

HPLC 同时测定三叶青中 5 种黄酮类成分的含量

刘帅英¹, 张晓芹², 王慧玉^{2*}, 袁宙新², 雷后兴², 倪京丽² (1. 丽水市食品药品与质量技术检验检测院, 浙江 丽水 323000,

2. 丽水市中医院, 浙江 丽水 323000)

摘要: 目的 建立 HPLC 同时测定三叶青中 5 个黄酮类化合物芦丁、异槲皮苷、山奈酚-3-*O*-芸香糖苷、槲皮素和山奈酚的含量。方法 Agilent ZORBAX SB-C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-0.2%磷酸溶液, 梯度洗脱, 流速为 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长为 360 nm, 柱温为 35 ℃。结果 芦丁、异槲皮苷、山奈酚-3-*O*-芸香糖苷、槲皮素和山奈酚分别在 0.087 8~0.878 μg、0.069 6~0.696 μg、0.162 9~1.629 μg、0.002 7~0.027 μg、0.007 23~0.072 3 μg 内与峰面积呈良好的线性关系, $r \geq 0.999\ 7$; 平均加样回收率分别为 97.44%, 96.88%, 97.00%, 96.42%, 96.24%。结论 该方法简便、高效, 可作为三叶青的质量控制提供参考。

关键词: 三叶青; 芦丁; 异槲皮苷; 山奈酚-3-*O*-芸香糖苷; 槲皮素; 山奈酚; 含量测定

中图分类号: R917 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2018)12-1878-03

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2018.12.025

引用本文: 刘帅英, 张晓芹, 王慧玉, 等. HPLC 同时测定三叶青中 5 种黄酮类成分的含量[J]. 中国现代应用药学, 2018, 35(12): 1878-1880.

Simultaneous Determination of Five Major Flavonoids in *Tetrastigma Hemsleyanum* by HPLC

LIU Shuaiying¹, ZHANG Xiaoqin², WANG Huiyu^{2*}, YUAN Zhouxin², LEI Houxing², NI Jingli² (1. Lishui Inspection Institute for Food and Drug & Quality and Technology Control, Lishui 323000, China; 2. Lishui Hospital of Traditional Chinese Medicines, Lishui 323000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To develop a determination method of rutin, isoquercitrin, kaempferol-3-*O*-rutinoside, quercetin, and kaempferol in *Tetrastigma hemsleyanum* by HPLC. **METHODS** HPLC assay was carried out using an Agilent ZORBAX SB-C₁₈ column (250 mm×4.6 mm, 5 μm) with column temperature at 35 ℃. The mobile phase was acetonitrile-0.2% phosphoric acid in gradient elution at a flow rate of 1.0 mL·min⁻¹. And the detection wavelength was 360 nm. **RESULTS** The linear ranges of rutin, isoquercitrin, kaempferol-3-*O*-rutinoside, quercetin, kaempferol, and baicalin were 0.087 8–0.878 μg, 0.069 6–0.696 μg, 0.162 9–1.629 μg, 0.002 7–0.027 μg, 0.007 23–0.072 3 μg, respectively ($r \geq 0.999\ 7$), and the average recoveries of three components were 97.44%, 96.88%, 97.00%, 96.42%, 96.24%, respectively. **CONCLUSION** The method is simple, quick and accurate, can be used for the quality control of the *Tetrastigma hemsleyanum*.

KEYWORDS: *Tetrastigma hemsleyanum*; rutin; isoquercitrin; kaempferol-3-*O*-rutinoside; quercetin; kaempferol; determination

三叶青为葡萄科崖爬藤属植物三叶崖爬藤(*Tetrastigma hemsleyanum* Diels et Gilg)的块根, 具有清热解毒、祛风化痰、活血止痛的功效^[1]。近年来, 用 HPLC-Q-TOF-MS 或 UPLC-MS/MS 法测定三叶青中化学成分的研究已有报道^[2-3], 但此类仪器昂贵, 难以普及。也有学者用 HPLC 对三叶青中槲皮素和山奈酚、谷甾醇和胡萝卜苷等成分进行测定^[4-6], 但均只检测到 2~3 种有效成分, 缺乏多指标性能。本研究采用 HPLC 同时测定三叶青中 5 种黄酮类成分, 为三叶青质量标准的制定奠定基础。

