

高效液相色谱法同时测定鬼针草提取物中 3 种单体成分的含量

张丽¹,徐国兵²,陈飞虎^{3*},刘建军³,陈卫东^{1*} (1. 安徽中医学院药学院,合肥 230031;2. 安徽省食品药品检验所,合肥 230051;3. 安徽医科大学药学院,合肥 230032)

摘要:目的 建立高效液相色谱法同时测定鬼针草提取物中鬼针聚炔苷、金丝桃苷和异槲皮苷含量的方法。方法 采用高效液相色谱法,色谱柱为 Agilent ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈ 柱(4.6 mm×250 mm,5 μm);流动相为甲醇-乙腈-0.4% 磷酸溶液(24:6:70);流速为 1.0 mL·min⁻¹;检测波长为 255 nm;柱温为 25 ℃。结果 鬼针聚炔苷、金丝桃苷和异槲皮苷的线性范围分别为 0.002 587~0.258 7 μg($r=0.999\ 8$),0.009 944~0.497 2 μg($r=0.999\ 8$)和 0.010 13~0.506 7 μg($r=0.999\ 7$);平均回收率($n=6$)分别为 97.86%,101.11%和 102.71%。结论 该方法准确,简便,重复性好,可用于同时测定鬼针草提取物中鬼针聚炔苷、金丝桃苷和异槲皮苷含量的同时测定。

关键词:高效液相色谱法;鬼针草;鬼针聚炔苷;金丝桃苷;异槲皮苷

中图分类号:R917 文献标志码:A 文章编号:1001-2494(2011)22-1759-03

HPLC Determination of Three Components of *Bidens bipinnata* L. Extract

ZHANG Li¹,XU Guo-bing²,CHEN Fei-hu^{3*},LIU Jian-jun³,CHEN Wei-dong^{1*} (1. College of Pharmacy,Anhui University of Traditional Chinese Medicine,Hefei 230031, China;2. Anhui Institute for Food and Drug Control,Hefei 230051, China;3. College of Pharmacy,Anhui Medical University,Hefei 230032,China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a HPLC method for determination of bipinnatapolycetyloside, hyperoside and isoquercitrin in *Bidens bipinnata* L. extract. **METHODS** The HPLC method was performed on a Agilent ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈ column (4.6 mm×250 mm,5 μm) with MeOH-acetonitrile-0.4% phosphoric acid(24:6:70) as the mobile phase. The flow rate was 1.0 mL·min⁻¹. The detection wavelength was 255 nm, and the column temperature was set at 25 ℃. **RESULTS** The calibration curves of bipinnatapolycetyloside, hyperoside and isoquercitrin were linear in the ranges of 0.002 587–0.258 7 μg($r=0.999\ 8$), 0.009 944–0.497 2 μg($r=0.999\ 8$), 0.010 13–0.506 7 μg($r=0.999\ 7$), respectively. The average recoveries ($n=6$) of the three components from the samples were 97.86%, 101.11% and 102.71%, respectively. **CONCLUSION** This method is accurate, simple and reliable to determine the contents of bipinnatapolycetyloside, hyperoside and isoquercitrin in *Bidens bipinnata* L. extract.

KEY WORDS: HPLC; *Bidens bipinnata* L.; bipinnatapolycetyloside; hyperoside; isoquercitrin

鬼针草(*Bidens bipinnata* L.)系菊科鬼针草属多种植物的全草,广泛分布于热带及温带地区,药材资源丰富,遍布全国各地^[1]。鬼针草药用历史悠久,《中药大辞典》^[2]载“鬼针草,苦,平,无毒。功能:清热解毒、散瘀消肿。主治:疟疾、腹泻、痢疾、肝炎、急性肾炎、胃痛、噎膈、肠痛、咽喉肿痛、跌打损伤、蛇虫咬伤”。

鬼针草属植物含有多种具有生物活性的化学成分,主要有黄酮类、聚炔类等^[3]。其中黄酮类成分具有活血化淤、通脉降压等功效,对心血管疾病如动脉硬化、血管栓塞等有预防和治疗作用^[4],近年来的研究表明,黄酮类化合物在保肝作用方面也显示

