

马艳妮,李智宁,王 韬,等.超高效液相色谱法测定忍冬叶中 5 种黄酮成分[J].江苏农业科学,2020,48(7):226-229.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.07.043

超高效液相色谱法测定忍冬叶中 5 种黄酮成分

马艳妮,李智宁,王 韬,王志尧,魏 悦,张海艳

(河南省科学院天然产物重点实验室/河南省生物技术开发中心/河南科高中标检测技术有限公司,河南郑州 450002)

摘要:通过超高效液相色谱-二极管阵列检测法(ultra performance liquid chromatography-diode array detector,简称 UPLC-DAD)测定忍冬叶中芸香苷、木犀草苷、忍冬苷、野漆树苷、木犀草素 5 种黄酮类成分的含量。使用 Agilent Elipse plus C₁₈ 反向色谱柱(4.6 mm 100 mm,3.5 μm),用乙腈(A)-0.1% 甲酸水溶液(B)进行梯度洗脱(0~20 min,14% A;20~50 min,14%~17% A;50~60 min,17%~32% A;60~61 min,32%~90% A),流速为 0.5 mL/min,进样体积为 4 L,柱温为 30 ℃,检测波长为 350 nm。结果表明,芸香苷、木犀草苷、忍冬苷、野漆树苷、木犀草素分别在 0.28~27.68、0.43~43.28、0.80~53.27、0.27~27.48、0.16~16.46 μg/mL 时与其峰面积呈良好的线性关系,平均回收率分别为 97.39%、99.03%、99.19%、98.88%、97.03%,相对标准偏差(RSD)分别为 0.96%、0.27%、0.88%、0.64%、1.39%,说明仪器的精密度及方法的重复性均良好,符合定量测定的要求。综合研究结果得出,该方法操作简单、分离效果好、灵敏度高,可为忍冬叶的开发利用和质量控制提供方法学基础。

关键词:忍冬叶;黄酮;超高效液相-二极管阵列检测法;质量控制

中图分类号:R284 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2020)07-0226-04

药用植物忍冬有花(金银花)、藤(忍冬藤)两大药用部位,其中金银花具有清热解毒、疏散风热的功效,忍冬藤具有清热解毒、疏风通络的功效。研究发现,作为非药用部位的忍冬叶,同样具有抗菌、抗炎、抗氧化等多种生物活性^[1-2]。研究还发现,忍冬叶中含有有机酸、黄酮和环烯醚萜苷等多类活性成分^[3-4],并且其绿原酸含量接近金银花,有时甚至高于金银花^[5];忍冬叶中的黄酮含量则明显高于金银花和忍冬藤^[6-8]。结合忍冬叶高产量、低价格的特点^[9]来开发利用忍冬叶具有巨大的经济意义和社会效益。

2015 年版《中华人民共和国药典》中规定,绿原酸和木犀草苷为金银花的含量控制指标^[10],可以参照此标准对忍冬叶进行质量控制,但是由于指标成分略显单一,难以全面衡量忍冬叶的质量。关于忍

冬叶成分含量检测的报道较多^[11-13],并且目前的研究已经具有同时测定多种活性成分的优势。本试验首次建立了用超高效液相色谱-二极管阵列检测法(ultra performance liquid chromatography-diode array detector,简称 UPLC-DAD)同时测定忍冬叶中芸香苷、木犀草苷、忍冬苷、野漆树苷及木犀草素 5 种黄酮类活性成分的检测方法,以期对忍冬叶的开发利用和多指标质量控制提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 试验仪器、试剂与材料

1.1.1 仪器 Agilent 超高效液相色谱仪(型号 6400,配备自动进样器、四元梯度泵和二极管阵列检测器);分析天平(型号为 AUW220D),购自 SHIMADZU 公司。

1.1.2 药品与试剂 对照品芸香苷(纯度为 91.9%,批号为 100080-201409),购自中国食品药品检定研究院;木犀草苷(纯度 ≥ 98%,批号为 MUST-13060908),购自成都曼斯特生物科技有限公司;野漆树苷(纯度 ≥ 98%,批号为 wkq916021802)、木犀草素(纯度 ≥ 98%,批号为 wkq916051201)和忍冬苷(纯度 ≥ 98%,批号为 wkq18072701),均购自四川省维克奇生物科技有限公司;甲醇、乙腈、甲酸均为色谱级试剂,购自

