

UPLC 法同时测定裸花紫珠中 5 种类黄酮类成分

邵 军^{1,2,3}, 陈伟康^{2,3}, 马双成⁴, 罗跃华^{1,2,3*}

1. 南昌大学药学院, 江西 南昌 330046
2. 江西省食品药品检验所, 江西 南昌 330029
3. 江西省药品与医疗器械质量工程技术研究中心, 江西 南昌 330029
4. 中国食品药品检定研究院, 北京 100050

摘要: 目的 建立同时测定裸花紫珠中 5 个有效成分的超高效液相色谱 (UPLC) 方法。方法 采用 Agilent Eclipse XDB-C₁₈ 色谱柱 (100 mm×3.0 mm, 1.8 μm), 流动相为乙腈 (A)-0.1% 甲酸水溶液 (B), 梯度洗脱, 体积流量为 0.7 mL/min。检测波长 350 nm, 柱温 40 °C。结果 木犀草苷、毛蕊花糖苷、木犀草素-4'-O-β-D-吡喃葡萄糖苷、木犀草素、5, 4'-二羟基-3, 7, 3'-三甲氧基黄酮分别在 2.44~122.0 μg/mL ($r=0.999\ 8$)、9.06~453.0 μg/mL ($r=0.999\ 9$)、4.42~221.0 μg/mL ($r=0.999\ 9$)、3.36~168.0 μg/mL ($r=0.999\ 8$)、2.52~126.0 μg/mL ($r=0.999\ 8$) 内线性关系良好; 平均回收率在 98.5%~100.8%。结论 所建立的 UPLC 法简便快速、重复性良好、结果准确可靠, 可作为裸花紫珠药材质量标准控制的方法。

关键词: 裸花紫珠; 超高效液相色谱; 木犀草苷; 毛蕊花糖苷; 木犀草素-4'-O-β-D-吡喃葡萄糖苷; 木犀草素; 5, 4'-二羟基-3, 7, 3'-三甲氧基黄酮

中图分类号: R286.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2014)010-1473-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.10.022

Simultaneous determination of five flavonoids in *Callicarpa nudiflora* by UPLC

SHAO Jun^{1,2,3}, CHEN Wei-kang^{2,3}, MA Shuang-cheng⁴, LUO Yue-hua^{1,2,3}

1. School of Pharmacy, Nanchang University, Nanchang 330046, China
2. Jiangxi Provincial Institute for Food and Drug Control, Nanchang 330029, China
3. Jiangxi Provincial Engineering Research Center for Drug and Medical Device Quality, Nanchang 330029, China
4. National Institute for Food and Drug Control, Beijing 100050, China

Abstract: Objective To develop a UPLC method for the simultaneous determination of five active ingredients in *Callicarpa nudiflora*. **Methods** Analysis was performed on an Agilent Eclipse XDB-C₁₈ column (100 mm ×3.0 mm, 1.8 μm) eluted with acetonitrile (A) and 0.1% methanoic acid (B) in a gradient program. The flow rate was 0.7 mL/min, the detection wavelength was 350 nm, and the column temperature was 40 °C. **Results** Luteoloside, acteoside, luteolin-4'-O-β-D-glucopyranoside, luteolin, and 5, 4'-dihydroxy-3, 7, 3'-trimethoxyflavone showed a good linearity in the ranges of 2.44–122.0 μg/mL ($r = 0.999\ 8$), 9.06–453.0 μg/mL ($r = 0.999\ 9$), 4.42–221.0 μg/mL ($r = 0.999\ 9$), 3.36–168.0 μg/mL ($r = 0.999\ 8$), and 2.52–126.0 μg/mL ($r = 0.999\ 8$). The average recoveries, measured at three concentration levels, varied from 98.5%–100.8%. **Conclusion** The method is simple, accurate, and can be used for the quality control of *C. nudiflora*.

