

· 化学与分析 ·

UPLC 测定全缘叶绿绒蒿花中 3 种黄酮类成分

向海燕¹, 黄艳菲^{2,3}, 金乾¹, 刘圆^{2*}

(1. 西南民族大学药学院, 成都 610041; 2. 西南民族大学民族医药研究院, 成都 610041;
3. 湖北中医药大学教育部中药资源和中药复方重点实验室, 武汉 430065)

[摘要] 目的:采用 UPLC 测定 11 批全缘叶绿绒蒿花中槲皮素-3-*O*- β -D-葡萄糖-(1 \rightarrow 6)- β -D-葡萄糖苷(M1), 槲皮素-3-*O*-[2''-*O*-乙酰基- β -D-葡萄糖-(1 \rightarrow 6)- β -D-葡萄糖苷](M2)和异槲皮苷(M3)的含量。方法:采用超声提取法,提取溶剂为体积分数 90% 甲醇,提取时间为 45 min,对全缘叶绿绒蒿样品进行处理。色谱柱为 ACQUITY UPLC HSS T3(2.1 mm \times 100 mm, 1.8 μ m),流速 300 μ L \cdot min⁻¹,柱温 35 $^{\circ}$ C,检测波长 255 nm,以乙腈-0.1% 冰乙酸水(16:84)为流动相,洗脱时间 10 min。结果:在 11 批全缘叶绿绒蒿花样品中,不同产地、不同采集时间的样品所含有的 3 种黄酮类化学成分含量各不相同,但总体上两种槲皮素葡萄糖苷含量较高,而异槲皮苷的含量较低;马尔康县梦笔山所采样品黄酮苷总含量高于其他采集地,5 月和 6 月采集的样品黄酮苷总含量高于 7 月。结论:全缘叶绿绒蒿花中所含主要化学成分含量随产地、采收月份不同而有所差异。该方法准确且具有较高灵敏度,可较准确反应全缘叶绿绒蒿花中化学成分的含量,可为全缘叶绿绒蒿花的质量评价和质量标准提高提供依据。

[关键词] 全缘叶绿绒蒿; 花; 超高压液相色谱; 黄酮

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)01-0051-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2018010051

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20171011.1350.008.html>

[网络出版时间] 2017-10-11 13:50

Determination of Three Flavonoids in Flower of *Meconopsis integrifolia* by UPLC

XIANG Hai-yan¹, HUANG Yan-fei^{2,3}, JIN Qian¹, LIU Yuan^{2*}

(1. College of Pharmacy, Southwest Minzu University, Chengdu 610041, China; 2. Ethnic Medicine Institute, Southwest Minzu University, Chengdu 610041, China; 3. Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Resource and Compound Prescription, Ministry of Education, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China)

[Abstract] **Objective:** To quantitatively analyze quercitrin-3-*O*- β -D-glucose- (1 \rightarrow 6) - β -D-glucoside (M1), quercitrin-3-*O*- [2''-*O*-acetyl- β -D-glucose- (1 \rightarrow 6) - β -D-glucoside] (M2), and isoquercitrin (M3) in 11 batches of flowers of *Meconopsis integrifolia* by ultra performance liquid chromatography (UPLC). **Method:** The ultrasonic extraction method was used with processing time of 45 min, and the extraction solvent was 90% methanol aqueous solution. ACQUITY UPLC HSS T3 chromatographic column was used at the column temperature of 35 $^{\circ}$ C, flow rate of 300 μ L \cdot min⁻¹ and the detection wavelength of 255 nm, with acetonitrile-0.1% glacial acetic acid solution (16:84) as the mobile phase for isocratic elution for 10 min. **Result:** The contents of 3 flavonoids in 11 batches of flowers of *M. integrifolia* in different regions and at different acquisition time were different. Generally,

[收稿日期] 20170514(004)

[基金项目] 国家科技支撑计划项目(2015BAC05B02);四川省科技应用基础计划项目(2014JY0181);西南民族大学教育教学研究与改革项目(2015年)

