

HPLC 测定不同品种金银花及叶中木犀草苷含量

赵金娟¹, 管仁伟², 路俊仙², 王萌², 杜肖璇¹, 林慧彬^{2*}, 林建强^{3*}

(1. 山东中医药大学, 济南 250014; 2. 山东省中医药研究院, 济南 250014;
3. 山东大学微生物技术国家重点实验室, 济南 250100)

[摘要] 目的: 比较不同品种之间金银花及叶中黄酮类成分木犀草苷含量的差异。方法: 采用 Diamonsil-C₁₈ 色谱柱 (150 mm × 4.6 mm, 5 μm), 乙腈-0.5% 冰醋酸溶液为流动相梯度洗脱, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 35 °C, 检测波长 350 nm。结果: 木犀草苷在 0.015 6 ~ 0.5 g·L⁻¹ 呈良好线性关系, 平均回收率为 96.88%。结论: 1~10 号金银花样品中木犀草苷的含量在 0.08% ~ 0.22% 之间, 均高于《中国药典》规定的 0.050%, 其中亚特良种金银花 (意大利种质) 及九丰一号含量较高。红金银花中木犀草苷含量为 0.11%, 符合《中国药典》该指标要求。金银花叶中木犀草苷的含量分别为 0.75%, 0.76%, 明显高于花中木犀草苷的含量。

[关键词] 金银花; 金银花叶; 红金银花; 木犀草苷; 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)06-0103-04

[doi] 10.11653/syfy2014060103

Determination of Content of Galuteolin in Different Varieties of *Lonicerae japonicae* Flos and *L. japonicae* Folium by HPLC

ZHAO Jin-juan¹, GUAN Ren-wei², LU Jun-xian², WANG Meng²,
DU Xiao-xuan¹, LIN Hui-bin^{2*}, LIN Jian-qiang^{3*}

(1. Shandong University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Ji'nan 250014, China;
2. Shandong Institute of TCM, Ji'nan 250014, China;
3. State Key Lab of Microbial Technology, Shandong University, Ji'nan 250100, China)

[Abstract] **Objective:** To compare differences of the content of galuteolin between different varieties of *Lonicerae japonicae* Flos and *L. Japonicae* Folium. **Method:** The separation was performed on a Diamonsil-C₁₈ column (150 mm × 4.6 mm, 5 μm), acetonitrile-0.5% acetic acid was used as the mobile phase with gradient elution, the flowrate was 1.0 mL·min⁻¹, column temperature was 35 °C, the detection wavelength was at 350 nm. **Result:** The linear range ($n = 6$) was 0.015 625-0.5 g·L⁻¹ ($R^2 = 1$) respectively. The averagerecoveries of galuteolin was 96.88% respectively. **Conclusion:** The content of galuteolin in from 1 to 10 sample is between 0.08% and 0.22%, which is higher than 0.050% of requirement of ChP. The content of galuteolin in ya te improved variety *L. japonicae* Flos (introduced from Italy) and jiu feng yi hao is higher than others samples. The content of galuteolin in *L. japonica* var. *chinensis* is 0.11%, which meets the medicinal requirements. The content of galuteolin in *L. japonicae* Folium is between 0.75% and 0.76%, which is apparently higher than it in *L. japonicae* Flos.

[Key words] *Lonicerae japonicae* Flos; *L. japonicae* Folium; *Lonicera japonica* var. *chinensis*; galuteolin; HPLC

[收稿日期] 20130515(005)

[基金项目] 国家“十二五”支撑计划项目(2011BAI06B01)

[第一作者] 赵金娟, 在读硕士, E-mail: zhaojinjuan1020@126.com

[通讯作者] * 林慧彬, 博士, 研究员, 从事中药资源与质量控制工作, Tel: 0531-82949822, E-mail: linhuiyin68@163.com;

* 林建强, E-mail: jianqianglin@sdu.edu.cn

金银花为忍冬科植物忍冬 *Lonicera japonica* Thunb. 的干燥花蕾或带初开的花,具有清热解毒、疏风散热的功效^[1]。黄酮类成分是金银花主要有效成分之一。目前从金银花中分离鉴定出的黄酮类成分主要有黄酮和黄酮醇两类^[2],如木犀草素、木犀草素-7-葡萄糖苷、异绿原酸、绿原酸等^[3-4]。其中木犀草苷作为金银花的一个新的质量控制指标,对流感病毒NA有较好的抑制活性^[5],对慢性髓原白血病细胞增殖有抑制作用^[6],且对阿霉素所致的心肌损伤有明显保护作用^[7]。2010年版《中国药典》规定金银花中含木犀草苷不得少于0.050%^[1]。对不同品种金银花中木犀草苷的含量进行测定,选出含量较高的品种,可以为金银花的良种选育提供参考依据。

