

## HPLC 同时测定不同产地密蒙花中 4 种化合物的含量

杨东方<sup>1</sup>, 姚雪峰<sup>1</sup>, 胡云飞<sup>2,3</sup> (1.山西药科职业学院, 太原 030031; 2.亳州学院, 安徽 亳州 236800; 3.国家中药材产品质量监督检验中心, 安徽 亳州 236800)

**摘要:** 目的 采用 HPLC 同时测定密蒙花中 4 种化合物(毛蕊花糖苷、蒙花苷、芹菜素、木犀草素)的含量, 并对不同产地的密蒙花进行比较。方法 采用 Waters Sunfire™ C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm), 以乙腈-0.2%磷酸水溶液为流动相, 梯度洗脱; 流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>; 柱温 30 ℃; 检测波长 330 nm(毛蕊花糖苷、蒙花苷、芹菜素)和 350 nm(木犀草素)。结果 4 种化合物在各自的范围内呈现良好的线性关系( $r>0.999\ 0$ ), 平均回收率为 97.75%~98.49%, RSD 为 0.7%~1.5%。测得不同产地毛蕊花糖苷、蒙花苷、芹菜素、木犀草素的含量分别为 21.046 3~42.886 3, 8.514 4~17.400 8, 0.317 3~1.205 3, 0.030 4~0.145 6 mg·g<sup>-1</sup>。结论 该法稳定可靠, 重复性好, 可为密蒙花质量评价提供一定依据。

**关键词:** 密蒙花; 高效液相色谱法; 毛蕊花糖苷; 蒙花苷; 芹菜素; 木犀草素

中图分类号: R284.1; R917.101 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2020)08-0921-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2020.08.005

引用本文: 杨东方, 姚雪峰, 胡云飞. HPLC 同时测定不同产地密蒙花中 4 种化合物的含量[J]. 中国现代应用药学, 2020, 37(8): 921-925.

### Simultaneous Determination of 4 Components in *Buddleja officinalis* Maxim. from Different Regions by HPLC

YANG Dongfang<sup>1</sup>, YAO Xuefeng<sup>1</sup>, HU Yunfei<sup>2,3</sup> (1. Shanxi Pharmaceutical Vocational College, Taiyuan 030031, China; 2. Bozhou University, Bozhou 236800, China; 3. National Chinese Medicinal Materials Product Quality Supervision and Inspection Center, Bozhou 236800, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To establish an HPLC method for simultaneous determination of acteoside, linarin, apigenin, luteolin in *Buddleja officinalis* Maxim. and to compare the content of *Buddleja officinalis* Maxim. from different origins. **METHODS** The analysis was performed on Waters Sunfire™ C<sub>18</sub> analytical column(4.6 mm×250 mm, 5 μm) with the gradient elution of acetonitrile-0.05% phosphoric acid solution at a flow rate of 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, the column temperature was 30 ℃ and the detection wavelength was set at 330 nm(acteoside, linarin, apigenin) and 350 nm(luteolin). **RESULTS** Four constituents showed good linear relationships( $r>0.999\ 0$ ) within their own ranges, whose average recoveries were 97.75%-98.49% with the RSDs of 0.7%~1.5%. The contents of acteoside, linarin, apigenin, luteolin in samples of different regions were in ranges of 21.046 3~42.886 3, 8.514 4~17.400 8, 0.317 3~1.205 3, 0.030 4~0.145 6, respectively. **CONCLUSION** This reliable, stable and reproducible method can be used to evaluate the quality of *Buddleja officinalis* Maxim..

**KEYWORDS:** *Buddleja officinalis* Maxim.; HPLC; acteoside; linarin; apigenin; luteolin

密蒙花又名小锦花、黄饭花、蒙花、鸡骨头花等<sup>[1]</sup>, 为马钱科醉鱼草属植物密蒙花 *Buddlejae officinalis* Maxim. 的干燥花蕾及花序<sup>[2]</sup>, 广泛分布于湖南、湖北、云南、广西、四川等省区<sup>[3]</sup>。春季花未开放时采收, 除去杂质, 干燥。密蒙花性甘, 微寒, 归肝经, 可清热泻火、养肝明目、退翳, 多用于治疗目赤肿痛、视物昏花、肝虚目暗等症<sup>[2]</sup>。