Key words: *Callicarpa nudiflora* Hook.; UPLC; luteoloside; acteoside; luteolin-4'-O-β-D-glucopyranoside; luteolin; 5, 4'-dihydroxy-3, 7, 3'-trimethoxyflavone

裸花紫珠 *Callicarpa nudiflora* Hook. 始载于唐代《本草拾遗》, 为马鞭草科 (Verbenaceae) 紫珠属 *Callicarpa* L. 植物, 主产于广东、广西, 生于平地至海拔 1 200 m 的山坡、谷地、溪旁林中或灌丛

中。叶药用, 有止血止痛、散瘀消肿之效, 用于外伤出血、跌打肿痛、风湿肿痛、肺结核咯血、胃出血^[1-2]。《中国药典》1977 年版一部以裸花紫珠名记载, 以后各版药典均未记载。对于裸花紫珠药材

收稿日期: 2014-01-26

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81373955); 中国食品药品检定研究院中青年发展研究基金课题 (2013WA9)

作者简介: 邵 军 (1991—), 男, 硕士在读, 从事药物分析研究。Tel: 13617007985 E-mail: 452224929@qq.com

*通信作者 罗跃华 Tel: (0791)88158689 E-mail: emailuo@sohu.com

的测定方法报道,有文献采用分光光度法测定裸花紫珠药材水提取物中总黄酮的量^[3],或采用酚蓝-酚比色法测定裸花紫珠中总酚的量^[4]以及应用 HPLC 法测定其中 1~2 个成分, HPLC 法测定的成分有毛蕊花糖苷^[5]、木犀草素^[6]、齐墩果酸与熊果酸^[7]。本课题组通过对裸花紫珠叶乙醇提取物的醋酸乙酯及正丁醇部分分离制备得到了 5 个单体化合物,结构鉴定为木犀草苷、毛蕊花糖苷、木犀草素-4'-O-β-D-吡喃葡萄糖苷、木犀草素、5,4'-二羟基-3,7,3'-三甲氧基黄酮。除毛蕊花糖苷为酚苷类化合物,其余 4 组分均为黄酮类化合物。近年来研究表明,裸花紫珠中黄酮类成分具有抗炎、止血作用^[8],毛蕊花糖苷可能是裸花紫珠止血作用的主要活性成分^[9]。本实验采用超高效液相色谱法(UPLC)对裸花紫珠药材中的 5 个有效成分同时进行测定,该方法操作简单准确,分离效果好,灵敏度高,可为裸花紫珠药材质量控制提供可靠的方法。

《中国药典》1977 年版一部描述裸花紫珠的药用部位为裸花紫珠的干燥叶,有文献描述其药用部位为地上干燥部分^[10],而原药材的有效成分的量决定了药材及其制剂的疗效。为此,本实验测定并比较了裸花紫珠不同部位(枝和叶)中以上 5 种成分的差异,为明确裸花紫珠的药用部位提供了参考。

1 材料与试剂

1.1 材料

裸花紫珠为本课题组在海南五指山区采收,药材经江西省食品药品检验所袁桂平主任中药师鉴定为裸花紫珠 *Callicarpa nudiflora* Hook. 地上部分。

对照品木犀草素、5,4'-二羟基-3,7,3'-三甲氧基黄酮、木犀草素-4'-O-β-D-吡喃葡萄糖苷由江西省食品药品检验所分离制备,并鉴定结构, HPLC 峰面积归一化法计算质量分数均在 99% 以上,可供测定用。木犀草苷(批号 11720-201106)、毛蕊花糖苷(批号 1530-200202)对照品均购于中国食品药品检定研究院。

1.2 仪器与试剂

Agilent 1290 系列高效液相色谱仪; G4220A Bin pump 二元高压泵, G1316C TCC 柱温箱, G4226A 全自动进样器; G4212A 二极管阵列检测器; Agilent ChemStation 工作站; Sartorius BT 25S 电子天平; Sartorius BSA124S—CW 电子天平。

乙腈为色谱纯,水为 Millipore 制备的超纯水,其他试剂均为分析纯。

2 方法

2.1 混合对照品溶液的制备

分别称取木犀草苷、毛蕊花糖苷、木犀草素-4'-O-β-D-吡喃葡萄糖苷、木犀草素、5,4'-二羟基-3,7,3'-三甲氧基黄酮对照品适量,精密称定,置同一 100 mL 量瓶中,加 70% 甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,制成质量浓度分别为 0.122、0.453、0.221、0.168、0.126 mg/mL 的混合溶液,即得。

2.2 供试品溶液的制备

取本品粉末(过四号筛)约 1 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入 70% 甲醇 50 mL,称定质量,超声处理(功率 500 W,频率 40 kHz) 40 min,放冷,再称定质量,用 70% 甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.3 色谱条件