出其优势^[5-7]。聚炔类成分具有抑制白血病细胞作用和抗炎作用^[8]。笔者通过提取分离纯化得到了总黄酮含量大于 50% 的鬼针草提取物,选择鬼针草提取物中 3 种主要成分金丝桃苷、异槲皮苷及鬼针聚炔苷为指标,采用 HPLC 同时测定这 3 种单体成分的含量。

1 仪器与试药

Shimadzu 高效液相色谱仪:LC-20AD 泵,SIL-20A 自动进样器,SPD-M20A 紫外可见光检测器,LC-solution 色谱工作站(日本岛津);METTLER XP-205 电子天平(上海 Mettler-Toledo 有限公司)。

基金项目:科技部“重大新药创制”国家科技重大专项课题(2009ZX09103-386)

作者简介:张丽,女,硕士研究生 研究方向:药物新剂型的研究与开发 * 通讯作者:陈飞虎,男,博士生导师 研究方向:新药药理研究
Tel:(0551)5161116 E-mail:cfhchina@sohu.com; 陈卫东,男,硕士生导师 研究方向:药物新剂型的研究与开发
(0551)35136810 E-mail:747484971@qq.com

对照品: 鬼针聚炔苷 (安徽医科大学药学院天然药化实验室, 经 HPLC 峰面积归一化法测定其纯度为 89.2%), 金丝桃苷 (批号 111521-200303, 中国药品生物制品检定所)、异槲皮苷 (批号 100406, 上海融禾医药科技有限公司); 鬼针草提取物 (批号 20101021, 20101022, 20101023, 20101030, 安徽医科大学); 甲醇, 乙腈为色谱纯, 水为重蒸馏水, 其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的制备

精密称取鬼针聚炔苷、金丝桃苷和异槲皮苷对照品适量, 置于 10 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并定容至刻度, 摇匀, 制成质量浓度分别为 0.145 0、0.497 2 和 0.506 7 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照品储备液。

2.2 供试品溶液的制备

取鬼针草提取物样品约 10 mg, 精密称定, 置于 25 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并定容至刻度, 摇匀, 作为供试品溶液。

2.3 色谱条件与系统适用性实验

色谱柱: Agilent ZORBAX Eclipse XDB- C_{18} 柱 (4.6 mm $\times$ 250 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-乙腈-0.4% 磷酸溶液 (24: 6: 70); 流速: 1.0 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 检测波长: 255 nm; 柱温: 25 $^{\circ}\text{C}$; 进样量: 10 μL 。理论塔板数以金丝桃苷计不低于 5 000, 样品中待测组分与相邻峰的分度大于 1.5, 见图 1。

2.4 标准曲线和线性范围

精密量取鬼针聚炔苷、金丝桃苷和异槲皮苷对照品储备液, 用甲醇稀释, 摇匀, 分别制成系列浓度

的混合对照品溶液。分别吸取系列浓度混合对照品溶液各 10 μL , 注入液相色谱仪, 依“2.3”项下色谱条件进行测定, 记录色谱图。以峰面积 (Y) 为纵坐标, 进样量 ($X, \mu\text{g}$) 为横坐标, 绘制标准曲线。鬼针聚炔苷、金丝桃苷和异槲皮苷的线性回归, 线性范围和相关系数见表 1。

2.5 精密度实验

精密吸取混合对照品溶液 10 μL , 依“2.3”项下色谱条件进行测定, 连续进样 6 次, 计算鬼针聚炔苷、金丝桃苷和异槲皮苷的峰面积相对标准偏差 (RSD) 值, 结果鬼针聚炔苷、金丝桃苷和异槲皮苷的峰面积 RSD 值分别为 0.93%、1.03% 和 0.89%, 表明精密度良好。

2.6 稳定性实验

取供试品溶液, 室温下放置, 分别于 0、1、2、5、11、18 h 依“2.3”项下色谱条件进行测定。鬼针聚炔苷、金丝桃苷和异槲皮苷的峰面积相对标准偏差 (RSD) 值分别为 0.33%、1.25% 和 0.88% ($n=6$)。结果表明供试品溶液在 18 h 内稳定性良好。