[第一作者] 向海燕,在读硕士,从事民族药品种、质量和新药资源保护与利用研究,Tel:18328593418,E-mail:1406473797@qq.com

[通信作者] *刘圆,博士,教授,从事民族药品种、质量和新药资源保护与利用研究,Tel:028-85528812,E-mail:499769896@qq.com

the contents of quercitrin were higher than the content of isoquercitrin; the total content of flavonoid glycosides in Mengbi mountain, Maerkang county was higher than that in the other regions; and the content of flavonoid glycosides from the samples collected in May and June were higher than those collected in July. **Conclusion:** The contents of main components in 11 batches of flowers of *M. integrifolia* were relevant to their origins and collection time. The method in this study could reflect the exact contents of compositions, providing reference for quality evaluation and quality standard improvement of *M. integrifolia*.

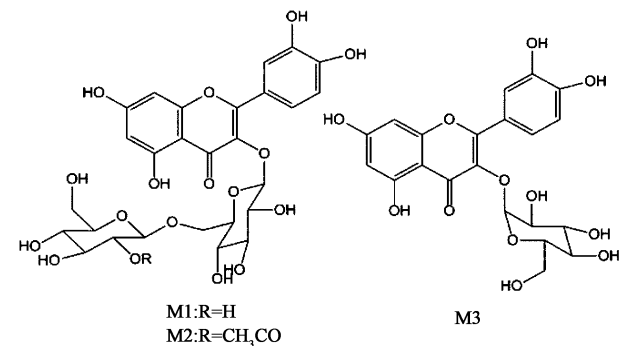
[Key words] *Meconopsis integrifolia*; flower; UPLC; flavonoids

“欧贝”来源于绿绒蒿属多种植物,根据花的颜色不同分为白花绿绒蒿、红花绿绒蒿、蓝花绿绒蒿和黄花绿绒蒿,以花入药,均具有清肝热、肺热功效。在藏族医临床使用中,根据花的颜色不同用于治疗疾病的侧重点不同,白花绿绒蒿和黄花绿绒蒿均可用于“培根”病的医治,白花绿绒蒿还可用于“培根”和“龙的”合并病,红花绿绒蒿治疗“血分”病,蓝花绿绒蒿治疗“赤巴”病^[1]。全缘叶绿绒蒿为黄花绿绒蒿的来源,又叫“欧贝赛保”。主产区为青藏高原地区的青海、四川、西藏、云南、甘肃等省区,生长于海拔3 500~5 000 m的高原地带^[1-2]。绿绒蒿在藏族地区中有悠久的历史,始载于公元八世纪的《月王药诊》,《四部医典》和《晶珠本草》均有记载。据统计,约有120个藏族药成方制剂使用绿绒蒿,用于治疗肺热咳嗽、湿热性水肿、痢疾泄泻等证^[3-5]。目前有关全缘叶绿绒蒿的研究报道较少,药理研究表明,全缘叶绿绒蒿全草提取物具有很好的抗氧化、肝保护作用;化学研究表明,全缘叶绿绒蒿全草中主要含有黄酮类成分和生物碱类成分,包括普托品碱,马齿苋酰胺E,威尔士绿绒蒿定碱,隐品碱,沙明碱,木犀草素,二氢槲皮素,洋芹素等^[6-8]。课题组前期对全缘叶绿绒蒿花的化学成分进行研究,发现花中的主要化学成分为黄酮苷,分离制备得到了4个槲皮素苷,其中2个为新化合物^[9]。绿绒蒿虽然在藏族地区有广泛应用,但其质量标准还有待完善。《部颁标准·藏药分册》记载了全缘叶绿绒蒿药材标准,对性状和显微鉴别作了要求,尚未收载含量测定项,并且全缘叶绿绒蒿花中主要活性成分的含量是多少、如何对其含量进行更合理地评价等方面工作也未见报道。为更客观、科学评价全缘叶绿绒蒿花的质量,本研究采用UPLC,以全缘叶绿绒蒿花的3个主要化学成分为指标,对不同产地、不同采集时间的全缘叶绿绒蒿花主要化学成分的含量进行分析,以期在全缘叶绿绒蒿花的质量评价、质量标准提高以及全缘叶绿绒蒿的进一步研究提供科学依据。

