

UPLC 测定醉鱼草不同部位中 4 种黄酮类成分

李正¹, 吴德玲^{1,2*}, 赵宏苏¹, 许凤清¹, 张伟¹

(1. 安徽中医药大学药学院, 合肥 230012;
2. 安徽省现代中药重点实验室, 合肥 230012)

[摘要] **目的:**建立超高效液相色谱(UPLC)同时测定醉鱼草 *Buddleja lindleyana* 茎、叶、花、果实中蒙花苷、木犀草素、金合欢-7-O-β-D-葡萄糖苷、金合欢素 4 种黄酮类成分含量方法,比较在醉鱼草各个部位中 4 种成分的分布情况。**方法:**采用 Waters Acquity BEH C₁₈ 色谱柱(2.1 mm × 50 mm, 1.7 μm),流动相乙腈-0.1% 甲酸水溶液(梯度洗脱),流速 0.15 mL·min⁻¹,检测波长 330 nm,柱温 30 °C,进样体积 2 μL。**结果:**蒙花苷、木犀草素、金合欢-7-O-β-D-葡萄糖苷和金合欢素的进样量分别在 0.002 0~0.600 3 μg ($r = 0.999\ 7$), 0.000 4~0.040 1 μg ($r = 0.999\ 9$), 0.000 4~0.039 9 μg ($r = 0.999\ 9$), 0.000 2~0.020 0 μg ($r = 0.999\ 9$) 和峰面积呈良好的线性关系,仪器精密度及方法重复性均良好,符合定量测定要求。平均回收率分别为 100.2%, 97.1%, 94.3%, 92.4%, RSD 分别为 0.7%, 1.1%, 2.3%, 1.9%。**结论:**4 种黄酮类成分含量在醉鱼草不同部位存在较大差异,其中醉鱼草花中 4 种黄酮总含量最高,通过比较各不同部位成分的含量差异,为醉鱼草的进一步开发利用提供实验依据。该检测方法操作简单,分离效果好,灵敏度高,可用于醉鱼草不同部位中多个黄酮成分的含量测定。

[关键词] 醉鱼草; 蒙花苷; 木犀草素; 金合欢-7-O-β-D-葡萄糖苷; 金合欢素; 茎; 叶; 花; 果实

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)06-0074-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017060074

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20161228.1343.056.html>

[网络出版时间] 2016-12-28 13:43

Determination of Contents of Four Flavonoids in Different Parts of *Buddleja lindleyana* by UPLC

LI Zheng¹, WU De-ling^{1,2*}, ZHAO Hong-su¹, XU Feng-qing¹, ZHANG Wei¹

(1. Faculty of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012, China;
2. Anhui Key Laboratory of Modern Chinese Medicine, Hefei 230012, China)

[Abstract] **Objective:** To develop a UPLC method for the determination of linarin luteolin, acacia-7-O-β-D-glucopyranoside and acacetin contents in different parts (stem, leaf, flower and fruit) of *Buddleja lindleyana*, and compare the distribution of 4 kinds of flavonoids in different parts of *B. lindleyana*. **Method:** The optimal conditions of separation and detection were achieved on an Acquity BEH C₁₈ column (2.1 mm × 50 mm, 1.7 μm), with acetonitrile (A) - 0.1% formic acid solution (B) as the mobile phase for gradient elution, at a flow rate of 0.15 mL·min⁻¹, with a detection wavelength of 330 nm. The column temperature was 30 °C and sample volume was 2 μL. **Result:** Linarin, luteolin, acacia-7-O-β-D-glucopyranoside and acacetin showed a good linearity in the range of 0.002 0-0.600 3 ($r = 0.999\ 7$), 0.000 4-0.040 1 ($r = 0.999\ 9$), 0.000 4-0.039 9 ($r = 0.999\ 9$) and 0.000 2-0.020 0 μg ($r = 0.999\ 9$) respectively. Their average recoveries were 100.2%, 97.1%, 94.3% and 92.4%. **Conclusion:** The method was accurate and simple with high repeatability and stability, and

[收稿日期] 20160523(002)

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81373841)

[第一作者] 李正,在读硕士,从事中药活性成分研究,Tel:15255473258,E-mail:liger808@sina.com

[通讯作者] * 吴德玲,硕士,教授,硕士生导师,从事中药活性成分研究、中药质量评价研究和中药新药的研究与开发,Tel:0551-68120166,E-mail:dlwu7375@sina.com

can be used for the determination of multiple flavonoids in different parts of *B. lindleyana*.

