

## UPLC 法同时测定香椿芽中 8 种黄酮醇苷

葛重宇<sup>1</sup>, 林玲<sup>2</sup>, 顾芹英<sup>2</sup>, 李楠<sup>3</sup>, 杨欢<sup>2\*</sup>, 贾晓斌<sup>2,4\*</sup>

(1. 无锡市第三人民医院药学部, 江苏无锡 214000; 2. 江苏大学药学院, 江苏镇江 212013; 3. 镇江市药品检验所, 江苏镇江 212050; 4. 江苏省中医药研究院, 江苏南京 210028)

**摘要:** 目的 建立 UPLC 法同时测定香椿 *Toona sinensis* Roemer 芽中芸香苷、杨梅苷、金丝桃苷、异槲皮苷、番石榴苷、紫云英苷、槲皮苷、阿福豆苷的含有量。方法 香椿芽 60% 甲醇提取液的分析采用 Waters XBridge Shield RP18 色谱柱 (2.1 mm × 150 mm, 1.7 μm); 以乙腈-水为流动相, 梯度洗脱; 体积流量 0.35 mL/min; 检测波长 350 nm; 柱温 35 °C。结果 8 种黄酮醇苷在各自范围内线性关系良好 ( $r \geq 0.999 2$ ), 平均加样回收率 98.3% ~ 103.5%, RSD 0.46% ~ 3.36%。结论 该方法准确稳定, 重复性好, 可用于香椿芽的质量控制。

**关键词:** 香椿; 芽; 黄酮醇苷; UPLC

中图分类号: R284.1

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2017)09-1873-04

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2017.09.023

## Simultaneous determination of eight flavonol glycosides in *Toona sinensis* shoots by UPLC

GE Chong-yu<sup>1</sup>, LIN Ling<sup>2</sup>, GU Qin-ying<sup>2</sup>, LI Nan<sup>3</sup>, YANG Huan<sup>2\*</sup>, JIA Xiao-bin<sup>2,4\*</sup>

(1. Department of Pharmacy, The Third People's Hospital of Wuxi City, Wuxi 214000, China; 2. School of Pharmacy, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China; 3. Zhenjiang Municipal Institute for Drug Control, Zhenjiang 212050, China; 4. Jiangsu Provincial Academy of Chinese Medicine, Nanjing 210028, China)

**ABSTRACT: AIM** To establish a UPLC method for the simultaneous content determination of glycosides, rutin, myricitrin, hyperoside, isoquercitrin, gallic acid, astragaloside, quercitrin and afzelin in the shoots of *Toona sinensis* Roemer. **METHODS** The analysis of 60% methanol extract of *T. sinensis* shoots was performed on a 35 °C thermostatic Waters XBridge Shield RP18 column (2.1 mm × 150 mm, 1.7 μm), with the mobile phase comprising of acetonitrile-water flowing at 0.35 mL/min in a gradient elution manner, and the detection wavelength was set at 350 nm. **RESULTS** Eight flavonol glycosides showed good linear relationships within their own ranges ( $r \geq 0.999 2$ ), whose average recoveries were 98.3% - 103.5% with the RSDs of 0.46% - 3.36%. **CONCLUSION** This accurate, stable and reproducible method can be used for the quality control of *T. sinensis* shoots.

**KEY WORDS:** *Toona sinensis* Roemer; shoots; flavonol glycosides; UPLC

香椿 *Toona sinensis* Roemer 为楝科香椿属乔木, 因嫩叶具有特殊的芳香性气味而得名, 为我国常见树种, 主要分布于山东、安徽、河南、河北、江苏及四川等地<sup>[1-2]</sup>。香椿芽为香椿的嫩叶, 常于清明

至谷雨时节采收, 既是人民喜爱的传统蔬菜, 又是一味传统中药, 《本草纲目》中记载“嫩芽月食, 消风祛毒”, 其味苦、性温、无毒, 具有清热收敛、消炎解毒、去燥湿等功效, 临床上常用于治疗

收稿日期: 2016-12-19

基金项目: 国家自然科学基金 (81303313); 江苏省自然科学基金 (BK20150463); 江苏省“六大人才高峰”项目 (YY-010); 江苏省药学会-奥赛康医院药学基金 (A201619); 江苏大学学生科研立项 (14A145)

作者简介: 葛重宇 (1980—), 男, 硕士生, 主管药师, 研究方向为中药学。Tel: (0510) 82697391, E-mail: 56057702@qq.com

\* 通信作者: 杨欢 (1980—), 男, 副教授, 研究方向为中药化学。Tel: (0511) 88791564, E-mail: yanghuan1980@hotmail.com

