

HPLC同时测定密蒙花中毛蕊花苷、蒙花苷的含量

朱露^{1,2}, 雷鹏^{1,2*}, 刘海涛¹, 谭润雅^{1,2}, 黄琪¹

(1. 中南大学湘雅医院药剂科, 长沙 410008; 2. 中南大学药学院, 长沙 410013)

[摘要] 目的: 建立反相高效液相色谱法同时测定密蒙花中毛蕊花苷、蒙花苷的含量。方法: 采用 Promosil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈(A)-0.1% 磷酸(B)水溶液, 梯度洗脱(0~10 min, 20% A; 10~20 min, 20%~40% A; 30 min, 60% A), 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 327 nm, 柱温 25 °C。结果: 密蒙花中毛蕊花苷、蒙花苷进样量分别在 0.079 5~1.272 0 μg ($r=0.999 6$), 0.051 6~0.412 8 μg ($r=1.000 0$) 与峰面积呈良好的线性关系。平均加样回收率分别为 100.8%, 103.1%; RSD 分别为 2.2%, 1.8%。结论: 该方法简便、准确、可靠, 为密蒙花的质量控制提供一定的依据。

[关键词] 密蒙花; 毛蕊花苷; 蒙花苷; 高效液相色谱

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)13-0076-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014130076

Simultaneous Determination of Acteoside and Linarin in Flos Buddlejae by RP-HPLC

ZHU Lu^{1,2}, LEI Peng^{1,2*}, LIU Hai-tao¹, TAN Run-ya^{1,2}, HUANG Qi¹

(1. Department of Pharmacy, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China;

2. College of Pharmacy, Central South University, Changsha 410013, China)

[Abstract] **Objective:** To develop a RP-HPLC method for simultaneous determination of acteoside and linarin in Flos Buddlejae. **Method:** The analysis was performed on Promosil C₁₈ reversed-phase analytical column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), the mobile phase was acetonitrile (A) -0.1% phosphoric acid solution (B) with gradient elution (0-10 min, 20% A; 10-20 min, 20%-40% A; 30 min, 60% A), the column temperature was 25 °C, the flow rate was 1.0 mL·min⁻¹ and the detecting wavelength was 327 nm. **Result:** Acteoside and linarin showed good linearity in the range of 0.079 5-1.272 0 μg ($r=0.999 6$) and 0.051 6-0.412 8 μg ($r=1.000 0$); the average recovery was 100.8%, 103.1%, respectively and RSD was 2.2%, 1.8%, respectively. **Conclusion:** This established method is simple, rapid, reliable and can be used to evaluate the quality of Flos Buddlejae.

[Key words] Flos Buddlejae; acteoside; linarin; RP-HPLC

[收稿日期] 20131115(004)

[基金项目] 湖南省中医药管理局科研计划项目(2010036)

[第一作者] 朱露, 硕士生, 从事中药制剂及质量控制的研究, Tel: 13787299362, E-mail: Wszl9722@163.com

[通讯作者] * 雷鹏, 副教授, 硕士生导师, 从事中药新药研发及中药质量控制研究, Tel: 0731-84327584, E-mail: lp7222003@163.com

[参考文献]

- [1] 潘胜利, 顺庆生, 柏巧明, 等. 中国药用柴胡原色图志[M]. 上海: 上海科学技术文献出版社, 2002: 09.
- [2] 四川省食品药品监督管理局. 四川省中药材标准[M]. 成都: 四川科学技术出版社, 2010: 250.

- [3] 熊哈晖, 蔡光明, 黄鹤慧, 等. 藏柴胡地上部分有效成分提取工艺的研究[J]. 中南药学, 2007, 5(3): 214.
- [4] 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: 263.

[责任编辑 顾雪竹]

密蒙花为马钱科植物密蒙花的干燥花蕾及花序,是一种传统中药,史载于《开宝本草》,之后的眼科著作多有记载,现载于2010年版《中国药典》。其味甘、性微寒,主入肝、胆之经,有清热养肝、明目退翳之功^[1],现代中医临床上常用于治疗“干眼症”、“糖尿病视网膜病变”等症,疗效显著^[2-4]。