色谱柱: Agilent Eclipse XDB-C₁₈ (100 mm × 3.0 mm, 1.8 μm); 流动相为乙腈(A)-0.1% 甲酸(B),梯度洗脱: 0~0.5 min, 10% A; 0.5~12.0 min, 10%~14% A; 12.0~20.0 min, 14%~35% A; 20.0~25.0 min, 35%~80% A; 体积流量 0.7 mL/min; 检测波长 350 nm; 柱温 40 °C; 进样量 1 μL。在上述色谱条件下,木犀草苷、毛蕊花糖苷、木犀草素-4'-O-β-D-吡喃葡萄糖苷、木犀草素、5,4'-二羟基-3,7,3'-三甲氧基黄酮 5 个色谱峰的分离度均大于 1.5。

2.4 线性关系考察

精密吸取“2.1”项下混合对照品储备液 0.25、0.5、1.0、2.5、5.0 mL,分别置 10 mL 量瓶中,用 70% 甲醇定容至刻度,摇匀,即得 5 个系列浓度的混合对照品溶液,在上述色谱条件下进样测定。以对照品溶液的浓度为横坐标(X),峰面积为纵坐标(Y),绘制标准曲线,得回归方程。将“2.1”项下的混合对照品储备液用 70% 甲醇逐级稀释后,以 3 倍噪音(S/N ≥ 3)计算检测限(LOD)。结果见表 1。

2.5 精密度试验

取按“2.1”项下方法制备的混合对照品储备液,在上述色谱条件下连续进样 6 次,记录色谱峰面积,结果木犀草苷、毛蕊花糖苷、木犀草素-4'-O-β-D-吡喃葡萄糖苷、木犀草素、5,4'-二羟基-3,7,3'-三甲氧基黄酮的峰面积的 RSD 分别为 0.36%、0.27%、0.69%、0.22%、0.60%。

2.6 稳定性试验

取按“2.2”项下方法制备的供试品溶液,在上

表1 5个成分标准曲线测定结果及检测限

Table 1 Determination of standard curve and detection limit of five constituents

成分	回归方程	r	线性范围 / (μg·mL ⁻¹)	检测限 / (μg·mL ⁻¹)
木犀草苷	Y=2.385 X-11.923 3	0.999 8	2.44~122.0	0.3
毛蕊花糖苷	Y=0.673 8 X-1.423 1	0.999 9	9.06~453.0	0.5
木犀草素-4'-O-β-D-吡喃葡萄糖苷	Y=1.306 4 X+10.721 7	0.999 9	4.42~221.0	0.5
木犀草素	Y=1.297 4 X-0.081 2	0.999 8	3.36~168.0	0.3
5, 4'-二羟基-3, 7, 3'-三甲氧基黄酮	Y=1.366 7 X-0.477 8	0.999 8	2.52~126.0	0.5

述色谱条件下于0、2、4、8、12、24 h 分别进样测定, 记录色谱峰面积, 结果木犀草苷、毛蕊花糖苷、木犀草素-4'-O-β-D-吡喃葡萄糖苷、木犀草素、5, 4'-二羟基-3, 7, 3'-三甲氧基黄酮的 RSD 值分别为1.5%、1.3%、0.25%、0.34%、1.1%。

2.7 重复性试验

取同一批裸花紫珠药材, 按“2.2”项下方法制备6份供试品溶液, 在上述色谱条件下进样测定, 记录色谱峰面积, 以质量分数为指标计算RSD。结果木犀草苷、毛蕊花糖苷、木犀草素-4'-O-β-D-吡喃葡萄糖苷、木犀草素、5, 4'-二羟基-3, 7, 3'-三甲氧基黄酮的平均质量分数分别为3.245、0.196、0.028、0.026、0.027 mg/g, RSD 分别为0.32%、0.43%、0.56%、0.82%、0.80%。

2.8 加样回收率试验

取本品粉末(过四号筛)约0.5 g, 精密称定, 加入相当于样品中各成分含有量的80%, 100%, 120%的对照品溶液各3份, 按“2.2”项下方法制备供试品溶液, 在上述色谱条件下进样测定, 记录色

