

超高效液相色谱法测定不同产地槐花中 4 种黄酮含量

唐燕玲^{1*}, 罗卓卡², 蔡庆群¹, 丘振文¹, 冯时茵¹

(1. 广州中医药大学第一附属医院药学部, 广州 510405; 2. 苏州大学附属常州市肿瘤医院药剂科, 常州 213002)

摘 要: **目的** 建立超高效液相色谱法(ultra performance liquid chromatography, UPLC)检测槐花中 4 种黄酮类成分含量的分析方法, 并比较不同产地槐花中 4 种黄酮类成分的含量差异及聚类分析。**方法** 色谱柱为 ACQUITY UPLC BEH C₁₈(2.1 mm×50 mm, 1.7 μm); 流动相 A 为甲醇溶液, B 为 0.1%乙酸水溶液, 梯度洗脱。柱温为 30 °C, 检测波长为 360 nm; 通过 TB tools 热图绘制选项以及 PCA 主成分分析图绘制功能进行各产地样品的聚类分析。**结果** 4 种黄酮对照品在相应浓度范围内与峰面积均呈现良好线性关系; 回收率均在 95%~105%之间; 不同产地槐花中的 4 种黄酮类成分含量差异较大, 基于 4 种黄酮类成分含量对不同产地的槐花的 PCA 主成分分析及聚类热图分析结果表明, 槐花具有明显的产地聚类特性。**结论** 该方法操作简单, 结果稳定准确, 专属性强, 并且分析时间短, 能够降低分析成本, 适合作为槐花的含量测定方法。不同产地槐花质量差异明显, 可通过优选产地从而保证其来源的质量稳定性以及用药安全性。

关键词: 槐花; 不同产地; 超高效液相色谱法; 聚类分析

Determination of 4 flavonoids in *Sophora japonica* from different habitats by ultra performance liquid chromatography

TANG Yan-Ling^{1*}, LUO Zhuo-Ka², CAI Qing-Qun¹, QIU Zhen-Wen¹, FENG Shi-Yin¹

(1. The First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China; 2. Changzhou Cancer Hospital Affiliated to Soochow University, Changzhou 213002, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for the determination of 4 flavonoids in *Sophora japonica* by ultra performance liquid chromatography (UPLC), and to compare the content differences and cluster analysis of the 4 kinds of flavonoids in *Sophora japonica* from different regions. **Methods** The column was ACQUITY UPLC BEH C₁₈ column (2.1 mm×50 mm, 1.7 μm). Mobile phase A was methanol solution, and B was 0.1% acetic acid aqueous solution, with gradient elution. The column temperature was 30 °C, and the detection wavelength was 360 nm. The cluster analysis of samples from different origins was carried out through the TB tools heat map drawing option and the PCA principal component analysis map drawing function. **Results** Four kinds of flavonoid reference substances showed a good linear relationship with the peak area in the corresponding concentration range. The recovery rates were all between 95% and 105%. The content of 4 kinds of flavonoid components in *Sophora japonica* from different origins varied greatly, based on 4 kinds of flavonoids in PCA principal component analysis and clustering heat map analysis of locust flower from different origins showed that locust flowers had obvious clustering characteristics of

*通讯作者: 唐燕玲, 主管药师, 主要研究方向为药物质量控制研究。E-mail: 917895422@qq.com

*Corresponding author: TANG Yan-Ling, Pharmacist, the First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Courtyard, No.16, Airport Road, Baiyun District, Guangzhou 510405, China. E-mail: 917895422@qq.com

origin. **Conclusion** This method is simple in operation, stable and accurate in results, strong in specificity, and short in analysis time, which can reduce the analysis cost, and is suitable as a content determination method for *Sophora japonica*. The quality of *Sophora japonica* from different producing areas is obviously different, so the quality stability and medication safety of *Sophora japonica* can be ensured by optimizing the producing areas.