贾晓斌 (1966—), 男, 教授, 研究方向为中药物质基础。Tel: (025) 85608672, E-mail: jxiaobin2005@hotmail.com

肠炎、痢疾等疾病<sup>[3]</sup>。近几年来,国内外学者对香椿芽生物活性、药效物质基础和药理机制的研究取得了较为丰硕的成果<sup>[4-9]</sup>,迄今已从中分离得到10个没食子酸类和21个黄酮类化合物,由于它们具有较强的抗氧化作用,被认为是该药材的重要生物活性物质<sup>[10-11]</sup>。

在前期研究中, Yang等<sup>[2,12]</sup>采用LC-MS法鉴别香椿芽中的没食子酸及其衍生物等,姜祖祥等<sup>[13-15]</sup>通过HPLC法测定没食子酸、没食子酸甲酯、芸香苷、山柰酚-3-O- $\alpha$ -L-鼠李糖苷、槲皮素-3-O- $\alpha$ -L-鼠李糖苷的含有量,但对番石榴苷、金丝桃苷、杨梅苷、紫云英苷等黄酮醇苷类活性物质<sup>[16]</sup>尚无定量测定报道。因此,本实验建立UPLC法同时测定芸香苷、杨梅苷、金丝桃苷、异槲皮苷、番石榴苷、紫云英苷、槲皮苷和阿福豆苷8种黄酮醇苷的含有量,以期对香椿芽质量评价提供方法。

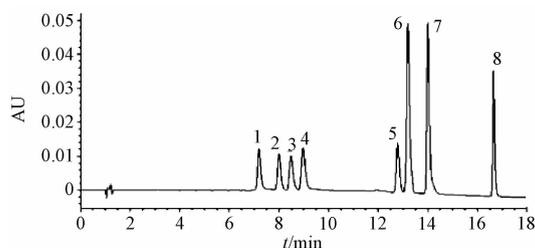
### 1 仪器与材料

Waters Acquity UPLC BEH Shield RP18 色谱柱(2.1 mm  $\times$  150 mm, 1.7  $\mu$ m); AE240 电子分析天平(0.01 mg, 瑞士 Mettler-Toledo 公司)。乙腈为色谱纯(美国 Fisher Scientific 公司); 三氟乙酸为色谱纯(美国 Sigma-Aldrich 公司); 甲醇为分析纯(国药集团上海化学试剂有限公司); 水为超纯水(>18.2 M $\Omega$   $\cdot$  cm, Millipore 公司 Milli-Q Biocel 纯水系统制备)。杨梅苷、金丝桃苷、异槲皮苷、番石榴苷、紫云英苷、槲皮苷、阿福豆苷均为本实验室分离得到; 芸香苷对照品购自中国食品药品检定研究院(批号 100080-200306)。香椿芽于2016年5月采自江苏大学校园内,经江苏大学生药理学研究所陈钧教授鉴定为香椿 *Toona sinensis* Roemer 的叶,新鲜嫩叶置通风阴凉处干燥,粉碎后过40目筛,收集细粉,供分析用。

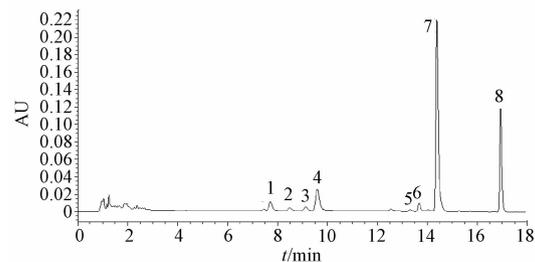
### 2 方法与结果

**2.1 色谱条件** Waters Acquity UPLC BEH Shield RP18 色谱柱(2.1 mm  $\times$  150 mm, 1.7  $\mu$ m); 流动相水(含0.1%三氟乙酸, A)-乙腈(含0.1%三氟乙酸, B), 梯度洗脱(0~10 min, 18%  $\rightarrow$  30% B; 10~17 min, 30% B); 体积流量0.35 mL/min; 检测波长350 nm; 柱温35  $^{\circ}$ C; 进样量5  $\mu$ L。色谱图见图1。

**2.2 对照品贮备液制备** 精密称取对照品芸香苷14.50 mg、杨梅苷1.30 mg、金丝桃苷1.30 mg、异槲皮苷16.85 mg、番石榴苷1.80 mg、紫云英苷4.20 mg、槲皮苷39.55 mg、阿福豆苷23.15 mg,