1 材料

1.1 仪器 Waters600E-2487 高效液相色谱仪;

Waters-996 二极管阵列检测器;XS205DU 型电子天平(梅特勒-托利多仪器公司);LC-350A 型超声波中药处理机(济宁市中区鲁超仪器厂);0.45 μm 微孔滤膜(有机系,天津市恒奥科技发展有限公司)。

1.2 试剂 木犀草苷对照品(中国药品生物制品检定所,批号 11720-201106,供含量测定用),乙腈(DNK, United States of America, HPLC Grades),冰醋酸(天津市科密欧化学试剂有限公司,批号 20110924,高效液相色谱纯),无水乙醇(天津市富宇精细化工有限公司,分析纯),纯化水。

1.3 样品来源见表1,样品1~9号经林慧彬研究员鉴定为金银花 *Lonicerae japonicae* Flos,10号为红金银花 *L. japonica* var. *chinensis*,11~12号为金银花叶 *L. japonicae* Folium,样品经粉碎处理后作为实验材料。

表1 金银花木犀草苷 HPLC 含量测定

No.	编号	品种	木犀草苷含量/%	样品性状	产地
1	S101201	金银花 <i>L. japonica</i>	0.12	以二白、大白为主,花黄白色,稍大	山东
2	S201202	金银花 <i>L. japonica</i>	0.10	以二白为主,花黄绿色,色稍暗	山东
3	S201203	金银花(九丰一号) <i>L. japonica</i>	0.15	以二白、三青为主,花深绿色,花稍大,厚	平邑
4	S201204	金银花 <i>L. japonica</i>	0.08	以二白、三青为主,花黄绿色	封丘
5	S201205	金银花 <i>L. japonica</i>	0.13	以三青为主,花淡绿色	河南
6	S201206	金银花(亚特立本金银花) <i>L. japonica</i>	0.11	以二白为主,花黄白色	北京
7	S201207	金银花(亚特良种金银花) <i>L. japonica</i>	0.11	以二白为主,花黄白色	山东亚特药植物园
8	S201208	金银花(亚特良种金银花) <i>L. japonica</i>	0.12	以三青为主,花淡绿色	兰州武威
9	S201209	金银花(引进意大利种质亚特良种金银花) <i>L. japonica</i>	0.22	以二白、大白为主,花淡黄色	山东亚特药植物园
10	S201210	红金银花(亚特红良种金银花) <i>L. japonica</i> var. <i>chinensis</i>	0.11	以银花为主,其余为三青、二白、大白的混合品,花红紫色	山东亚特药植物园
11	S201211	金银花叶(引进意大利种质亚特良种金银花叶) <i>L. japonica</i>	0.75	叶绿色	山东亚特药植物园
12	S201212	金银花叶(亚特金银花叶) <i>L. japonica</i>	0.76	叶绿色	山东亚特药植物园

2 方法

2.1 色谱条件 Diamonsil-C₁₈ 色谱柱(150 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相:以乙腈为流动相 A,以0.5% 冰醋酸溶液为流动相 B,按表1进行梯度洗脱;流速:1.0 mL·min⁻¹;柱温:35 ℃;检测波长:350 nm;进样量:10 μL。在此条件下木犀草苷对照品及样品分离效果较好(见图1)。

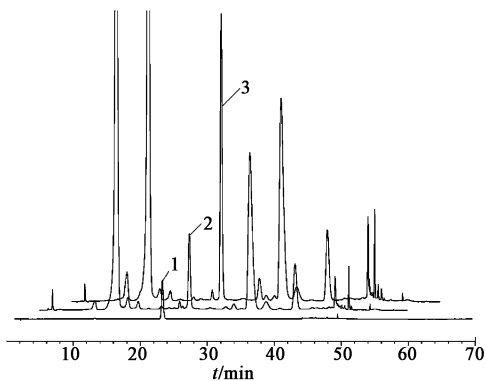
2.2 木犀草苷供试品及对照品溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 称取木犀草苷对照品