KEY WORDS: *Sophora japonica*; different origins; ultra performance liquid chromatography; cluster analysis

1 引 言

槐花为豆科植物槐树(*Sophora japonica* L.)的干燥花或花蕾,是我国首批收录的药食同源的中药^[1,2]。2020 版《中国药典》^[3]记载其功效为凉血止血,清肝泻火,主要可用于便血、痔血、血痢、崩漏、吐血、衄血、肝热目赤、头痛眩晕。现代药理研究表明其具有抗氧化、抗炎、降血压、调节免疫等多种药理活性^[4]。

不论是作为保健食品或者中药材,槐花发挥作用的物质基础主要是其黄酮类物质,其含量的高低与槐花品质及药用效果都密切相关^[5-8]。目前,《中国药典》^[3]规定槐花含量测定的指标成分只有 1 个,即芦丁,单一的指标并不能全面反映槐花药材的质量^[9-12]。不少学者^[13-15]开展了对槐花中主要黄酮如芦丁、槲皮素、水仙苷的含量测定研究,然而其主要采用的方法为高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC),分析时间较长,且目前未见有关不同产地槐花主要黄酮类成分的比较研究。因此,本研究将采用超高效液相色谱法(ultra high performance liquid chromatography, UPLC)建立槐花中 4 种主要黄酮类成分(芦丁、山奈酚-3-O-芸香苷、水仙苷、槲

皮素)含量的测定方法,并对不同产地槐花中这 4 种黄酮类成分进行分析,以期能快速检测槐花中主要黄酮类成分,同时也为更好地控制槐花药材质量提供依据。

2 材料与方 法

2.1 仪器与材料

KQ-300 超声波清洗器(东莞市科桥超声波设备有限公司);MP200B 电子天平(0.1 mg,上海精科天平有限公司);BP211D 电子分析天平($d=0.01$ mg,德国 Sartorius 公司);ACQUITY UPLC 系统(QSM 四元溶剂管理系统、FTN 样品管理系统自动进样器、CH-A 型柱温箱、UPLC 专用二极管阵列检测器、真空脱气机、Empower3 色谱工作站,美国 Waters 公司)。

2.2 实验方法

2.2.1 供试品的制备

槐花样品充分干燥后,精密称取粉末各 0.3 g,置于 50 mL 容量瓶中,精密加入甲醇溶液 40 mL,超声(功率设置为 250 W,频率设置为 50 kHz)提取 30 min,放冷至室温后用甲醇补至 50 mL,过滤,即得供试品溶液。

不同产地槐花及批号见表 1。

表 1 不同产地槐花样品信息
Table 1 Sample information of *Portulacaoleracea* from different regions

产地	批号/采样日期	文中编号
山东济南	20180309	SD_1
山东济南	20180310	SD_2
山东济南	20180311	SD_3
广东广州	20180401	GD_1
广东中山	20180402	GD_2
广东珠海	20180403	GD_3
河北石家庄	20180412	HeB_1
河北石家庄	20180414	HeB_2
河北秦皇岛	20180415	HeB_3
河北唐山	20180418	HeB_4
湖北武汉	20180501	HuB_1
湖北武汉	20180503	HuB_2

续表 1

产地	批号/采样日期	文中编号
湖北黄石	20180504	HuB_3
安徽合肥	20180605	AH_1
安徽合肥	20180609	AH_2
安徽马鞍山	20180619	AH_3
江苏南京	20180701	JS_1
江苏南京	20180703	JS_2
江苏无锡	20180709	JS_3
江苏无锡	20180711	JS_4

2.2.2 对照品的制备

精密称取对照品芦丁、山奈酚-3-O-芸香苷、水仙苷、槲皮素适量, 加甲醇制备含芦丁、山奈酚-3-O-芸香苷、水仙苷、槲皮素对照品浓度分别为 100、35、20、15 μg/mL 的混合对照品母液。精密移取混合对照品母液 0.05、0.1、0.2、0.4、0.8 mL 于 10 mL 容量瓶中, 加入甲醇至刻度处, 即得梯度混合对照品溶液。