1 仪器与试剂

Agilent 1200 DAD 高效液相色谱仪(美国

Agilent 公司); XS105DU 型电子天平(瑞士梅特勒公司); DL-360D 型智能超声波清洗器(上海之信仪器有限公司)。

芦丁对照品(批号: 10080-200306; 含量: 100%)、异槲皮苷对照品(批号: 111809-201403; 含量: 92.9%)、山奈酚-3-*O*-芸香糖苷对照品(批号: 112007-201602; 含量: 90.8%)、槲皮素对照品(批号: 100081-201408; 含量: 99.1%)、山奈酚对照品(批号: 110861-201310; 含量: 93.2%)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。10 批三叶青样品从市场上购入, 具体信息见表 1。

基金项目: 丽水市科技计划项目(2017ZDYF16)

作者简介: 刘帅英, 女, 硕士, 副主任药师 Tel: (0578)2155869
任药师 Tel: (0578)2124079 E-mail: whyu20091006@126.com

E-mail: liushuaiying123@126.com *通信作者: 王慧玉, 女, 副主

表1 三叶青样品来源

Tab. 1 Sample sources of *Tetrastigma hemsleyanum*

编号	批号	来源
S1	1602082	衢州南孔中药有限公司
S2	1604152	
S3	1606127	
S4	1610091	
S5	1701036	华润丽水医药有限公司
S6	1701036	浙江贝尼菲特中药饮片有限公司
S7	17052001	浙江景岳堂药业有限公司
S8	16081902	
S9	17072403	
S10	117090901	

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 Agilent ZORBAX SB-C₁₈(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相为乙腈(A)-0.2%磷酸溶液(B), 梯度洗脱(0~5 min, 20%→22%A; 5~10 min, 22%→25%A; 10~20 min, 25%→35%A; 20~25 min, 35%→40%A; 25~30 min, 40%→55%A; 30~35 min, 55%→20%A); 检测波长为 360 nm; 流速为 1.0 mL·min⁻¹, 柱温为 35 ℃, 运行时间为 35 min; 进样量为 15 μL。

2.2 混合对照品溶液的制备

精密称取芦丁、异槲皮苷、山奈酚-3-O-芸香糖苷、槲皮素和山奈酚对照品适量, 分别加甲醇制成芦丁、异槲皮苷、山奈酚-3-O-芸香糖苷、槲皮素和山奈酚浓度分别为 878.0, 174.0, 543.0, 540.0, 723.0 μg·mL⁻¹ 的对照品储备液。精密吸取 5 种对照品储备液制成分别含芦丁、异槲皮苷、山奈酚-3-O-芸香糖苷、槲皮素和山奈酚浓度为 43.90, 34.80, 81.45, 1.35, 3.615 μg·mL⁻¹ 的混合对照品溶液(已按各自质量分数折算)。

2.3 供试品溶液的制备

精密称取三叶青粉末 2.0 g, 置 100 mL 锥形瓶中, 加甲醇 50 mL, 密塞, 称重, 超声提取(250 W, 40 Hz)60 min, 放冷至室温, 用甲醇补足减失的质量, 滤过, 滤液置水浴上蒸干, 残留物用甲醇定容至 5 mL 量瓶中, 用 0.45 μm 的微孔滤膜过滤, 取续滤液作为供试品溶液。

2.4 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 15 μL, 按“2.1”项下色谱条件进样分析, 记录色谱图, 结果样品中芦丁、异槲皮苷、山奈酚-3-O-芸香糖苷、槲皮素和山奈酚色谱峰的保留时间分别为 5.5, 6.7, 7.5, 18.7, 24.1 min。目标峰与其相邻色谱峰的分度度>1.5, 理论板数芦丁计

≥10 000, 色谱图见图 1。

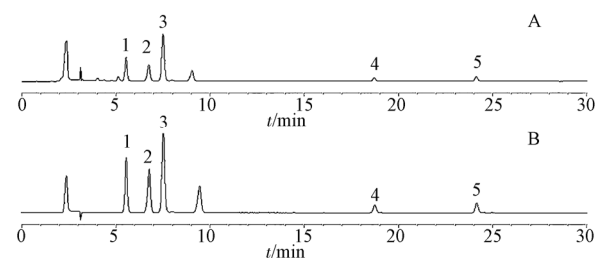


图1 HPLC 图

A-样品; B-对照品; 1-芦丁; 2-异槲皮苷; 3-山奈酚-3-O-芸香糖苷; 4-槲皮素; 5-山奈酚。

Fig. 1 HPLC chromatograms

A-sample; B-reference substances; 1-rutin; 2-isoquercitrin; 3-kaempferol-3-O-rutinoside; 4-quercetin; 5-kaempferol.

