

# RP-HPLC法测定柳叶鬼针草地上部分中 3种黄酮苷的含量

朱娜<sup>1</sup>, 李绪文<sup>1</sup>, 刘桂英<sup>1</sup>, 魏巍<sup>1</sup>, 杨瑞杰<sup>1</sup>, 桂明玉<sup>1</sup>, 刘贤英<sup>2</sup>, 金永日<sup>1\*</sup>

(1. 吉林大学化学学院, 长春 130012 2. 吉林大学第二医院, 长春 130041)

**摘要** 目的: 对柳叶鬼针草地上部分中的 3种主要黄酮苷类成分木犀草素-7-O-β-D-吡喃葡萄糖苷(化合物I)、槲皮苷(化合物II)、紫柳因-4-甲氧基-4-O-β-D-吡喃葡萄糖苷(化合物III)进行含量测定。方法: 采用反相高效液相色谱法, 使用 ZORBAX SB-C<sub>18</sub> (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 以乙腈-0.1% 醋酸水溶液为流动相进行梯度洗脱 (0~30 min, 16:84; 30~46 min, 24:76), 流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 检测波长 350 nm, 柱温 25℃。结果: 化合物I~III 进样量在 0.01~5.00 μg 范围内均有良好的线性关系 ( $r \geq 0.9992$ ,  $n=8$ )。化合物I~III 的平均回收率 ( $n=6$ ) 分别为 100.3% (RSD 为 2.0%), 100.4% (RSD 为 1.8%) 和 102.6% (RSD 为 1.9%)。结论: 本方法能够准确测定柳叶鬼针草中 3种主要黄酮苷类成分含量。

**关键词:** 柳叶鬼针草; 黄酮苷; 含量测定; 反相高效液相色谱

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2009)12-2029-03

## RP-HPLC determination of three flavonoids in aerial parts of *Bidens ceruana* L.

ZHU Na<sup>1</sup>, LIXu-wen<sup>1</sup>, LIU Gui-ying<sup>1</sup>, WEI Wei<sup>1</sup>, YANG Rui-jie<sup>1</sup>,  
GUIMing-yu<sup>1</sup>, LIU Xian-ying<sup>2</sup>, JIN Yong-ri<sup>1\*</sup>

(1. Chemistry College of Jilin University Changchun 130012, China 2. The Second Hospital of Jilin University Changchun 130041, China)

**Abstract Objective** To determine three flavonoids luteolin-7-O-β-D-glucopyranoside (compound I), quercitrin (compound II), butein-4-methoxyl-4-O-β-D-glucopyranoside (compound III) in aerial parts of *Bidens ceruana*. **Methods** Separation was carried out on a ZORBAX SB-C<sub>18</sub> column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm). The mobile phase was acetonitrile-water (containing 0.1% acetic acid) with gradient elution (0-30 min, 16:84; 30-46 min, 24:76). The flow rate was 1.0 mL·min<sup>-1</sup> at 25℃, and the detection wavelength was set at 350 nm. **Results** The linearity was in the range of 0.01-5.00 μg for compounds I-III ( $r \geq 0.9992$ ,  $n=8$ ); The average recoveries ( $n=6$ ) for compound I-III were 100.3% (RSD=2.0%), 100.4% (RSD=1.8%) and 102.6% (RSD=1.9%) respectively. **Conclusion** This method is accurate, reliable and sensitive for determination of three flavonoids in *Bidens ceruana* L.

