

# 三叶青地上部分抗炎提取物质量控制研究

廖淑彬, 陈丹\*, 刘秀棉, 洪丽婷, 熊朝栋, 余文静(福建中医药大学药学院, 福州 350122)

**摘要:** 目的 建立三叶青地上部分抗炎提取物(anti-inflammatory extracts of *Tetrastigma hemsleyanum* Diels et Gilg's aerial part, THAA)质量控制方法。方法 采用薄层色谱法鉴别 THAA; 采用比色法测定 THAA 总黄酮含量; 建立 HPLC 同时测定 THAA 7 个效应组分含量, 并在此基础上建立了以异荛草苷为内参物, 同步测定 7 个效应组分的 HPLC 一测多评法。结果 6 批 THAA 供试品色谱, 在与三叶青地上部分对照药材及混合对照品色谱相应位置上, 显相同颜色的荧光斑点, 各组分分离良好; 建立的比色法在  $9.63\sim 57.79\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  内呈良好的线性关系, 回归方程为  $A=1.120\times 10^{-2}C-2.400\times 10^{-3}$ ,  $r=0.999\ 5$ , 3 批 THAA 总黄酮平均含量为 60.02%~60.32%。HPLC 测得 THAA 中绿原酸、荛草苷、异荛草苷、异荛草苷-2'-O-鼠李糖苷、牡荆苷、异牡荆苷、牡荆苷-2''-O-鼠李糖苷的平均含量分别为 21.64%, 8.04%, 6.61%, 19.51%, 2.03%, 1.59%, 4.03%; 一测多评法同时测定 THAA 中 7 个抗炎效应组分含量与外标法分别测定的含量结果无显著性差异。结论 所建立的薄层色谱鉴别法, 总黄酮的含量测定法以及 7 个效应组分 HPLC 含量测定法及一测多评法, 可为 THAA 内在质量控制提供参考。

**关键词:** 三叶青地上部分提取物; 质量控制; 薄层色谱法; 比色法; 高效液相色谱法; 一测多评

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2020)13-1590-07

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2020.13.010

引用本文: 廖淑彬, 陈丹, 刘秀棉, 等. 三叶青地上部分抗炎提取物质量控制研究[J]. 中国现代应用药学, 2020, 37(13): 1590-1596.

## Studies on Quality Control of Anti-inflammatory Extracts of *Tetrastigma Hemsleyanum* Diels Et Gilg's Aerial Part

LIAO Shubin, CHEN Dan\*, LIU Xiumian, HONG Liting, XIONG Chaodong, YU Wenjing(College of Pharmacy, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To develop a method for studies on the quality control of anti-inflammatory extracts of *Tetrastigma hemsleyanum* Diels et Gilg's aerial part(THAA). **METHODS** Identify the THAA by TLC; the content of total flavonoids of THAA were determined by colorimetric method; HPLC was established for the simultaneous determination of 7 pharmacodynamic components of THAA. Moreover, isoorientin was used as the internal reference in the determination of 7 pharmacodynamic components by quantitative analysis of multi-components by single-marker for THAA. **RESULTS** Six batches of THAA samples were chromatographed, and the fluorescent spots of the same color were displayed on the corresponding positions of the medicinal materials and the mixed reference materials on THAA. The components were well separated. The established colorimetric method showed a good linear relationship in the range of  $9.63\sim 57.79\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . The regression equation was  $A=1.120\times 10^{-2}C-2.400\times 10^{-3}$ ,  $r=0.999\ 5$ . The average content of total flavonoids in 3 batches of THAA was 60.02%~60.32%. The content of chlorogenic acid, orientin, isoorientin, isoorientin-2'-O-rhamnoside, vitexin, isovitexin, vitexin-2''-O-rhamnoside in the anti-inflammatory extracts of THAA was about 21.64%, 8.04%, 6.61%, 19.51%, 2.03%, 1.59%, 4.03%; There was no significant difference between the content of 7 anti-inflammatory medicinal components in the THAA quantitative analysis of multi-components by single-marker multi-evaluation method and HPLC. **CONCLUSION** The established TLC identification, the determination method of total flavonoids, and the HPLC and quantitative analysis of multi-components by single-marker of the 7 pharmacodynamic components can be used as a reference for the internal quality control of the THAA.

**KEYWORDS:** extracts of *Tetrastigma hemsleyanum* Diels et Gilg's aerial part; quality control; TLC; colorimetry; HPLC; quantitative analysis of multi-components by single-marker(QAMS)

三叶青(*Tetrastigma hemsleyanum* Diels et Gilg)为葡萄科崖爬藤属植物, 是我国特有的珍稀药用植物, 福建省、浙江省中药饮片炮制规范已收载

三叶青块根<sup>[1-2]</sup>, 湖南省中药饮片炮制规范则收载三叶青全草<sup>[3]</sup>。三叶青在浙江、福建等省民间素有药食两用习俗, 近年来临床多应用于抗肿瘤、抗

基金项目: 福建省科技计划项目(2019Y0037, 2010Y2004); 福建省中医药科研项目(2017FJZY202)

作者简介: 廖淑彬, 女, 硕士生 Tel: 13358261594 E-mail: 1281397802@qq.com \*通信作者: 陈丹, 女, 博士, 教授 Tel: 13515026709 E-mail: gscd2@163.com

艾滋病毒和治疗血液病、心血管疾病、肝炎及肺炎等感染性疾病<sup>[4]</sup>。药理实验研究表明,三叶青具有抗肿瘤、抗炎、解热镇痛、抗病毒、保肝以及免疫调节等多种药理作用<sup>[5-6]</sup>,三叶青地上部分抗炎提取物(anti-inflammatory extracts of *Tetrastigma hemsleyanum* Diels et Gilg's aerial part, THAA)是从三叶青藤茎叶分离纯化的有效部位<sup>[7]</sup>,研究证实该提取物具有良好的抗炎镇痛作用<sup>[8]</sup>。中药提取物通常作为中间体用于中药制剂的制备,其质量控制直接影响到相关制剂的质量<sup>[9]</sup>。因此,本研究从中药整体性结合多指标的层面建立控制THAA内在质量的方法,采用已明确的7个效应组分群为代表,从整体表征效应组分群角度,研究THAA与抗炎药效相关联的定性和定量的质量控制方法。