收稿日期:2019-11-02

基金项目:河南省重点研发与推广专项(科技攻关)项目(编号:182102310695);河南省科学院基本科研项目(编号:190613035、18JK16014)。

作者简介:马艳妮(1983—),女,陕西杨凌人,博士,助理研究员,主要从事天然产物化学研究。Tel:(0371)65353099;E-mail:ni-2003@163.com。

通信作者:张海艳,博士,研究员,主要从事天然产物化学研究。Tel:(0371)65353099;E-mail:haiyanhai6828_cn@sina.com。

Thermo Fisher 公司。

1.1.3 试验样品 6 批忍冬叶采自河南省的不同地区,经河南中医药大学陈随清教授鉴定,这些样品均为忍冬科忍冬属忍冬 (*Lonicera japonica* Thunb.) 的干燥叶片,标本存放于河南省科学院天然产物重点实验室,标本编号依次为 150503、170504、170505、170506、170507、170708。

1.2 试验方法

1.2.1 样品的制备

1.2.1.1 对照品溶液的制备 分别精确称取适量芸香苷、木犀草苷、忍冬苷、野漆树苷、木犀草素对照品,并分别置于 5 个 25 mL 棕色量瓶中,用甲醇溶解并定容,分别制成质量浓度为 276.80、226.38、532.68、274.79、164.64 $\mu\text{g/mL}$ 的对照品储备液。于 4 $^{\circ}\text{C}$ 储存、备用。

1.2.1.2 供试品溶液的制备 精确称取约 0.15 g 忍冬叶粉末,过三号筛,置于 25 mL 棕色量瓶中,加约 24 mL 色谱级甲醇,超声处理 1 h,自然冷却后用甲醇定容至刻度,摇匀,用微孔滤膜 (0.22 μm) 过滤,取续滤液,即得供试品溶液。

1.2.2 色谱条件 色谱柱为 Agilent Eclipse Plus C_{18} 柱 (4.6 mm \times 100 mm, 3.5 μm),流动相为乙腈 (A) - 0.1% 甲酸水溶液 (B),梯度洗脱 (0 ~ 20 min, 14% A; 20 ~ 50 min, 14% ~ 17% A; 50 ~ 60 min, 17% ~ 32% A; 60 ~ 61 min, 32% ~ 90% A),流速为 0.5 mL/min,柱温为 30 $^{\circ}\text{C}$,检测波长为 350 nm,进样体积为 4 μL 。

1.2.3 方法学考察

1.2.3.1 线性关系、检出限及定量限^[14]的考察 精确吸取各 2.5 mL 芸香苷、忍冬苷、野漆树苷、木犀草素对照品溶液及 5 mL 木犀草苷对照品溶液,置于 25 mL 棕色量瓶中,用含量 $\geq 99.5\%$ 的甲醇溶液溶解,定容,制成芸香苷、木犀草苷、忍冬苷、野漆树苷、木犀草素质量浓度分别为 27.68、45.28、53.27、27.48、16.46 $\mu\text{g/mL}$ 的混合对照品溶液。分别吸取 2、1.6、1.2、0.8、0.4、0.1、0.05、0.02 mL 混合对照品溶液置于 2 mL 棕色量瓶中,用甲醇定容。按照“1.2.2”节的色谱条件进行测定,以质量浓度为横坐标 (x)、峰面积为纵坐标 (y) 进行线性回归分析,并计算各对照品的检出限 [信噪比 (S/N) = 3 : 1] 和定量限 (S/N = 10 : 1)。

1.2.3.2 精密度试验 取适量稀释后的混合对照品溶液,按照“1.2.2”节的色谱条件进行检测,连续

进样 6 次,记录各峰面积。

1.2.3.3 重复性试验 取任一忍冬叶样品 6 份,按照“1.2.1.2”节的方法制备 6 份供试品溶液,按照“1.2.2”节的色谱条件进行检测,记录各峰面积。