2.2.3 液相色谱分析条件

色谱柱为 ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 色谱柱 (2.1 mm×50 mm, 1.7 μm); 流动相 A 为甲醇溶液, B 为 0.1% 乙酸水溶液, 梯度洗脱如表 2。柱温为 30 °C, 检测波长为 360 nm, 进样体积 1 μL。

表 2 梯度洗脱程序
Table 2 Gradient elution procedure

时间/min	0.1%乙酸水/%	甲醇/%
0	80	20
2	40	60
3	40	60
3.5	20	80
5	20	80

2.2.4 方法学考察

(1)线性关系考察

分别吸取 2.2.2 梯度混合对照品溶液各 1 μL, 注入超

高速液相色谱仪, 按 2.2.3 UPLC 测定条件测定峰面积, 以峰面积为纵坐标(Y), 以各对照品浓度(X, μg/mL)为横坐标绘制标准曲线。

(2)精密度考察

精密吸取混合对照品溶液 1 μL, 连续进样 6 次, 按 2.2.3 UPLC 测定条件测定, 记录峰面积, 计算峰面积 RSD 值。

(3)稳定性考察

精密吸取 2.2.1 供试品溶液 1 μL, 每隔 2 h 按 2.2.3 UPLC 测定条件测定 1 次, 记录峰面积, 测定 24 h 内供试品溶液的稳定性。

(4)重复性考察

精密称取槐花样品粉末 6 份, 每份 0.3 g, 按照 2.2.1 供试品项下制备供试液, 按 2.2.3 UPLC 测定条件测定, 记录峰面积, 计算各黄酮成分含量, 以 6 份样品的相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)评估方法的重复性。

(5)加样回收率考察

取已知含量的槐花样品粉末 6 份, 精密称定, 分别加入适量的 4 种黄酮对照品, 按照 2.2.1 供试品项下制备供试液, 按 2.2.3 UPLC 测定条件测定, 记录峰面积, 计算各黄酮成分含量, 计算其加样回收率。

2.2.5 不同产地槐花黄酮含量测定

不同产地槐花样品经充分干燥后, 按照 2.2.1 供试品项下制备供试液, 按 2.2.3 UPLC 测定条件测定, 记录峰面积, 计算各黄酮成分含量。通过 TB tools 热图绘制选项以及 PCA 主成分分析图绘制功能进行各产地样品的聚类分析。

3 结果与分析

3.1 UPLC 色谱条件的确定

经过考察,在上述 2.2.3 UPLC 条件下,槐花中 4 种黄酮类成分能够达到基线分离,分离度良好,且分析时间仅需 5 min,大大提高了分析效率(见图 1)。

3.2 线性关系

经过考察后得 4 个黄酮成分的标准曲线如表 3 所示。结果表明,4 种黄酮类成分在相应的线性范围内线性关系良好。

3.3 精密度、稳定性、重复性及加样回收率

经考察得该方法的精密度、稳定性、重复性 RSD 值均小于 2%,加样回收率在 95%~105%之间,RSD 值小于 2.2%,说明方法具有良好的精密度、稳定性、重复性以及

准确性(见表 4)。

3.4 不同产地槐花样品 4 种黄酮类成分含量测定结果分析

3.4.1 不同产地槐花样品 4 种黄酮类成分含量的比较

由表 5 以及图 2 可知,不同产地槐花样品 4 种黄酮类成分具有较大的差异,芦丁含量在 59.38~94.25 mg/g 之间,山奈酚-3-O-芸香苷含量在 0.45~5.12 mg/g 之间,水仙苷含量在 0.75~4.28 mg/g 之间,木犀草素含量在 3.25~12.68 mg/g 之间。江苏产槐花 4 种黄酮类成分含量最高,而山东产地的最低。

3.4.2 不同产地槐花样品的聚类分析

基于槐花中 4 种主要黄酮成分的 PCA 主成分分析表明,不同产地槐花都可以明显区分开(见图 3);而聚类热图分析也表明,不同产地均可以聚为单独的一簇,具有明显的产地聚类特性(见图 4)。