适量,精密称定,加70%乙醇超声溶解制成每1 mL含40 μg的溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备 取粉碎后过60目筛的样品约2 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入70%乙醇50 mL,称定质量,超声处理(功率250 W,频率35 kHz)1 h,放冷,再称定质量,用70%乙醇补足减失的质量,摇匀,滤过,滤液经0.45 μm微孔滤膜滤过后作为供试品溶液备用。

2.3 方法学考察



1. 木犀草苷对照品;2. 金银花样品;3. 金银花叶样品

图1 木犀草苷对照品及样品 HPLC

2.3.1 线性关系考察 用木犀草苷对照品分别配制 0.015 625, 0.031 25, 0.062 5, 0.125, 0.25, 0.5 g·L⁻¹ 的木犀草苷标准液, 进样量为 10 μL, 以色谱峰面积(Y)对质量(X)进行回归, 得木犀草苷的线性回归方程为 $Y = 4 \times 10^6 X + 89\ 092$, $R^2 = 1$, 表明在 0.015 625 ~ 0.5 g·L⁻¹ 呈良好线性关系。

2.3.2 精密度试验 取上述配制的 40 mg·L⁻¹ 木犀草苷对照品溶液, 在相同的色谱条件下连续进样 6 次, 每次 10 μL, 测得木犀草素的峰面积 RSD 为 2.10%, 表明仪器进样精密度良好。

2.3.3 稳定性试验 取同一 2.2.2 供试样品溶液, 分别在 0, 3, 6, 9, 12, 24 h 进样, 每次进样 10 μL, 测定木犀草素的峰面积 RSD 为 1.13%, 表明样品溶液在 24 h 内稳定。

2.3.2 重复性试验 取同一批金银花药材, 按供试品制备方法配制 6 份, 分别进样 10 μL, 测定含量 RSD 为 1.37%, 表明该方法的重复性较好。

2.3.3 加样回收率试验 取已知含量的药材样品 6 份, 分别加入与样品量之比约为 1:1 的木犀草苷对照品, 按样品制备方法和测试条件进行测定, 计算得回收率为 96.88%, RSD 为 2.28%。

2.4 样品测定 按上述方法分别取各金银花供试品溶液进行测定, 进样量为 10 μL, 测定木犀草苷峰面积, 以外标法计算木犀草苷的含量。结果见表 2。

表2 木犀草苷 HPLC 梯度洗脱流动相

t /min	流动相 A (乙腈)	流动相 B (0.5% 冰醋酸溶液)
0 ~ 15	10 ~ 20	90 ~ 80
15 ~ 30	20	80
30 ~ 40	20 ~ 30	80 ~ 70

3 结果

3.1 不同品种金银花中木犀草苷含量比较 2010 年版《中国药典》规定金银花中含木犀草苷不得少于 0.050%^[1], 由表 1 结果可知, 1 ~ 10 号木犀草苷的含量在 0.08% ~ 0.22%, 均高于 0.050%, 符合《中国药典》该指标规定。其中, 9 号亚特良种金银花(意大利种质)中木犀草苷的含量为 0.22%, 在所有样品中含量最高, 3 号九丰一号次之, 5 号河南金银花中木犀草苷的含量也达到了 0.13%, 8 号亚特良种金银花(兰州基地)为 0.12%。其余样品中木犀草苷含量相差不大, 但是 4 号封丘金银花木犀草苷的含量偏低, 与其他品种有差异。

3.2 金银花叶木犀草苷含量比较 11, 12 号金银花叶中木犀草苷的含量分别达到了 0.75%, 0.76%, 含量相差不大。但是金银花与叶中木犀草苷的含量差异较大, 金银花叶中木犀草苷含量明显高于金银花。

4 讨论

4.1 亚特良种金银花(意大利种质)木犀草苷的含量 高达 0.22%, 比其他样品高接近一倍, 在所有花的样品中含量最高。九丰一号为 0.15%, 相较于其他品种, 含量较高。因而亚特良种金银花(意大利种质)和九丰一号可以为金银花优良品种的筛选提供品种来源, 为金银花优良品种在产地的推广提供参考依据。

4.2 红金银花是金银花自然诱变产生的二倍体, 适应性强、耐旱、耐涝、耐寒, 是集药用、观赏、水土保持于一体的特异型品种^[8]。其木犀草苷的含量为 0.11%, 符合《中国药典》该指标要求, 其在用于观赏树木的同时可以其考虑作为药用来源之一。