现代药理作用研究表明, 密蒙花有降血糖、抗氧化、免疫调节、对抗眼部疾病、治疗帕金森病、抗菌、抗炎等作用<sup>[4-5]</sup>。密蒙花含有黄酮类、萜类、苯乙醇苷类、挥发油<sup>[6]</sup>等多种化学成分, 其中蒙花苷、木犀草素、芹菜素和毛蕊花糖苷为密蒙花中的主要成分<sup>[7]</sup>。

中药材品质取决于所含化学成分量的差异和

**基金项目:** 国家中医药管理局全国中药特色技术传承人才培养项目(国中医药人教函[2019]43 号); 国家质量监督检验检疫总局科技计划项目(2015QK098); 山西省高等学校科技创新项目(201711118)

**作者简介:** 杨东方, 女, 硕士, 讲师 Tel: 13513604572 E-mail: 476510266@qq.com.

质的区别,遗传基因是形成道地药材的本质,产地环境影响其遗传基因的表达,遗传基因与产地环境相互作用决定了其次生代谢产物的产生和积累<sup>[8]</sup>。为了进一步探究不同产地密蒙花的品质差异,为密蒙花的品质鉴定、化学成分的开发利用、质量评价以及全面有效建立密蒙花药材质量标准提供依据,本实验采用 HPLC 同时测定密蒙花中的 4 个主要组分(蒙花苷、木犀草素、芹菜素、毛蕊花糖苷)的含量。

## 1 仪器与材料

### 1.1 仪器

U-3000 高效液相色谱仪(DAD 检测器,美国 Thermo); Waters Sunfire™ C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm); XPE-205 电子分析天平(瑞士 Mettler-toledo 公司,精度 0.001 mg); FB15065 超声波清洗器(美国 Thermo 公司)。

### 1.2 材料

对照品毛蕊花糖苷(批号: 111530-201713; 纯度: 92.5%)、蒙花苷(批号: 111528-201710; 纯度: 96.6%)、芹菜素(批号: 111901-201603; 纯度: 99.2%)、木犀草素(批号: 111520-201605; 纯度: 99.6%)均购自中国食品药品检定研究院; 乙腈为色谱纯(美国 Tedia 有限公司); 水为屈臣氏去离子水; 甲醇、磷酸为分析纯,均购自国药集团化学试剂有限公司。17 批密蒙花除 2 批收集于山西大同、安徽大别山地区产地外,其他样品购自安徽亳州或产地合作社。密蒙花样品经安徽中医药大学周建理教授鉴定,均为马钱科植物密蒙花 *Buddleja officinalis* Maxim. 的干燥花蕾及花序,样品信息见表 1。

表 1 17 批密蒙花样品信息

Tab. 1 Sample information of 17 batches of *Buddleja officinalis* Maxim

编号	产地	采收时间	来源	编号	产地	采收时间	来源
Y1	四川青川	不明	收购	Y10	陕西旬阳	2018.03	收购
Y2	四川青川	不明	收购	Y11	陕西旬阳	2018.03	收购
Y3	四川青川	不明	收购	Y12	陕西旬阳	2018.03	收购
Y4	四川金堂	不明	收购	Y13	云南姚安	不明	收购
Y5	四川金堂	不明	收购	Y14	云南姚安	不明	收购
Y6	四川金堂	不明	收购	Y15	云南姚安	不明	收购
Y7	湖北五峰	2018.03	收购	Y16	山西大同	2018.03	采集
Y8	湖北五峰	2018.03	收购	Y17	安徽大别山地区	2018.03	采集
Y9	湖北五峰	2018.03	收购				

## 2 方法

### 2.1 供试品溶液的制备

取密蒙花干燥粉末(过三号筛)约 0.50 g,精密称定,置锥形瓶中,精密加入甲醇 25 mL,称重,置 85 °C 水浴中加热回流 1 h,放冷至室温,再称重,用甲醇补足减失的量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

### 2.2 对照品溶液的制备

精密称取毛蕊花糖苷、蒙花苷、芹菜素、木犀草素对照品适量(按对照品标示纯度折算),置 10 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,配制成浓度分别为 1.299, 0.771, 0.601, 0.159 mg·mL<sup>-1</sup> 的混合对照品储备液。

