超高效液相色谱法测定侧柏炭中 5 个黄酮类成分

单鸣秋，高 静，丁安伟*
南京中医药大学 江苏省方剂研究重点实验室，江苏 南京 210046

摘 要：目的 建立同时测定侧柏炭中杨梅素、槲皮苷、槲皮素、山柰酚和穗花杉双黄酮 5 种黄酮类化合物的超高效液相色谱（UPLC）分析方法。**方法** 采用 Waters Acquity UPLC 系统，Waters BEH C_{18} 柱（50 mm×2.1 mm，1.7 mm）；流动相为 0.05%甲酸水溶液-甲醇，梯度洗脱；体积流量 0.2 mL/min；柱温 30 ℃；进样量 2 μL；检测波长 360 nm。**结果** 杨梅素、槲皮苷、槲皮素、山柰酚和穗花杉双黄酮在线性范围内均具有良好的线性关系（r≥0.999 5）；平均回收率在 96.85%～99.01%，RSD≤4.00%。**结论** UPLC 分离效果及重复性好，且快速、简便，可作为侧柏炭的质量控制方法。

关键词：侧柏炭；黄酮类化合物；杨梅素；槲皮苷；槲皮素；山柰酚；穗花杉双黄酮；超高效液相色谱
中图分类号：R286.02 **文献标志码**：A **文章编号**：0253 - 2670(2011)02 - 0282 - 03

Determination of five flavonoids in *Cacumen Platycladi Carbonisatum* by UPLC

SHAN Ming-qiu, GAO Jing, DING An-wei
Jiangsu Key Laboratory for Traditional Chinese Medicine Formulae Research, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China

Abstract: **Objective** To establish a UPLC method for simultaneous determination of five flavonoids (myricetin, quercitrin, quercetin, kaempferol, and amentoflavone) in *Cacumen Platycladi Carbonisatum*. **Methods** The analysis was performed on a Waters Acquity UPLC system with a Waters BEH C_{18} column (50 mm×2.1 mm, 1.7 mm). The five flavonoids were separated with gradient mobile phase consisting of 0.05% aqueous formic acid and methanol. The temperature of column was 30 ℃, and the injection volume was 2 μL/min, detection wavelength was 360 nm. **Results** The five flavonoids including myricetin, quercitrin, quercetin, kaempferol, and amentoflavone had good linearity (r≥0.999 5) within the linear ranges. The average recovery rate was 96.85% — 99.01% with RSD≤4.00%. **Conclusion** The developed UPLC method is simple, sensitive and accurate and has the good repeatability in separation, which is available for the quality control of *Cacumen Platycladi Carbonisatum*.

Key words: *Cacumen Platycladi Carbonisatum*; flavonoids; myricetin; quercitrin; quercetin; kaempferol; amentoflavone; UPLC

侧柏叶为柏科植物侧柏 *Platycladus orientalis* (L.) Franco 的干燥枝鞘及叶，味苦涩、性寒，具有凉血止血的功效[1]。侧柏炭为其制炭炮制品，亦为中药中传统的止血药，传统止血方十灰散中重要组成药味之一。侧柏炭中所含主要成分为黄酮类化合物，目前测定指标成分多为槲皮苷或槲皮素，均采用 HPLC 法[2-3]。测定成分单一，不能全面反映其内在质量。笔者曾采用 HPLC 法测定侧柏炭中杨梅素、槲皮苷、槲皮素、山柰酚和穗花杉双黄酮，但是分析时间较长，一次需要 70 min 以上。本研究采用超高效液相色谱法（UPLC）技术，建立了同时测定侧柏炭中这些黄酮类化合物的方法，可在 25 min 左右完成一次色谱分析。此方法快捷、准确，重现性好，可较全面地控制侧柏炭中黄酮类成分，为其质量控制提供参考。

1 仪器与试药

Waters Acquity 超高效液相色谱仪，配有二极管阵列（DAD）检测器。H66025T 型超声清洗机（无锡超声电子设备厂），Librorael—40SM 电子分析天平（精确到 0.01 mg）。

槲皮苷（批号 111538-200403）、槲皮素（批号 100081-200406）（中国药品生物制品检定所），山柰酚、穗花杉双黄酮（上海顺勃生物工程技术有限公司），杨梅素（南京泽朗医药科技有限公司）。甲醇

收稿日期：2010-05-31
基金项目：国家“十一五”科技攻关项目（2006BAI09B06-02）；中国药典 2010 年版项目（YS-128）
作者简介：单鸣秋（1978—），男，讲师，博士在读。Tel: (025)85811519 E-mail: shanmingqiu@163.com
*通讯作者 丁安伟 Tel: (025)85811523 E-mail: awding105@163.com