谱峰面积。结果木犀草苷的低、中、高的回收率分别为98.3%、98.1%、99.2%, RSD 分别为0.79%、0.85%、0.72%; 毛蕊花糖苷的低、中、高的回收率分别为99.1%、98.2%、98.3%, RSD 分别为0.74%、0.85%、0.99%; 木犀草素-4'-O-β-D-吡喃葡萄糖苷的低、中、高的回收率分别为99.2%、98.5%、98.4%, RSD 分别为0.97%、0.75%、0.89%; 木犀草素的低、中、高的回收率分别为98.2%、99.6%、98.9%, RSD 分别为0.67%、0.96%、0.75%。5, 4'-二羟基-3, 7, 3'-三甲氧基黄酮的低、中、高的回收率分别为99.6%、101.3%、101.5%, RSD 分别为0.65%、0.88%、0.85%。

2.9 样品的测定

取裸花紫珠叶7批, 分别按“2.2”项下方法每批制备2份供试品溶液; 取裸花紫珠3批, 每批的枝和叶分别按“2.2”项下方法每批制备2份供试品溶液, 在上述色谱条件下进样测定, 按外标法以峰面积计算样品中5个有效成分的量, 测定结果见表2。

测定结果表明, 5个成分在裸花紫珠叶的量均高于在枝中的量。裸花紫珠枝与叶的UPLC谱图见图1。

表2 样品的测定结果 (n=3)

Table 2 Determination of samples (n=3)

批号	部位	质量分数 / (mg·g ⁻¹)				
		木犀草苷	毛蕊花糖苷	木犀草素-4'-O-β-D-吡喃葡萄糖苷	木犀草素	5, 4'-二羟基-3, 7, 3'-三甲氧基黄酮
120617	叶	0.101	1.138	0.002	0.008	0.070
120619	叶	0.268	3.802	0.070	0.078	0.078
120624	叶	0.264	0.743	0.098	0.058	0.104
120710	叶	0.380	3.172	0.058	0.056	0.054
120713	叶	0.384	3.455	0.140	0.048	0.072
120716	叶	0.360	3.665	0.090	0.044	0.084
120910	叶	0.466	1.845	0.112	0.074	0.074
130508	叶	0.192	1.213	0.054	0.052	0.101
130510	枝	0.009	0.623	0.012	0.011	0.026
	叶	0.262	3.691	0.098	0.108	0.112
130512	枝	0.019	0.989	0.016	0.028	0.026
	叶	0.216	1.787	0.074	0.102	0.986
	枝	0.008	0.498	0.012	0.019	0.021

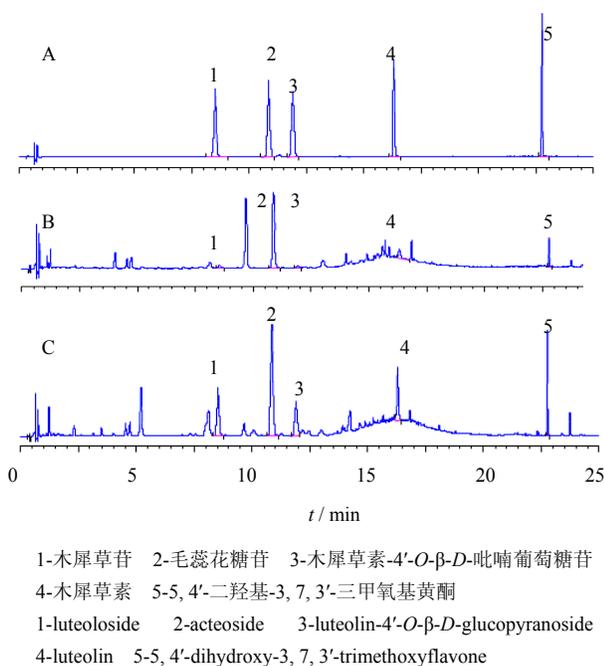


图 1 混合对照品 (A)、裸花紫珠枝 (B) 和裸花紫珠叶 (C) 的 UPLC 谱图

Fig. 1 UPLC of mixed reference substances (A), *C. nudiflora* stems (B), and *C. nudiflora* leaves (C)