1 材料

ACQUITY 型超高效液相色谱仪(包括四元泵溶剂系统、自动进样系统和 PDA 检测器,美国 Waters 公司),ESJ200-4 型电子天平(沈阳龙腾电子有限公司),BT 25 S 型电子天平(Sartorius 科学仪器有限公司)。

槲皮素-3-O-β-D-葡萄糖-(1→6)-β-D-葡萄糖苷(M1),槲皮素 3-O-[2'''-O-乙酰基-β-D-葡萄糖-(1→6)-β-D-葡萄糖苷](M2)由课题组自制,经(核磁、质谱)鉴定,色谱峰面积处理(归一化法),纯度分别为98%,95%;异槲皮苷(M3)(成都曼斯特公司,批号 MUST-15070211,纯度≥98%)。色谱纯乙腈(美国 Sigma-Aldrich 公司),其他试剂均为分析纯,水为屈臣氏蒸馏水。3个指标性成分的结构式见图1。



M1. 槲皮素-3-O-β-D-葡萄糖-(1→6)-β-D-葡萄糖苷; M2. 槲皮素-3-O-[2'''-O-乙酰基-β-D-葡萄糖-(1→6)-β-D-葡萄糖苷]; M3. 异槲皮苷
图1 3个黄酮苷的化学结构式

Fig. 1 Chemical formula of three flavonoids

全缘叶绿绒蒿花样品采集于四川川西高原地区,经西南民族大学民族医药研究院刘圆教授鉴定为罂粟科全缘叶绿绒蒿 *Meconopsis integrifolia* 的花。具体样品信息见表1。

2 方法与结果

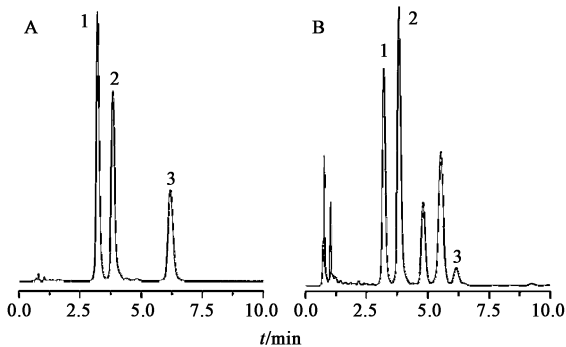
2.1 色谱条件 参考课题组的前期建立的方法^[9]。采用 ACQUITY UPLC HSS T3 色谱柱(2.1 mm×100 mm,1.8 μm),柱温35℃,检测波长255 nm,进样量2 μL,流速300 μL·min⁻¹,流动相乙腈-0.1%冰乙酸水(16:84),等度洗脱10 min。对照

表 1 全缘叶绿绒蒿花样品信息

Table 1 Sample information of *Meconopsis integrifolia* flower

No.	采集地	海拔/m	采集日期
H1	四川省阿坝州马尔康县梦笔山	4 200	2013-06-30
H2	四川省阿坝州小金县美沃乡	3 500	2014-05-10
H3	四川省阿坝州小金县巴朗山	3 980	2014-05-10
H4	四川省阿坝州红原县阿木乡龙让沟	3 700	2015-06-19
H5	四川省阿坝州小金县夹金山	3 950	2015-06-20
H7	四川省甘孜州康定县雅家埂虫草基地	3 870	2014-06-21
H8	四川省甘孜州康定县折多山二台子	4 100	2014-06-22
H9	四川省阿坝州汶川县卧龙特区	4 000	2015-06-23
H10	四川省甘孜州康定县雅家埂山顶	4 000	2014-06-21
H10	四川省甘孜州康定县雅家埂	4 000	2015-06-30
H11	四川省甘孜州康定县折多山	4 300	2015-07-04

