

UPLC 测定狭山野豌豆中 6 种化学成分的含量

常安¹, 王维宁², 郝延军², 杨燕云¹, 许亮¹, 康廷国^{1*}

(1. 辽宁中医药大学, 辽宁大连 116600; 2. 辽宁省药品检验检测院, 沈阳 110030)

[摘要] 目的:建立超高效液相色谱法(UPLC)同时测定狭山野豌豆中6种成分(绿原酸、杨梅苷、金丝桃苷、异槲皮苷、山柰苷、槲皮苷)的含量测定方法。方法:采用 Eclipse Plus C₁₈ RRHD 色谱柱(2.1 mm × 50 mm, 1.8 μm),以乙腈(B)-0.1% 甲酸溶液(A)为流动相进行梯度洗脱(0~7 min, 5%~10% B; 7~11 min, 10%~12% B; 11~20 min, 12% B; 20~25 min, 12%~19% B; 25~30 min, 19%~24% B),流速 0.2 mL·min⁻¹,检测波长 340 nm,柱温 30 ℃。结果:狭山野豌豆中6个成分在线性范围内呈现良好的线性关系, $r > 0.9999$,回收率均在 99.15%~101.98%,RSD 0.7%~1.7%。结论:该方法操作简便、精确,稳定性重复性好,可用于同时测定狭山野豌豆中6种化学成分的含量,为狭山野豌豆的质量控制提供依据。

[关键词] 狭山野豌豆; 超高效液相色谱法; 绿原酸; 杨梅苷; 金丝桃苷; 异槲皮苷; 山柰苷; 槲皮苷

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)09-0048-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016090048

Simultaneous Determination of Six Compounds in *Vicia amoena* var. *angusta* by UPLC

CHANG An¹, WANG Wei-ning², HAO Yan-jun², YANG Yan-yun¹, XU Liang¹, KANG Ting-guo^{1*}

(1. Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China;

2. Liaoning Institute for Drug Control, Shenyang 110030, China)

[Abstract] **Objective:** To establish an UPLC method for simultaneously determining content of 6 major compounds (chlorogenic acid, myricitrin, hyperoside, isoquercitrin, kaempferitrin, quercitrin) in *Vicia amoena* var. *angusta*. **Method:** An Eclipse Plus C₁₈ RRHD column (2.1 mm × 50 mm, 1.8 μm) was adopted, with acetonitrile (B) -0.1% formic acid aqueous solution (A) as mobile phase for gradient elution (0-7 min, 5%-10% B; 7-11 min, 10%-12% B; 11-20 min, 12% B; 20-25 min, 12%-19% B; 25-30 min, 19%-24% B). The flow rate was 0.2 mL·min⁻¹. The detection wavelength was set at 340 nm and the column temperature was at 30 ℃. **Result:** Six components of *V. amoena* var. *angusta* showed good linear relationship in the linear range ($r > 0.9999$) and the average recoveries were between 99.15% to 101.98% with the RSD of 0.7%-1.7%. **Conclusion:** The developed method is convenient, rapid and accurate with high repeatability and stability, suitable for simultaneously determining contents of 6 compounds in *V. amoena* var. *angusta* and can provide basis for the quality control of *V. amoena* var. *angusta*.

[Key words] *Vicia amoena* var. *angusta*; UPLC; chlorogenic acid; myricitrin; hyperoside; isoquercitrin; kaempferitrin; quercitrin

狭山野豌豆多生于较干燥地,例如固定沙丘、沙地、向阳山坡等。其小叶为延长的长圆形或长圆状

线形、近线形,其余特征与山野豌豆相同^[1]。2010年版《中国药典》一部附录Ⅲ收载其与山野豌豆、毛

[收稿日期] 20151116(007)

[基金项目] 辽宁省十二五规划“辽宁省中药材标准”编写项目

[第一作者] 常安,在读硕士,从事中药鉴定与品质评价, Tel:15140269906, E-mail: changan0225@163.com

[通讯作者] *康廷国,教授,博士生导师,从事中药鉴定与品质评价, Tel:0411-87586018, E-mail: kangtg@lnutcm.edu.cn

山野豌豆、假香野豌豆、广布野豌豆干燥地上部分作为透骨草药用^[2],主要功效祛风除湿、活血止痛,临床上用于湿疼痛、疮疡肿毒等^[3]。野豌豆属植物全草和叶含有多种黄酮类成分^[4-5],现代药理研究表明野豌豆属植物具有抗炎镇痛、抗肿瘤、体外抗真菌活性、有抗氧化、清除自由基、抗疲劳以及抗过敏等作用^[6]。透骨草药材几乎全部依赖野生资源,随着透骨草药材在各地使用情况不一,野生资源也正慢慢受到破坏,同时在辽宁省中药资源普查中发现辽宁地区市场上流通的透骨草药材主要以狭山野豌豆入药居多,但是目前关于狭山野豌豆研究甚少。因此,其化学成分及质量控制具有重要的意义。本课题组通过 UPLC-Q-TOF-MS 对狭山野豌豆化学成分进行定性研究并通过对照品对比确认可知狭山野豌豆中含有绿原酸、杨梅苷、金丝桃苷、异槲皮苷、山柰苷、槲皮苷,因此,本试验采用 UPLC 同时测定狭山野豌豆中 6 种化学成分的含量,为狭山野豌豆质量控制提供科学依据^[7-13]。