**Key words** *Bidens ceruana*; flavonoids; determination; RP-HPLC

柳叶鬼针草 (*Bidens ceruana* L.) 为 1 年生草本植物, 生于草甸及沼泽边缘, 有时沉于水中, 该植物在我国分布于东北、华北、甘肃、四川、云南、西藏等地, 一般夏秋季采收, 鲜用或晒干。柳叶鬼针草中含鞣质、抗坏血酸、胡萝卜素、黄酮类化合物和精油, 具有清热解毒、活血、利尿等功能。主治腹泻痢疾、咽喉肿痛、跌打损伤、风湿痹痛等症<sup>[1]</sup>。我们从柳叶鬼针草中分离得到 3 个含量相对较高的黄酮苷, 经理化性质和波谱学数据分析鉴定了它们的结构, 分别

为木犀草素-7-O-β-D-吡喃葡萄糖苷(化合物 I)、槲皮苷(化合物 II)、紫柳因-4-甲氧基-4-O-β-D-吡喃葡萄糖苷(化合物 III)<sup>[2~5]</sup>。本文采用 RP-HPLC 法测定了柳叶鬼针草中这 3 种黄酮苷类化合物的含量, 为柳叶鬼针草药材质量标准的建立提供了含量测定方法。

### 1 仪器与材料

Agilent 1100 型高效液相色谱仪, VWD 检测器, Agilent 1100 工作站。甲醇、乙腈为色谱纯, 水为重

\* 通讯作者 Tel/Fax (0431) 85167996 E-mail: jiny@jlu.edu.cn

蒸水。

本实验所用的原料采自吉林省辉南县,经长春中医药大学邓明鲁教授鉴定为柳叶鬼针草(*Bidenes ceruna* L.)。

化合物 I、II、III 的对照品均为自制,系从柳叶鬼针草提取物中分离得到,并经  $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ 、MS、IR 和 UV 等光谱法鉴定其结构;按本方法色谱条件,归一化法测得它们的纯度分别为 99.2%, 99.0%, 99.2%。

## 2 色谱条件

采用 ZORBAX SB-C<sub>18</sub> 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈 - 0.1% 醋酸水溶液 (0~30 min 16:84 30~46 min 24:76), 流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 检测波长 350 nm, 柱温 25 °C (室温), 进样量 20 μL。

## 3 溶液制备

**3.1 对照品混合溶液** 精密称取化合物 I 2.20 mg 化合物 II 2.40 mg 化合物 III 0.60 mg 置于同一 100 mL 量瓶中, 加乙腈 - 0.1% 醋酸水溶液 (16:84) 溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得。

**3.2 供试品溶液** 取干燥的柳叶鬼针草粉末 (过 60 目筛), 混合均匀, 精密称取 1.0 g 用甲醇水浴 (72 °C) 回流提取 3 次, 每次加甲醇 20 mL, 回流时间分别为 2 h 1.5 h 1 h 合并提取液, 蒸干溶剂后加乙腈 - 0.1% 醋酸水溶液 (16:84) 溶解并定容至 50 mL, 过 0.45 μm 滤膜, 取续滤液即得。

## 4 方法学考察

**4.1 线性关系考察** 精密称取化合物 I、II、III 的对照品适量, 以乙腈 - 0.1% 醋酸水溶液 (16:84) 溶解并配制成浓度均为 0.25, 0.125, 0.05, 0.025, 0.0125, 0.005, 0.0025, 0.0005 mg·mL<sup>-1</sup> 的对照品混合溶液。分别取上述溶液各 20 μL 注入液相色谱仪, 结果表明化合物 I、II、III 的进样量 ( $X$ , μg) 均在 0.01~5.00 μg 范围内, 与峰面积 ( $Y$ ) 呈现良好的线性关系。回归方程分别为:

$$Y = 2.423 \times 10^3 X - 138.6 \quad r = 0.9992$$

$$Y = 1.693 \times 10^3 X - 44.35 \quad r = 0.9996$$

$$Y = 2.463 \times 10^3 X - 15.59 \quad r = 0.9998$$

**4.2 检测限** 精密称取化合物 I、II、III 的对照品适量, 以乙腈 - 0.1% 醋酸水溶液 (16:84) 配成浓度为 0.01 mg·mL<sup>-1</sup> 的对照品混合溶液, 用流动相逐级稀释, 进样, 按 3 倍信噪比计算化合物 I、II、III 的最低检测限分别为 0.75, 0.5, 1.0 ng。