A. 对照品



B. 供试品

1. 芸香苷 2. 杨梅苷 3. 金丝桃苷 4. 异槲皮苷 5. 番石榴苷  
6. 紫云英苷 7. 槲皮苷 8. 阿福豆苷

1. rutinose 2. myricitrin 3. hyperoside 4. isoquercitrin  
5. guaijaverin 6. astragalol 7. quercitrin 8. afzelin

图1 各黄酮醇苷 UPLC 色谱图

Fig. 1 UPLC chromatograms of various flavonol glycosides

60% 甲醇溶解并定容至250 mL, 即得。

**2.3 供试品溶液制备** 精密称取香椿芽细粉0.250 g, 置入15 mL 具塞玻璃离心管中, 加入60% 甲醇10.0 mL, 密塞, 称定质量, 超声提取30 min, 冷却至室温, 60% 甲醇补足减失的质量, 涡旋15 s, 静置片刻, 上清液以0.22  $\mu$ m 微孔滤膜过滤, 弃去5 mL 初滤液, 收集1 mL 续滤液, 即得。

**2.4 线性关系考察** 将“2.2”项下对照品贮备液进行多次2倍稀释, 得到6份对照品溶液, 在“2.1”项色谱条件下测定。以峰面积为纵坐标(Y), 质量浓度为横坐标(X)进行回归, 结果见表1, 可知各黄酮醇苷在各自范围内线性关系良好。

表1 各黄酮醇苷线性关系

Tab. 1 Linear relationships of various flavonol glycosides

成分	回归方程	r	线性范围/ ( $\mu$ g $\cdot$ mL <sup>-1</sup> )
芸香苷	$Y = 17\ 846\ 994.797\ 5X - 2\ 855.936\ 8$	1.000 0	0.906 ~ 58.0
杨梅苷	$Y = 18\ 181\ 045.830\ 8X - 15.666\ 7$	1.000 0	0.081 3 ~ 5.20
金丝桃苷	$Y = 17\ 510\ 327.840\ 3X + 510.614\ 9$	0.999 9	0.081 3 ~ 5.20
异槲皮苷	$Y = 19\ 544\ 405.769\ 5X - 5\ 127.885\ 1$	1.000 0	1.05 ~ 67.4
番石榴苷	$Y = 16\ 102\ 734.135\ 0X$	1.000 0	0.113 ~ 7.20
紫云英苷	$Y = 23\ 225\ 706.441\ 9X - 1\ 793.712\ 6$	0.999 2	0.263 ~ 16.8
槲皮苷	$Y = 21\ 648\ 729.362\ 0X - 7\ 446.431\ 0$	0.999 2	2.47 ~ 158
阿福豆苷	$Y = 19\ 831\ 426.277\ 6X - 6\ 003.793\ 1$	1.000 0	1.45 ~ 92.6

**2.5 精密度试验** 吸取供试品溶液和对照品贮备液(低、中、高3个质量浓度), 在“2.1”项色

谱条件下测定,连续6次,测得芸香苷、杨梅苷、金丝桃苷、异槲皮苷、番石榴苷、紫云英苷、槲皮苷、阿福豆苷峰面积RSD分别为1.11%、1.07%、0.80%、0.80%、1.26%、0.87%、0.30%、0.43%,表明仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验 按“2.3”项下方法制备供试品溶液,在“2.1”项色谱条件下于2、4、6、8、12、24、36、48 h测定,测得芸香苷、杨梅苷、金丝桃苷、异槲皮苷、番石榴苷、紫云英苷、槲皮苷、阿福豆峰面积RSD分别为0.65%、1.83%、0.58%、0.98%、1.06%、0.62%、0.33%、0.58%,表明供试品溶液在48 h内稳定性良好。

2.7 重复性试验 按“2.3”项下方法平行制备供试品溶液6份,在“2.1”项色谱条件下测定,测得芸香苷、杨梅苷、金丝桃苷、异槲皮苷、番石榴苷、紫云英苷、槲皮苷、阿福豆含有量RSD分别为0.73%、0.98%、1.32%、0.86%、1.62%、0.61%、0.52%、0.85%,表明该方法重复性良好。

2.8 加样回收率试验 精密称取香椿芽粉末9份,每份125.0 mg,加入一定量对照品贮备液,60%甲醇补足至10.0 mL,按“2.3”项下方法制备9份供试品溶液,在“2.1”项色谱条件下测定,计算回收率。结果,芸香苷、杨梅苷、金丝桃苷、异槲皮苷、番石榴苷、紫云英苷、槲皮苷、阿福豆平均加样回收率分别为100.7% (RSD = 2.20%)、100.8% (RSD = 3.14%)、103.5% (RSD = 1.25%)、102.0% (RSD = 1.72%)、101.0% (RSD = 3.36%)、98.3% (RSD = 0.71%)、102.6% (RSD = 0.64%)、103.3% (RSD = 0.46%)。