2.5 线性关系考察

分别精密吸取“2.2”项下混合对照品溶液 2, 5, 10, 15, 20 μL, 按“2.1”项下色谱条件进样, 以峰面积(Y)为纵坐标, 各组分的质量(X)为横坐标, 绘制标准曲线, 得芦丁、异槲皮苷、山奈酚-3-O-芸香糖苷、槲皮素和山奈酚的线性回归方程分别为 $Y=1\,436X+1.065$ ($r=0.999\,7$)、 $Y=1\,478X+20.60$ ($r=0.999\,9$)、 $Y=1\,332X-0.314$ ($r=0.999\,9$)、 $Y=4\,215X-0.265$ ($r=0.999\,9$)、 $Y=3\,184X+0.252$ ($r=0.999\,9$), 分别在 0.087 8~0.878 μg、0.069 6~0.696 μg、0.162 9~1.629 μg、0.002 7~0.027 μg、0.007 23~0.072 3 μg 内呈良好的线性关系。

2.6 仪器精密度试验

将“2.2”项下混合对照品溶液注入液相色谱仪, 连续进样 6 次, 每次 15 μL, 记录保留时间和峰面积, 芦丁、异槲皮苷、山奈酚-3-O-芸香糖苷、槲皮素和山奈酚峰面积 RSD 分别为 0.62%, 0.43%, 0.37%, 0.45%, 0.36%, 保留时间 RSD<0.5%, 表明仪器精密度符合要求。

2.7 稳定性试验

精密吸取同一批供试品溶液(批号: 17072403), 分别于 0, 2, 6, 8, 12, 16, 24 h 按“2.1”项下色谱条件进样, 记录色谱图。结果显示, 芦丁、异槲皮苷、山奈酚-3-O-芸香糖苷、槲皮素和山奈酚峰面积 RSD 分别为 0.75%, 0.66%, 0.63%, 0.73%, 0.38%。表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.8 重复性试验

取同一批三叶青(批号: 17072403), 平行取样 6 份, 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进样测定, 结果芦丁、异槲皮苷、

山奈酚-3-*O*-芸香糖苷、槲皮素和山奈酚峰面积的RSD 分别为 2.11%, 1.59%, 1.68%, 1.55%, 1.49%。表明该方法的重复性良好。

2.9 加样回收率试验

取已知含量的三叶青(批号: 17072403)6 份, 每份约 1.0 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 分别精密加入芦丁、异槲皮苷、山奈酚-3-*O*-芸香糖苷、槲皮素和山奈酚对照品溶液适量, 按“2.3”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, 结果见表 2。

表 2 加样回收率考察结果(n=6)

Tab. 2 Result of recovery tests(n=6)

组分	样品原 含量/ μg	对照品 加入量/ μg	测得量/ μg	加样回收 率/%	平均值/ %	RSD/ %
芦丁	36.10	35.12	70.82	98.86	97.44	1.01
	36.12	35.12	70.10	96.75		
	36.14	35.12	70.31	97.29		
	36.17	35.12	70.16	96.78		
	36.20	35.12	70.77	98.43		
	36.23	35.12	70.12	96.50		
异槲皮苷	30.10	34.80	64.12	97.76	96.88	1.18
	30.15	34.80	63.61	96.15		
	30.17	34.80	64.23	97.87		
	30.19	34.80	63.27	95.06		
	30.22	34.80	63.79	96.47		
	30.12	34.80	64.22	98.00		
山奈酚 -3- <i>O</i> -芸香 糖苷	102.10	108.60	208.12	97.62	97.00	0.88
	102.15	108.60	208.56	97.98		
	102.17	108.60	207.62	97.10		
	102.20	108.60	207.95	97.38		
	102.26	108.60	206.45	95.94		
	102.21	108.60	206.47	96.00		
槲皮素	2.61	2.70	5.21	96.30	96.42	0.67
	2.62	2.70	5.20	95.56		
	2.65	2.70	5.28	97.41		
	2.74	2.70	5.35	96.67		
	2.69	2.70	5.28	95.93		
	2.79	2.70	5.40	96.67		
山奈酚	5.20	4.34	9.40	96.77	96.24	0.95
	5.24	4.34	9.37	95.16		
	5.27	4.34	9.49	97.24		
	5.21	4.34	9.34	95.16		
	5.20	4.34	9.41	97.00		
	5.29	4.34	9.46	96.08		