1 仪器与试剂

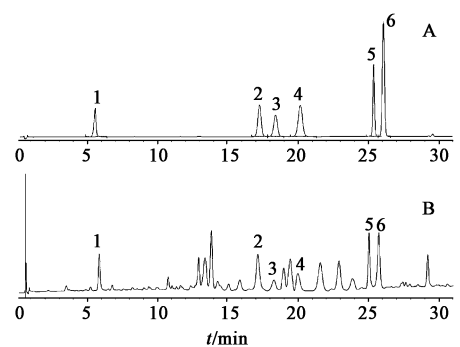
1290 Infinity 系列超高效液相色谱仪(美国安捷伦公司,配备高压二元梯度泵、可控温自动进样器和二极管阵列检测器),ACCULAB ALC-11C 4 型电子天平(德国赛多利斯集团),DFT-200 型粉碎机(温岭市林大机械有限公司),HH-4 型数显恒温水浴锅(上海蓝凯仪器仪表有限公司)。

对照品槲皮苷(批号 111538-200504),金丝桃苷(批号 111521-201406),杨梅苷(批号 111860-201102),绿原酸(批号 110753-201314),异槲皮苷(批号 111809-201403),山柰苷(批号 111775-200701)均购于中国食品药品检定研究院。乙腈、甲酸为色谱纯,纯净水(杭州娃哈哈集团有限公司),其他试剂均为分析纯。狭山野豌豆 10 批样品均采自不同产地,经辽宁省药品检验检测院中药室主任药师王维宁鉴定为狭山野豌豆 *Vicia amoena* var. *angusta* 的干燥地上部分,样品标本保留在辽宁省药品检验检测院。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Eclipse Plus C₁₈ RRHD 色谱柱(2.1 mm × 50 mm, 1.8 μm),流动相乙腈(B)-0.1% 甲酸溶液(A)梯度洗脱(0 ~ 7 min, 5% ~ 10% B; 7 ~ 11 min, 10% ~ 12% B; 11 ~ 20 min, 12% B; 20 ~ 25 min, 12% ~ 19% B; 25 ~ 30 min, 19% ~ 24% B),柱温 30 °C,检测波长 340 nm,流速 0.2 mL·min⁻¹,进样量 2 μL。见图 1。上述色谱条件下,样品各色

谱峰保留时间适中,样品中各组分的色谱峰分离度良好。



A. 混合对照品; B. 供试品; 1. 绿原酸; 2. 杨梅苷; 3. 金丝桃苷; 4. 异槲皮苷; 5. 山柰苷; 6. 槲皮苷

图 1 狭山野豌豆 UPLC 色谱

Fig. 1 Chromatograms of sample from *Vicia amoena* var. *angusta*

2.2 对照品溶液制备 精密称定对照品绿原酸、杨梅苷、金丝桃苷、异槲皮苷、山柰苷、槲皮苷适量,加入甲醇分别制备含 0.024, 0.052, 0.033, 0.062, 0.075, 0.114 mg·L⁻¹ 的混合对照品溶液,摇匀,备用。

2.3 供试品溶液制备 取样品粉末(过 40 目筛),精密称定 1 g,加入 70% 甲醇 80 mL,回流 2 h,提取液蒸干,残渣加 70% 甲醇溶解,定容至 10 mL 量瓶中,摇匀,过 0.22 μm 微孔滤膜,得供试品溶液。

2.4 标准曲线绘制 精密吸取 2.2 项下混合对照品溶液,用 70% 甲醇稀释配制系列梯度浓度的对照品混合溶液,依法测定峰面积,以对照品的峰面积(Y)对相应的浓度(X)进行线性回归,得回归方程、相关系数及线性范围,结果见表 1。

表 1 6 种主要成分的线性方程、相关系数、线性范围

Table 1 Linear equations, correlation coefficients, linear ranges of six constituents