4.3 金银花叶尚未被列为药用部位, 但对金银花叶提取物抗菌作用的研究表明, 金银花叶提取液对大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽胞杆菌、鼠伤寒沙门氏菌、青霉、黑曲霉、黄曲霉和酿酒酵母等均有一定抑制作用^[9]。同时研究证明同一植株金银花中叶的总黄酮明显高于花中的含量^[10], 本实验也证明金银花叶中木犀草苷含量高出发好几倍, 符合药用要求, 可以进一步加以利用。因而有必要对金银花叶进行深入研究, 这将有利于金银花资源的充分利用, 扩大药用来源。

4.4 另外, 笔者的研究发现不同品种金银花及叶中木犀草苷的含量与总黄酮含量呈一定的正相关, 与绿原酸的含量没有相关性。针对不同品种金银花化学成分之间的相关性研究也将会进一步深入研究。

三七乳膏中三七皂苷 R_1 、人参皂苷 R_{g_1} 、 R_{b_1} 、 R_d 的裸鼠体外透皮特征研究

黎月桃, 朱黎霞, 曾庆, 黄国志*
(南方医科大学珠江医院, 广州 510280)

[摘要] 目的: 采用高效液相色谱法同步考察三七乳膏中三七皂苷 R_1 、人参皂苷 R_{g_1} 、 R_{b_1} 、 R_d 的体外透皮能力。方法: 优选梯度洗脱及检测条件, 采用 Franz 透皮扩散仪进行三七乳膏的裸鼠体外透皮实验, 测定三七皂苷 R_1 、人参皂苷 R_{g_1} 、 R_{b_1} 、 R_d 的累积透皮量。结果: 建立三七皂苷 R_1 、人参皂苷 R_{g_1} 、 R_{b_1} 、 R_d 的高效液相同步检测方法, 体外透皮吸收符合零级速率特征。结论: 本研究为三七乳膏的质量控制及临床应用提供依据。

[关键词] 高效液相色谱; 三七乳膏; 透皮吸收

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)06-0106-04

[doi] 10.11653/syfy2014060106

Study on Transdermal Permeability of Notoginsenoside R_1 , Ginsenoside R_{g_1} , R_{b_1} and R_d in Notoginseng Radix et Rhizoma Cream by HPLC Through Nude Mouse Skin *in vitro*

LI Yue-tao, ZHU Li-xia, ZENG Qing, HUANG Guo-zhi*
(Zhujiang Hospital of Southern Medical University, Guangzhou 510280, China)

[收稿日期] 20131114(014)

[基金项目] 2011 年广东省科技计划资助项目(2011B061300071)

[第一作者] 黎月桃, 硕士, 从事康复医学与理疗学研究, Tel: 15820245829, E-mail: 333963123@qq.com, 337963123@qq.com

[通讯作者] * 黄国志, 教授, 博士生导师, 从事康复医学与理疗学研究, Tel: 18666087186, E-mail: drhuang66@gmail.com

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 205.
- [2] 张百霞, 周凤琴, 郭庆梅. 金银花中黄酮类化合物的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(23): 349.
- [3] 丁既鹏, 李世林. 醇提法和超声波法提取金银花中黄酮类物质的研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2005, 11(4): 64.
- [4] 蔡清宇, 郝特, 李曼玲, 等. 7 份不同产地金银花质量初步调查[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(5): 246.
- [5] 王海娣, 杜冠华, 刘艾林. 天然黄酮类化合物的神经氨酸酶抑制活性评价[J]. 中国新药杂志, 2009, 18(15): 1435.
- [6] 韩宁宁, 叶文博. 木犀草素和木犀草苷对 K562 细胞增殖的影响[J]. 上海师范大学学报: 自然科学版, 2008, 37(6): 622.
- [7] 何玲, 孙桂波, 孙潇, 等. 木犀草苷对阿霉素诱导乳鼠心肌细胞损伤的保护作用[J]. 中国药理学通报, 2010, 28(9): 1229.
- [8] 靳维荣, 李广华, 孙强, 等. 自然诱变品种红金银花中木犀草苷含量初探[J]. 现代中药研究与实践, 2011, 25(5): 22.
- [9] 赵彦杰. 金银花叶提取物的抑菌效果研究[J]. 食品科学, 2007, 28(7): 63.
- [10] 郭玉, 阳育聪, 刘运美, 等. 金银花及其叶中有效成分的比较研究[J]. 南华大学学报: 医学版, 2008, 36(2): 154.

[责任编辑 邹晓翠]