
异槲皮苷	y=44 334x+6 925.6	12.37~123.75	0.999 9
山柰酚-3-O-芸香糖苷	y=75 926x+41 910	13.23~132.31	0.999 9
紫云英苷	y=61 843x-8 617.2	4.63~46.30	0.999 9
槲皮素	y=33 650x-34 194	5.75~57.50	0.999 9
山柰酚	y=33 553x-16 749	3.36~33.66	0.999 9

品溶液加甲醇逐级稀释,按“2.1”项下色谱条件进样分析,记录峰面积。当信噪比为3:1时得检测限,信噪比为10:1时得定量限。结果,芦丁、异槲皮苷、山柰酚-3-O-芸香糖苷、紫云英苷、槲皮素和山柰酚的检测限分别为0.217 8、0.123 8、0.066 2、0.046 3、0.191 7、0.112 3 μg/mL,定量限分别为0.435 6、0.247 5、0.165 4、0.154 3、0.575 0、0.421 2 μg/mL。

2.3.4 精密度试验 取“2.2.1”项下混合对照品适量,按“2.1”项下色谱条件连续进样6次,记录各成分峰面积。结果,芦丁、异槲皮苷、山柰酚-3-O-芸香糖苷、紫云英苷、槲皮素和山柰酚峰面积的RSD分别为0.21%、0.63%、0.31%、0.47%、0.45%、0.67%(n=6),表明仪器精密度良好。

2.3.5 重复性试验 取同一批三叶青(批号:20171012),平行取样6份,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件进行分析,记录峰面积并计算含量。结果,芦丁、异槲皮苷、山柰酚-3-O-芸香糖苷、紫云英苷、槲皮素和山柰酚含量的RSD分别为1.30%、1.20%、1.77%、1.67%、1.80%、1.87%(n=6),表明该方法重复性良好。

2.3.6 稳定性试验 取同一供试品溶液(批号:2017-1012),于室温下放置0、2、6、8、10、12、24 h后,按“2.1”项下色谱条件进样分析,记录峰面积。结果,芦丁、异槲皮苷、山柰酚-3-O-芸香糖苷、紫云英苷、槲皮素和山柰酚峰面积的RSD分别为2.18%、3.20%、3.08%、1.27%、1.14%、2.44%(n=7),表明供试品溶液在24 h内稳定。

2.3.7 加样回收率试验 取已知含量的三叶青粉末(批号:20171012)9份,精密称定适量,分别按各成分已知含量的50%、100%、150%加入混合对照品,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件进样分析,计算加样回收率。结果,芦丁、异槲皮苷、山柰酚-3-O-芸香糖苷、紫云英苷、槲皮素和山柰酚的平均加样回收率分别为96.23%、86.88%、97.51%、97.67%、97.50%、87.46%,RSD分别为1.85%、1.90%、1.84%、1.94%、1.25%、2.01%(n=9),回收率试验结果见表3。

2.3.8 耐用性试验 取同一供试品溶液(批号:

表3 回收率试验结果

Tab 3 Result of recovery tests

成分	样品含量, μg	加入量, μg	测得量, μg	回收率, %	平均回收率(n=9), %	RSD(n=9), %			
芦丁	39.84	19.92	59.02	96.31	96.23	1.85			
	39.84	19.62	59.17	98.52					
	39.84	20.01	58.41	92.78					
	39.84	39.95	78.53	96.83					
	39.84	40.15	79.32	98.33					
	39.84	39.96	77.73	94.83					
	39.84	60.21	97.14	95.17					
	39.84	59.46	97.22	96.51					
	39.84	57.45	95.43	96.77					
	异槲皮苷	23.59	11.78	34.08			88.97	86.88	1.90
		23.59	11.61	33.77			87.65		
		23.59	11.84	33.81			86.30		
23.59		23.63	43.93	86.03					
23.59		23.75	44.44	87.77					
23.60		23.64	44.59	88.83					
23.60		35.62	53.38	83.63					
23.59		35.17	54.02	86.50					
23.59		33.99	52.90	86.23					
山柰酚-3-O-芸香糖苷		19.63	9.83	29.23	97.60	97.51	1.84		
		19.63	9.68	29.13	98.06				
		19.63	9.88	29.59	100.86				
	19.63	19.72	39.21	99.32					
	19.63	19.81	39.05	98.03					
	19.63	19.72	38.61	96.27					
	19.63	29.71	47.89	95.11					
	19.63	29.34	47.81	96.03					
	19.63	28.35	46.95	96.35					
	紫云英苷	6.02	3.03	8.98	97.44			97.67	1.94
		6.02	2.99	9.04	100.93				
		6.02	3.05	8.94	95.69				
6.02		6.08	11.88	96.29					
6.02		6.11	12.06	98.76					
6.02		6.08	11.91	96.80					
6.02		9.17	15.22	100.29					
6.02		9.06	14.78	96.71					
6.02		8.75	14.43	96.10					
槲皮素		7.55	3.84	11.32	97.97	97.50	1.25		
		7.55	3.79	11.25	97.62				
		7.55	3.86	11.36	98.55				
	7.55	7.71	15.05	97.22					
	7.56	7.75	15.02	96.35					
	7.55	7.71	15.06	97.36					
	7.56	11.62	19.11	99.46					
	7.55	11.47	18.48	95.22					
	7.55	11.09	18.39	97.74					
	山柰酚	4.44	2.27	6.45	88.55			87.46	2.01
		4.44	2.24	6.38	86.61				
		4.44	2.28	6.47	89.04				
4.44		4.55	8.33	85.49					
4.44		4.57	8.49	88.62					
4.44		4.55	8.26	83.96					
4.44		6.86	10.52	88.63					
4.44		6.78	10.45	88.64					
4.44		6.55	10.18	87.63					