成分	标准曲线	线性范围 /μg·L ⁻¹
绿原酸	$Y = 12\ 337X - 1.333$	0.012 ~ 0.144
杨梅苷	$Y = 9\ 042.8X + 1.081$	0.026 ~ 0.312
金丝桃苷	$Y = 10\ 759X - 5.594\ 3$	0.017 ~ 0.198
异槲皮苷	$Y = 9\ 656.1X - 12.611$	0.031 ~ 0.372
山柰苷	$Y = 7\ 328.20X - 4.253$	0.038 ~ 0.451
槲皮苷	$Y = 9\ 713.4X - 10.344$	0.057 ~ 0.684

注:r 均为 0.999 9。

2.5 精密度试验 取同一供试品溶液 S1(朝阳县木头城子)2 μL,重复进样 6 次,测定各组分的峰面积值,计算得绿原酸、杨梅苷、金丝桃苷、异槲皮苷、

山柰苷、槲皮苷 RSD 分别为 0.2% , 0.5% , 1.0% , 0.4% , 1.8% , 0.8% 。显示仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验 取同一供试品溶液 S1 (朝阳区木头城子) 分别于 0, 4, 8, 12, 24, 48 h 进样 2 μL , 记录峰面积。结果绿原酸、杨梅苷、金丝桃苷、异槲皮苷、山柰苷、槲皮苷峰面积的 RSD 分别为 1.2% , 2.1% , 1.7% , 1.9% , 1.6% , 1.7% , 表明狭山野豌豆供试品溶液在 48 h 内稳定性良好。

2.7 重复性试验 取同一供试品 S1 (朝阳区木头城子) 约 1 g , 共 6 份 , 精密称定 , 按 2.3 项下方法平

行操作 , 制备 6 份供试液 , 按 2.1 项下方法测定 , 结果绿原酸、杨梅苷、金丝桃苷、异槲皮苷、山柰苷、槲皮苷的平均质量分数分别为 0.49% , 1.37% , 0.33% , 0.66% , 1.39% , 1.43% , RSD 分别为 1.0% , 1.3% , 1.5% , 0.9% , 1.1% , 1.6% , 表明该方法重复性良好。

2.8 加样回收率试验 取同一供试品 S1 (朝阳区木头城子) 6 份 , 每份约 0.5 g , 精密称定 , 分别精密加入混合对照品溶液适量 , 按 2.3 项下方法制备供试溶液并依法测定 , 计算加样回收率 , 结果见表 2。

表 2 狭山野豌豆中 6 个化学成分加样回收率试验数据

Table 2 Recovery data for six constituents in *Vicia amoena* var. *angusta*

成分	样品中量 / μg	加入量 / μg	测得量 / μg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%	成分	样品中量 / μg	加入量 / μg	测得量 / μg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
绿原酸	0.245	0.249	0.498	101.61	101.98	0.7	异槲皮苷	0.357	0.351	0.707	101.48	99.97	0.9
	0.250	0.247	0.504	103.02				0.347	0.349	0.701	98.89		
	0.259	0.257	0.520	101.48				0.357	0.355	0.708	99.33		
	0.258	0.242	0.506	102.10				0.359	0.360	0.717	100.17		
	0.248	0.245	0.499	102.54				0.355	0.350	0.706	100.16		
	0.256	0.257	0.516	101.14				0.361	0.362	0.724	99.77		
杨梅苷	0.679	0.667	1.332	97.90	99.15	1.7	山柰苷	0.765	0.752	1.524	100.93	100.59	1.0
	0.623	0.611	1.220	97.75				0.838	0.821	1.668	101.22		
	0.627	0.619	1.258	101.95				0.773	0.783	1.545	98.72		
	0.62	0.622	1.242	100.02				0.785	0.772	1.568	101.29		
	0.669	0.661	1.316	97.90				0.833	0.818	1.653	100.24		
	0.650	0.656	1.302	99.38				0.817	0.802	1.628	101.12		
金丝桃苷	0.167	0.167	0.333	99.54	101.16	1.3	槲皮苷	0.725	0.712	1.445	101.15	100.67	0.8
	0.170	0.163	0.338	103.00				0.757	0.752	1.508	99.81		
	0.174	0.171	0.348	101.40				0.747	0.736	1.494	101.52		
	0.170	0.165	0.339	102.27				0.749	0.735	1.494	101.42		
	0.173	0.170	0.343	100.29				0.760	0.751	1.509	99.66		
	0.171	0.169	0.340	99.77				0.754	0.745	1.502	100.44		

2.9 样品测定 分别取狭山野豌豆 10 批样品 , 按 2.3 项下方法分别制备供试品溶液 , 按 2.1 项下色谱条件分别平行测定 3 份 , 计算样品含量 , 结果见表 3。

3 讨论

3.1 提取条件考察 本试验对提取溶剂 (60% , 70% , 75% , 80% 甲醇) , 溶剂用量 (60, 70, 80, 100 mL) , 提取时间 (1, 1.5, 2, 2.5 h) 和提取方法 (回流法、超声法、索式提取法) 进行考察 , 结果发现 , 试验采用 70% 甲醇 80 mL , 回流 2 h 的为最佳提