[Key words] *Buddleja lindleyana*; linarin; luteolin; acacia-7-O- β -D-glucopyranoside; acacetin; stem; leaf; flower; fruit

醉鱼草为马钱科的一种落叶灌木,为民间常用的中草药,具有祛风除湿、止咳化痰、散瘀之功效^[1]。本课题组对醉鱼草果实中化学成分进行了系统研究,发现其化学成分复杂多样^[2-5],主要含有黄酮类、苯丙素类、三萜类、苷类等。据文献报道,其中含有的多种黄酮类成分具有良好的药理活性。蒙花苷对金黄色葡萄球菌和乙型溶血链球菌具有一定的抑制作用^[6];木犀草素具有明确的抗菌作用^[7];金合欢-7-O- β -D-葡萄糖苷具有一定的抗氧化作用^[8];金合欢素具有很好的抑制房颤的作用,可作用于人的肝癌细胞系的增殖阶段 G2,诱导细胞的凋零,促成细胞周期的停滞同时又具有抗艾滋病毒的作用^[9-10]。这些黄酮类药理活性与醉鱼草临床应用一致,因此以黄酮类成分为指标评价醉鱼草药材质量较为科学、合理。从植物的次生代谢来说,不同部位的化学成分含量可能存在一定差异。关于醉鱼草中黄酮类成分测定文献报道较少,陈以军等^[11]利用 HPLC 测定醉鱼草果实中木犀草素的含量,应程等^[12]利用金属离子络合对大叶醉鱼草和巴东醉鱼草的不同部位总黄酮含量进行测定。为更加全面、快速、准确地评价醉鱼草药材质量,本研究在前期研究的基础上通过 UPLC 方法对醉鱼草茎、叶、花、果实 4 种不同部位中蒙花苷、木犀草素、金合欢-7-O- β -D-葡萄糖苷、金合欢素黄酮类成分的含量进行测定,为客观评价醉鱼草药材质量、合理探讨用药部位,综合开发利用醉鱼草资源提供科学依据。

1 材料

Acquity H-Class 型超高压液相色谱仪(UPLC, 美国 Waters 公司,包括四元高压梯度泵,真空脱气机,自动进样器,柱温箱,二极管阵列检测器,Empower3 色谱工作站),BP210S 型电子天平(德国 Sartorius 公司),AB135-S 型 1/10 万天平(瑞士 Mettler Toledo 仪器有限公司),Milli-Q Advantage A10 型一体式超纯水机(美国 Milipore 公司),WL-100 型打粉机(瑞安市威力制药机械厂),KQ-250VDE 型三频数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

蒙花苷、木犀草素、金合欢-7-O- β -D-葡萄糖苷、金合欢素对照品均为自制(经核磁和质谱鉴定,采用峰面积归一化法计算,纯度均 > 98%);乙腈、甲

醇(色谱纯,德国 Merck 公司),甲酸(分析纯,天津市永大化学试剂有限公司),水(超纯水)。

醉鱼草药材 2014 年采自安徽省无为县,共采 3 批。第一批记为茎 1,叶 1,花 1,果实 1;第二批记为茎 2,叶 2,花 2,果实 2;第三批记为茎 3,叶 3,花 3,果实 3。经安徽中医药大学药学院刘守金教授鉴定为马钱科植物醉鱼草 *Buddleja lindleyana* 的茎、叶、花、果实。

2 方法与结果

2.1 色谱条件及系统适应性 AcquityBEH C₁₈ 色谱柱(2.1 mm × 50 mm, 1.7 μ m);流动相乙腈(A)-0.1% 甲酸水(B)溶液,梯度洗脱(0~5 min, 72%~70% B; 5~5.5 min, 70%~30% B; 5.5~8 min, 30% B; 8~8.1 min, 30%~0% B; 8.1~12 min, 0% B);流速 0.15 mL·min⁻¹,检测波长 330 nm,柱温 30 $^{\circ}$ C,进样体积 2 μ L。在上述条件下,样品中各对照品与其他组分基本达到基线分离。结果见图 1。