1.2.3.4 稳定性试验 取任一忍冬叶的同一供试品溶液,分别于 0、4、8、12、24、48、72 h 进样,记录各峰面积。

1.2.3.5 加样回收率试验 精确称取 9 份已知黄酮含量的忍冬叶样品,随机分为 3 组,分别加入高、中、低 3 个浓度的芸香苷、木犀草苷、忍冬苷、野漆树苷、木犀草素对照品溶液,先按照“1.2.1.2”节的方法制备 9 份供试品溶液,再按照“1.2.2”节的色谱条件进行检测,记录各峰面积,计算回收率及相对标准偏差 (RSD)。

1.2.4 样品测定与数据分析 取不同产地或批次的忍冬叶,按照“1.2.1.2”节的方法分别平行制备 3 份供试品溶液,按照“1.2.2”节的色谱条件进行检测。根据不同样品检测结果中各个化合物的峰面积,用线性方程计算出所检测溶液中各个化合物的浓度,再结合检测过程中稀释倍数等其他因素,最终求得待测样品中各个化合物的含量。

2 结果与分析

2.1 标准曲线的绘制

依据“1.2.3.1”节的不同对照品溶液浓度对检测结果进行线性回归,得到 5 种待测黄酮化合物的回归方程,并计算其检出限与定量限,结果见表 1。

2.2 方法学考察结果

2.2.1 精密度试验 通过计算得出,标准品溶液中芸香苷、木犀草苷、忍冬苷、野漆树苷、木犀草素峰面积的 RSD ($n=6$) 分别为 1.12%、0.70%、0.78%、0.76%、0.73%,表明仪器的精密度良好,符合定量测定要求。

2.2.2 重复性试验 取 6 份忍冬叶 170708 样品,制成供试品溶液后进行检测,计算得出芸香苷、木犀草苷、忍冬苷、野漆树苷、木犀草素含量分别为 406.7、1 475.0、7 060.4、577.6、174.0 $\mu\text{g/g}$, RSD ($n=6$) 分别为 2.89%、1.88%、2.87%、1.15%、2.33%。说明该方法的重复性良好,符合定量测定的要求。

2.2.3 稳定性试验 取忍冬叶 170708 的同一供试品溶液,分别于 0、4、8、12、24、48、72 h 进样,计算得出,芸香苷、木犀草苷、忍冬苷、野漆树苷、木犀草素

表 1 忍冬叶中 5 种黄酮类成分的回归方程及其检出限与定量限

化合物	回归方程	r^2	线性范围 ($\mu\text{g/mL}$)	检出限 ($\mu\text{g/mL}$)	定量限 ($\mu\text{g/mL}$)
芸香苷	$y = 5.592\ 7x + 0.133\ 5$	0.999 1	1.38 ~ 27.68	0.237 3	0.780 1
木犀草苷	$y = 11.827\ 1x + 0.641\ 7$	0.999 1	0.45 ~ 45.28	0.134 4	0.443 5
忍冬苷	$y = 5.987\ 2x + 1.730\ 6$	0.999 1	1.33 ~ 53.27	0.265 5	0.876 2
野漆树苷	$y = 7.006\ 2x + 1.350\ 3$	0.999 2	1.37 ~ 27.48	0.243 9	0.804 9
木犀草素	$y = 17.918\ 9x - 1.067\ 6$	0.999 3	0.16 ~ 16.46	0.029 9	0.098 7

含量的 $RSD(n=7)$ 分别为 0.98%、1.24%、0.69%、1.20%、0.33%，表明所测 5 种黄酮成分在 72 h 内的稳定性良好。

2.2.4 加样回收率试验 精确称取 9 份已知含量

的忍冬叶样品(忍冬叶 170708),随机分为 3 组后,在每组中分别加入高、中、低 3 个浓度的混合对照品溶液,制成 9 份供试品溶液后进行检测。由表 2 可以看出,该检测方法的准确度较高。

表 2 忍冬叶中 5 种黄酮类成分的加样回收结果($n=3$)