## 1 仪器与试剂

### 1.1 仪器

XS205 十万分之一电子天平、AR2140 万分之一电子天平(梅特勒-托利多仪器上海有限公司);Yoko-PN 电动喷雾器(武汉药科新技术开发有限公司);ZF1-I型多功能紫外分析仪(上海嘉鹏科技有限公司);UV-4802 型双光束紫外可见分光光度计(尤尼柯上海仪器有限公司);Waters 2695 高效液相色谱仪,Waters 2998 PDA 检测器,Empower 3 色谱工作站。

### 1.2 试剂

THAA(自制,批号:20150205,20160705,20160807,20160808,20160809,20160925);三叶青地上部分药材由福建宁化县益珍农业科技有限公司提供,经福建中医药大学中药鉴定教研室范世明高级实验师鉴定;绿原酸(批号:101727-201401)、荭草苷(批号:111777-201302)、异荭草苷(批号:111777-201401)、牡荆苷(批号:111678-200602)和牡荆苷-2"-O-鼠李糖苷(批号:100577-201504)对照品,含量均 $\geq 98\%$ ,均购自中国食品药品检定研究院;异牡荆苷对照品(南京景竹生物科技有限公司,含量 $>98\%$ );异荭草苷-2'-O-鼠李糖苷对照品(自制,含量 $>98\%$ );聚酰胺薄膜(浙江台州路桥四甲生化塑料厂);其余试剂均为分析纯,水为超纯水。

## 2 方法与结果

### 2.1 THAA 的薄层色谱鉴别

**2.1.1 混合对照品溶液的制备** 分别精密称取绿原酸 10.58 mg、异荭草苷-2'-O-鼠李糖苷 13.15 mg、

荭草苷 13.13 mg、异荭草苷 11.53 mg、牡荆苷 13.53 mg、异牡荆苷 13.68 mg、牡荆苷-2"-O-鼠李糖苷对照品 13.13 mg,加甲醇溶解,置 25 mL 量瓶中,用甲醇稀释至刻度,制得对照品储备液。分别精密吸取 1 mL 对照品储备液至 5 mL 量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,制得混合对照品溶液,即得(每 1 mL 含绿原酸 0.084 6 mg、异荭草苷-2'-O-鼠李糖苷 0.105 2 mg、荭草苷 0.105 0 mg、异荭草苷 0.092 2 mg、牡荆苷 0.108 2 mg、异牡荆苷 0.109 4 mg、牡荆苷-2"-O-鼠李糖苷 0.105 0 mg)。

**2.1.2 供试品溶液的制备** 称取 THAA 25 mg,加 50%甲醇 5 mL 超声溶解,即得。

**2.1.3 三叶青地上部分对照药材溶液与阴性对照溶液的制备** 称取三叶青地上部分药材粉末 3 g,加 60%乙醇 75 mL,回流提取 3 次,滤过,合并滤液,水浴蒸干,残渣加 50%甲醇 10 mL 超声溶解,即得三叶青地上部分对照药材溶液。取缺三叶青地上部分药材粉末,同法制得阴性对照溶液。

**2.1.4 薄层色谱鉴别** 分别吸取混合对照品溶液、三叶青地上部分对照药材溶液、6 批供试品溶液和阴性对照溶液各 5  $\mu$ L,点于同一块聚酰胺薄膜上,以氯仿-丙酮-乙醇-36%乙酸(4:2:3.6:2)为展开剂,展开槽饱和 20 min 后展开,取出,晾干,喷以 3%三氯化铝乙醇溶液,在 105  $^{\circ}$ C 加热 5 min,置 365 nm 紫外光灯下检视。结果表明,6 批 THAA 供试品色谱在与三叶青地上部分对照药材及混合对照品色谱相应位置上,显相同颜色的荧光斑点。结果见图 1。

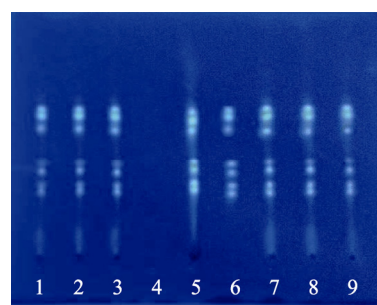


图 1 THAA 薄层鉴别色谱图

1~3、7~9-THAA; 4-阴性对照; 5-三叶青地上部分对照药材溶液; 6-混合对照品溶液; 从上到下依次是牡荆苷-2''-O-鼠李糖苷、异荭草苷-2'-O-鼠李糖苷、绿原酸、异牡荆苷、牡荆苷、异荭草苷、荭草苷。

### Fig. 1 TLC of THAA

1-3, 7-9-THAA; 4-negative control; 5-control solution of *Tetrastigmatis hemsleyanum* Diels et Gilg's aerial part; 6-mixed reference solution; from top to bottom were vitexin-2''-O-rhamnoside, isoorientin-2''-O-rhamnoside, chlorogenic acid, isovitexin, vitexin, isoorientin, orientin.