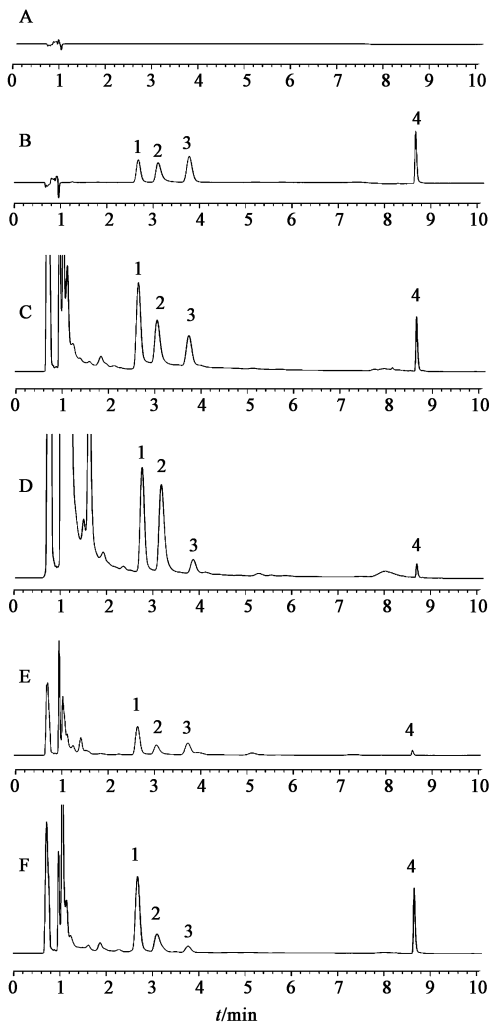
2.2 样品制备

2.2.1 对照品溶液制备 取蒙花苷、木犀草素、金合欢-7-O- β -D-葡萄糖苷、金合欢素对照品适量,精密称定,分别置于 10 mL 棕色量瓶中,加甲醇溶解,定容。分别制成含蒙花苷 2.01 g·L⁻¹,木犀草素 0.60 g·L⁻¹,金合欢-7-O- β -D-葡萄糖苷 0.74 g·L⁻¹,金合欢素 1.08 g·L⁻¹的对照品储备液。储存于 4 $^{\circ}$ C 的冰箱中,备用。

2.2.2 供试品溶液制备 称取醉鱼草药材茎、叶、花、果实粉末(过 4 号筛)各 1.0 g,精密称定,加甲醇 20 mL 回流提取 3 次,每次 1 h,合并浓缩滤液,加甲醇定容至 100 mL,用 0.22 μ m 微孔滤膜滤过,即得。

2.3 方法学考察

2.3.1 线性关系考察 精密吸取各对照品储备液适量于量瓶中配制成含蒙花苷、木犀草素、金合欢-7-O- β -D-葡萄糖苷、金合欢素的质量浓度分别为 300, 149, 60.081, 59.919, 29.994 mg·L⁻¹的混合对照品溶液,按 3, 6, 12, 30, 60, 300 倍依次稀释,得系列混合对照品。蒙花苷质量浓度依次为 100.050, 50.025, 25.013, 10.005, 5.003, 1.000 mg·L⁻¹;木犀草素的质量浓度依次为 20.027, 10.014, 5.007, 2.003, 1.001, 0.200 mg·L⁻¹;金合欢-7-O- β -D-葡萄



A. 空白; B. 对照品; C. 茎; D. 果实; E. 花; F. 叶; 1. 蒙花苷; 2. 木犀草素; 3. 金合欢-7-O-β-D-葡萄糖苷; 4. 金合欢素

图 1 醉鱼草不同部位 UPLC

Fig. 1 UPLC of different part of *Buddleja lindleyana*

糖苷的质量浓度依次为 19.973, 9.987, 4.993, 1.997, 0.999, 0.200 mg·L⁻¹; 金合欢素的质量浓度依次为 9.998, 4.999, 2.500, 0.998, 0.500, 0.100 mg·L⁻¹。按 2.1 项下色谱条件进样, 以其峰面积为纵坐标(Y), 进样量为横坐标(X), 进行回归分析, 结果见表 1。

2.3.2 精密度试验 取蒙花苷、木犀草素、金合欢-7-O-β-D-葡萄糖苷、金合欢素混合对照品溶液, 按 2.1 项下色谱条件, 连续进样 6 次, 计算峰面积的 RSD, 4 种成分峰面积的 RSD 分别为 0.8%, 1.9%, 0.9%, 0.2%。结果表明仪器精密度良好, 符合定量测定要求。

2.3.3 重复性试验 精密量取同一样品(果实 1) 6 份, 按 2.2.2 项下的方法操作, 在上述色谱条件下分析测定。蒙花苷、木犀草素、金合欢-7-O-β-D-葡萄

表 1 醉鱼草中 4 个黄酮类成分的回归方程和线性范围

Table 1 Regression equations and linear ranges of four flavonoid components in *Buddleja lindleyana*