### 2.3 色谱条件

色谱柱: Waters Sunfire™ C<sub>18</sub>(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-0.2%磷酸水溶液梯度洗脱,流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>,柱温 30 °C,波长 330, 350 nm; 进样量 10 μL,梯度洗脱程序见表 2,色谱图见图 1。

表 2 梯度洗脱程序

Tab. 2 Program of the linear gradient elution

时间/min	乙腈/%	0.2%磷酸水溶液/%
0~3	10→18	90→82
3~25	18→19	82→81
25~32	19→20	81→80
32~60	20→38	80→62
60~75	38→100	62→0
75~80	100	0

### 2.4 方法学考察

**2.4.1 线性关系、检出限及定量限试验** 分别精密吸取混合对照品储备液 0.5, 1.0 mL 置 200 mL 量瓶中,用甲醇稀释至刻度,混匀,另精密吸取混合对照品储备液 1.0, 2.0 mL 置 100 mL 量瓶中,用甲醇稀释至刻度,混匀,再精密吸取混合对照品储备液 2.5, 5.0 mL 置 5 mL 量瓶中,用甲醇稀释至刻度,混匀,得到一系列浓度不同的混合对照品溶液。按“2.3”项下色谱条件进样,以峰面积 *Y* 为纵坐标,以对照品溶液浓度 *X* 为横坐标进行线性回归分析,并以 3 倍和 10 倍信噪比(*S/N*)确定方法的检出限(LOD)和定量限(LOQ)。结果见表 3。

**2.4.2 仪器精密度试验** 精密吸取同一混合对照品溶液 10.0 μL,按“2.3”项下色谱条件连续进样 6 次,测得毛蕊花糖苷、蒙花苷、芹菜素、木犀草素峰面积的 RSD 分别为 0.36%, 0.69%, 0.88%, 0.57%,表明仪器精密度良好。

