HPCE 法测定鬼针草提取液中 10 种酚类化合物

吴婷妮,余长柱,李荣,孙晓梅,李俊*安徽医科大学药学院,安徽合肥 230032

摘 要:目的 建立 HPCE-DAD 法测定鬼针草中 10 种酚类化合物(木犀草苷、芦丁、槲皮素-3-O-葡萄糖苷、槲皮苷、水杨酸、木犀草素、山柰酚、槲皮素、没食子酸和原儿茶酸)的方法,比较 6 种不同体积分数的乙醇对上述化合物提取效率的影响。方法 实验考察了缓冲液 pH、浓度、分离电压、毛细管冷却液温度等因素对分离的影响。在 214 nm 检测波长下,60 cm 长毛细管中,25 mmol/L 硼砂(pH 9.5),分离电压 25 kV,毛细管冷却液温度 25 ℃时上述各化合物在 16 min 内能得到完全分离。结果 木犀草苷、芦丁、槲皮素-3-O-葡萄糖苷、槲皮苷、水杨酸、木犀草素、山柰酚、槲皮素、没食子酸和原儿茶酸分别在 5.0~120、5.0~12

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253 - 2670(2013)17 - 2404 - 06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.17.012

Determination of 10 phenolic compounds in extract from *Bidens bipinnata* by HPCE

WU Ting-ni, YU Chang-zhu, LI Rong, SUN Xiao-mei, LI Jun School of Pharmacy, Anhui Medical University, Hefei 230032, China

Abstract: Objective To develop a novel method using high-performance capillary electrophoresis coupled with DAD (HPCE-DAD) for the simultaneous determination of 10 phenolic compounds (luteolin-7-*O*-glucoside, rutin, quercetin-3-glucoside, quercetin-3-rhamnoside, salicylic acid, luteolin, kaemferol, quercetin, gallic acid, and protocatechuic acid) in *Bidens bipinnata*. The extraction efficiency of above mentioned compounds was compared using six different ethanol/water solutions. **Methods** The effects of pH value and concentration of buffer, applied voltage, and temperature on the separation were researched. The 10 compounds were baseline separated within 16 min in a 60 cm length capillary at a separation voltage of 25 kV with a running buffer consisting of 25 mmol/L borate (pH 9.5) at wavelength of 214 nm. **Results** Excellent linearities of luteolin-7-*O*-glucoside, rutin, quercetin-3-glucoside, quercetin-3-rhamnoside, salicylic acid, luteolin, kaemferol, quercetin, gallic acid, and protocatechuic acid were observed at 5.0−120, 5.0−120, 5.0−120, 5.0−120, 1.0−120, 2.5−120, 5.0−120, 2.5−120, 2.5−120, and 2.5−120 mg/L, respectively. The detection limits were at 2.5, 2.5, 2.5, 2.5, 0.5, 1.0, 2.5, 1.0, 1.0, and 1.0 mg/L, respectively. The relative standard deviations (RSD) of precision were below 5.17% (*n* = 6). The mean recoveries for 10 phenolic compounds in *B. bipinnata* ranged from 94.4% to 105.8%, with RSD values of 0.32%−4.33%. **Conclusion** The contents of luteolin-7-*O*-glucoside, rutin, quercetin-3-rhamnoside, salicylic acid, luteolin, kaemferol, quercetin, gallic acid, and protocatechuic acid in *B. bipinnata* are 95.04−105.84, 78.03−110.45, 96.45−177.96, 178.78−300.00, 62.06−66.54, 71.08−72.85, 77.39−95.30, 68.27−77.43, 68.47−88.47, and 107.24−142.43 µg/g, respectively.

Key words: HPCE-DAD; *Bidens Bipinnata* L.; phenolic compounds; rutin; salicylic acid; luteolin; kaemferol; quercetin; gallic acid; protocatechuic acid

基金项目:安徽高校省级科学研究项目(KJ2013Z139);安徽医科大学校科学研究项目(2012xkj018)

作者简介: 吴婷妮(1984—), 女, 助理实验师, 研究方向为天然药物活性成分分析。E-mail: wtn2001ok@163.com

收稿日期: 2013-03-28

^{*}通信作者 李 俊 E-mail: lj@ahmu.edu.cn

鬼 针 草 Bidens bipinnata L. 为 菊 科 (Compositae)管状花亚科鬼针草属 Bidens L. 1 年生草本植物,药材资源丰富,药用历史悠久,主治痢疾、肝炎、胃痛、蛇虫咬伤等^[1-2]。木犀草苷、芦丁、槲皮素-3-O-葡萄糖苷、槲皮苷、水杨酸、木犀草素、山柰酚、槲皮素、没食子酸和原儿茶酸是鬼针草中比较常见的酚类成分,具有抗微生物、抗氧化、抗炎以及细胞毒性等药理作用^[3]。