成分	回归方程	r	线性范围/μg
蒙花苷	$Y = 2\,535\,471.87X - 6\,130.8$	0.999 7	0.002 0 ~ 0.600 3
木犀草素	$Y = 16\,858\,747.96X + 2\,402.8$	0.999 9	0.000 4 ~ 0.040 1
金合欢-7-O-β-D-葡萄糖苷	$Y = 17\,068\,811.87X - 7\,092.3$	0.999 9	0.000 4 ~ 0.039 9
金合欢素	$Y = 24\,076\,248.46X - 56.449$	0.999 9	0.000 2 ~ 0.020 0

糖苷、金合欢素的平均质量分数分别为 1.234%, 0.125%, 0.012%, 0.009%。RSD 分别为 1.5%, 0.8%, 1.1%, 1.2%。符合定量测定要求。

2.3.4 稳定性试验 取混合对照品溶液, 于室温下放置, 分别在 0, 1, 2, 4, 8, 12, 24 h 进样。结果表明, 所测 4 种成分在 24 h 内稳定。蒙花苷、木犀草素、金合欢-7-O-β-D-葡萄糖苷、金合欢素的 RSD 分别为 1.5%, 1.6%, 1.0%, 1.7%, 符合定量测定要求。

2.3.5 加样回收率试验 取同一批(果实 1) 已测定样品 6 份, 每份约 0.5 g, 精密称定, 分别精密加入含蒙花苷 3.131 5 g·L⁻¹, 木犀草素 0.326 0 g·L⁻¹, 金合欢-7-O-β-D-葡萄糖苷 0.032 5 g·L⁻¹, 金合欢素 0.012 5 g·L⁻¹ 的对照品溶液各 2 mL, 按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液, 按 2.1 项下色谱条件进样, 计算回收率。结果见表 2。

2.4 样品测定 取同一产地 3 批醉鱼草药材的茎、叶、花、果实 4 个不同部位样品, 按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液, 在上述的色谱条件下依次进样测定, 结果见表 3。

3 讨论

在对流动相体系筛选过程中^[13-14], 先后考察了甲醇-水, 乙腈-水, 甲醇-0.1% 磷酸水溶液和乙腈-0.1% 磷酸水溶液 4 种系统, 结果表明乙腈-0.1% 磷酸水溶液系统洗脱, 色谱峰基线稳定, 分离度好。分别对提取溶剂(甲醇, 50% 甲醇, 70% 甲醇, 无水乙醇, 50% 乙醇, 70% 乙醇), 提取方法(回流、超声), 提取时间(20, 40, 60 min) 和溶剂用量(20, 40, 60, 80 mL) 进行了考察, 结果表明, 甲醇 20 mL 回流提取 3 次, 每次 1 h, 可以使得 4 种成分均达到较高的提取效率。

对同一产地不同批次醉鱼草药材的茎、叶、花、果实中蒙花苷、木犀草素、金合欢-7-O-β-D-葡萄糖苷、金合欢素的含量进行了测定。由测定结果可知, 不同批次的醉鱼草药材中同一种成分含量变化不

表 2 醉鱼草中 4 种成分的加样回收率试验

Table 2 Recovery of four compounds of *Buddleja lindleyana*

成分	称样量 /g	样品中量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	平均回收 率/%	RSD /%
蒙花苷	0.502 4	6.266	6.263	12.504	100.2	0.7
	0.502 6	6.267	6.263	12.512		
	0.502 3	6.264	6.263	12.521		
	0.502 2	6.263	6.263	12.605		
	0.502 3	6.264	6.263	12.581		
	0.501 6	6.255	6.263	12.495		
木犀草素	0.576 7	0.658	0.652	1.298	97.1	1.1
	0.591 5	0.674	0.652	1.299		
	0.580 7	0.662	0.652	1.297		
	0.579 0	0.660	0.652	1.302		
	0.587 1	0.669	0.652	1.298		
	0.582 4	0.664	0.652	1.292		
金合欢- 7-O-β-D 葡萄糖苷	0.443 3	0.067	0.065	0.127	94.3	2.3
	0.456 6	0.069	0.065	0.131		
	0.436 0	0.065	0.065	0.127		
	0.438 6	0.066	0.065	0.126		
金合欢素	0.446 6	0.067	0.065	0.130		
	0.452 0	0.068	0.065	0.129		
	0.475 0	0.029	0.025	0.051 2	92.4	1.9
	0.470 0	0.028	0.025	0.050 8		
	0.458 3	0.028	0.025	0.051 3		
	0.447 0	0.027	0.025	0.050 1		
0.441 0	0.027	0.025	0.049 5			
0.473 0	0.028	0.025	0.051 6			