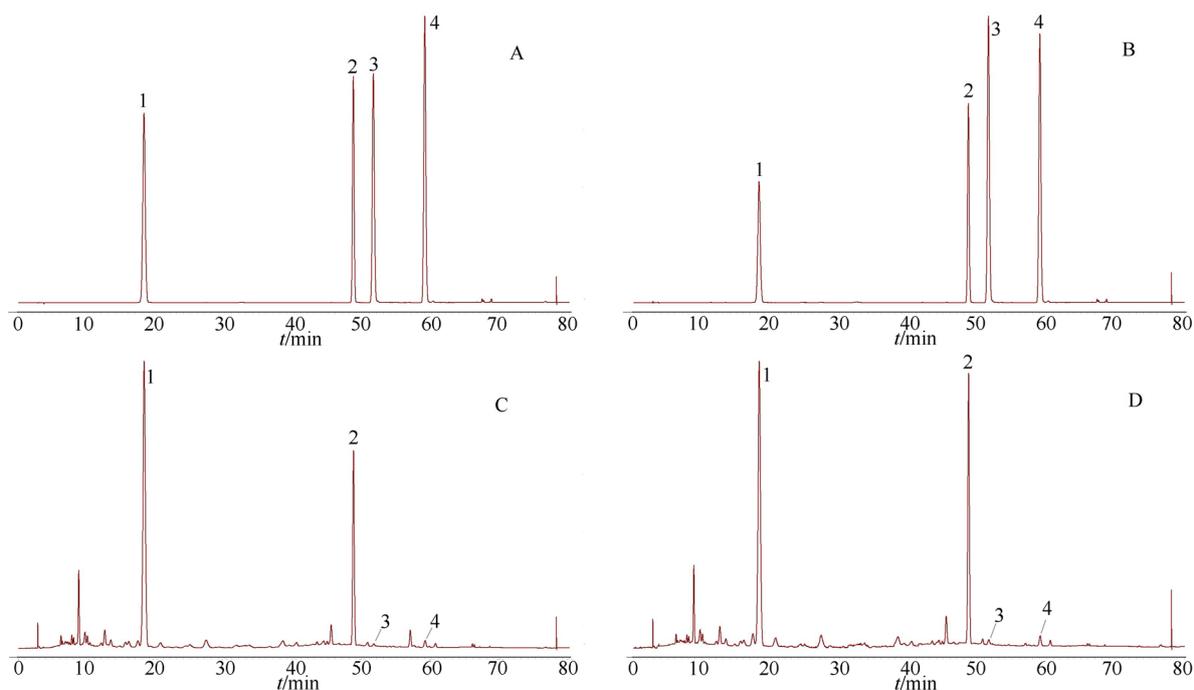


图1 高效液相色谱图

A-混合对照品(330 nm); B-混合对照品(350 nm); C-供试品(330 nm); D-供试品(350 nm); 1-毛蕊花糖苷; 2-蒙花苷; 3-木犀草素; 4-芹菜素。

Fig. 1 HPLC chromatograms

A-mixed reference(330 nm); B-mixed reference(350 nm); C-sample(330 nm); D-sample(350 nm); 1-acteoside; 2-linarin; 3-luteolin; 4-apigenin.

表3 4个成分回归方程、相关系数、线性范围、检测限(LOD)和定量限(LOQ)

Tab. 3 Regression equations, correlation coefficients, linear ranges and limits of detection(LOD), limits of quantification (LOQ) of 4 components

化合物	线性关系	<i>r</i>	线性范围/mg·mL <sup>-1</sup>	LOD/μg·kg <sup>-1</sup>	LOQ/μg·kg <sup>-1</sup>
毛蕊花糖苷	$Y=126.76X-0.3761$	0.9998	0.0032~1.2990	2.9	9.7
蒙花苷	$Y=162.19X-0.1102$	0.9999	0.0019~0.7710	2.5	8.3
芹菜素	$Y=330.63X-0.1578$	0.9999	0.0015~0.6010	2.2	7.3
木犀草素	$Y=1243X-0.2234$	0.9999	0.0004~0.1590	1.6	5.3

**2.4.3 稳定性试验** 取密蒙花供试品溶液(Y1),按“2.3”项下色谱条件分别于 0, 4, 8, 12, 18, 24 h 进样,测得毛蕊花糖苷、蒙花苷、芹菜素、木犀草素峰面积的 RSD 分别为 0.64%, 0.31%, 0.83%, 0.95%,表明密蒙花供试品溶液在 24 h 内稳定性较好。

**2.4.4 重复性试验** 取同一批样品(Y1)粉末 6 份,分别按“2.1”项下方法制备供试品溶液,按“2.3”项下色谱条件分别进样测定,测得密蒙花中 4 种待测成分含量平均值( $n=6$ )的 RSD 分别为 0.87%, 1.08%, 0.51%, 0.91%,表明样品重复性较好。

**2.4.5 回收率试验** 精密称取已知含量的样品 6 份,每份约 0.25 g,精密称定,分别精密加入混合对照品储备液 1.0 mL,按“2.1”项下方法制备供试品溶液,按“2.3”项下色谱条件分别进行测定,计算加样回收率。结果见表 4。

## 2.5 含量测定

取 17 批密蒙花样品,按“2.1”项下方法制备成供试品溶液,按“2.3”项下色谱条件进样分析,测定 4 种待测化合物的峰面积,参照对照品的峰面积用外标法计算密蒙花中毛蕊花糖苷、蒙花苷等 4 个化合物的含量,结果见表 5。

## 2.6 质控标准

采用 HPLC 对 17 批密蒙花样品中的毛蕊花糖苷进行含量测定,结果平均值为 32.06 mg·g<sup>-1</sup>,最大值为 42.886 mg·g<sup>-1</sup>,最小值 21.046 mg·g<sup>-1</sup>;根据测定结果由以下公式计算:

$$\mu = \bar{x} - \frac{tS}{\sqrt{n}} - MU$$

其中  $\mu$  为限度值;  $\bar{x}$  为平均值=32.06;  $t$  为分布临界表值=2.583;  $s$  为标准偏差=6.845 6;  $n$  为 17;  $MU$  为平均值与扩展不确定度的乘积=32.06×0.025 7。

表 4 密蒙花中 4 个化合物加样回收率试验

Tab. 4 Sampling recovery rate of 4 components in *Buddleja officinalis* Maxim.