密蒙花主要含黄酮类、苯乙醇苷类成分,黄酮类成分具有抗炎、降血糖等活性,苯乙醇苷类成分具有抗炎、免疫调节等作用^[5-6]。研究表明黄酮类成分因化学结构与性激素有相似性,可通过拟激素样作用来治疗性激素水平下降致使的干眼症^[7-8];抗炎活性可以减少炎症因子对眼表正常结构的损害(无论是干眼症还是糖尿病视网膜病变,病变过程都伴有炎症反应);此外黄酮类成分的降糖作用可延缓糖尿病并发症的发生,苯乙醇苷的免疫调节作用可通过增强机体免疫加强组织修复来对抗眼部疾病的发展^[9-13]。可见,黄酮类成分、苯乙醇苷类成分可视为是密蒙花发挥临床疗效的物质基础。黄酮类、苯乙醇苷类成分中,蒙花苷、毛蕊花苷含量显著高于其他成分含量,可视为代表性成分^[14-15]。2010年版《中国药典》中仅规定了蒙花苷的含量,基于中药多成分多靶点作用特点,本文同时测定密蒙花中蒙花苷、毛蕊花苷含量,为进一步完善密蒙花的质量控制体系提供一定的参考依据。

1 仪器与试剂

Agilent 1100 系列液相色谱仪器(配 G1311A 四元梯度泵、G1313A 自动进样器、G1311A 柱温箱、G1313A 二极管阵列检测器,美国安捷伦科技有限公司),AG285 型电子天平(梅特勒-托利多上海有限公司)。

实验所选药材为各地市售药材,经中南大学湘雅医院药剂科雷鹏副教授鉴定为马钱科植物密蒙花 *Buddleja officinalis* Maxim. 的干燥花蕾。

毛蕊花苷(批号 MUST-12030806)、蒙花苷(批号 MUST-11082801)对照品均购自成都曼思特生物科技有限公司,乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

2 方法和结果

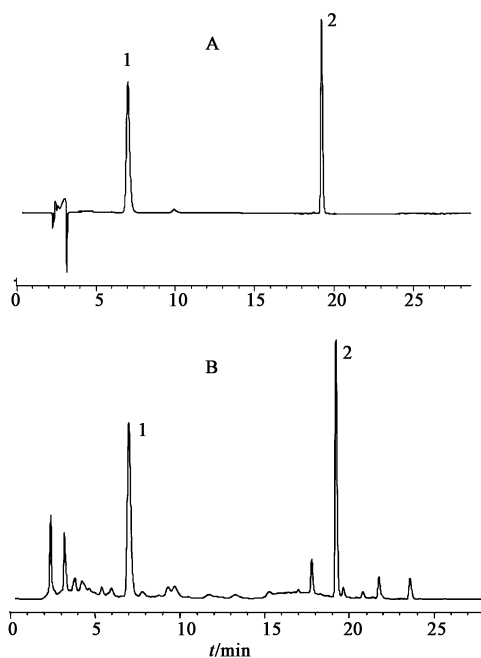
2.1 溶液的制备

2.1.1 对照品溶液制备 精密称取毛蕊花苷、蒙花苷对照品 7.95, 2.58 mg, 分别置于 50, 100 mL 量瓶中,加入一定量甲醇溶解(蒙花苷对照品加热超声溶解),定容,制得每 1 mL 含 159.0 μg 毛蕊花苷、25.8 μg 蒙花苷的对照品储备液。分别吸取上述对

照品储备液 5, 10 mL 至 25 mL 量瓶中,甲醇定容,摇匀,制成每 1 mL 含毛蕊花苷 31.80 μg 、蒙花苷 10.32 μg 的混合溶液。

2.1.2 供试品溶液制备 按照《中国药典》2010 年版一部附录高效液相色谱法试验,对样品进行均匀取样,将密蒙花干燥并粉碎,过三号筛,取密蒙花粉末约 50 mg,精密称定,置 25 mL 量瓶中,加入约 20 mL 90% 甲醇,超声提取 30 min,放冷至室温,加 90% 甲醇定容至刻度,摇匀,滤过,取续滤液作为供试品溶液,进样前用 0.45 μm 微孔滤膜过滤。

2.2 色谱条件 Promosil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm \times 250 mm, 5 μm),流动相乙腈(A)-0.1% 磷酸溶液(B)梯度洗脱(0~10 min, 20% A; 10~20 min, 20%~40% A; 30 min, 60% A),流速 1.0 mL \cdot min⁻¹,检测波长 327 nm,柱温 25 $^{\circ}\text{C}$ 。理论塔板数毛蕊花苷、蒙花苷均不低于 5 000,毛蕊花苷、蒙花苷分离度均 > 1.5,见图 1。



A. 混合对照品; B. 供试品; 1. 毛蕊花苷; 2. 蒙花苷

图 1 密蒙花 HPLC

2.3 线性范围考察 分别精密移取 2.1.1 项下毛蕊花苷对照品储备液 0.5, 1, 2, 4, 6, 8 μL , 蒙花苷对照品储备液 2, 4, 8, 10, 12, 16 μL 注入高效液相色谱仪,按 2.2 项色谱条件测定,记录色谱图。以进样量(X)为横坐标,峰面积(Y)为纵坐标绘制标准曲线,得回归方程 $Y_{\text{毛蕊花苷}} = 1\,301X + 42.692$ ($r = 0.999\,3$), $Y_{\text{蒙花苷}} = 2\,016.3X + 19.51$ ($r = 1.000\,0$)。结果表明毛蕊花苷进样量在 0.079 5 ~ 1.272 0 μg 、蒙花苷进样量在 0.051 6 ~ 0.412 8 μg 与峰面积呈良好的线

