

“武当二号金银花”和“武当三号金银花”不同药用部位中木犀草素的含量测定

李聪¹, 李鹏¹, 纪春草², 郑芳¹, 朱雪松¹, 李志浩¹, 刘慧敏¹, 熊琳¹, 黄麟杰¹

作者单位:¹湖北医药学院附属东风医院药学部, 武当特色中药研究所湖北省重点实验室,

湖北 十堰 442000;²湖北医药学院药学院, 湖北 十堰 442000

通信作者: 朱雪松, 男, 主任药师, 研究方向为医院药学与临床药学, E-mail: dfpharmacy@163.com

基金项目: 湖北省教育厅科学研究计划指导性项目(B2016505); 湖北省卫计委科研项目(2013Z-B04); 十堰市科学技术研究与开发项目计划(14Y47; 18Y74)

摘要:目的 利用高效液相色谱(HPLC)-DAD方法测定“武当二号金银花”和“武当三号金银花”中花蕾、叶、藤三个不同药用部位中木犀草素的含量。**方法** 色谱柱: Fortis-C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-乙腈-0.4% 磷酸(50:5:45); 流速: 0.6 mL/min; 检测波长: 350 nm; 柱温: 30 ℃。**结果** 有效成分木犀草素在测定的范围内呈现良好的线性关系($r=0.9995$), 平均回收率为 99.64%。**结论** 该方法简便快速、灵敏准确, 重现性好, 为控制“武当二号金银花”和“武当三号金银花”不同部位木犀草素的质量提供了一种可靠的方法。

关键词: 金银花; 木犀草素; 色谱法, 高效液相

Determination of the contents of luteolin in different parts of “Wudang II *Flos Lonicerae*” and “Wudang III *Flos Lonicerae*”

LI Cong¹, LI Peng¹, JI Chuncao², ZHENG Fang¹, ZHU Xuesong¹, LI Zhihao¹, LIU Huiming¹, XIONG Lin¹, HUANG Linjie¹

Author Affiliations: ¹Department of Pharmacy, Dongfeng Hospital Affiliated to Hubei University of Medicine, Hubei Key Laboratory of Wudang Local Chinese Medicine Research, Shiyan, Hubei 442000, China; ²Hubei University of Medicine, Shiyan, Hubei 442000, China

Abstract: **Objective** To establish HPLC-DAD method for determination of the contents of luteolin in different parts of “Wudang II *Flos Lonicerae*” and “Wudang III *Flos Lonicerae*”. **Methods** Fortis-C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) was used. The mobile phase was methanol-acetonitrile-0.4% phosphoric acid aqueous solution (50:5:45) at a flow rate of 0.6 mL/min. The detective wavelength was 350 nm. The column temperature was 30 ℃. **Results** The luteolin showed good linearity in a detection range and the average recovery rate was 99.64%. **Conclusion** The method is simple, rapid, sensitive, accurate and reproducible, which can be used to control the quality of luteolin in different parts of “Wudang II *Flos Lonicerae*” and “Wudang III *Flos Lonicerae*”.

Key words: *Flos Lonicerae*; Luteolin; Chromatography high pressure, liquid

湖北武当生物医药科技有限公司将“亚特良种金银花”与来源于武当地区金银花结合进行培育, 培植出适合武当地区生长的3个优良独特品种, 分别“武当一号金银花”、“武当二号金银花”、“武当三号金银花”。鉴于本地区光照条件好、雨量充沛、四季分明, 适合药材生长的优越自然条件, 已推广种植, 我市金银花基地达到4万余亩, 其中培植“武当三号”已成为全省最大的红色金银花基地, 总产量高达2000余吨, 市场前景广阔。本课题组已从采收期、不同花期、不同干燥方法、提取工艺研究等方面, 分别对武当二号金银花、武当三号金银花不同药用部位, 如花蕾、藤中的绿原酸、芦丁和木犀草苷等不同有效成分进行了分析研究^[1-5], 研究初步表

明其有效成分绿原酸、木犀草苷含量远高于《中国药典》(2015年版)中“金银花”项下相应规定^[6], 且产量高出金银花3~5倍以上。

“忍冬”之名远早于金银花, 最早出现于东晋葛洪著《肘后备急方》, 记载“忍冬茎叶锉数壶煮”, 故本草中最早用“忍冬”为药名, 宋代之前只用茎、叶; 明代则以茎、叶、花共同入药, 其后主要以花入药为主, 茎叶则分列为另一种药材, 以“忍冬藤”为名。现代研究表明, 忍冬藤、忍冬叶亦具有清热解毒、抗菌消炎、疏风通络的功效^[7-12]。因此, 本课题组对高质量、高产量的3个独特的“武当金银花”品种进行深加工和综合利用, 具有较高的社会效益和经济效益。本研究自2016年10月至2017年10月以木犀