成分	样品量/g	样品中含量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
毛蕊花糖苷	0.251 2	10.734	10.312	20.714	96.77	98.00	1.4
	0.250 6	10.709	10.312	21.049	100.27		
	0.250 7	10.713	10.312	20.700	96.84		
	0.250 4	10.700	10.312	20.884	98.75		
	0.251 6	10.752	10.312	20.888	98.29		
	0.251 1	10.730	10.312	20.740	97.07		
蒙花苷	0.251 2	3.737	3.563	7.277	99.36	98.49	0.7
	0.250 6	3.728	3.563	7.244	98.68		
	0.250 7	3.730	3.563	7.227	98.16		
	0.250 4	3.725	3.563	7.256	99.11		
	0.251 6	3.743	3.563	7.232	97.92		
	0.251 1	3.736	3.563	7.217	97.72		
木犀草素	0.251 2	0.084	0.092	0.174	98.35	97.75	1.1
	0.250 6	0.083	0.092	0.172	96.72		
	0.250 7	0.084	0.092	0.173	97.45		
	0.250 4	0.083	0.092	0.172	96.72		
	0.251 6	0.084	0.092	0.174	97.77		
	0.251 1	0.084	0.092	0.175	99.44		
芹菜素	0.251 2	0.012 5	0.014	0.026	97.74	98.18	1.5
	0.250 6	0.012 5	0.014	0.026	98.81		
	0.250 7	0.012 5	0.014	0.026	99.06		
	0.250 4	0.012 5	0.014	0.026	97.04		
	0.251 6	0.012 5	0.014	0.026	96.29		
	0.251 1	0.012 5	0.014	0.026	100.13		

表 5 17 批密蒙花样品中 4 个化合物含量测定结果

Tab. 5 Results of content determination of 4 compounds in 17 batches of *Buddleja officinalis* Maxim.

编号	产地	毛蕊花糖苷	蒙花苷	芹菜素	木犀草素
Y1	四川青川	34.080	16.698	0.782	0.064
Y2	四川青川	42.886	15.964	0.417	0.085
Y3	四川青川	39.254	15.536	0.572	0.054
Y4	四川金堂	36.649	14.201	0.386	0.030
Y5	四川金堂	42.799	14.798	0.328	0.050
Y6	四川金堂	40.170	15.582	0.382	0.039
Y7	湖北五峰	24.969	10.115	0.387	0.079
Y8	湖北五峰	27.166	8.514	0.317	0.060
Y9	湖北五峰	21.046	9.460	0.512	0.052
Y10	陕西旬阳	30.520	14.417	0.500	0.072
Y11	陕西旬阳	30.129	13.085	0.538	0.111
Y12	陕西旬阳	26.156	11.902	0.616	0.084
Y13	云南姚安	25.420	10.280	0.483	0.046
Y14	云南姚安	26.212	10.181	0.539	0.044
Y15	云南姚安	26.894	11.719	0.472	0.084
Y16	山西大同	40.747	11.205	0.428	0.053
Y17	安徽大别山	29.935	17.401	1.205	0.146

计算得  $\mu=26.9$ , 根据测定结果, 拟订密蒙花中毛蕊花糖苷限度  $\geq 25.0 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 。

根据 17 批密蒙花样品含量测定结果, 并采用上述计算方法, 拟订密蒙花中蒙花苷限度  $\geq 10.0 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ , 芹菜素  $\geq 0.4 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ , 木犀草素  $\geq 0.05 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ , 总黄酮(以蒙花苷、芹菜素、木犀草素总量计)  $\geq 10.5 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 。

### 3 讨论

#### 3.1 色谱条件的确立

对色谱条件进行优化, 对不同波长(190~700 nm)进行考察, 毛蕊花糖苷、蒙花苷、芹菜素、木犀草素的吸收波长分别是 330, 330, 338, 350 nm, 实验中发现波长 330, 338 nm 下, 毛蕊花糖苷、蒙花苷、芹菜素峰面积变化均较小, 故选择波长 330 nm 测定毛蕊花糖苷、蒙花苷、芹菜素含量, 选择波长 350 nm 测定木犀草素含量。并对不同提取溶剂进行考察, 比较不同比例甲醇-0.1%磷酸水<sup>[1]</sup>、乙腈-0.1%磷酸水<sup>[3]</sup>、乙腈-0.2%磷酸水等流动相, 以乙腈-0.2%磷酸水流动相梯度洗脱峰形对称、分离度好。