2.7 重复性实验

取同一批号的鬼针草提取物样品 (批号: 20101021) 6 份, 每份取约 5 mg, 精密称定, 按“2.2”项下方法制备供试品溶液, 依“2.3”项下色谱条件进行测定, 计算得鬼针聚炔苷、金丝桃苷和异槲皮苷的含量平均值分别为 19.51, 5.544, 29.81 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, RSD 分别为 0.58%、0.93%、1.59%, 结果表明, 该方法重现性好, 实验结果可靠。

2.8 加样回收率实验

取已经测得含量的样品 (批号 20101021) 6 份, 每份约 5 mg, 精密称定, 置 25 mL 量瓶中, 分别精密加入混合对照品溶液 1 mL (鬼针聚炔苷、金丝桃苷和异槲皮苷质量浓度分别为 118.5, 29.83, 152.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), 按“2.2”项下方法制备样品溶液, 依“2.3”项下色谱条件分别进样测定, 计算回收率, 鬼针聚炔苷、金丝桃苷和异槲皮苷回收率, RSD 分别为 97.86%, 1.31%; 101.11%, 1.76%; 102.71%, 2.07% ($n=6$)。结果表明本法的准确性较好。

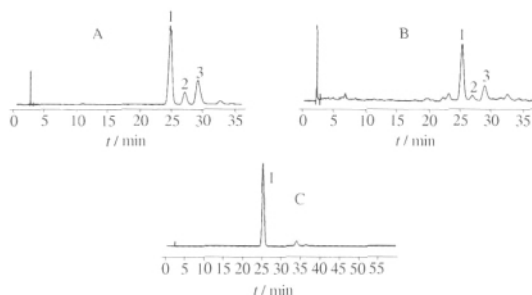


图 1 鬼针草提取物对照样品色谱图

A - 混合对照品; B - 供试样品; C - 归一化法色谱图; 1 - 鬼针聚炔苷; 2 - 金丝桃苷; 3 - 异槲皮苷

Fig. 1 HPLC Chromatograms of reference substances and sample of *Bidens bipinnata* L. Extract

A - reference substances; B - sample; C - HPLC chromatograms of normalization method; 1 - bipinnatopolyacetyloside; 2 - hyperoside; 3 - isoquercitrin

表 1 鬼针聚炔苷、金丝桃苷和异槲皮苷的线性回归分析

Tab. 1 Regression analysis of bipinnatopolyacetyloside, hyperoside and isoquercitrin

Standards	Regression equations	Linear range/ μg	r
Bipinnatopolyacetyloside	$Y = 9 \times 10^6 X - 9\ 536.2$	0.002 587 - 0.258 70	0.999 8
Hyperoside	$Y = 3 \times 10^6 X - 12\ 887$	0.009 944 - 0.497 20	0.999 8
Isoquercitrin	$Y = 2 \times 10^6 X - 9\ 437.7$	0.010 13 - 0.506 70	0.999 7

2.9 样品含量测定

分别取鬼针草提取物4批样品,按“2.2”项下方法分别制备供试品溶液,按“2.3”项下色谱条件分别测定,按外标法计算含量,结果见表2。

3 讨论

3.1 测定指标的选择

鬼针草提取物的主要成分是黄酮类和聚炔类,其中金丝桃苷,异槲皮苷和鬼针聚炔苷含量相对较高,所以选择测定这3个成分的含量做为质量控制的指标,本实验采用HPLC同时测定金丝桃苷,异槲皮苷和鬼针聚炔苷的含量,灵敏度高,所用流动相系统和样品预处理方法简单,快速,可用于鬼针草提取物的质量控制。

3.2 鬼针聚炔苷对照品的制备问题

实验中用到的鬼针聚炔苷对照品系由安徽医科大学药学院天然药化实验室制备,经熔点测定、UV、MS、¹H-NMR和¹³C-NMR等确定其结构。由于鬼针草提取物成分复杂,鬼针聚炔苷初步分离收率较低,故本次测定用鬼针聚炔苷对照品纯度为89.2%,后续进一步的纯化研究工作正在进行中。