草素为质控指标,分别对武当二号金银花、武当三号金银花的花蕾、叶、藤不同药用部位进行分析比较研究,旨在为推进本地区武当金银花的资源开发和综合利用提供依据。

1 仪器与试药

1.1 仪器 高效液相色谱仪(DIONEX,型号:Ulti-Mate 3000);WTF20002 电子天平(杭州万特衡器有限公司, $d=0.01\text{ g}$);METTLER TOLEDO 电子分析天平($d=0.01\text{ mg}$);高速万能粉碎机(天津市泰斯特仪器有限公司,型号:频率 $(50\pm 1)\text{ Hz}$,FW100 型);数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司,型号:额定频率 40 kHz ,KQ-500DE 型);电热恒温干燥箱(兰州宏瑞食品有限公司,型号:202 型)。

1.2 试药 木犀草素对照品(中国药品生物制品检定所,批号 111720-200604);“武当二号金银花”和“武当三号金银花”的花蕾、叶、藤分别于 2015 年 5 月 23 日、2016 年 5 月 18 日、2017 年 5 月 20 日采自湖北武当生物医药科技有限公司赛武当金银花种植基地,并经湖北医药学院陈吉炎教授鉴定为忍冬科植物忍冬(*Lonicera Japonica* Thunb.)的花蕾、茎枝和叶;高效液相所用甲醇和乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 药材的预处理 新采的三批(20150523, 20160518, 20170520)“武当二号金银花”和“武当三号金银花”的花蕾、叶和藤,用清水洗净,将藤剪成约 2 cm 茎枝段,蒸汽杀青(花蕾、叶和藤分别约蒸 3、6、10 min)后,置 45℃ 电热恒温干燥箱干燥、粉碎后过筛(花蕾和叶的干燥粉末过四号筛,藤的干燥粉末过三号筛),干燥粉末经过筛后置密闭的棕色瓶,并置干燥器中,于冰箱中保存($2\sim 4\text{ }^{\circ}\text{C}$),备用。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 精密称取木犀草素对照品 3.84 mg,置 50 mL 棕色量瓶中,用甲醇稀释,得到浓度为 76.8 $\mu\text{g/mL}$ 的对照品储备液;精密量取适量上述储备液,用 85% 乙醇稀释 10 倍,得浓度为 7.68 $\mu\text{g/mL}$ 的对照品溶液。上述溶液均用封口膜封上,置 2~4℃ 冰箱中备用。

2.2.2 供试品溶液的制备 精密称取“2.1”项下预处理的“武当二号金银花”干燥的花蕾、叶和藤(简称二蕾、二叶和二藤)粉末和“武当三号金银花”干燥的花蕾、叶和藤(简称三蕾、三叶和三藤)粉末各一份(其中二蕾、二藤和三蕾约 1 g;二叶、三叶和三藤约 0.5 g),置具塞锥形瓶中,加 85% 乙醇各 20 mL,称量,超声处理(超声功率:500 W,频率:40 kHz,超声温度:40℃)45 min,放冷,再称量,用

85% 乙醇补足减失的重量,摇匀,用有机相过滤头($0.22\text{ }\mu\text{m}$)过滤,弃去初滤液,取续滤液,即得。

2.3 色谱条件与系统适应性 色谱柱:Fortis- C_{18} 柱($250\text{ mm}\times 4.6\text{ mm}$, $5\text{ }\mu\text{m}$);流动相:甲醇-乙腈-0.4% 磷酸溶液(50:5:45);流速为 0.6 mL/min;柱温为 30℃;检测波长为 350 nm;进样量为 20 μL 。在此色谱条件下,分别进样“2.2.2”项下木犀草素对照品溶液和供试品溶液,记录色谱图(图 1)。结果:木犀草素色谱峰保留时间约为 17 min,理论塔板数以木犀草素色谱峰计不低于 6 600,其 DAD 匹配值均不低于 999.4,分离度均不低于 2.0。