#### 3.2 结果分析

密蒙花中蒙花苷与芹菜素、木犀草素同属黄酮类, 实验发现其含量具有正相关性。蒙花苷含量较高, 稳定性较好, 芹菜素、木犀草素含量较低, 故参照中国药典 2015 年版一部, 采用蒙花苷作为密蒙花的质控标准。近年来, 有学者提出了中药药效物质的“叠加作用”“显效形式”“毒性分散效应”假说, 中药药效可能是由一类化合物共同作用产生的<sup>[9-10]</sup>。未来是否可以采取蒙花苷为代表测定总黄酮含量, 还有待进一步研究。同时, 密蒙花中毛蕊花糖苷含量较高。由于毛蕊花糖苷具有降血糖、免疫调节、抗菌等生物活性, 故建议增加毛蕊花糖苷作为质控指标。中药质量评价应采用多维评价, 以往的质量标准多集中于单指标含量测定, 并不能很好反映密蒙花的质量状况。

综上所述, 密蒙花在我国分布广泛, 受地域分布和采收时间的影响较大, 密蒙花成分的含量也有所不同, 因此, 中国药典 2015 年版仅以单一成分蒙花苷为指标, 并不能全面地反映药材的品质。本实验采用 HPLC 同时测定了密蒙花中的 4 个主要组分(蒙花苷、木犀草素、芹菜素、毛蕊花糖苷)的含量, 为确保密蒙花用药安全、有效提供了参考。

## REFERENCES

- [1] XU L, YAO X L, HE X H, et al. Determination of 3 flavonoids in *Buddleja officinalis* Maxim. with HPLC [J]. J Tradit Chin Med Univ Hunan(湖南中医药大学学报), 2008, 28(5): 21-23.
- [2] 中国药典: 一部[S]. 2015: 329-329.
- [3] ZHU L. Study on quality standard and extraction technology of *Buddlejae Flos* [D]. Changsha: Central South University, 2014.
- [4] SHI L, XIE G Y, WANG S, et al. Advance in pharmaceutical research of *Buddleia officinalis* Maxim [J]. Chin Wild Plant Resour(中国野生植物资源), 2016, 35(3): 34-40.
- [5] HOUGHTON P J, HYLANDS P J, MENSAH A Y, et al. *In vitro* tests and ethnopharmacological investigations: Wound healing as an example [J]. J Ethnopharmacol, 2005, 100(1/2): 100-107.
- [6] TAI B H, JUNG B Y, CUONG N M, et al. Total peroxynitrite scavenging capacity of phenylethanoid and flavonoid glycosides from the flowers of *Buddleja officinalis* [J]. Biol Pharm Bull, 2009, 32(12): 1952-1956.
- [7] 王晓静, 路娟, 彭纪铭, 等. 密蒙花中 4 个化合物含量的多波长高效液相色谱法测定[J]. 时珍国医国药, 2017, 28(10): 2329-2331.
- [8] XU F, YANG D H, SHANG M Y, et al. Effective forms, additive effect, and toxicities scattering effect of pharmacodynamic substances of TCMS some reflections evoked by the study on the metabolic disposition of traditional Chinese medicines(TCM) [J]. Mod Tradit Chin Med Mater Med-World Sci Technol(世界科学技术-中医药现代化), 2014, 16(4): 688-703.
- [9] YANG D F, HU Y F, CAI C F, et al. Analysis of quality status of *Cassia obtusifolia* in market by specific chromatogram [J]. Chin Tradit Pat Med(中成药), 2019, 41(6): 1328-1333.
- [10] GUO L, ZHU W C, LIU C. Advances in studies of chemical components of *Buddleja officinalis* Maxim. and their bioactivities [J]. Food Res Dev(食品研究与开发), 2012, 33(7): 222-225.

收稿日期: 2019-04-07

(本文责编: 曹粤锋)