3 讨论

3.1 UPLC 的选择

对比了 HPLC 和 UPLC 法测定裸花紫珠中 5 个成分的量, 发现 UPLC 法在检测裸花紫珠中 5 个成分具有分离效果好, 检测时间短, 方法重复性好等诸多优点, 故采用 UPLC 法测定裸花紫珠中 5 个有效成分的量。

3.2 供试品溶液制备方法的确定

分别考察了提取溶剂 (甲醇、70% 甲醇、乙醇、70% 乙醇)、提取方法 (超声、回流)、提取时间 (20、30、40、50 min) 以及溶剂用量 (25、50、100 mL), 结果发现采用 50 mL 70% 甲醇超声处理 40 min, 该条件下裸花紫珠中 5 个有效成分可以达到最佳提取效率。

3.3 检测波长的选择

对供试品色谱 400~200 nm 进行光谱扫描, 经对各个波长的供试品色谱图进行比较, 以 350 nm 为检测波长, 5 个峰的响应值均较大, 较能反映样品中 5 个组分的信息。

3.4 体流量的选择

UPLC 的体流量对裸花紫珠 5 个成分的分离效果影响较大。考察了不同体流量 (0.3、0.5、0.7 mL/min) 对 5 个成分分离效果的影响, 结果发现体流量在 0.7 mL/min 时, 5 个成分与相邻色谱峰分离效

果较好。

3.5 柱温的选择

考察了不同柱温 (25、30、40、50 °C) 对 5 个成分分离效果的影响, 结果发现柱温控制在 40 °C 时, 5 个成分与相邻色谱峰分离效果较好。

3.6 测定结果分析

本实验考察了不同产地和不同批次裸花紫珠叶中 5 个有效成分的量, 测定结果可看出, 5 个有效成分的质量分数存在较大差异, 其中毛蕊花糖苷和木犀草苷的质量分数相对较高, 而木犀草素、5, 4'-二羟基-3, 7, 3'-三甲氧基黄酮、木犀草素-4'-O-β-D-吡喃葡萄糖苷量相对较低; 通过对裸花紫珠枝和叶中 5 个有效成分质量分数的比较表明, 5 个有效成分在裸花紫珠叶的质量分数均高于在枝中的量。因此, 《中国药典》1977 年版一部对于裸花紫珠的药用部位为其干燥叶的描述准确。

UPLC 具有超高柱效的分离能力和分离速度, 对成分较复杂的中药具有良好的分离效果并能大大缩短样品运行的时间。本实验建立了 UPLC 方法操作简单、准确、重复性好, 具有分离效果好, 检测时间短, 方法重复性好等诸多优点。此外, 本实验还比较了裸花紫珠枝与叶中 5 种成分量的差异, 为明确裸花紫珠的药用部位具有积极意义。

参考文献

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志 [M]. 科学出版社, 1982.
- [2] 蔡金平, 董琳, 关薇薇, 等. 裸花紫珠的研究进展 [J]. 现代药物与临床, 2012, 27(1): 60-64.
- [3] 谌乐刚, 宋永强. 分光光度法测定裸花紫珠药材水提物中总黄酮的含量 [J]. 华西药学杂志, 2005, (5): 449-450.
- [4] 颜小捷, 谷陟欣, 卢凤来, 等. FOLIN-酚比色法测定裸花紫珠中总酚含量 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(18): 74-78.
- [5] 李才堂, 文萍, 郭琦丽, 等. HPLC 测定裸花紫珠药材中毛蕊花糖苷的含量 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 19(1): 84-86.
- [6] 胡蓉, 姚闽, 李玉云, 等. HPLC 法测定裸花紫珠药材中木犀草素的含量 [J]. 中药新药与临床药理, 2009, 20(3): 271-272.
- [7] 张艳秋, 洪金波. HPLC 法测定裸花紫珠中齐墩果酸与熊果酸的含量 [A] // 海南省药学会 2006 年学术年会论文集 [C]. 海口: 海南药学会, 2006.
- [8] 梁纪军, 徐凯, 李留法, 等. 裸花紫珠总黄酮的抗炎、止血作用研究 [J]. 现代中西医结合杂志, 2009, 18(26): 3161-3162.
- [9] 李伟, 徐向平, 关怀, 等. HPLC 法测定裸花紫珠片中木犀草素 [J]. 中草药, 2009, 40(4): 578-580.
- [10] 刘明生. 黎药学概论 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2008.