品以及样品 UPLC 色谱见图 2。



A. 对照品; B. 样品 H4; 1. 槲皮素-3-O-β-D-葡萄糖-(1→6)-β-D-葡萄糖苷; 2. 槲皮素-3-O-[2''-O-乙酰基-β-D-葡萄糖-(1→6)-β-D-葡萄糖苷]; 3. 异槲皮苷

图 2 全缘叶绿绒蒿花 UPLC 色谱

Fig. 2 UPLC of *Meconopsis integrifolia* flower

2.2 对照品溶液的制备 分别精密称定 M1, M2

表 2 标准曲线、线性范围、检测限和定量限

Table 2 Standard curves, linear ranges, LOD and LOQ

对照品	线性范围/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	标准曲线	相关系数(r)	LOD/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	LOQ/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$
M1	0.025 04 ~ 0.500 8	$Y = 1 \times 10^7 X - 26 910$	1.000 0	0.937 5	1.812
M2	0.025 02 ~ 0.500 4	$Y = 9 \times 10^6 X - 8 280.3$	0.999 9	1.125	2.500
M3	0.006 275 ~ 0.200 8	$Y = 2 \times 10^7 X - 38 258$	0.999 9	1.255	2.500

2.6 重复性试验 取样品(H9),每份约 0.25 g,精密称定,按照 2.3 项下方法制备供试品溶液 6 份,以 2.1 项色谱条件进行分析测定。得 3 种化合物平均质量分数分别为 3.33%, 4.93%, 0.25%, RSD 分别为 3.5%, 3.2%, 3.6%。

2.7 稳定性试验 取样品溶液在室温条件下分别

和 M3 适量,用甲醇定容于 25 mL 量瓶,使对照品储备液的质量浓度分别为 0.500 8, 0.500 4, 0.200 8 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

2.3 供试品溶液的制备 精密称定全缘叶绿绒蒿花约 0.25 g,置于具塞锥形瓶中,精密加入 90% 甲醇 30 mL,称定质量,超声(45 kHz, 300 W)处理 45 min 后,放至室温,用 90% 甲醇补足减失质量,混合均匀,滤纸过滤,取经 0.22 μm 微孔滤膜过滤后的续滤液作为供试品溶液。

2.4 标准曲线绘制 分别精密吸取 M1 和 M2 对照品母液 4, 3, 2, 1, 0.5, 0.25 mL 置 5 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,得 M1 质量浓度为 0.400 6, 0.300 5, 0.200 3, 0.100 2, 0.050 08 和 0.020 54 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的对照品溶液; M2 质量浓度为 0.400 3, 0.300 2, 0.200 2, 0.100 1, 0.050 04 和 0.025 02 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的对照品溶液。精密吸取 M3 对照品母液 3.75 mL 置 5 mL 量瓶中,加甲醇定容至刻度,得质量浓度为 0.150 6 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的对照品溶液,另外取 M3 母液 2.5 mL 置于 5 mL 量瓶中,加甲醇定容至刻度,得质量浓度为 0.100 4 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的对照品溶液,再将质量浓度为 0.100 4 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的溶液依次对半稀释,得质量浓度为 0.050 20, 0.025 10, 0.012 55 和 0.006 275 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的对照品溶液;按照 2.1 项下色谱条件测定,以对照品的质量浓度为横坐标,色谱峰面积作为纵坐标,计算得出标准曲线。检测限(LOD)及定量限(LOQ)。见表 2。

2.5 精密度试验 分别取 M1, M2 和 M3 混合对照品液,按照 2.1 项下色谱条件,连续 6 次进样,根据各化合物峰面积计算出 RSD 分别为 0.8%, 0.7%, 0.9%, 说明仪器精密度符合定量测定要求。

放置 2, 3, 5, 7, 9, 12, 24 h 后进样,根据出峰面积计算 RSD 以考察样品的稳定性。结果样品中 3 种被测成分峰面积 RSD 分别为 1.1%, 1.2%, 1.5%, 表明 24 h 内样品保持稳定。

2.8 加样回收率试验 取全缘叶绿绒蒿的花样品(H3, M1 平均质量分数为 4.60%, M2 平均质量分

数为 3.54%, M3 平均质量分数为 0.62%) 粉末约 0.12 g 共 6 份, 精密称定, 分别加入适量 M1, M2 和 M3 对照品溶液, 依照 2.3 项下供试品溶液制备