## 2.2 THAA 总黄酮的含量测定

**2.2.1 对照品溶液的制备** 精密称定异荭草苷-2'-*O*-鼠李糖苷对照品 12.04 mg, 加甲醇适量, 超声溶解, 放冷, 置 50 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 即得(每 1 mL 中含 0.240 8 mg 异荭草苷-2'-*O*-鼠李糖苷)。

**2.2.2 供试品溶液的制备** 精密称取 THAA 约 20 mg, 加 50%甲醇超声溶解, 置 25 mL 量瓶中, 用 50%甲醇稀释至刻度, 摇匀, 即得。

**2.2.3 测定波长的选择** 精密吸取 4.0 mL 对照品溶液和 2.0 mL 供试品溶液, 分别置 25 mL 量瓶中, 加 50%甲醇至 6.0 mL, 精密加入 5%亚硝酸钠溶液 1.0 mL, 摇匀, 放置 6 min, 再精密加入 10%硝酸铝溶液 1.0 mL, 摇匀, 放置 6 min, 精密加入 4%氢氧化钠试液 10.0 mL, 加水稀释至刻度, 摇匀, 放置 15 min, 即得待测溶液。待测溶液于 400~800 nm 进行扫描。结果表明, 在 500 nm 处, 对照品溶液和供试品溶液均呈最大吸收, 故选择测定波长为 500 nm。

**2.2.4 标准曲线制备及线性关系考察** 分别精密吸取“2.2.1”项下对照品溶液 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0 mL 于 25 mL 量瓶中, 按“2.2.3”项下“加 50%甲醇至 6.0 mL”起同法操作制备溶液, 以 50%甲醇同法配制溶液为空白, 在 500 nm 处测定吸光度, 以异荭草苷-2'-*O*-鼠李糖苷对照品的浓度为横坐标, 吸光度(*A*)值为纵坐标, 绘制标准曲线。结果表明, 异荭草苷-2'-*O*-鼠李糖苷在 9.63~57.79  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  内呈良好的线性关系, 回归方程为  $A=1.120\times 10^{-2}C-2.400\times 10^{-3}$ ,  $r=0.999\ 5$ 。

**2.2.5 稳定性试验** 取同一供试品溶液, 精密吸取 3.0 mL 至 25 mL 量瓶, 按“2.2.3”项下自“加 50%甲醇至 6.0 mL”起同法操作, 于第 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 min 分别测定吸光度, 30 min 内吸光度的 RSD 为 3.44%, 15 min 内吸光度的 RSD 为 0.38%, 结果表明, 供试品溶液显色后 15 min 内较稳定。

**2.2.6 仪器精密度试验** 精密量取 4.0 mL 对照品溶液, 置 25 mL 量瓶中, 按“2.2.3”项下自“加 50%甲醇至 6.0 mL”起同法操作, 依法测定吸光度, 重复测定 6 次, RSD 为 0.09%。结果表明仪器精密度良好。

**2.2.7 重复性试验** 取同一批 THAA(批号: 20150205), 分别精密称取约 20 mg, 共 6 份, 分

别制备供试品溶液, 精密量取 2.0 mL 置 25 mL 量瓶中, 按“2.2.3”项下自“加 50%甲醇至 6 mL”起同法操作, 依法测定吸光度, 计算总黄酮平均含量为 60.02%, RSD 为 0.52%。结果表明, 方法重复性良好。

**2.2.8 加样回收率试验** 分别精密称取已知含量的同一批 THAA 粉末(批号: 20160705, 总黄酮含量为 60.37%)约 10 mg, 共 6 份, 分别置 25 mL 量瓶中, 分别精密加入异荭草苷-2'-*O*-鼠李糖苷对照品 5.72 mg, 按“2.2.9”项下方法操作, 测定吸光度, 计算回收率。结果平均回收率为 100.03%, RSD 为 0.71%, 表明方法回收率良好。

**2.2.9 样品含量测定** 分别取 3 批 THAA 粉末, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 精密量取 2.0 mL 供试品溶液, 置 25 mL 量瓶中, 按“2.2.3”项下“加 50%甲醇至 6.0 mL”起同法操作, 依法测定吸光度, 结果 3 批样品总黄酮平均含量分别为 60.32%, 60.02%, 60.26%, RSD 分别为 0.86%, 0.32%, 0.61%。

## 2.3 HPLC 同时测定 THAA 效应组分群 7 个组分的含量

**2.3.1 供试品溶液的制备** 精密称取 THAA 约 10 mg, 加适量 50%甲醇超声溶解, 置 25 mL 量瓶中, 用 50%甲醇稀释至刻度, 摇匀, 即得供试品溶液。

**2.3.2 混合对照品溶液的制备** 分别精密称取对照品绿原酸、荭草苷、异荭草苷、异荭草苷-2'-*O*-鼠李糖苷、牡荆苷、异牡荆苷、牡荆苷-2''-*O*-鼠李糖苷适量, 加适量 50%甲醇超声溶解, 分别稀释成各对照品储备液(浓度分别为 0.059 2, 0.105 0, 0.461 0, 1.052, 0.108 2, 0.109 4, 0.105 0  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ )。分别精密量取各对照品储备液, 绿原酸 2.0 mL, 荭草苷 5.0 mL, 异荭草苷 2.0 mL, 异荭草苷-2'-*O*-鼠李糖苷 2.0 mL, 牡荆苷 2.5 mL, 异牡荆苷 2.0 mL, 牡荆苷-2''-*O*-鼠李糖苷 4.0 mL, 置 25 mL 量瓶中, 加 50%甲醇稀释至刻度, 摇匀, 即得。

**2.3.3 色谱条件与系统适用性试验** 250-4 Lichrocart C<sub>18</sub>(4.6 mm×250 mm, 5  $\mu\text{m}$ ); 流动相 甲醇(A)-0.5%甲酸水(B)梯度洗脱, 洗脱程序为 0~15 min, 19%A; 15~20 min, 19%→25%A; 20~26 min, 25%→33.5%A; 26~29 min, 33.5%A; 29~35 min, 33.5%→40%A; 35~51 min, 40%→19%A; 51~55 min, 19%A。流速 1.0  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ;

检测波长 350 nm; 柱温 40 °C, 进样量 10  $\mu$ L。在上述色谱条件下, 分别精密吸取供试品溶液、混合对照品溶液 10  $\mu$ L, 注入液相色谱仪, 记录色谱图, 各相邻峰之间  $R>1.5$ , 理论板数按异荭草苷-2'-*O*-鼠李糖苷计 $\geq 4\ 000$ 。结果见图 2。