20171012),分别在流速0.8、1.0、1.2 mL/min,柱温30、35、40 ℃,流动相磷酸浓度0.15%、0.1%条件下进样分析,考察各成分峰之间的分离情况。结果,芦丁、异槲皮

苷、山柰酚-3-O-芸香糖苷、紫云英苷、槲皮素和山柰酚之间分离度均>1.5,各峰理论板数均大于10 000,表明该方法耐用性好。

2.3.9 样品含量测定 3批样品分别各取适量,粉碎,取粉末约4.0 g,各3份,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件进行分析,记录峰面积并计算各成分含量,样品含量测定结果见表4。

表4 样品含量测定结果( $n=3$ ,mg/g)

Tab 4 Results of content determination of samples ( $n=3$ ,mg/g)

批号	芦丁	异槲皮苷	山柰酚-3-O-芸香糖	紫云英苷	槲皮素	山柰酚
20171012	0.039 8	0.023 6	0.019 6	0.006 0	0.007 6	0.004 4
20171020	0.037 7	0.024 0	0.018 9	0.005 7	0.006 6	0.004 0
20171107	0.034 8	0.022 0	0.019 0	0.005 0	0.006 3	0.003 1

### 3 讨论

#### 3.1 检测波长的选择

笔者前期首先将6个成分的对照品溶液在210~400 nm波长下进行紫外扫描,结果发现,这6个成分在360 nm波长处均有较大吸收,因此选择360 nm为检测波长。

#### 3.2 色谱条件的选择

笔者前期考察了不同性能填料的色谱柱 Alliance SilGreen C<sub>18</sub>和MACHERY-NAGEL NUCLEOSIL C<sub>18</sub>的分离效果,并从对称因子、分析时间、分离度等方面对三叶青供试品溶液进行综合评价,最终选择SilGreen C<sub>18</sub>色谱柱,该色谱柱分离的峰形良好,分析时间较短,且在较低柱压下能实现快速高效的分离。笔者还考察了甲醇-冰醋酸水溶液、甲醇-磷酸水溶液、乙腈-磷酸水溶液作为流动相,以及不同浓度磷酸水溶液0.1%、0.15%、0.2%对6个成分分离的影响,结果发现,乙腈-0.2%磷酸水溶液作为流动相时具有良好的分离效果。

综上所述,本研究建立的HPLC方法准确度高、稳定性强,能够实现三叶青块根中6个黄酮类成分含量的同时测定,可为三叶青质量控制标准的建立提供参考。

但本方法只对三叶青中黄酮类成分进行了定量分析,后续还应对三叶青中其他化学成分(酚酸类、三萜类、甾类和二苯乙烯类等)进行定量分析,建立三叶青中多指标成分含量的分析方法,进一步完善三叶青质量标准。

### 参考文献

- [1] 南京中医药大学. 中药大辞典: 下册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1979: 3007-3008.
- [2] 蔡伟炜, 陈丹, 范世明, 等. 中药三叶青化学成分及药理作用研究进展[J]. 天津药学, 2014, 26(1): 38-41.
- [3] 浦锦宝, 梁卫青, 郑军献, 等. HPLC法测定三叶青中槲皮素、山柰酚的含量[J]. 中国中医药科技, 2011, 18(2): 134-135.
- [4] 郑军献, 胡轶娟, 梁卫青, 等. 紫外可见分光光度法测定三叶青中总黄酮的含量[J]. 中国中医药科技, 2009, 16(5): 386-387.
- [5] 徐硕, 金鹏飞, 徐文峰, 等. 民间中药三叶青的研究进展[J]. 中南药学, 2016, 14(12): 1336-1341.
- [6] 许文, 傅志勤, 林婧, 等. UPLC-MS/MS法同时测定三叶青中10种黄酮类成分[J]. 药学学报, 2014, 49(12): 1711-1717.
- [7] 许文, 傅志勤, 林婧, 等. HPLC-Q-TOF-MS和UPLC-QqQ-MS的三叶青主要成分定性定量研究[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(22): 4365-4372.
- [8] 刘洋, 钱丽华. HPLC法测定三叶青中槲皮素和山柰酚含量研究[J]. 安徽农学通报, 2015, 21(17): 26-28, 35.
- [9] 何丽针, 夏骏, 姜文娟, 等. 高效液相色谱内标法测定三叶青块根中槲皮素和β-谷甾醇的含量[J]. 中兽医学杂志, 2017(5): 3-5.
- [10] 丁丽, 章璐幸, 邱彦. HPLC-ELSD法同时测定三叶青中胡萝卜苷和β-谷甾醇的含量[J]. 安徽医药, 2015, 19(11): 2083-2084.
- [11] 林婧, 纪明妹, 黄泽豪, 等. 三叶青的化学成分及其体外抗肿瘤活性研究[J]. 中国药理学杂志, 2015, 50(8): 658-663.

(收稿日期: 2019-03-09 修回日期: 2019-03-29)

(编辑: 唐晓莲)

《中国药房》杂志——中国科技核心期刊, 欢迎投稿、订阅