方法制备样品, 以 2.1 项下色谱条件进行测定分析, 并计算各被测成分的 RSD 和加样回收率, 结果见表 3。

表 3 全缘叶绿绒蒿花中 3 种成分的加样回收率

Table 3 Recoveries of three components of *Meconopsis integrifolia* flower

成分	称样量/g	样品中量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
M1	0.126 0	5.796	6.160	12.26	104.94	105.78	2.3
	0.129 6	5.962	6.160	12.73	109.87		
	0.127 8	5.879	6.160	12.50	107.48		
	0.125 9	5.791	6.160	12.21	104.17		
	0.129 5	5.957	6.160	12.42	104.90		
	0.127 8	5.879	6.160	12.25	103.37		
M2	0.126 0	4.460	4.504	8.955	99.79	101.23	1.4
	0.129 6	4.588	4.504	9.218	102.81		
	0.127 8	4.524	4.504	9.105	101.71		
	0.125 9	4.457	4.504	8.945	99.67		
	0.129 5	4.584	4.504	9.121	100.73		
	0.127 8	4.524	4.504	9.148	102.66		
M3	0.126 0	0.781	0.858	1.539	88.32	92.61	3.6
	0.129 6	0.804	0.858	1.621	95.18		
	0.127 8	0.792	0.858	1.585	92.35		
	0.125 9	0.781	0.858	1.545	89.04		
	0.129 5	0.803	0.858	1.613	94.41		
	0.127 8	0.792	0.858	1.620	96.50		

2.9 样品含量测定 将各批全缘叶绿绒蒿花样品按照 2.3 项下方法制备供试品溶液, 以 2.1 项下色谱条件检测, 按外标法以所得峰面积计算样品中 3 个化合物含量。结果见表 4。

表 4 全缘叶绿绒蒿花样品中 3 种成分质量分数

Table 4 Contents of 3 reference substance of *Meconopsis integrifolia* flower

No.	M1	M2	M3	总量
H1	53.13	33.00	4.44	90.57
H2	28.68	23.89	6.41	58.98
H3	45.98	35.42	6.22	87.62
H4	24.83	44.43	2.24	71.49
H5	32.05	47.17	2.96	82.17
H6	24.79	36.06	1.38	62.23
H7	26.42	37.78	1.18	65.38
H8	25.27	30.08	0.82	56.16
H9	33.26	50.04	2.54	85.84
H10	33.57	24.34	2.37	60.28
H11	12.40	28.15	1.29	41.84

3 结论与讨论

对比考察了超声提取和热回流提取, 发现超声提取重复性好, 且误差更小, 因此选择超声提取方法; 对比考察了提取溶剂为不同体积分数(50%, 70%)的甲醇和乙醇时提取效果的影响, 结果发现 70% 甲醇为溶剂时提取效果最好; 考察了甲醇体积分数分别为 10%, 30%, 50%, 70%, 90% 时对提取效果的影响, 结果发现 90% 甲醇比其他溶剂的提取效果好; 考察了超声时间 15, 30, 45, 60 min 对提取效果的影响, 结果发现超声 45, 60 min 结果相近, 且效果相比超声 15, 30 min 均更好, 因此选择超声时间为 45 min。

本实验的全缘叶绿绒蒿花样品主要采集于川西高原的康定县、小金县、红原县、汶川县和马尔康县, 采收时间为 2013—2015 年, 采收月份为 5 月到 7 月。从产地来看, 3 个化合物总含量最高的是在马尔康县梦笔山和小金县巴郎山地区采集的样品, 其次是在汶川县卧龙特区巴郎山地区采集的样品, 这