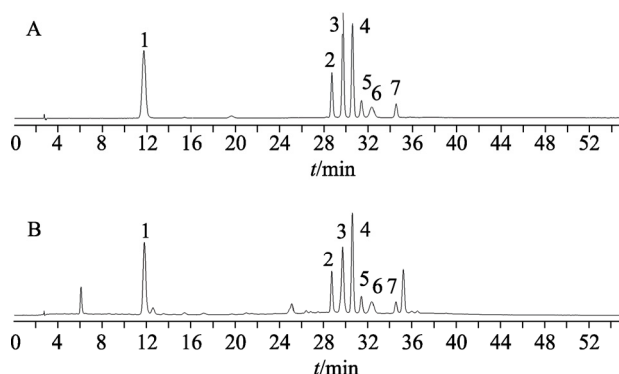


图 2 THAA 高效液相色谱图

A-混合对照品; B-供试品; 1-绿原酸; 2-荭草苷; 3-异荭草苷; 4-异荭草苷-2'-*O*-鼠李糖苷; 5-牡荆苷; 6-牡荆苷-2''-*O*-鼠李糖苷; 7-异牡荆苷。

Fig. 2 HPLC chromatograms of THAA

A-mixed reference substance; B-sample; 1-chlorogenic acid; 2-orientin; 3-isoorientin; 4-isoorientin-2'-*O*-rhamnoside; 5-vitexin; 6-vitexin-2''-*O*-rhamnoside; 7-Isovitexin.

**2.3.4 线性关系考察** 精密量取“2.3.2”项下混合对照品溶液 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0 mL, 分别置 10 mL 量瓶中, 用 50%甲醇稀释至刻度, 摇匀。分别精密吸取 10  $\mu$ L 注入液相色谱仪, 记录色谱图。以对照品浓度( $x$ ,  $\mu$ g·mL<sup>-1</sup>)为横坐标, 峰面积( $y$ )为纵坐标, 绘制标准曲线, 计算回归方程, 记录线性范围。结果见表 1。

表 1 线性关系考察结果

Tab. 1 Results of linear relationship inspection

| 成分                      | 回归方程                                         | $r$     | 线性范围/<br>$\mu$ g·mL <sup>-1</sup> |
|-------------------------|----------------------------------------------|---------|-----------------------------------|
| 绿原酸                     | $y=1.440\ 0\times 10^4x-4.500\ 7\times 10^4$ | 1.000 0 | 8.460~59.220                      |
| 荭草苷                     | $y=1.390\ 7\times 10^4x-2.413\ 9\times 10^3$ | 0.999 8 | 2.100~21.000                      |
| 异荭草苷                    | $y=3.575\ 9\times 10^4x-5.813\ 8\times 10^2$ | 0.999 9 | 1.844~18.440                      |
| 异荭草苷-2'- <i>O</i> -鼠李糖苷 | $y=1.494\ 1\times 10^4x-2.480\ 3\times 10^3$ | 1.000 0 | 4.208~42.080                      |
| 牡荆苷                     | $y=2.531\ 6\times 10^4x-3.351\ 4\times 10^4$ | 0.999 8 | 0.541~5.410                       |
| 异牡荆苷                    | $y=2.420\ 4\times 10^4x-2.138\ 2\times 10^3$ | 0.999 6 | 0.438~4.376                       |
| 牡荆苷-2''- <i>O</i> -鼠李糖苷 | $y=1.831\ 6\times 10^4x-1.049\ 4\times 10^4$ | 0.999 8 | 0.840~8.400                       |

**2.3.5 仪器精密度试验** 精密量取“2.3.2”项下混合对照品溶液 4.0 mL, 置 10 mL 量瓶中, 加 50%甲醇稀释至刻度, 摇匀。精密吸取 10  $\mu$ L, 连续注入液相色谱仪 6 次, 记录峰面积值, 计算绿原酸、荭草苷、异荭草苷、异荭草苷-2'-*O*-鼠李糖苷、牡

荆苷、异牡荆苷、牡荆苷-2''-*O*-鼠李糖苷 RSD 分别为 0.27%, 0.30%, 0.24%, 0.28%, 0.57%, 0.66%, 0.76%。结果表明, 仪器精密度良好。

**2.3.6 重复性试验** 分别精密称取同一批 THAA(批号: 20150205)粉末约 10 mg, 6 份, 按“2.3.1”项下方法制备供试品溶液, 按“2.3.3”项下色谱条件进样测定, 计算含量及 RSD。结果绿原酸、荭草苷、异荭草苷、异荭草苷-2'-*O*-鼠李糖苷、牡荆苷、异牡荆苷、牡荆苷-2''-*O*-鼠李糖苷平均含量分别为 21.67, 8.02, 6.62, 19.50, 2.31, 1.58, 4.03 mg·g<sup>-1</sup>, RSD 分别为 0.51%, 0.23%, 0.83%, 1.01%, 0.88%, 1.17%, 0.72%。结果表明, 方法重复性良好。

**2.3.7 稳定性试验** 取同一份供试品溶液, 分别于配制后 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24 h 精密吸取 10  $\mu$ L, 注入液相色谱仪, 记录绿原酸、荭草苷、异荭草苷、异荭草苷-2'-*O*-鼠李糖苷、牡荆苷、异牡荆苷、牡荆苷-2''-*O*-鼠李糖苷峰面积的 RSD 分别为 0.45%, 1.48%, 1.63%, 0.91%, 1.43%, 1.63%, 0.97%。结果表明, 供试品在 24 h 内稳定性良好。

**2.3.8 加样回收率试验** 分别精密称取同一批 THAA 粉末约 5 mg(批号: 20150205)6 份, 按“2.3.1”项下方法操作, 分别精密加入各对照品, 按“2.3.3”项下色谱条件进样测定并计算, 绿原酸、荭草苷、异荭草苷、异荭草苷-2'-*O*-鼠李糖苷、牡荆苷、异牡荆苷、牡荆苷-2''-*O*-鼠李糖苷平均回收率分别为 100.4%, 99.38%, 98.96%, 101.5%, 95.49%, 98.46%, 98.73%, RSD 分别为 0.34%, 0.66%, 0.55%, 0.77%, 0.29%, 0.66%, 0.66%, 表明方法回收率良好。