成分	称样量 (g)	样品中含量 (μg)	加入量 (μg)	测得量 (μg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
芸香苷	0.080 2	32.1	27.7	57.6	96.32	97.39	0.96
	0.080 1	32.0	33.2	63.7	97.70	97.39	0.96
	0.079 8	31.9	38.7	69.3	98.16	97.39	0.96
木犀草苷	0.080 2	120.3	97.4	215.3	98.90	99.03	0.27
	0.080 1	120.2	119.0	237.6	99.33	99.03	0.27
	0.079 8	119.7	140.7	257.4	98.85	99.03	0.27
忍冬苷	0.080 2	569.4	452.8	1 018.8	99.67	99.19	0.88
	0.080 1	568.7	586.0	1 133.7	98.18	99.19	0.88
	0.079 8	566.6	681.8	1 245.1	99.74	99.19	0.88
野漆树苷	0.080 2	48.1	38.5	85.7	98.96	98.88	0.64
	0.080 1	48.1	46.7	94.3	99.47	98.88	0.64
	0.079 8	47.9	57.7	103.7	98.20	98.88	0.64
木犀草素	0.080 2	16.0	16.5	31.2	96.00	97.03	1.39
	0.080 1	16.0	18.1	32.9	96.48	97.03	1.39
	0.079 8	16.0	19.8	35.3	98.60	97.03	1.39

2.3 样品测定结果

6 份不同产地或批次的忍冬叶的液相色谱结果见图 1,计算结果见表 3。可以看出,忍冬叶中这 5 种黄酮含量差别较大,其中芸香苷和木犀草素的含量较低,木犀草苷、忍冬苷和野漆树苷的含量较高,而且不同产地的每种黄酮成分的含量差异也较大。

3 讨论与结论

在对流动相体系进行筛选的过程中^[15-16],笔者先后考察了甲醇-水、甲醇-0.1% 甲酸水溶液、乙腈-水和乙腈-0.1% 甲酸水溶液 4 种体系,结果表

明,乙腈-0.1% 甲酸水溶液体系下的色谱峰分离度较好,基线也较稳定。采用二极管阵列检测器对 5 个黄酮成分在波长为 190~400 nm 的范围内进行扫描,发现芸香苷分别在 256、353 nm 处有最大、较大吸收,而木犀草苷、忍冬苷、野漆树苷、木犀草素依次在 347、350、340、350 nm 处有最大吸收。分析比较得出,在 350 nm 波长下得到的色谱峰较好且检测结果稳定,因此统一选择 350 nm 作为检测波长。对提取溶剂(甲醇、50% 甲醇、70% 乙醇)的考察结果表明,用甲醇超声提取 1 h 后,待测化合物的色谱峰响应值相对较大。