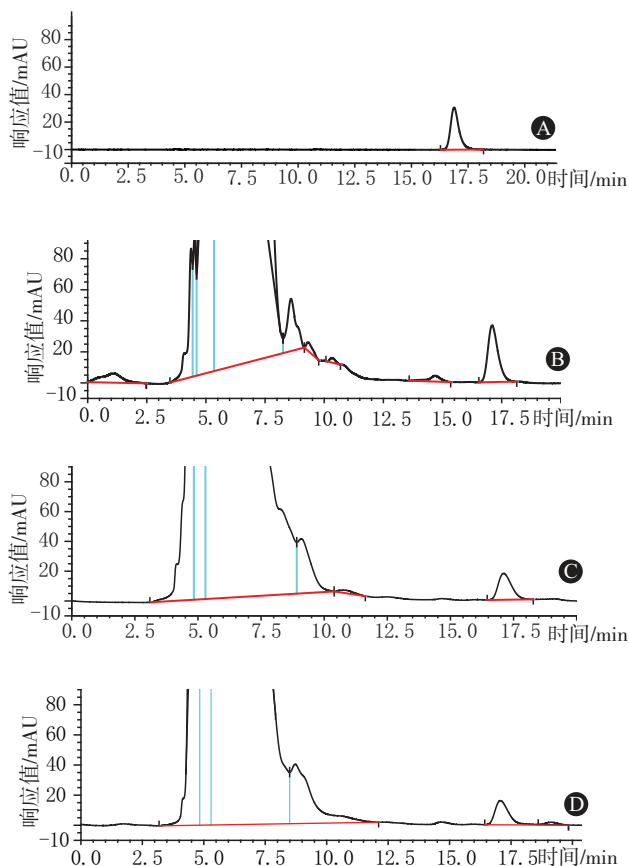


图1 HPLC 色谱图($\lambda=350\text{ nm}$):A 为对照品图;B 为三号叶供试品图;C 为三号藤供试品图;D 为三号花供试品图

2.4 标准曲线的绘制 精密吸取“2.2.1”项下木犀草素的对照品储备液适量,共 6 份,用甲醇稀释成浓度分别为 1.536、3.072、6.144、9.216、12.288、15.36 $\mu\text{g/mL}$ 的对照品溶液,分别进样 20 μL ,记录木犀草素色谱峰面积。以进样浓度($X, \mu\text{g/mL}$)为横坐标,峰面积(Y)为纵坐标,绘制标准曲线,得木犀草素回归方程为 $Y=3.4039X+0.1967$ ($r=0.9995$)。结果表明木犀草素在 1.536~15.36 $\mu\text{g/mL}$ 浓度范围内与峰面积呈良好的线性关系。

2.5 精密度试验 精密吸取“2.2.1”项下浓度为 7.68 $\mu\text{g/mL}$ 的对照品溶液 20 μL 注入液相色谱仪,

连续进样 6 次,记录峰面积,测得木犀草素峰面积的 RSD 为 0.93% ($n=6$),表明仪器精密密度良好。

2.6 重复性试验 取批号为 20170520 的“武当三号金银花”叶干燥粉末,按“2.2.2”项下的方法制备供试品溶液,平行操作制备 6 份,按“2.3”项下色谱条件各进样 20 μL ,记录峰面积,结果木犀草素峰面积的 RSD 为 1.62% ($n=6$),表明该方法重复性良好。

2.7 稳定性试验 取批号为 20170520 的“武当三号金银花”叶干燥粉末,按“2.2.2”项下的方法制备供试品溶液 1 份,分别于 0、4、8、12、16、20、24 h 按“2.3”项下的色谱条件进样 20 μL ,记录峰面积,结果木犀草素峰面积的 RSD ($n=7$) 分别为 1.37% ($n=7$),表明在 24 h 内供试品溶液稳定。

2.8 加样回收率试验 取批号为 20170520 的“武当三号金银花”叶的干燥粉末 0.25 g(每 1 g 叶中含木犀草素为 0.233 mg),共 9 份,分三组,精密称定,分别精密加入“2.2.1”项下的浓度为 7.68 $\mu\text{g/mL}$ 的木犀草素对照品溶液 6.0、7.5、9.0 mL(低、中、高各三份)于上述三组样品中,按“2.2.2”项下三叶供试品制备的方法制备溶液,依据“2.3”项下色谱条件进样 20 μL ,测定木犀草素的峰面积,并按标准曲线计算的含量。结果见表 1。

表 1 加样回收率试验结果($n=6$)