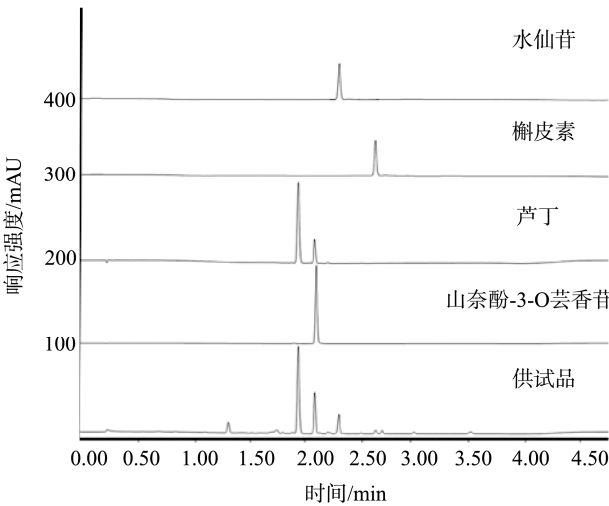


图 1 槐花黄酮成分 UPLC 色谱图

Fig.1 UPLC chromatogram of flavonoids in *Sophora japonica*

表 3 4 种黄酮类成分的线性关系
Table 3 Linear relationship of 4 components

成分	回归方程	线性范围/($\mu\text{g/mL}$)	<i>r</i>
芦丁	$Y=9.76\times10^4X+1.05\times10^3$	0.5~80	0.9990
山奈酚-3-O-芸香苷	$Y=8.58\times10^4X+1.22\times10^4$	0.175~28	0.9997
水仙苷	$Y=9.12\times10^4X+1.48\times10^3$	0.1~16	0.9997
槲皮素	$Y=9.48\times10^4X+1.66\times10^3$	0.075~12	0.9998

表 4 精密度、稳定性、重复性及加样回收率考察结果
Table 4 Investigation results of precision, stability, repeatability and recovery rate

成分	精密度 RSD/%	稳定性 RSD/%	重复性 RSD/%	加样回收率	
				回收率/%	RSD/%
芦丁	1.23	1.22	1.34	98.13	2.13
山奈酚-3-O-芸香苷	0.58	1.58	1.23	99.23	1.97
水仙苷	1.24	1.98	0.58	100.25	1.48
槲皮素	1.45	1.24	1.76	98.75	1.54

表 5 20 批样品含量测定结果(mg/g, n=3)
Table 5 Content determination results of 20 batches of samples (mg/g, n=3)

产地	芦丁	山奈酚-3-O-芸香苷	水仙苷	槲皮素
SD_1	60.52±0.19	1.79±0	2.34±0	6.68±0.02
SD_2	59.38±0.73	2.11±0.02	2.38±0.02	6.45±0.07
SD_3	61.45±0.2	1.97±0	2.05±0	7.02±0.02
GD_1	76.89±0.75	3.45±0.03	3.67±0.03	10.12±0.09
GD_2	80.7345±1.08	3.6225±0.04	3.8535±0.05	10.62±0.14
GD_3	79.8±1.06	3.58±0.04	3.8±0.05	10.5±0.13
HeB_1	65.01±0.79	2.33±0.028	1.55±0.01	7.25±0.08
HeB_2	68.23±0.98	2.45±0.03	1.65±0.02	7.06±0.1
HeB_3	66.45±0.39	2.39±0.01	1.5±0	7.42±0.04
HeB_4	69.1±0.53	2.48±0.01	1.56±0.01	7.71±0.06
HuB_1	88.23±0.39	3.99±0.01	4.25±0.01	10.35±0.04
HuB_2	88.67±1.78	4±0.08	4.27±0.08	10.4±0.2
HuB_3	88.89±0.88	4.02±0.03	4.28±0.04	10.42±0.1
AH_1	62.77±0.97	0.45±0	0.75±0.01	3.25±0.05
AH_2	63.02±0.98	0.45±0	0.75±0.01	3.26±0.05
AH_3	63.39±1.26	0.45±0	0.75±0.01	3.28±0.06
JS_1	94.254±2.2	5.08±0.11	4.23±0.09	12.58±0.29
JS_2	95±1.8	5.12±0.09	4.26±0.08	12.68±0.24
JS_3	93.23±1.24	5.02±0.06	4.18±0.05	12.44±0.16
JS_4	93.41±1.25	5.03±0.06	4.19±0.056	12.46±0.16