**2.3.9 样品测定** 取 3 批(批号: 20150205, 20160705, 20160807)THAA 粉末, 每个批号 3 份样品, 分别精密称取约 10 mg, 按“2.3.1”项下方法操作, 按“2.3.3”项下色谱条件进样测定并计算, 3 批 THAA 效应组分群平均含量( $n=3$ ), 绿原酸 21.58, 21.57, 21.77 mg·g<sup>-1</sup>, RSD 0.29%, 0.18%, 0.17%; 荭草苷 8.05, 8.05, 8.03 mg·g<sup>-1</sup>, RSD 0.47%, 0.77%, 0.18%; 异荭草苷 6.60, 6.60, 6.64 mg·g<sup>-1</sup>, RSD 0.71%, 0.46%, 1.15%; 异荭草苷-2'-*O*-鼠李糖苷 19.53, 19.48, 19.53 mg·g<sup>-1</sup>, RSD 0.56%, 0.46%, 1.51%; 牡荆苷 2.30, 2.31, 2.30 mg·g<sup>-1</sup>, RSD 0.68%, 0.69%, 1.00%; 异牡荆苷 1.59, 1.60, 1.57 mg·g<sup>-1</sup>, RSD 0.50%, 0.87%, 1.41%; 牡荆苷

-2''-O-鼠李糖苷 4.02, 4.03, 4.04 mg·g<sup>-1</sup>, RSD 0.28%, 0.57%, 0.98%。

2.4 一测多评法同时测定 THAA 效应组分群 7 个效应组分含量

2.4.1 对照品溶液的制备 同“2.3.2”项下。

2.4.2 供试品溶液的制备 同“2.3.1”项下。

2.4.3 色谱条件与系统适用性试验 同“2.3.3”项下。

2.4.4 内参物及相对校正因子的确定 由于 THAA 效应组分群 7 个成分的质量浓度( $W$ )与检测器的响应值(峰面积,  $A$ )在一定的线性范围内成正比, 即  $f=A/C$ , 故在对样品中 7 个组分同时测定时, 选择 THAA 中含量相对较高、对照品相对易得的异荛草苷典型成分作为参照内标物, 按以下相对校正因子计算公式(1), 分别计算内标成分异荛草苷与其他组分之间的相对校正因子, 再通过校正因子计算其他组分的含量。由此可导出定量计算公式(2)。

$$f_{im} = \frac{f_i}{f_m} = \frac{W_i / A_i}{W_m / A_m} = \frac{W_i A_m}{A_i W_m} \quad (1)$$

$$W_m = \frac{W_i \times A_m}{A_i \times f_{im}} \quad (2)$$

式中,  $A_i$  为内标物峰面积,  $W_i$  为内标物浓度。 $A_m$  为其他组分  $m$  的峰面积,  $W_m$  为其他组分浓度。结果见表 2。

表 2 相对校正因子考察结果

Tab. 2 Investigate result of relative correction factor

| 项目    | $f_{\text{绿原酸/}}$ | $f_{\text{荛草苷/}}$ | $f_{\text{异荛草苷/}}$ | $f_{\text{异荛草苷-2''-O-}}$ | $f_{\text{牡荆苷/}}$ | $f_{\text{异牡荆苷/}}$ | $f_{\text{牡荆苷-2''-O-}}$ |
|-------|-------------------|-------------------|--------------------|--------------------------|-------------------|--------------------|-------------------------|
|       | 异荛草苷              | 异荛草苷              | 异荛草苷               | 鼠李糖苷/异荛草苷                | 异荛草苷              | 异荛草苷               | 李糖苷/异荛草苷                |
| 1     | 2.757             | 2.613             | 1.000              | 2.384                    | 1.473             | 1.538              | 2.166                   |
| 2     | 2.757             | 2.613             | 1.000              | 2.384                    | 1.473             | 1.538              | 2.166                   |
| 3     | 2.78              | 2.617             | 1.000              | 2.383                    | 1.477             | 1.542              | 2.181                   |
| 4     | 2.755             | 2.613             | 1.000              | 2.383                    | 1.472             | 1.538              | 2.168                   |
| 5     | 2.779             | 2.617             | 1.000              | 2.383                    | 1.476             | 1.542              | 2.181                   |
| 6     | 2.808             | 2.621             | 1.000              | 2.382                    | 1.482             | 1.549              | 2.204                   |
| 均值    | 2.772             | 2.616             | 1.000              | 2.383                    | 1.476             | 1.541              | 2.178                   |
| RSD/% | 0.76              | 0.12              | 0.00               | 0.03                     | 0.25              | 0.28               | 0.68                    |

2.4.5 相对校正因子重现性考察

2.4.5.1 不同进样体积的考察 按相对校正因子测定条件和方法, 取“2.4.1”项下方法制备的混合对照品溶液, 分别进样 1, 2, 4, 8, 10, 15, 20, 25  $\mu\text{L}$ , 测定  $f_{\text{绿原酸/异荛草苷}}$ 、 $f_{\text{荛草苷/异荛草苷}}$ 、 $f_{\text{异荛草苷/异荛草苷}}$ 、 $f_{\text{异荛草苷-2''-O-鼠李糖苷/异荛草苷}}$ 、 $f_{\text{牡荆苷/异荛草苷}}$ 、 $f_{\text{异牡荆苷/异荛草苷}}$ 、 $f_{\text{牡荆苷-2''-O-鼠李糖苷/异荛草苷}}$ , 并计算各相对校正因子  $\text{RSD} \leq 0.78\%$ , 表明进样体积对各组分相对校正因子无显著影响。