（色谱纯），水（高纯水）。其他试剂为分析纯。10 批侧柏叶生品均购于安徽亳州药材市场，并经南京中医药大学药学院陈建伟教授鉴定为柏科植物侧柏 *Platycladus orientalis*（L.）Franco 的干燥枝鞘及叶，见表 1。

表 1 侧柏叶生品来源

Table 1 Sources of *Cacumen Platycladi*

编号	产地	批号	编号	产地	批号
S1	河南	071022	S6	安徽	081102
S2	安徽	080724	S7	青海	081102
S3	河南	080723	S8	河南	081110-3
S4	江苏	080722	S9	河南	081110-2
S5	山东	081105	S10	河南	081110-1

2 方法与结果

2.1 侧柏炭样品的制备[4]

取侧柏叶 50 g，温度为 280 ℃，炒制 5 min，即得。

2.2 对照品溶液的制备

分别精密称取对照品杨梅素、槲皮苷、槲皮素和山柰酚适量，加甲醇溶解并稀释，制成质量浓度分别为 325.60、319.20、1 122.00、315.20 μg/mL 的混合对照品溶液。精密称取穗花杉双黄酮对照品适量，加 DMSO 溶解，再加甲醇稀释制成质量浓度为 486.80 μg/mL 的穗花杉双黄酮对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备

取侧柏炭粉末约 3 g，精密称定，置于具塞锥形瓶中，加入甲醇 50 mL，超声处理（工作频率 40 kHz，功率 250 W）1 h，滤过；滤渣同法超声处理 1 次，滤过，合并滤液，蒸干，残渣用甲醇溶解，转移至 25 mL 量瓶中，稀释至刻度，摇匀，即得。

2.4 色谱条件

Waters BEH C_{18} 柱（50 mm×2.1 mm，1.7 mm）；流动相为 0.05%甲酸水溶液-甲醇，梯度洗脱，见表 2；体积流量 0.2 mL/min；柱温 30 ℃；进样量 2 μL；检测波长 360 nm。在此色谱条件下，各成分之间分离情况良好，见图 1。

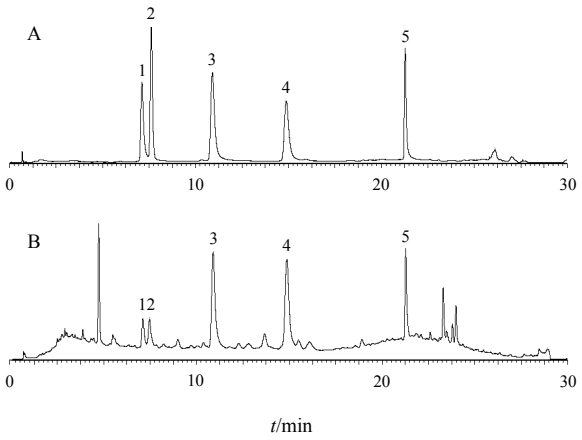
2.5 线性关系、检测限（LOD）及定量限（LOQ）

分别精密吸取混合对照品溶液及穗花杉双黄酮对照品溶液各 1 mL，置于 10 mL 量瓶中，加甲醇稀释至刻度。用倍比稀释的方法以甲醇制成系列对照品溶液，在上述色谱条件下，分别进样 2 μL，每个质量浓度进 3 针，测定峰面积值。以峰面积平均值与质量浓度进行线性回归，结果见表 2。将混合对照品溶液用甲醇不断进行稀释后分析，得到 5 个成分的 LOD 值（S/N≈2～3）和 LOQ 值（S/N≈10），结果见表 3。

表 2 流动相梯度表

Table 2 Mobile phase gradient

时间/min	0.05%甲酸水溶液/%	甲醇/%
0.0	95	5
1.8	70	30
15.8	55	45
17.8	50	50
25.8	15	85
27.8	5	95
29.8	95	5
30.0	95	5



1-杨梅素 2-槲皮苷 3-槲皮素 4-山柰酚 5-穗花杉双黄酮
1-myricetin 2-quercitrin 3-quercetin 4-kaempferol 5-amentoflavone

图 1 对照品（A）和侧柏炭样品（B）的 UPLC 图

Fig. 1 UPLC chromatograms of reference substances (A) and *Cacumen Platycladi Carbonisatum* (B)

2.6 精密度试验

取批号 081110-1 侧柏炭粉末制备的供试品溶液，进样 2 μL，连续进样 6 次，分别记录峰面积，计算，结果杨梅素、槲皮苷、槲皮素、山柰酚和穗花杉双黄酮峰面积的 RSD 分别为 2.02%、3.15%、1.94%、1.74%、2.15%。