**4.3 精密度试验** 取化合物 I、II、III 的对照品适

量, 分别用乙腈 - 0.1% 醋酸水溶液 (16:84) 溶解并制成浓度均为 0.025 mg·mL<sup>-1</sup> 的对照品混合溶液, 连续进样 6 次, 测定峰面积, 计算化合物 I、II、III 峰面积的 RSD ( $n = 6$ ) 分别为 1.2%, 0.70%, 0.90%。

**4.4 稳定性试验** 供试品溶液在 0~12 h 内每隔 2 h 进样 1 次, 测定峰面积, 计算化合物 I、II、III 峰面积的 RSD 分别为 1.9%, 1.3%, 1.0%。结果表明在 12 h 内供试品溶液稳定。

**4.5 重复性试验** 取干燥的柳叶鬼针草粉末 (过 60 目筛) 6 份, 按“3.2”项下方法操作, 制得 6 份溶液, 分别注入色谱仪测定含量。结果样品中化合物 I、II、III 含量的平均值 ( $n = 6$ ) 分别为 0.103%, 0.119%, 0.0228%; RSD 分别为 1.1%, 1.1%, 2.0%。

**4.6 加样回收率试验** 取已知含量 (化合物 I、II、III 含量分别为 0.103%, 0.119%, 0.0228%) 的干燥柳叶鬼针草粉末 6 份, 每份约 0.5 g 分别向其中加入 3 种化合物的单一对照品甲醇溶液 (化合物 I ~ III 浓度分别为 0.60, 0.69, 0.12 mg·mL<sup>-1</sup>) 各 1 mL, 按“3.2”项下方法操作, 制得 6 份供试溶液, 进样测定化合物 I ~ III 的峰面积, 计算回收率。结果化合物 I、II、III 的平均回收率 ( $n = 6$ ) 分别为 100.3% (RSD 为 2.0%), 100.4% (RSD 为 1.8%) 和 102.6% (RSD 为 1.9%)。

## 5 含量测定

分别精密吸取按“3”项下方法制备的对照品混合溶液和供试品溶液各 20 μL, 注入高效液相色谱仪, 记录色谱图, 按外标法以峰面积计算样品中化合物 I、II、III 的含量。结果 3 批柳叶鬼针草样品中化合物 I 的含量分别为 0.103%, 0.106%, 0.107%; 化合物 II 的含量分别为 0.113%, 0.116%, 0.117%; 化合物 III 的含量分别为 0.0228%, 0.0233%, 0.0239%。

## 6 讨论

**6.1 测定波长的选择** 紫外光谱图显示化合物 I、II、III 皆在 350 nm 附近有最大吸收, 故选定 350 nm 为测定波长。

**6.2 流动相选择** 分别考察了甲醇 - 水和乙腈 - 水的不同比例的流动相, 发现流动相为乙腈 - 0.1% 醋酸水溶液 (0~30 min 16:84 30~46 min 24:76) 能达到很好的分离效果, 对照品和样品分离的色谱图见图 1。

**6.3 提取溶剂的选择** 本文考察了提取溶剂, 比较

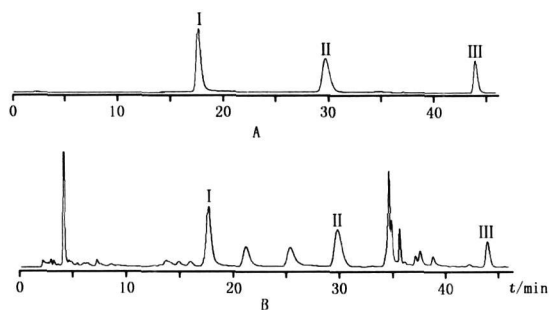


图 1 化合物 I ~ III 的对照品 (A) 及样品 (B) 色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms of reference substances of compound I ~ III (A) and sample (B)