性关系。

2.4 精密度试验 精密吸取混合对照品溶液 10 μL , 在 2.2 项色谱条件下连续进样 6 次, 记录峰面积值。计算毛蕊花苷、蒙花苷峰面积的 RSD 分别为 0.89%, 0.47%, 结果表明仪器精密度良好。

2.5 稳定性试验 精密吸取同一供试品溶液(四川, 高新), 于制备后 0, 4, 6, 8, 12, 24 h 各进样 10 μL , 在 2.2 项色谱条件下记录毛蕊花苷、蒙花苷峰面积。结果供试品溶液中毛蕊花苷、蒙花苷峰面积的 RSD 分别为 1.47%, 1.34%, 表明供试品试液在 24 h 内稳定性较好。

2.6 重复性试验 精密称取同一样品 6 份(四川, 高新), 按 2.1.2 项下方法制备供试品试液, 注入高效液相色谱仪, 进样体积 10 μL , 在 2.2 项色谱条件下测定, 外标法计算, 毛蕊花苷的平均质量分数为 1.62%、蒙花苷的平均质量分数为 0.79%, RSD 分别为 1.41%, 0.24%, 结果表明该方法重复性良好。

2.7 加样回收率试验 取密蒙花粉末约 25 mg(四川, 高新), 精密称定, 共 6 份, 分别精密移取毛蕊花苷对照品储备液 3.5 mL、蒙花苷对照品储备液 6.8 mL 于 25 mL 量瓶中, 按 2.1.2 项下方法制备, 在 2.2 项下色谱条件测定。见表 1。

表 1 密蒙花中 2 种成分加样回收率试验

成分	样品中量 / μg	加入量 / μg	测得量 / μg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
毛蕊花苷	408.24	556.50	987.71	104.1	100.8	2.2
	409.86	556.50	983.60	101.9		
	411.48	556.50	975.38	101.3		
	406.62	556.50	969.02	100.8		
	416.34	556.50	961.17	99.1		
	416.34	556.50	959.67	97.6		
蒙花苷	196.56	175.44	383.26	106.4	103.1	1.8
	197.34	175.44	376.18	101.9		
	198.12	175.44	380.24	103.8		
	195.78	175.44	374.62	101.9		
	200.46	175.44	382.01	103.5		
	200.46	175.44	378.16	101.3		

2.8 样品含量测定 分别取不同产地的 22 批药材, 按 2.1.2 项下方法制备, 进样体积 10 μL , 在 2.2 项色谱条件下进样测定, 外标法计算, 各批药材中毛蕊花苷、蒙花苷的含量见表 2。

表 2 22 批次密蒙花样品中毛蕊花苷、蒙花苷的含量测定 ($n=2$)

No.	产地	批号	毛蕊花苷	蒙花苷
1	湖南	110378	1.01	0.94
2	云南	20120601	3.42	0.70
3	湖北	110331	0.87	0.80
4	广西	11062701	1.03	1.04
5	湖北	2011032905	2.63	0.81
6	湖北	-	4.62	0.81
7	四川	20090809	1.10	1.05
8	湖北	100448	3.06	1.00
9	湖南	2012050708	1.52	0.79
10	四川(高新)	-	1.62	0.79
11	湖北	110601	2.07	0.81
12	河北	20120510	2.56	0.98
13	湖北	120819	2.55	0.74
14	陕西	20130224	1.25	1.23
15	湖北	2012063007	1.28	0.64
16	湖北	1205007	2.26	1.04
17	广西	20130218	2.20	1.18
18	湖北	2011103105	1.72	0.88
19	广西	71001	1.89	1.16
20	湖南	110378	1.36	0.83
21	四川	100311	0.59	0.52
22	广西	121212	0.87	0.79

3 讨论

考察了甲醇-水、乙腈-水系统, 发现黏度较小、洗脱能力较强的乙腈-水系统可以缩短保留时间, 且各峰分离度显著提高, 故选乙腈-水系统; 为了进一步改善峰形, 加入一定量磷酸, 故采用乙腈-水(0.1% 磷酸)系统作流动相, 各峰分离度均 > 1.5 , 且峰形对称。由于毛蕊花苷、蒙花苷结构差异较大, 等度洗脱耗时, 故选择梯度洗脱(0 ~ 10 min, 20% A; 10 ~ 20 min, 20% ~ 40% A; 30 min, 60% A)。分别取毛蕊花苷和蒙花苷的对照品溶液在 200 ~ 500 nm 进行紫外扫描, 发现毛蕊花苷在 334 nm 处有最大吸收, 蒙花苷在 327 nm 处有最大吸收, 本实验选择 327 nm 为测定波长。