注: SD 代表山东; GD 代表广东; HeB 代表河北; HuB 代表湖北; AH 代表安徽; JS 代表江苏。

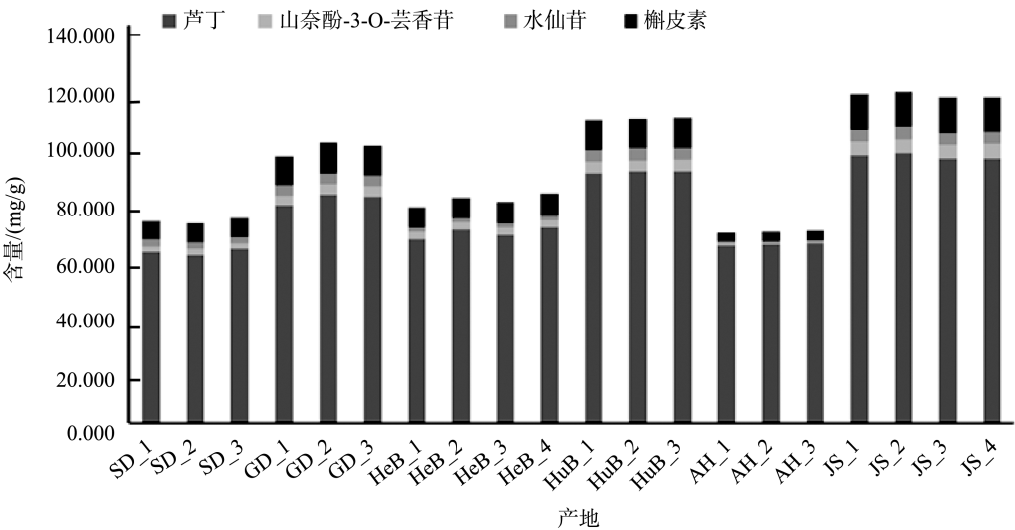


图 2 20 批样品含量测定结果(n=3)
Fig.2 Content determination results of 20 batches of samples(n=3)