了乙醇、甲醇和 80% 乙醇, 结果以甲醇提取效率最佳, 故选择甲醇作为提取溶剂。通过比较甲醇室温冷浸 24 h 回流提取 2 h (72 °C)、超声提取 0.5 h, 发现回流提取率最高, 回流提取 3 次与 4 次的提取率基本一致, 因此选择回流提取 3 次; 通过不同固液比 (1:15, 1:20, 1:25) 的提取率的比较, 发现结果差别不大, 每次加入甲醇量为 20 mL; 3 次回流时间分别选择 2 h, 1.5 h, 1 h 的依据是首次提取需要浸润的时间长, 而后含量相对减少, 所以后 2 次提取时间依次递减。经试验发现, 按上述时间回流提取 3 次

与均按 2 h 回流提取的提取率基本一致, 因此确定 3 次回流时间分别为 2 h, 1.5 h, 1 h。

**6.4 小结** 本测定方法可以准确、灵敏地测定柳叶鬼针草中 3 种黄酮苷的含量, 化合物 I、II、III 能达到基线分离, 重复性及回收率较好, 结果可靠, 为柳叶鬼针草质量标准的建立提供了依据。

#### 参考文献

- 1 Editorial Committee of Chinese Book on Chinese Medicine (中华本草编委会). Chinese Book on Chinese Medicine (中华本草). Vol 7 (第 7 卷). Shanghai (上海): Shanghai Science and Technology Publisher (上海科学技术出版社), 1999: 730.
- 2 YU De-quan (于德泉), YANG Jun-shan (杨峻山). Handbook of Analytical Chemistry (分析化学手册). Vol 7 (第 7 卷). Beijing (北京): Chemical Industry Press (化学工业出版社), 1999: 838.
- 3 Calinsan CA, Mackel J. A diterpenoid sulphate and flavonoids from *Wedelia asperina*. *Phytochemistry*, 1998; 47(6): 1093.
- 4 ZHAO Feng-deng, Strack Dieter, Baumert Alfred. Antioxidant flavonoids from leaves of *Polygonum hydropiper* L. *Phytochemistry*, 2003; 62: 219.
- 5 XU Yan (徐燕), LIANG Jing-yu (梁敬钰). Chemical constituents of *Sonchus oleraceus* L. (苦苣菜的化学成分). *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2005, 36(5): 411.

(本文于 2009 年 4 月 20 日修改回)

## 欢迎订阅《中国临床药理学杂志》

《中国临床药理学杂志》主要报道我国临床药理学及相关领域的新成果、新技术、新方法, 有关临床用药的基础研究, 合理用药、药物不良反应、药物相互作用、药物动力学、血药浓度监测以及有关医院药理学学科的研究成果与实践。旨在为我国广大临床药理学工作者提供一个学术交流、信息传递和了解国内外临床药理学及相关学科发展情况的窗口与平台。作为一本专业特色明显的全国性期刊, 本刊被收录为国家科技部“中国科技论文统计源期刊”(中国科技核心期刊)、国家级火炬计划项目“中国科学引文数据库来源期刊”、“中国学术期刊综合评价数据库来源期刊”, “中国期刊网”、“中国学术期刊(光盘版)”和“万方数据资源系统(China info)数字化期刊群”, 并从 1998 年起被美国《国际药理学文摘》(IPA)和美国化学文摘(CA)摘录收录。

本刊的主要读者对象为医院药师、医师和大专院校、科研单位研究人员和临床药理学工作者。

本刊为双月刊, 大 16 开本, 64 页, 逢单月 25 日出版。每期定价 8 元, 全年 48 元。邮发代号 4-573 欢迎广大读者到本地邮局订阅。国外代号 4726BM (中国国际图书贸易公司, 北京 399 信箱)。国内统一刊号: CN31-1726 国际标准出版物编号: ISSN1007-4406 杂志社地址: 上海市医学院路 138 号 290 信箱, 邮编: 200032 电话: (021) 54237256 传真: (021) 64176498 E-mail: lcxy@fudan.edu.cn