2.4.5.2 不同流速的考察 考察 0.6, 0.8, 1.0, 1.2  $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$  流速对  $f_{\text{绿原酸/异荛草苷}}$ 、 $f_{\text{荛草苷/异荛草苷}}$ 、 $f_{\text{异荛草苷/异荛草苷}}$ 、 $f_{\text{异荛草苷-2''-O-鼠李糖苷/异荛草苷}}$ 、 $f_{\text{牡荆苷/异荛草苷}}$ 、 $f_{\text{异牡荆苷/异荛草苷}}$ 、 $f_{\text{牡荆苷-2''-O-鼠李糖苷/异荛草苷}}$  的影响, 结果各相对校正因子 RSD 分别为 2.67%, 3.45%, 2.18%, 1.06%, 1.93%, 2.35%, 1.18%, 表明流速对各组分相对校正因子无显著影响。

2.4.5.3 不同柱温的考察 考察 25, 30, 35, 40  $^{\circ}\text{C}$  柱温对各相对校正因子的影响, 结果  $f_{\text{绿原酸/异荛草苷}}$ 、 $f_{\text{荛草苷/异荛草苷}}$ 、 $f_{\text{异荛草苷/异荛草苷}}$ 、 $f_{\text{异荛草苷-2''-O-鼠李糖苷/异荛草苷}}$ 、 $f_{\text{牡荆苷/异荛草苷}}$ 、 $f_{\text{异牡荆苷/异荛草苷}}$ 、 $f_{\text{牡荆苷-2''-O-鼠李糖苷/异荛草苷}}$  的 RSD 分别为 1.21%, 0.89%, 2.21%, 1.35%, 2.25%, 1.16%, 2.54%, 表明柱温对各组分相对校正因子无显著影响。

2.4.5.4 高效液相色谱仪及色谱柱的考察 按相对校正因子测定条件和方法, 在 2 种高效液相色谱系统(SHIMADU LC-20A、Waters 2695-2998 PDA)和 3 种色谱柱[250-4 Lichrocart C<sub>18</sub>(250 mm×4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ )、Dima Diamonsil C<sub>18</sub>(250 mm×4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ )、Elite C<sub>18</sub>(250 mm×4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ )]上测定, 结果各相对校正因子  $\text{RSD} \leq 2.12\%$ , 说明各相对校正因子在不同仪器及色谱柱下的耐用性较好。

2.4.5.5 不同实验室的考察 建立的一测多评法在 3 个不同实验室进行, 采用 250-4 Lichrocart C<sub>18</sub>(250 mm×4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ), 结果显示 3 个不同实验室测得的各相对校正因子 RSD 分别为 1.10%, 1.21%, 1.38%, 2.73%, 0.95%, 1.87%, 3.06%。

2.4.6 待测组分色谱峰的定位 考察不同色谱仪器上采用不同色谱柱以及不同流动相比比例[流动相为甲醇(A)-0.5%甲酸水(B)(比例 1: 0~15 min 17%A; 15~20 min, 17%→23%A; 20~26 min, 23%→31.5%A; 26~29 min, 31.5%A; 29~35 min, 31.5%→38%A; 35~51 min, 38%→17%A; 51~55 min, 17%A。比例 2: 0~15 min, 19%A; 15~20 min, 19%→25%A; 20~26 min, 25%→33.5%A; 26~29 min, 33.5%A; 29~35 min, 33.5%→40%A; 35~51 min, 40%→19%A; 51~55 min, 19%A。比例 3: 0~15 min, 21%A; 15~20 min, 21%→27%A; 20~26 min, 27%→35.5%A; 26~29 min, 35.5%A; 29~35 min, 35.5%→42%A; 35~51 min, 42%→21%A; 51~55 min, 21%A)。因待测组分的保留时间会有所波动, 利用相对保留值( $R_{k/s}$ )辅助判断,  $R_{k/s} = t_{r(k)}/t_{r(s)}$ 。由内参物

的保留时间  $t_{R(s)}$ 与待测组分的相对保留时间  $R_{k/s}$ , 求出待测组分的保留时间  $t_{R(k)}$ (峰位置)。

结果测得绿原酸、荭草苷、异荭草苷、异荭草苷-2'-*O*-鼠李糖苷、牡荆苷、异牡荆苷、牡荆苷-2''-*O*-鼠李糖苷  $R_{k/s}$  分别为 3.260, 1.063, 1.000, 0.980, 0.926, 0.861, 0.830。RSD≤3.13%, 表明选择相对保留时间进行峰的定位是可行的。结果见表 3。

**2.4.7 一测多评法与外标法结果比较** 采用 SPSS 20.0 软件, 分别将一测多评法计算的 3 批 THAA 中绿原酸、荭草苷、异荭草苷、异荭草苷-2'-*O*-鼠李糖苷、牡荆苷、异牡荆苷、牡荆苷-2''-*O*-鼠李糖苷的含量与外标法测定结果比较, 利用 Pearson 相关系数进行结果评价, 判别一测多评法用于 THAA 中 7 个效应组分同步含量测定结果的准确性与差异性。结果表明相关系数分别为 0.999 8, 0.998 9, 1.000 0, 1.000 0, 1.000 0, 0.997 8, 1.000 0,  $P$  值均为 0。提示采用一测多评法同步测定 THAA 中 7 个抗炎药效成分含量与外标法分别测定的含量结果呈正向直线, 2 种方

法测定的 7 个效应组分含量结果无显著性差异; 一测多评 HPLC 可用于同步测定 THAA 7 个效应组分含量。结果见表 4。

### 3 讨论

三叶青在民间已有较长的药用历史, 以块根或全草入药。近年来, 三叶青块根因其在抗肿瘤、保肝和免疫调节上的突出作用被大量使用; 同时, 三叶青地上部分煎煮液因其抗炎效果良好也被广泛用于辅助抗肿瘤治疗。课题组研究证实, 三叶青地上部分提取物具有良好的抗炎镇痛作用<sup>[8]</sup>, 提取物总黄酮含量>60%, 其制备工艺已获发明专利授权。实验在前期研究的基础上, 建立了薄层色谱法鉴别 THAA、比色法测定其总黄酮含量以及 HPLC 一测多评法同步测定 THAA 7 个效应组分含量, 旨在为 THAA 提供整体及多组分群的质量控制分析方法。