2.9 样品含有量测定 按“2.3”项下方法制备3份供试品溶液,在“2.1”项色谱条件下测定,结果见表2。

表2 各黄酮醇苷含有量测定结果 (mg/g, n = 3)

Tab. 2 Results of content determination of various flavonol glycosides (mg/g, n = 3)

成分	1	2	3	平均值
芸香苷	0.047	0.047	0.048	0.047
杨梅苷	0.016	0.016	0.016	0.016
金丝桃苷	0.022	0.022	0.022	0.022
异槲皮苷	0.119	0.121	0.124	0.121
番石榴苷	0.007	0.007	0.007	0.007
紫云英苷	0.024	0.024	0.024	0.024
槲皮苷	0.551	0.540	0.551	0.547
阿福豆苷	0.242	0.246	0.246	0.244

### 3 讨论与结论

本实验比较了Acquity UPLC BEH Shield RP18 (2.1 mm × 150 mm, 1.7 μm)、Cortecs UPLC C<sub>18</sub> (2.1 mm × 100 mm, 1.6 μm)、Acquity UPLC BEH C<sub>18</sub> (2.1 mm × 150 mm, 1.7 μm) 色谱柱,发现采用Acquity UPLC BEH Shield RP18 色谱柱时,出峰时间适中,黄酮醇苷色谱峰对称性最好,可实现与其他色谱峰的基线分离 (R > 1.5)。

然后,比较了不同体积分数甲醇(20%、40%、60%)、料液比(1:10、1:20、1:40)、超声时间(15、30、45 min)下的提取效果,发现以60%甲醇为溶剂(料液比1:40),超声提取30 min时,各黄酮醇苷的色谱峰峰面积最大。

综上所述,本实验采用UPLC法同时测定香椿芽中芸香苷、杨梅苷、金丝桃苷、异槲皮苷、番石榴苷、紫云英苷、槲皮苷、阿福豆苷的含有量,该方法操作简便,分析速度快,重复性好,而且所制备样品溶液稳定,可为该药材的质量评价与控制提供可靠的方法。

#### 参考文献:

[1] Hseu Y C, Chang W H, Chen C S, et al. Antioxidant activities of *Toona sinensis* leaves extracts using different antioxidant models[J]. *Food Chem Toxicol*, 2008, 46(1): 105-114.

[2] Yang Y, Wang J, Xing Z E, et al. Identification of phenolics in Chinese toon and analysis of their content changes during storage [J]. *Food Chem*, 2011, 128(4): 831-838.

[3] 王旭波, 顾芹英, 沈玉萍, 等. 香椿的化学成分研究进展 [J]. *南京中医药大学学报*, 2014, 30(4): 396-400.

[4] Lin M J, Chang S C, Jea Y S, et al. *In vitro* antioxidant capability and performance assessment of White Roman goose supplemented with dried *Toona sinensis*[J]. *J Appl Anim Res*, 2016, 44(1): 395-402.

[5] Yang H, Gu Q Y, Xu Y, et al. Comparative study on two antioxidant flavanol-3-O-α-L-rhamnosides in the leaves of *Toona sinensis* (Chinese Toon) from different production sites by HPLC-UV [J]. *J Liq Chromatogr R T*, 2015, 38(6): 687-691.

[6] Hseu Y C, Chen S C, Lin W H, et al. *Toona sinensis* (leaf extracts) inhibit vascular endothelial growth factor (VEGF) -induced angiogenesis in vascular endothelial cells[J]. *J Ethnopharmacol*, 2011, 134(1): 111-121.

[7] Sun J, Li Y Z, Ding Y H, et al. Neuroprotective effects of gallic acid against hypoxia/reoxygenation-induced mitochondrial dysfunctions *in vitro* and cerebral ischemia/reperfusion injury *in vivo*[J]. *Brain Res*, 2014, 1589(1-5): 126-139.

[8] 沈玉萍, 钟雄雄, 余筱洁, 等. 中药香椿叶的化学成分研究[J]. *中国药学杂志*, 2013, 48(1): 22-24.