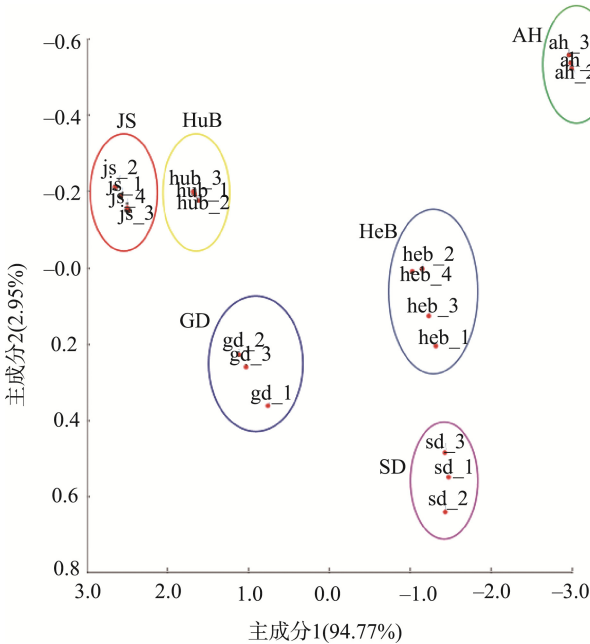


图 3 PCA 主成分分析
Fig.3 PCA principal component analysis

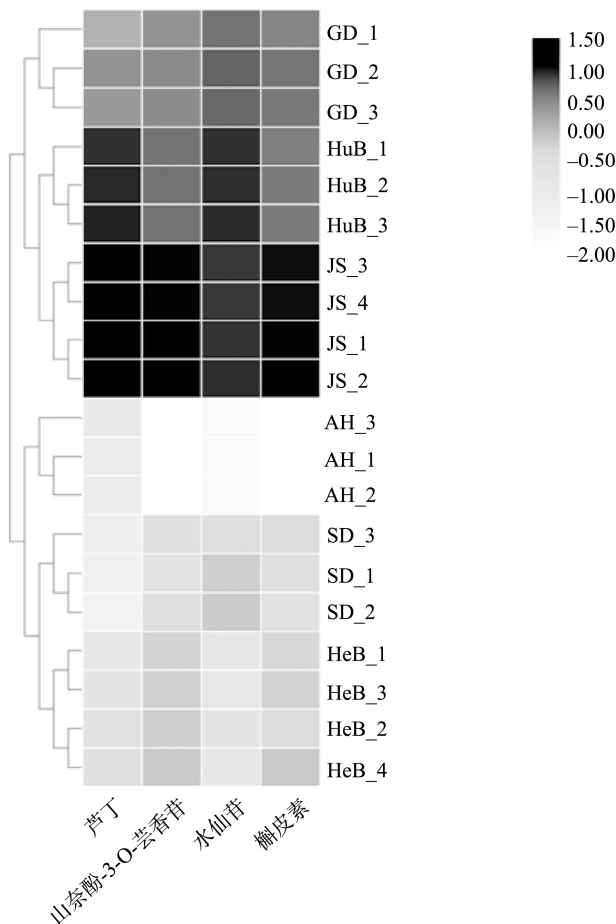


图 4 不同产地槐花的聚类分析热图
Fig.4 Cluster analysis diagram of *Sophora japonica* from different producing areas

4 结 论

本研究建立了 UPLC 测定药食两用中药槐花中 4 种黄酮类成分含量的方法, 结果表明该方法操作简单, 结果稳定准确, 专属性强, 并且分析时间短, 能够降低分析成本, 适合作为槐花的含量测定方法。同时对不同产地槐花中 4 种黄酮类成分进行比较分析, 结果表明, 不同产地槐花中 4 种黄酮类成分具有显著差异, 且具有明显的产地聚类特性, 研究结果可为进一步提高槐花质量标准以及槐花的优质来源提供参考和依据。

参考文献

[1] 胡安徽. 槐花入药的本草考证[J]. 中成药, 2018, 40(11): 2587-2589.
Hu AH. Textual research on medicinal herbs of *Sophora japonica* [J]. Chin Tradit Patent Med, 2018, 40(11): 2587-2589.
[2] 钱文文, 辛宝, 史传道. 槐花的营养保健功能及食品开发前景[J]. 农产品加工, 2016, (18): 59-61.
Qian WW, Xin B, Shi CD. Nutrition and processing of *Sophra japonica* [J]. Farm Prod Proc, 2016, (18): 59-61.

[3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020.
State Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China [M]. Beijing: China Medical Science and Technology Press, 2020.
[4] 刘琳, 程伟. 槐花化学成分及现代药理研究新进展[J]. 中医药信息, 2019, 36(4): 125-128.
Liu L, Cheng W. Research progress in chemical constituents and modern pharmacology of *Sophora japonica* [J]. Inform Tradit Chin Med, 2019, 36(4): 125-128.
[5] 郭建平, 夏勤, 顿文亮, 等. 槐花散治疗溃疡性结肠炎肠风下血证作用机制研究[J]. 现代中医药, 2020, 40(5): 9-14, 21.
Wang JP, Xia Q, Dun WL, et al. A study on the effect and mechanism of huaihua powder in the treatment of ulcerative colitis by emulating the intestinal sub wind blood syndrome [J]. Mod Tradit Chin Med, 2020, 40(5): 9-14, 21.
[6] 杨欣, 王乐. 槐花醇提取物促进肝癌大鼠的细胞凋亡[J]. 现代食品科技, 2020, 36(3): 17-21, 259.
Yang X, Wang L. Apoptosis of *Sophora japonica* extraction on hepatoma rats [J]. Mod Food Sci Technol, 2020, 36(3): 17-21, 259.
[7] 马艳琴, 郭珊珊, 马进, 等. 不同槐花炮制品中总黄酮含量的比较