3.3 色谱柱类型、检测波长及流动相的选择

由于金丝桃苷和异槲皮苷均属于黄酮类物质,且为同分异构体,色谱行为比较接近,同时,鬼针聚炔苷与金丝桃苷色谱行为也比较接近,三者很难达到基线分离。本实验考察了不同色谱柱[Apollon C₁₈(4.6 mm×250 mm,5 μm),Inertsil ODS-SP C₁₈柱

(4.6 mm×250 mm,5 μm),Inertsil ODS-SP C₁₈柱(4.6 mm×150 mm,5 μm),Agilent ZORBAX Eclipse XDB C₁₈柱(4.6 mm×250 mm,5 μm)]对分离度的影响,结果表明:使用Agilent ZORBAX Eclipse XDB C₁₈柱时,3个成分均能很好地分离;其他类型的色谱柱在相同的色谱条件下,分离效果不太理想。

通过DAD检测,金丝桃苷和异槲皮苷均在255、354 nm处有最大吸收,鬼针聚炔苷在255 nm处也有最大吸收,故选择255 nm为检测波长。实验先后试用了3种流动相系统:甲醇-水,甲醇-0.4%磷酸,甲醇-乙腈-0.4%磷酸,结果表明,使用甲醇-水,甲醇-0.4%磷酸系统时,金丝桃苷和异槲皮苷难以达到基线分离,而使用甲醇-乙腈-0.4%磷酸系统,通过不同比例的摸索,最终确定甲醇-乙腈-0.4%磷酸(24:6:70)等度洗脱,3个成分均能获得较好的分离效果。

REFERENCES

[1] XIA Q,LIU Y,LI Y. Determination of hyperoside in different parts and different species of *Herba Bidens* by RP-HPLC [J]. *West China J Pharm Sci*(华西药科学杂志), 2009, 24(1): 82-83.

[2] Jiangsu New Medical College. *Dictionary of Chinese Materia Medica*(中药大辞典 [M]). Shanghai: Shanghai Science and Technology Publishers, 1986: 1694.

[3] MA M. Study on The Chemical Constituents of *Bidens bipinnata* [J]. Jinan: Shandong University of Traditional Chinese Medicine, 2003.

[4] WANG L J,CAO X G,YU G, et al. Research development for the determination of rutin and quercetin in *Flos Sophorae Immaturus* [J]. *Chin J Inf Tradit Chin Med* (中国中医药信息杂志), 2008, 15(3): 94-96.

[5] YUAN L P,CHEN F H,LU L, et al. Protective effects of total flavonoids of *Bidens pilosa* L. (TFB) on animal liver injury and liver fibrosis [J]. *J Ethnopharmacol*, 2008, 116(4): 539-546.

[6] WU F R,CHEN F H,HU W, et al. Anti-fibrosis effect and mechanism of total flavones of *Bidens bipinnata* L on immunological liver fibrosis in rats [J]. *Chin Pharmacol Bull*(中国药理学通报), 2008, 24(6): 753-756.

[7] ZHONG M M,CHEN F H,YUAN L P, et al. Protective effect of total flavonoids from *Bidens bipinnata* L. against carbon tetrachloride-induced liver injury in mice [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2007, 59(7): 1017-1025.

[8] WANG J P,QIN H Y,ZHANG H Y, et al. Inhibition of 5 compounds from *Bidens bipinnata* on leukemia cells *in vitro* [J]. *J Chin Med Mater*(中药材), 1997, 20(5): 247-249.

(收稿日期: 2011-05-05)

表2 鬼针草提取物样品含量测定结果 . mg · g⁻¹, n = 3, $\bar{x} \pm s$

Tab. 2 Determination results of bipinnatopolyacetyloside, hyperoside and isoquercitrin in the extract of *Bidens bipinnata* L. mg · g⁻¹, n = 3, $\bar{x} \pm s$

Lot No	Bipinnatopolyacetyloside	Hyperoside	Isoquercitrin
20101021	19.58 ± 0.39	5.714 ± 0.098	29.97 ± 0.22
20101022	19.73 ± 0.19	5.943 ± 0.100	1.38 ± 0.72
20101023	19.88 ± 0.10	5.799 ± 0.050	30.70 ± 0.36
20101030	16.89 ± 0.032	7.585 ± 0.075	38.23 ± 0.40

欢迎投稿 欢迎订阅 欢迎刊登广告