表 3 醉鱼草样品不同部位中 4 种成分含量测定

Table 3 Content determination results of different part of *Buddleja lindleyana* %

样品	蒙花苷	木犀草素	金合欢-7-O-β-D 葡萄糖苷	金合欢素
茎 1	1.639	0.015	0.003	0.003
茎 2	1.617	0.014	0.002	0.003
茎 3	1.662	0.017	0.003	0.001
叶 1	2.385	0.270	0.018	0.021
叶 2	2.345	0.277	0.016	0.019
叶 3	2.425	0.284	0.014	0.022
花 1	3.313	0.043	0.129	0.010
花 2	3.437	0.044	0.136	0.012
花 3	3.326	0.041	0.125	0.011
果实 1	1.247	0.114	0.015	0.006
果实 2	1.405	0.139	0.016	0.009
果实 3	1.253	0.132	0.013	0.008

大,各成分在醉鱼草不同部位存在很大差异。蒙花苷在茎、叶、花、果实中含量变化趋势为花 > 叶 > 茎 > 果;木犀草素在茎、叶、花、果实中含量变化趋势为叶 > 果 > 花 > 茎;金合欢-7-O-β-D 葡萄糖苷在茎、叶、花、果实中含量变化趋势为花 > 叶 > 果 > 茎;金合欢素在茎、叶、花、果实中含量变化趋势为叶 > 花 > 果 > 茎。样品中 4 种黄酮总含量以花中最高。

本实验方法操作简单,分离效果好,灵敏度高,通过比较各不同部位成分的含量差异,为醉鱼草的进一步开发利用提供实验依据。2015 年版《中国药典》尚未收录醉鱼草,其质量评价标准空白,该 4 种黄酮类成分含量检测方法可为醉鱼草药材质量控制提供参考依据。

[参考文献]

[1] 江苏新医学院. 中药大词典. 下册[M]. 上海:上海科学技术出版社,1986:1128-1129.

[2] 吴培云,任亚硕,吴德玲,等. HPLC-DLSD 同时测定不同产地醉鱼草果实中 3 种三萜皂苷的含量[J]. 中国中药杂志,2016,41(7):1218-1221.

[3] WU D L, WANG Y K, LIU J S, et al. Two new compounds from the fruits of *Buddleja lindleyana* with neuroprotective effect[J]. J Asian Nat Prod Res, 2012, 14(4):342-347.

[4] 汪洋奎,吴德玲,刘劲松,等. 醉鱼草果实的化学成分研究: I [J]. 安徽中医学院学报,2010,29(6):71-72.

[5] 吴德玲,汪洋奎,刘劲松. 醉鱼草果实的化学成分研究 II [J]. 中成药,2011,33(12):2107-2109.

[6] 谢玉峰,张秀云,魏志平,等. 巴东醉鱼草提取物抑菌活性研究[J]. 西北农业学报, 2016, 25(1):142-146.

[7] 姚新生. 天然药物化学[M]. 3 版. 北京:人民卫生出版社,2002:173.

[8] 孙静. 河北香菊中黄酮类化合物抗氧化活性研究[D]. 石家庄:河北医科大学,2010:2-3.

[9] Hsu Y L, Kuo P L, LIN C C. Acacetin in-hibits the proliferation of HepG2 by blocking cell cycle progression and inducing apoptosis[J]. Biochem Pharmacol, 2004, 67(5):823-829.

[10] 赵声兰,陈朝银. 天然食物中的抗艾滋病有效成分[J]. 食品与机械,2007,23(3):166-170.

[11] 陈以军,任亚硕,吴德玲,等. 反相高效液相色谱法测定醉鱼草果实中木犀草素的含量[J]. 安徽中医药大学学报,2014,33(4):87-88.

[12] 应程. 醉鱼草属两种植物药的鉴定与黄酮类成分含量测定[D]. 武汉:中南民族大学,2012:46-54.

[13] 安杉杉,陈燕忠,林世源,等. HPLC 测定脱脂紫苏子中迷迭香酸和木犀草素的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(22):66-68.

[14] 常安,王维宁,郝延军,等. UPLC 测定峡山野豌豆中 6 中成分的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2016,22(9):48-51.

[责任编辑 顾雪竹]