取方法。

3.2 色谱条件选择 本试验选择了甲醇-水、甲醇-0.1% 甲酸溶液、乙腈-水及乙腈-0.1% 甲酸溶液为流动相梯度洗脱 , 各色谱峰的峰形和分离度为最佳。

3.3 结果分析 对 10 批狭山野豌豆进行含量测定 , 由表 3 可知绿原酸、杨梅苷、金丝桃苷、异槲皮苷、山柰苷、槲皮苷的质量分数分别为 0.39 ~ 1.03, 0.28 ~ 1.67, 0.2 ~ 1.93, 0.4 ~ 3.17, 0.43 ~ 2.6, 0.62 ~ 5.77 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$, 狭山野豌豆中 6 种化学成分总含量由高到低依次为槲皮苷 (23.94 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$) > 山柰

表 3 狭山野豌豆中 6 个成分的含量测定 (n=3)

Table 3 Contents of six constituents in samples of *Vicia amoena* var. *angusta* (n=3)

No.	来源	mg·g ⁻¹					
		绿原酸	杨梅苷	金丝桃苷	异槲皮苷	山柰苷	槲皮苷
S1	辽宁朝阳县	0.49	1.37	0.33	0.66	1.39	1.43
S2	辽宁建平县	0.42	1.20	0.52	1.10	3.44	5.77
S3	辽宁大连市	0.53	0.28	0.20	0.48	0.46	0.62
S4	辽宁鲅鱼圈	0.39	0.33	0.23	0.40	0.49	0.63
S5	辽宁大石桥	1.03	0.36	1.35	1.70	0.43	1.09
S6	辽宁千山景区	0.67	1.67	1.93	3.17	2.19	4.52
S7	辽宁辽阳县	0.47	1.11	0.47	0.80	2.60	2.37
S8	辽宁岫岩县	0.44	1.25	0.40	0.80	2.25	3.28
S9	辽宁抚顺县	0.59	1.53	1.18	1.92	1.85	3.00
S10	辽宁新宾县	0.77	0.61	0.84	1.17	0.73	1.23

苷 (15.84 mg·g⁻¹) > 异槲皮苷 (12.18 mg·g⁻¹) > 杨梅苷 (9.72 mg·g⁻¹) > 金丝桃苷 (7.46 mg·g⁻¹) > 绿原酸 (5.79 mg·g⁻¹)。研究表明 10 批不同产地狭山野豌豆 6 中化学成分含量存在差异,不同的产地、生态环境及采收时间对狭山野豌豆含量的影响较大。因此,本试验对狭山野豌豆中 6 种化学成分进行含量测定研究,为狭山野豌豆的质量控制提供依据,以保证药材的质量。

[参考文献]

[1] 中国科学院《中国植物志》杂志编辑委员会. 中国植物志. 第 42 卷[M]. 北京:科学出版社,1959:245-246. 1995:238.

[2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北

京:中国医药科技出版社,2010:附录 25.

[3] 中国医学科学院药物研究所,北京医学院药理学系. 中药志. 第 1 册[M]. 北京:人民卫生出版社,1961:576.

[4] 魏锋,阎文玫. 山野豌豆黄酮类化学成分的研究[J]. 药学学报,1997,32(10):765-768.

[5] 鞠爱华,郭晓凤. 山野豌豆和大叶野豌豆中总黄酮的含量测定[J]. 中药材,1988,11(6):33-34.

[6] 孙探,高昂,巩江,等. 野豌豆属植物药理学研究概况[J]. 安徽农业科学,2011,39(14):8386-8394.

[7] 夏玮,古丽加玛丽·阿比斯,潘晨,等. 腊梅花中黄酮类化合物的 UHPLC/QTOF-MS 分析[J]. 中成药,2014,36(11):2345-2349.

[8] 宋建平,许虎乙,陈菲,等. 罗布麻叶黄酮类成分的 UPLC-Q-TOF-MS 分析[J]. 中药材,2014,37(7):1199-1204.

[9] 张峻颖,冯超,徐雪,等. HPLC 同时测定香蜂花药材中的 3 种有效成分[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(24):78-81.

[10] 薛珍珍,晏仁义,余盛贤,等. HPLC-DAD 测定厚朴商品中 6 种活性成分的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(22):95-99.

[11] 杜海芳,熊礼燕,林励,等. HPLC 同时测定沉香中 5 种色酮含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(20):87-90.

[12] 张晓静,赵艳霞,邓雁如,等. HPLC 同时测定白及中 3 种成分的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(21):40-42.

[13] 王舒. HPLC 同时测定灯盏细辛提取物中 3 种有效成分的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(19):72-74.

[责任编辑 顾雪竹]