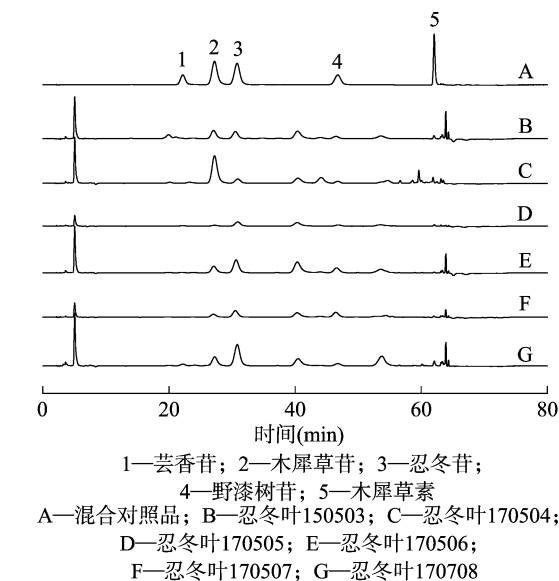


图1 混合对照品与忍冬叶的超高效液相色谱结果

表 3 忍冬叶中 5 种黄酮类化合物含量的测定结果

忍冬叶 样品编号	含量(μg/g)				
	芸香苷	木犀草苷	忍冬苷	野漆树苷	木犀草素
150503	TR	1 886.0 ± 37.5	3 105.0 ± 54.2	925.5 ± 20.7	153.0 ± 8.2
170504	TR	6 556.2 ± 181.8	1 359.3 ± 23.5	617.0 ± 19.7	76.9 ± 3.8
170505	124.1 ± 4.1	136.2 ± 3.9	1 876.9 ± 51.2	428.2 ± 26.6	78.9 ± 4.1
170506	108.6 ± 2.9	1 493.5 ± 49.9	5 966.2 ± 173.7	1 952.5 ± 18.1	53.1 ± 0.5
170507	TR	562.6 ± 45.0	2 250.0 ± 62.9	1 558.0 ± 4.2	52.5 ± 1.2
170708	406.7 ± 14.9	1 475.0 ± 27.7	7 060.4 ± 126.9	577.6 ± 19.0	174.0 ± 7.6

注:TR 表示痕量检出(定量限以下);n = 3。

对忍冬叶中 5 种黄酮类成分(芸香苷、木犀草苷、忍冬苷、野漆树苷和木犀草素)含量的测定结果显示,不同产地或批次的忍冬叶中 5 种黄酮类成分含量不一。总体来说,木犀草苷和忍冬苷的含量相对较高,芸香苷和木犀草素的含量相对较低。本检测方法操作简单,分离效果好,灵敏度高,重现性好,可以为忍冬叶的进一步开发利用及质量控制提供试验依据。

参考文献:

[1] 马俊利,商克勇,周艳红. 忍冬叶总黄酮对四氯化碳致急性肝损伤小鼠的保护作用[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(24): 304 – 307.

[2] 马艳妮,王志尧,郭展展,等. 忍冬叶总黄酮的测定及其体外抗菌活性[J]. 中国实验方剂学杂志,2017,23(6):55 – 59.

[3] 陈玲,张海艳,李晓,等. 忍冬的化学成分研究进展[J]. 现代药物与临床,2015,30(1):108 – 114.

[4] 朱姮,陈静娴,文蕾,等. 忍冬叶化学成分的研究进展[J]. 山东科学,2016,29(6):30 – 39.

[5] 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 – 157.

[6] 石雨荷,谢舒平,王丽君,等. 高效液相色谱法同时测定湖南不同产地金银花中不同部位绿原酸与木犀草苷含量[J]. 中南药学,2019,17(4):552 – 555.

[7] 王柯,王艳艳,赵东保,等. HPLC 法测定金银花不同部位中木犀草素及其苷的含量[J]. 河南大学学报(自然科学版),2011,41(1):39 – 43.

[8] 范毅,陈玲,李晓,等. 不同产地金银花提取物的指纹图谱及绿原酸、木犀草苷含量测定[J]. 河南科学,2019,37(1):53 – 59.

[9] 罗磊,张冰洁,朱文学,等. 响应面试验优化超声辅助提取金银花叶黄酮工艺及其抗氧化活性研究[J]. 食品科学,2016,37(6):13 – 19.

[10] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:221.

[11] 钱正明,李会军,李萍,等. 高效液相色谱法测定忍冬藤和叶中 8 种活性成分[J]. 分析化学,2007,35(8):1159 – 1163.

[12] 朱金花,王悠悠,庆伟霞,等. HPLC 法同时测定忍冬叶中 9 种活性成分的研究[J]. 化学研究,2017,28(1):70 – 74.

[13] 田伟,范帅帅,甄亚钦,等. UPLC 比较金银花、忍冬藤和忍冬叶中 11 种活性成分的含量[J]. 中国中药杂志,2019,44(1): 100 – 105.

[14] Gao W, Wang R, Li D, et al. Comparison of five *Lonicera* flowers by simultaneous determination of multi – components with single reference standard method and principal component analysis[J]. Journal of Pharmaceutical Biomedical Analysis, 2016, 117(1): 345 – 351.

[15] 李正,吴德玲,赵宏苏,等. UPLC 测定醉鱼草不同部位中 4 种黄酮类成分[J]. 中国实验方剂学杂志,2017,23(6):74 – 77.

[16] Ren M T, Chen J, Song Y, et al. Identification and quantification of 32 bioactive compounds in *Lonicera* species by high performance liquid chromatography coupled with time – of – flight mass spectrometry[J]. Journal of Pharmaceutical Biomedical Analysis, 2008,48(5):1351 – 1360.