些采样地区的共同特点是采集地海拔较高,采集时间为药材刚开花的5月以及开花最为茂盛的6月;从海拔高低与黄酮含量的关系来看,海拔较高的小金巴郎山地区采集的样品中比海拔较低的小金美沃乡采集的样品中黄酮的总量要高。张长现等^[10]提出,五脉绿绒蒿中木犀草素和槲皮素的含量与海拔高度呈正相关增长,可能是因为海拔不同的地区受到的光照时间及紫外强度的不同,使得植物细胞内抗氧化相关酶的合成受到影响,这种植物本身的生理适应机制使得海拔越高,其体内的黄酮类化合物的含量也越高。虽然康定县海拔也较高,且样品采集时间同为6月份,但样品中3种黄酮的总量却比小金县的样品含量低,这说明植物生长环境对次生代谢产物的积累有较明显影响。

另外,采集时间对于全缘叶绿绒蒿花中黄酮富集也有较大影响。样品中含量最低的H11样品采集于7月,而黄酮含量最高的H1和H3则采集于5、6月,这表明在植物生长茂盛的时期,植物次生代谢产物往往最易于富集;7月,全缘叶绿绒蒿花开始凋谢并开始结果,此时花中的黄酮含量开始有所下降。由此,黄酮成分含量在全缘叶绿绒蒿花中的动态积累规律有待进一步研究。

本研究采用UPLC对全缘叶绿绒蒿花中主要化学成分进行含量测定,因其含量最高的几个化合物均无现成对照品可供购买使用,因此采用自制对照品(纯度>95%)进行含量测定,且M2中的杂质峰对其他化合物的测定无影响,因此可用于测定全缘叶绿绒蒿花中主要黄酮类成分的含量,以弥补至今尚无文献对全缘叶绿绒蒿花进行研究的空白。除样品H1和H4外,在其他9个样品中,发现含有少量的M2(querletin 3-O-[2''-O-acetyl]- β -D-glucose-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucoside])的一个同分异构体,但此化合物无法与M2达到完全分离。由于此同分异构体和M2结构大体一致,仅乙酰基的连接位置有所差别,因此对于如何才能使这2个化合物达到完全分离尚

待进一步研究。

[参考文献]

- [1] 帝玛尔·丹增彭措. 晶珠本草[M]. 上海:上海科学技术出版社,1986:114-115.
- [2] 中国科学院西北高原生物研究所. 藏药志[M]. 西宁:青海人民出版社,1991:466-467.
- [3] 宋立人,洪恂,丁绪亮,等. 现代中药学大辞典[M]. 北京:人民卫生出版社,2001:2071.
- [4] 廖志明,刘小翠,孙立卿,等. GC-MS分析红花绿绒蒿和全缘叶绿绒蒿超临界提取成分[J]. 中药材,2015,38(9):1882-1885.
- [5] 邵晶,郭玫,樊秦,等. 甘肃产不同品种藏药绿绒蒿的质量评价方法研究[J]. 中药材,2011,34(11):1678-1681.
- [6] ZHOU G, CHEN Y X, LIU S, et al. *In vitro* and *in vivo* hepatoprotective and antioxidant activity of ethanolic extract from *Meconopsis integrifolia* (Maxim.) Franch [J]. J Ethnopharmacol, 2013, 148(2): 664-670.
- [7] ZHOU Y, SONG J Z, Choi F F, et al. An experimental design approach using response surface techniques to obtain optimal liquid chromatography and mass spectrometry conditions to determine the alkaloids in *Meconopsi* species[J]. J Chromatography A, 2009, 1216(42): 7013-7023.
- [8] 吴海峰,沈建伟,宋志军,等. 藏药全缘叶绿绒蒿的化学成分研究[J]. 天然产物研究与开发,2009,21(3):430-432.
- [9] HUANG Y F, HAN Y T, CHEN K L, et al. Separation and purification of four flavonol diglucosides from the flower of *Meconopsis integrifolia* by high-speed counter-current chromatography[J]. J Sep Sci, 2015, 38(23): 4136-4140.
- [10] 张长现,叶润蓉,卢学峰,等. 不同海拔高度五脉绿绒蒿中槲皮素和木犀草素含量变化[J]. 天然产物研究与开发,2010,22(4):643-646,691.

[责任编辑 顾雪竹]