- [9] Shen Y P, Yin H W, Chen B, *et al.* Validated reversed phase-high performance liquid chromatography-diode array detector method for the quantitation of Rutin, a natural immunostimulant for improving survival in aquaculture practice, in *Toonea sinensis* Folium[J]. *Pharmacogn Mag*, 2012, 8(29): 49-53.
- [10] Wang K J, Yang C R, Zhang Y J. Phenolic antioxidants from Chinese toon (fresh young leaves and shoots of *Toona sinensis*) [J]. *Food Chem*, 2007, 101(1): 365-371.
- [11] Yang H, Gu Q Y, Gao T T, *et al.* Flavonols and derivatives of gallic acid from young leaves of *Toona sinensis* (A. Juss.) Roemer and evaluation of their anti-oxidant capacity by chemical methods[J]. *Pharmacogn Mag*, 2014, 10(38): 382-387.
- [12] Cheng K W, Yang R Y, Tsou S C, *et al.* Analysis of antioxidant activity and antioxidant constituents of Chinese toon[J]. *J Funct Foods*, 2009, 1(3): 253-259.
- [13] 顾芹英, 李慧华, 秦 冬, 等. RP-HPLC 法测定香椿叶中槲皮素-3-O- $\alpha$ -L-鼠李糖苷[J]. *中成药*, 2014, 36(3): 577-579.
- [14] 姜祖祥, 任深圳, 王旭波, 等. HPLC 法测定香椿叶中山柰酚-3-O-鼠李糖苷的含量[J]. *中国药房*, 2013, 24(47): 4467-4469.
- [15] 夏国华, 童馨苇, 丁 妍, 等. 反相高效液相色谱法测定香椿叶中芸香苷的含量[J]. *南京中医药大学学报*, 2011, 27(6): 41-42.
- [16] 孙小祥, 杨娅娅, 盛玉青, 等. 香椿叶中多酚类成分的研究[J]. *中成药*, 2016, 38(9): 1974-1977.

## HPLC 法同时测定艾叶中 7 种成分

吴佳丽<sup>1,2</sup>, 王永丽<sup>1,2\*</sup>, 刘 伟<sup>1,3</sup>, 尉小慧<sup>1</sup>, 俞桂新<sup>1,2\*</sup>

(1. 上海中医药大学中药研究所, 上海 201203; 2. 上海中药标准化研究中心, 上海 201203; 3. 上海中医药大学附属曙光医院, 肝肾疾病病证教育部重点实验室, 肝病研究所, 上海 201203)

**摘要:** 目的 建立 HPLC 法同时测定艾 *Artemisia argyi* Levl. et Vant. 叶中新绿原酸、隐绿原酸、绿原酸、咖啡酸、异绿原酸 B、异绿原酸 A、异绿原酸 C 的含有量。方法 艾叶 50% 甲醇提取液的分析采用 Prevail C<sub>18</sub> 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5  $\mu$ m); 流动相乙腈-水, 梯度洗脱; 体积流量 1.0 mL/min; 检测波长 325 nm; 柱温 30  $^{\circ}$ C。结果 7 种成分在各自范围内线性关系良好 ( $r \geq 0.9995$ ), 平均加样回收率 98.28% ~ 101.11%, RSD 1.04% ~ 2.59%。结论 该方法简便准确, 重复性好, 可用于艾叶的质量控制。

**关键词:** 艾; 叶; 化学成分; HPLC

中图分类号: R284.1

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2017)09-1876-04

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2017.09.024

## Simultaneous determination of seven constituents in *Artemisia argyi* leaves by HPLC

WU Jia-li<sup>1,2</sup>, WANG Yong-li<sup>1,2\*</sup>, LIU Wei<sup>1,3</sup>, WEI Xiao-hui<sup>1</sup>, CHOU Gui-xin<sup>1,2\*</sup>

(1. Institute of Chinese Materia Medica, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China; 2. Shanghai R&D Centre for Standardization of Chinese Medicines, Shanghai 201203, China; 3. Ministry of Education Key Laboratory of Liver and Kidney Diseases, Institute of Liver Diseases, Shuguang Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China)

**ABSTRACT:** AIM To establish an HPLC method for the simultaneous content determination of neochlorogenic acid, cryptochlorogenic acid, chlorogenic acid, caffeic acid, isochlorogenic acid B, isochlorogenic acid A and isoch-

收稿日期: 2016-11-19

基金项目: 上海市教委预算内项目 (2016YSN11); 中医药行业科研专项 (201307002)

作者简介: 吴佳丽 (1993—), 女, 硕士生, 从事中药活性成分与质量标准研究。Tel: (021) 50271706, E-mail: 185858199@qq.com

\* 通信作者: 王永丽 (1987—), 女, 硕士, 助理实验师, 从事中药活性成分与质量标准研究。Tel: (021) 50271706, E-mail: ylwang521@126.com

俞桂新 (1956—), 男, 博士, 研究员, 从事中药活性成分与质量标准研究。Tel: (021) 50271706, E-mail: chouguix-

inzyb@126.com