采用超声提取法对 60%, 70%, 80%, 90%, 100% 的甲醇、乙醇进行比较, 发现同浓度甲醇的提取率略高于乙醇; 甲醇的体积分数越高提取率越高, 80% 的甲醇提取率达到最大, 考虑到 90% 甲醇作提取溶剂目标成分峰面积相当, 但色谱峰分离情况较好, 故选用 90% 甲醇作为提取溶剂。考察了超声和加热回流两种提取方法, 结果显示超声处理效果较

好,提取率高,且操作简便,故选择超声提取。

由图1可见密蒙花药材中毛蕊花苷、蒙花苷的含量明显高于其他成分含量。表2数据可知,各地市售密蒙花药材中毛蕊花苷的含量较高,普遍高于蒙花苷的含量,毛蕊花苷平均质量分数为1.89%,蒙花苷的平均质量分数为0.89%,毛蕊花苷含量约为蒙花苷2倍;蒙花苷的含量分布较均匀,而不同批次间毛蕊花苷含量差异较大,并且毛蕊花苷含量变化与蒙花苷的含量变化没有相关性,这种差异除了考虑与产地有关,还可能与毛蕊花苷本身结构稳定性有关,其更易受炮制方法、贮存条件等影响,这还有待于进一步验证。

本文以蒙花苷、毛蕊花苷这两种代表性成分为效标成分,综合评价密蒙花的质量,为进一步完善密蒙花药材质量标准体系提供了一定参考。

[参考文献]

- [1] 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,2010:308.
- [2] 彭清华,姚小磊,吴权龙,等. 密蒙花提取物对去势雄兔干眼症的预防作用[J]. 中华眼科杂志,2008,44(11):1011.
- [3] 接传红,高健生,严京,等. 密蒙花方对单纯型糖尿病视网膜病变患者视网膜功能的影响[J]. 中国中医眼科杂志,2013,23(3):323.
- [4] 宋剑涛,高健生,接传红,等. 密蒙花方干预早期糖尿病视网膜病变初步疗效报告[J]. 中国中医眼科杂志,2010,20(5):225.
- [5] 韩澎,崔亚君,郭洪祝,等. 密蒙花化学成分及其活性研究[J]. 中草药,2004,35(10):12.
- [6] 郭雷,朱文成,刘超. 密蒙花化学成分及生物活性研究进展[J]. 食品研究与开发,2012,33(7):222.
- [7] 彭清华,姚小磊,吴权龙,等. 密蒙花提取物滴眼剂对实验性干眼症大鼠泪腺组织雄激素受体数量的影响[J]. 中国中西医结合杂志,2012,32(1):72.
- [8] McVey M J, Cooke G M, Curran IH, et al. Increased serum and testicular androgen levels in F1 rats with lifetime exposure to soy isoflavones [J]. Reprod Toxicol, 2004,18(5):677.
- [9] 吴正正,严京,高健生,等. 密蒙花方对缺氧状态下人血管内皮细胞细胞周期的影响[J]. 中国中医眼科杂志,2012(1):5.
- [10] YAO Xiao-lei, PENG Qing-hua, PENG-Jing, et al. Effects of extract of *Buddleja officinalis* on partial inflammation of lacrimal gland in castrated rabbits with dry eye[J]. Int J Ophthalmol, 2010, 3(2):114.
- [11] 刘绍燕. 密蒙花方防治糖尿病视网膜病变 TGF- β /Smad 信号转导机制研究[D]. 北京:中国中医科学院,2009.
- [12] 彭清华,姚小磊,吴权龙,等. 密蒙花提取物滴眼剂对实验性干眼症大鼠泪腺组织细胞凋亡的影响[J]. 中西医结合学报,2010,8(3):244.
- [13] 吴正正. 密蒙花方防治糖尿病视网膜病变 VEGF 信号转导机制研究[D]. 北京:中国中医科学院,2008.
- [14] 韩澎,崔亚军,郭洪祝,等. RP-HPLC法测定密蒙花中毛蕊花苷的含量[J]. 中草药,2003,34(12):30.
- [15] 王军宪,李教社,杨广德,等. 高效液相色谱法测定密蒙花中蒙花苷的含量[J]. 药物分析杂志,2001,21(2):103.

[责任编辑 顾雪竹]