2.10 样品含量测定

取各批样品约 2.0 g, 各 2 份, 精密称定, 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件测定, 计算含量, 结果见表 3。

3 讨论

3.1 检测波长的选择

根据文献报道^[4], 结合二极管阵列检测器全波长扫描, 分别采用 210, 254, 280, 360 nm 波长进行考察, 发现用 360 nm 时基线平稳, 色谱特征性强, 峰型较好。因此选择 360 nm 作为检测波长。

表 3 样品含量测定结果(n=2)

Tab. 3 Results of the content determination of sample(n=2)

编号	芦丁/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$	异槲皮苷/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$	山奈酚-3- <i>O</i> -芸 香糖苷/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$	槲皮素/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$	山奈酚/ $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$
S1	0.031 2	0.028 0	0.133 5	0.002 4	4.231 0
S2	0.029 9	0.027 9	0.132 8	0.002 6	5.100 0
S3	0.030 8	0.028 2	0.132 7	0.002 3	4.356 0
S4	0.030 7	0.028 7	0.134 8	0.002 8	4.251 0
S5	0.040 2	0.030 7	0.100 5	0.002 4	4.105 0
S6	0.041 7	0.034 2	0.100 1	0.002 4	4.085 0
S7	0.036 3	0.029 5	0.101 5	0.002 4	5.201 0
S8	0.035 7	0.029 3	0.101 7	0.002 9	5.209 0
S9	0.036 1	0.030 1	0.102 1	0.002 6	5.207 0
S10	0.036 5	0.031 1	0.101 9	0.002 5	5.203 0

3.2 样品溶剂的选择

用 80%甲醇、90%甲醇、纯甲醇、70%甲醇分别作溶剂进行比较, 结果发现用纯甲醇作溶剂的溶解性较好, 样品分离效果较好。

3.3 色谱条件的选择

分别考察了不同比例甲醇-磷酸水和乙腈-磷酸水为流动相系统, 磷酸水浓度分别为 0.1%, 0.15%, 0.2%, 结果发现 0.2%磷酸能减少拖尾现象, 但也会使仪器的压力略高, 综合考虑采用乙腈-0.2%磷酸水性梯度洗脱, 其响应值较高, 峰的分离度与峰形均较好且无干扰峰。

实验结果表明, 本方法具有良好的准确度和重复性, 能同时测定 5 种黄酮类成分的含量, 可为三叶青的质量控制提供参考。

REFERENCES

[1] 全国中草药汇编编写组. 全国中草药汇编(上册)[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1975: 31.

[2] XU W, FU Z Q, LIN J, et al. Rapid simultaneous determination of ten major flavonoids in *Tetragium hemsleyanum* by UPLC-MS/MS [J]. Acta Pharm Sin(药理学报), 2014, 49(12): 1711-1717.

[3] XU W, FU Z Q, LIN J, et al. Qualitative and quantitative analysis of major constituents in *Tetragium hemsleyanum* by HPLC-Q-TOF-MS and UPLC-QQQ-MS [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2014, 39(22): 4365-4372.

[4] PU J B, LIANG W Q, ZHENG J X, et al. Quercetin and kaempferol contents of *Tetragium hemsleyanum* determined by HPLC [J]. Chin J Tradit Med Sci Technol(中国中医药科技), 2011, 2(18): 134-135.

[5] LIU Y W, YIN H M, ZOU Y H. Determination of β -sitosterol in *Tetragium hemsleyanum* by HPLC-ELSD [J]. Chin Arch Tradit Chin Med(中华中医药学刊), 2012, 30(6): 1387-1389.

[6] 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.

收稿日期: 2018-02-09

(本文责编: 李艳芳)