成分	取样量 /g	样品含量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均回收率/%	RSD /%
木 犀 草 素	0.251 5	0.058 6	0.046 1	0.104 3	99.13	99.64	1.87
	0.252 8	0.058 9	0.046 1	0.103 9	97.61		
	0.253 7	0.059 1	0.046 1	0.104 5	98.48		
	0.250 7	0.058 4	0.057 6	0.117 6	102.78		
	0.250 2	0.058 3	0.057 6	0.114 3	97.22		
	0.254 1	0.059 2	0.057 6	0.117 0	100.35		
	0.255 4	0.059 5	0.069 1	0.127 9	98.99		
	0.252 0	0.058 7	0.069 1	0.129 1	101.88		
	0.251 1	0.058 5	0.069 1	0.127 8	100.29		

2.9 样品含量测定 分别取 3 批(20150523, 20160518, 20170520)按“1.3”项下方法预处理及储存的“武当二号金银花”和“武当三号金银花”干燥的花蕾、叶和藤适量,分别按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.3”项下色谱条件各进样 20 μL ,测定木犀草素的峰面积,并按标准曲线计算含量。结果见表 2。结果表明,“武当二号金银花”和“武当三号金银花”三个部位的干燥品在遮光、密闭、低温条件下贮藏,比较适宜,含量方面武当三号金银花三个部位木犀草素含量较二号高,且含量次序均为叶>藤>花蕾,其中叶中含木犀草素的含量几乎为花蕾的 3 倍。

表 2 3 批药材中木犀草素含量测定结果/(mg/g)

批号	存储 时间	武当二号金银花			武当三号金银花		
		花蕾	叶	藤	花蕾	叶	藤
20150523	2 年	0.061	0.171	0.099	0.082	0.222	0.163
20150604		0.058	0.164	0.092	0.084	0.225	0.159
20160518	1 年	0.062	0.175	0.102	0.084	0.228	0.167
20160609		0.063	0.177	0.105	0.087	0.228	0.169
20170520	0 年	0.064	0.179	0.104	0.086	0.233	0.171
20170608		0.066	0.180	0.107	0.089	0.235	0.173

3 讨论

3.1 供试品提取条件的优化 本实验在前期课题组的实验基础上,分别比较了加热回流、索氏及超声几种提取方式,最后确定超声提取作为本实验供试品处理的最佳提取方式^[1-5]。在 500 W 超声功率、40 kHz 超声频率、(40 $\pm$ 2) $^{\circ}\text{C}$ 的超声温度条件下,分别对超声提取时间(30、45、60、75、90 min)、提取溶剂(55% 乙醇、65% 乙醇、75% 乙醇、85% 乙醇、95% 乙醇)及不同的物料比(1:10、1:20、1:30、1:40、1:50、1:60)等方面做了系列考察,结果在提取溶剂为 85% 乙醇、超声时间为 45 min 时,两种药材三个部位中的木犀草素基本提取完全,武当二号的花蕾、藤与武当三号花蕾适宜物料比为 1:20,武当二号叶、武当三号叶和武当三号藤适宜物料比为 1:40。

3.2 色谱分析条件的选择 在波长范围为 190~400 nm 内,采用二极管阵列检测器对木犀草素对照品溶液进行全波长光谱扫描,结果在 350 nm 附近有最大吸收,故选择该波长为该试验木犀草素的检测波长。本实验在甲醇和磷酸水溶液做为流动相组分的基础上,虽然只加入了少量乙腈,但对木犀草素的出峰时间、峰形、峰纯度及柱效的改善,起了一定作用。当甲醇-乙腈-0.4% 磷酸为 50:5:45 时,出峰时间适宜(小于 20 min),峰形好,柱效和峰纯度均较高^[1]。

3.3 储存条件及不同药用部位对有效成分差异的影响 本课题组曾对“武当二号金银花”和“武当三号金银花”的花蕾期、银花期及金花期木犀草苷的分别进行测定,结果花蕾期较银花期、金花期含量高,故本文选择花蕾为研究对象。本实验考察了两种药材三个部位在遮光、密闭、2~4 $^{\circ}\text{C}$ 贮藏条件下,随着贮藏时间的延长,木犀草素的含量下降 3%~5%,表明“武当二号金银花”和“武当三号金银花”三个部位的干燥样品在遮光、密闭、低温条件下贮藏适宜;含量方面,三个部位木犀草素含量的高低次序均为叶>藤>花蕾,三个部位含量差异较大,其中叶中含木犀草素的含量几乎为花蕾的 3 倍。结合本课题组前期研究成果^[1-3,5],“武当三号金银花”中木犀