中药有效部位提取物是在中医理论指导下用药的中药, 具有多组分、多靶点、多途径协同作用的效果。因此, 利用薄层色谱法具备直观分离

表 3 一测多评不同因素对相对校正因子的影响结果

Tab. 3 Effect of various factors on relative correction factor by QAMS

| 仪器               | 色谱柱/流动相                        | $R_{A/s}$ | $R_{B/s}$ | $R_{C/s}$ | $R_{D/s}$ | $R_{E/s}$ | $R_{F/s}$ | $R_{G/s}$ |
|------------------|--------------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| SHIMAUZU LC-20A  | Lichrocart C <sub>18</sub>     | 3.266     | 1.143     | 1.000     | 0.977     | 0.942     | 0.841     | 0.789     |
|                  | Dima Diamonsil C <sub>18</sub> | 3.268     | 1.059     | 1.000     | 0.982     | 0.904     | 0.863     | 0.834     |
|                  | Elite C <sub>18</sub>          | 3.166     | 1.058     | 1.000     | 0.982     | 0.941     | 0.863     | 0.835     |
| 岛津 LC-20A        | Lichrocart C <sub>18</sub>     | 3.270     | 1.059     | 1.000     | 0.983     | 0.873     | 0.864     | 0.827     |
|                  | Dima Diamonsil C <sub>18</sub> | 3.277     | 1.045     | 1.000     | 0.982     | 0.943     | 0.862     | 0.835     |
|                  | Elite C <sub>18</sub>          | 3.272     | 1.059     | 1.000     | 0.967     | 0.941     | 0.854     | 0.835     |
| Waters 2695-2998 | Lichrocart C <sub>18</sub>     | 3.264     | 1.042     | 1.000     | 0.981     | 0.943     | 0.864     | 0.835     |
|                  | Dima Diamonsil C <sub>18</sub> | 3.271     | 1.058     | 1.000     | 0.982     | 0.941     | 0.863     | 0.835     |
|                  | Elite C <sub>18</sub>          | 3.266     | 1.059     | 1.000     | 0.981     | 0.942     | 0.864     | 0.834     |
| Waters 2695-2998 | 流动相比例 1                        | 3.265     | 1.060     | 1.000     | 0.981     | 0.864     | 0.863     | 0.835     |
|                  | 流动相比例 2                        | 3.265     | 1.059     | 1.000     | 0.976     | 0.939     | 0.863     | 0.834     |
|                  | 流动相比例 3                        | 3.266     | 1.059     | 1.000     | 0.982     | 0.940     | 0.863     | 0.835     |
| 平均值              |                                | 3.260     | 1.063     | 1.000     | 0.980     | 0.926     | 0.861     | 0.830     |
| RSD/%            |                                | 0.92      | 2.42      | 0.00      | 0.46      | 3.13      | 0.78      | 1.57      |

表 4 一测多评法(QAMS)与外标法(ESM)同步测定 THAA 中 7 个效应组分含量

Tab. 4 Results of 7 components content determination in QAMS and ESM

| 项目 | 取样量/mg | 绿原酸   |       | 荭草苷  |      | 异荭草苷 |      | 异荭草苷-2'- <i>O</i> -鼠李糖苷 |       | 牡荆苷  |      | 异牡荆苷 |      | 牡荆苷-2''- <i>O</i> -鼠李糖苷 |      |
|----|--------|-------|-------|------|------|------|------|-------------------------|-------|------|------|------|------|-------------------------|------|
|    |        | ESM   | QAMS  | ESM  | QAMS | ESM  | QAMS | ESM                     | QAMS  | ESM  | QAMS | ESM  | QAMS | ESM                     | QAMS |
| 1  | 10.83  | 21.59 | 21.71 | 8.17 | 8.18 | 6.50 | 6.50 | 19.27                   | 19.27 | 2.26 | 2.26 | 1.59 | 1.59 | 3.98                    | 4.00 |
|    | 10.83  | 21.59 | 21.71 | 8.17 | 8.18 | 6.50 | 6.50 | 19.27                   | 19.27 | 2.26 | 2.26 | 1.59 | 1.59 | 3.98                    | 4.00 |
|    | 9.83   | 21.49 | 21.42 | 8.04 | 8.04 | 6.57 | 6.57 | 19.41                   | 19.41 | 2.29 | 2.29 | 1.59 | 1.59 | 4.02                    | 4.01 |
| 2  | 10.86  | 21.66 | 21.80 | 8.15 | 8.15 | 6.62 | 6.62 | 19.14                   | 19.14 | 2.28 | 2.28 | 1.58 | 1.59 | 3.94                    | 3.96 |
|    | 9.86   | 21.53 | 21.48 | 8.03 | 8.03 | 6.61 | 6.61 | 19.43                   | 19.43 | 2.30 | 2.30 | 1.60 | 1.60 | 4.01                    | 4.00 |
|    | 9.26   | 21.57 | 21.29 | 8.05 | 8.03 | 6.71 | 6.71 | 19.23                   | 19.24 | 2.31 | 2.30 | 1.57 | 1.57 | 4.00                    | 3.95 |
| 3  | 9.71   | 21.99 | 21.96 | 8.10 | 8.10 | 6.62 | 6.62 | 19.80                   | 19.80 | 2.29 | 2.29 | 1.57 | 1.57 | 4.00                    | 3.99 |
|    | 10.95  | 21.73 | 21.02 | 8.04 | 8.00 | 6.65 | 6.65 | 19.83                   | 19.85 | 2.32 | 2.29 | 1.60 | 1.58 | 4.08                    | 3.95 |
|    | 9.28   | 21.74 | 21.27 | 7.96 | 7.93 | 6.56 | 6.56 | 19.51                   | 19.52 | 2.27 | 2.25 | 1.59 | 1.57 | 4.04                    | 3.96 |