2.7 稳定性试验

取批号 081110-1 侧柏炭粉末制备的供试品溶液，于 0、1、2、4、6、8 h 分别进样 2 μL，按上述色谱条件分析，分别记录峰面积，计算，结果杨梅素、槲皮苷、槲皮素、山柰酚和穗花杉双黄酮峰面积的 RSD 分别为 1.23%、3.30%、2.34%、1.90%、

表 3　5 个黄酮类化合物的回归方程及 LOD、LOQ 数据

Table 3　Linear regression equation, LOD, and LOQ data for five flavonoids

化合物	回归方程	线性范围/(μg·mL^{-1})	r	LOD/(μg·mL^{-1})	LOQ/(μg·mL^{-1})
杨梅素	Y＝308.92 X－22.13	1.02～32.56	0.999 8	0.02	0.08
槲皮苷	Y＝228.88 X－12.57	1.00～31.92	0.999 9	0.03	0.10
槲皮素	Y＝427.26 X＋496.04	3.51～112.20	0.999 5	0.02	0.09
山柰酚	Y＝518.23 X－18.49	0.99～31.52	0.999 8	0.01	0.06
穗花杉双黄酮	Y＝202.51 X＋33.73	1.52～48.68	0.999 7	0.02	0.08

1.83%，表明供试品溶液中 5 种黄酮类化合物在 8 h 内稳定。

2.8　加样回收率试验

取批号 081110-1 的侧柏炭粉末 6 份，每份 1.5 g，精密称定，置于 50 mL 具塞锥形瓶中，分别加入混合对照品溶液（含杨梅素 325.6 μg/mL、槲皮苷 159.6 μg/mL、槲皮素 1 122.0 μg/mL、山柰酚 157.6 μg/mL、穗花杉双黄酮 486.8 μg/mL）1 mL，制备供试品溶液，进样 2 μL，按上述色谱条件测定，分别计算回收率。结果杨梅素、槲皮苷、槲皮素、山柰酚和穗花杉双黄酮的平均回收率分别为 98.52%、99.01%、97.87%、97.88%、96.85%，RSD 分别为 1.75%、3.98%、2.38%、2.29%、1.89%。

2.9　样品测定

取 10 批侧柏炭适量，分别制备供试品溶液，各进样 2 μL，以各成分峰面积按外标法对其中的杨梅素、槲皮苷、槲皮素、山柰酚和穗花杉双黄酮进行测定，结果见表 4。

表 4　侧柏炭中黄酮类成分的测定（n＝3）

Table 4　Determination of five flavonoids in *Cacumen Platycladi Carbonisatum* (n＝3)

编号	质量分数/(mg·g^{-1})				
	杨梅素	槲皮苷	槲皮素	山柰酚	穗花杉双黄酮
S1	0.144	0.107	0.459	0.162	0.281
S2	0.102	0.075	0.327	0.150	0.262
S3	0.016	0.033	0.096	0.084	0.057
S4	0.032	0.047	0.116	0.120	0.156
S5	0.006	0.039	0.034	0.060	0.125
S6	0.092	0.050	0.305	0.148	0.222
S7	0.145	0.077	0.448	0.169	0.297
S8	0.215	0.067	0.772	0.151	0.322
S9	0.221	0.071	0.765	0.145	0.328
S10	0.178	0.072	0.704	0.147	0.295

3　讨论

本实验使用 DAD 为检测器，经过比较，在 360 nm 处所示色谱峰数目较多，分离较好，基线较平稳，因此选用 360 nm 为检测波长。

中药中化学成分复杂，往往含有结构、性质不尽相同的多种成分。化学成分研究既是基础科学问题，也是中药现代化的核心问题。超高效液相色谱具有高分离度、高分析速度和高灵敏度，能够对复杂样品中的多种成分进行快速定性和定量分析[5]。本实验建立的超高效液相色谱法同时测定侧柏炭中 5 种黄酮类化合物的方法，与常用的 HPLC 法相比，分析时间大幅缩短，分离效率和柱效大大提高。利用 UPLC 技术有助于进一步研究中药的化学成分。

参考文献

[1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.

[2] 吴怀恩, 甄汉深, 韦志英, 等. RP-HPLC 法同时测定侧柏叶炭中槲皮素和山柰素的含量 [J]. 中国药房, 2009, 20(12): 934.

[3] 江　波, 孙立立, 杨书斌, 等. HPLC 测定侧柏炭中槲皮苷和槲皮素的含量 [J]. 中成药, 2005, 27(7): 792.

[4] 高　静, 曾祥丽, 单鸣秋, 等. 正交设计法优选侧柏炭炮制工艺 [J]. 江苏中医药, 2008, 40(9): 65-67.

[5] 赵骏铭, 张紫佳, 孙庆龙, 等. 超高效液相色谱法测定杜仲中松脂醇二葡萄糖苷 [J]. 中草药, 2010, 41(11): 1896-1898.