- 研究[J]. 时珍国医国药, 2018, 29(1): 76–78.
- Ma YQ, Guo SS, Ma J, *et al.* Comparative study on the content of total flavonoids in different *Sophora japonica* products [J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2018, 29(1): 76–78.
- [8] 邝嘉乐, 岑志芳, 何汝邦, 等. 正交设计法优化槐花中总黄酮的提取工艺[J]. 佛山科学技术学院学报(自然科学版), 2015, 33(5): 48–51.
- Kuang JL, Ceng ZF, He RB, *et al.* Optimization of extraction technology of total flavonoids in *Sophora japonica* L. by orthogonal design test [J]. J Foshan Univ (Nat Sci Ed), 2015, 33(5): 48–51.
- [9] 蒋新龙, 郭叶莹, 吴小刚, 等. 槐花黄酮磷脂复合物制备及其对植物油氧化稳定性的影响[J]. 中国粮油学报, 2019, 34(9): 64–71.
- Jiang XL, Guo YY, Wu XG, *et al.* Preparation and its antioxidant effects on vegetable oils of phospholipids complex of total flavonoids from *Sophora japonica* [J]. J Chin Cere Oils Assoc, 2019, 34(9): 64–71.
- [10] 陈建真, 季忆, 陈彬. 槐花散总黄酮大孔树脂分离纯化的工艺研究[J]. 中华中医药杂志, 2015, 30(7): 2607–2609.
- Chen JZ, Ji Y, Chen B. Study on purification process of total flavonoids from Huaihua San by macroporous [J]. Chin J Tradit Chin Med Pharm, 2015, 30(7): 2607–2609.
- [11] 刘瑞, 泰刚, 裴晓丽, 等. UPLC法测定羊红膻药材中9个活性成分的含量[J]. 药物分析杂志, 2020, 40(6): 1097–1103.
- Liu R, Tai G, Pei XL, *et al.* Determination of nine components in Yanghongshan by UPLC [J]. Chin J Pharm Anal, 2020, 40(6): 1097–1103.
- [12] 段慧芳, 吴敬南, 朱亚莹, 等. UPLC 同时测定不同产地金银花中 10 种成分[J]. 中草药, 2019, 50(23): 5858–5864.
- Duan HF, Wu QN, Zhu YY, *et al.* Simultaneous determination of ten components in *Lonicerae japonicae flos* from different habitats by UPLC [J]. Chin Tradit Herb Drug, 2019, 50(23): 5858–5864.
- [13] 吴笛, 雷昌. HPLC 同时测定槐花散中 4 种黄酮类成分含量[J]. 中国中医药信息杂志, 2020, 27(6): 69–72.
- Wu D, Lei C. Simultaneous determination of four flavonoids in *Sophora japonica* powder by HPLC [J]. Chin J Inform Tradit Chin Med, 2020, 27(6): 69–72.
- [14] 黄和军, 崔小兵, 杨军辉. 一测多评法测定槐花中 3 种黄酮类成分的含量[J]. 安徽医药, 2019, 23(12): 2366–2370.
- Huang HJ, Cui XB, Yang JH. Determination of three flavonoids ingredients of *Sophorae flos* by QAMS method [J]. Anhui J, 2019, 23(12): 2366–2370.
- [15] 皮文霞, 赵文望, 蔡宝昌, 等. 槐花对照提取物的制备及槐花中 4 个黄酮类成分的含量测定[J]. 中国药房, 2018, 29(19): 2652–2656.
- Pi WX, Zhao WW, Cai BC, *et al.* Preparation of reference extract of *Sophora japonica* and contents determination of 4 flavonoids components in *Sophora japonica* [J]. Chin Pharm, 2018, 29(19): 2652–2656.

(责任编辑: 于梦娇)

作者简介



唐燕玲, 主管药师, 主要研究方向为
药物质量控制研究。
E-mail: 917895422@qq.com