分析多组分的特点,建立薄层色谱法鉴别 THAA。THAA 效应组分群主要为黄酮类成分,多含酚羟基或羧基,故实验选择聚酰胺为固定相;展开剂曾比较筛选了 36%乙酸、正丁醇-乙醇-水、正丁醇-乙醇-乙酸、乙醇-乙酸-水、氯仿-乙酸乙酯-甲醇-甲酸、氯仿-丙酮-乙醇-36%乙酸等系统,结果显示以氯仿-丙酮-乙醇-36%乙酸(4:2:3.6:2)作为展开剂系统时,分离效果最佳,斑点集中,故选择该条件用于 THAA 的聚酰胺薄层鉴别。TLC 鉴别结果表明,THAA 药效组分群在前期优化的工艺下制备的提取物效应组分群基本组成均一稳定;与三叶青地上部分药材相比,THAA 药效组分群得到了有效的富集,并保留了原有的药效组分群。

研究表明,THAA 需在 50%甲醇超声后溶解,故以 50%甲醇为溶剂;供试品溶液紫外吸收光谱在 270, 325 nm 处有明显的吸收峰,但以 UV 直接测定方法回收率误差较大,经比较选择硝酸铝比色法测定 THAA 总黄酮含量;同时选择提取物中含量较大的异荛草苷-2'-O-鼠李糖苷作为指标性成分,经  $\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3\text{-NaOH}$  显色后,THAA、异荛草苷-2'-O-鼠李糖苷在 500 nm 处均有最大吸收;经方法学考察含量测定结果准确稳定。3 批 THAA 总黄酮平均含量以异荛草苷-2'-O-鼠李糖苷计在 60.02%~60.32%。耐用性试验考察结果表明,THAA 经  $\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3\text{-NaOH}$  显色后,15 min 内吸光度值较稳定,故建议宜在显色后 15 min 内完成 THAA 总黄酮含量测定。

HPLC 预试验结果表明,THAA 在 350 nm 波长下,各组分色谱峰面积最大,故选择 350 nm 为检测波长。实验曾比较了多种不同比例的流动相,如甲醇-0.1%磷酸水溶液、甲醇-0.2%磷酸水溶液、甲醇-0.5%磷酸水溶液、甲醇-0.1%甲酸水溶液、甲醇-0.5%甲酸水溶液、乙腈-0.1%甲酸水溶液等。结果表明,采用 250-4 Lichrocart C<sub>18</sub> 色谱柱,甲醇-0.5%甲酸水为流动相梯度洗脱,柱温为 40 °C 时,THAA 中各效应组分绿原酸、荛草苷、异荛草苷、异荛草苷-2'-O-鼠李糖苷、牡荆苷、异牡荆苷、牡荆苷-2''-O-鼠李糖苷的色谱峰稳定且均达到基线分离。

由于 THAA 效应组分群 7 个组分对照品价格较高且不易获得,故研究建立了同步测定 THAA 效应组分绿原酸、荛草苷、异荛草苷、异荛草苷-2'-O-鼠李糖苷、牡荆苷、异牡荆苷、牡荆苷-2''-O-鼠李糖苷含量的 HPLC 一测多评法。选择含量较

高且相对易获得的对照品荛草苷、异荛草苷,比较以它们分别作为内参物时一测多评法与 HPLC 外标法的含量测定结果。实验结果表明,以异荛草苷作为内参物时,2 种方法测定的 7 个组分含量结果无显著性差异,故确定其 HPLC 一测多评法采用异荛草苷作为内参物。研究建立的同时测定 THAA 效应组分群 7 个效应组分含量的 HPLC 一测多评法,为 THAA 提供了多组分、多指标同步定量控制质量的简便、易行的含量测定方法。

为了验证所建立的 THAA 7 种效应组分 HPLC 一测多评法的适用性及准确性,对相对校正因子进行了重现性考察,考察不同进样体积、不同流速、不同柱温的影响,以及不同品牌液相色谱仪、不同色谱柱及不同流动相比比例的影响。结果表明,以异荛草苷为内参物时,各效应组分的相对校正因子均具有良好的重现性;而选用荛草苷为内参物时,各个组分的相对校正因子重现性较差,故 THAA 采用 HPLC 一测多评法含量测定时内参物定位异荛草苷。

## REFERENCES

- [1] 福建省食品药品监督管理局. 福建省中药饮片炮制规范: 2012 年版[M]. 福州: 福建科学技术出版社, 2013: 10-11.
- [2] 浙江省食品药品监督管理局. 浙江省中药炮制规范 2005 年版[M]. 杭州: 浙江科学技术出版社, 2006.
- [3] 汪文涛, 李文莉, 湖南省食品药品监督管理局. 湖南省中药饮片炮制规范: 2010 年版[M]. 长沙: 湖南科学技术出版社, 2010: 358-359.
- [4] CAI W W, CHEN D, FAN S M, et al. Research review on chemical components and pharmacological effects of *tetragymna hemsleyana* [J]. *Tianjin Pharm*(天津药学), 2014, 26(1): 38-41.
- [5] CHEN S P, LUO M X, MA L, et al. Ethylacetate extract from *Tetragymna hemsleyana* inhibits proliferation and induces apoptosis in HepG2 and SMMC-7721 cells [J]. *Cancer Manag Res*, 2018, 10: 3793-3799.
- [6] WANG C Y, JANG H, HAN Y K, et al. Alkaloids from *Tetragymna hemsleyana* and their anti-inflammatory effects on LPS-induced RAW264.7 cells [J]. *Molecules*, 2018, 23(6): 1445.
- [7] 陈丹, 蔡伟炜, 范世明. 三叶青地上部分总黄酮的提纯方法: CN104435401A[P]. 2015-03-25.
- [8] LIAO S B, CAI W W, CHEN D, et al. Anti-inflammatory and analgesic effects of the extracts of *tetragymna hemsleyana*'s aerial parts from Fujian *in vivo* [J]. *Chin J Mod Appl Pharm*(中国现代应用药学), 2017, 34(3): 319-324.
- [9] ZENG L J, CHEN D, ZHENG L, et al. Study on quality standard of *Dai Dai* flavone extracts [J]. *Drug Standards China*(中国药品标准), 2013, 14(5): 337-341.

收稿日期: 2019-12-28

(本文责编: 蔡珊珊)