鬼针草药材活性成分分析方法主要是 HPLC 法,邓亚宁等[4]用 HPLC 法测定了鬼针草总黄酮部位中芦丁的量。胡伟等^[5]用 HPLC 测定了鬼针草药材中金丝桃苷的量。李玉兰等^[6]建立了小花鬼针草的毛细管电泳特征图谱,尚未见毛细管电泳法(HPCE)分离测定鬼针草中单体组分的报道。HPLC法实际应用中常常遇到一些难题,如色谱柱容易污染,使用寿命短;有机溶剂消耗多;甚至有时采用梯度洗脱也难以实现组分的完全分离。毛细管电泳法^[7]高效、快速、低耗、简便、抗污染、抗干扰能力强,是 HPLC 法的一种很好的补充。本课题以鬼针草中的酚类化合物为研究对象,建立了 HPCE-DAD 分离测定分析方法。

1 仪器与试药

P/ACE MDQ 毛细管电泳系统(美国 Beckman), 配备有二极管阵列检测器 (DAD); 未涂层石英毛细管 (60 cm×75 μm, 有效长度 50 cm, 河北鑫诺光纤厂); PHS—3C 型精密酸度计(上海精密科学仪器有限公司); FA2004A 型电子天平(上海精天电子仪器厂); BP211D型电子天平(德国 Startarius); Milli—Q 型超纯水机(美国 Millipore); 中药粉碎机(瑞安市永历制药机械有限公司)。

木犀草苷(批号 100521,质量分数>98%)、 芦丁(批号 100305,质量分数>99%)、槲皮素-3-O-葡萄糖苷(批号 100406,质量分数>98%)、槲皮 苷(批号 100127,质量分数>98%)、木犀草素(批 号 100612,质量分数>98%)、山柰酚(批号 100317, 质量分数>98%)、没食子酸(批号 100502,质量 分数>98%)均购于上海融禾医药科技发展有限公司;槲皮素(批号 100081-200907, HPLC 测质量分 数为 96.5%)、原儿茶酸(批号 110809-200604,质量分数为 99.9%)均购于中国食品药品检定研究院; 水杨酸购于上海山浦化工有限公司,质量分数> 99%。鬼针草购于合肥市百姓缘大药房,产地为安 徽亳州,经安徽医科大学药学院副教授程文明鉴定 为菊科管状花亚科鬼针草属草本植物鬼针草 Bidens bipinnata L. 的干燥全草。甲醇为色谱纯,天津市四友精细化学品有限公司制造;乙醇为分析纯,上海振兴化工一厂生产;硼砂为分析纯,汕头市西陇化工厂有限公司生产。

2 方法与结果

2.1 供试品溶液的制备

鬼针草粉碎成粉末,精密称取 1.00 g 粉末 6 份,置于 6 个锥形瓶中,分别加水及 20%、40%、60%、80%、100%乙醇 15 mL,超声提取 40 min,4 000 r/min 离心 30 min,取上清液,0.45 μ m 微孔滤膜滤过,即得。

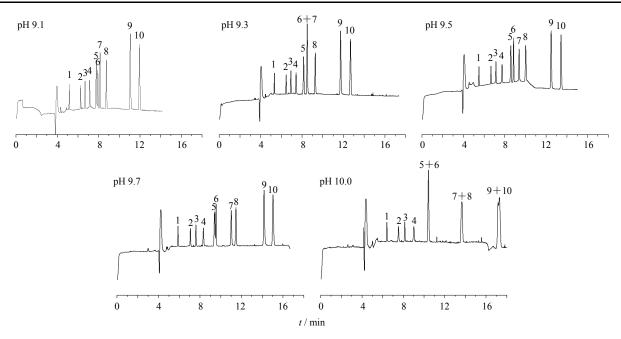
2.2 对照品溶液的制备

精密称取木犀草苷 4.0 mg,置 10 mL 量瓶中,70%乙醇溶解后稀释定容,精密称取芦丁、水杨酸、山柰酚、槲皮素、没食子酸各 10 mg,分别置 5 mL 量瓶,甲醇溶解后稀释定容,精密称取槲皮素-3-*O*-葡萄糖苷、槲皮苷、木犀草素、原儿茶酸各 5.0 mg,分别置 5 mL 量瓶中,甲醇溶解后稀释定容。其他不同浓度的工作液,用上述对照品溶液稀释得到。所有溶液均在 4 ℃避光保存。

2.3 电泳条件

运行缓冲液 25 mmol/L 硼砂 (pH 值 9.5), 分离 电压为 25 kV; 检测波长为 214 nm; 压力进样 3.4 kPa, 5 s; 温度为 25 ℃。每天开机后依次用 1 mol/L HCl (5 min)、水 (0.5 min)、甲醇 (5 min)、水 (0.5 min)、1 mol/L NaOH (5 min)、水 (1 min)、缓冲 溶液 (5 min) 冲洗,进样前依次用甲醇 (5 min)、 水 (0.5 min)、1 mol/L NaOH (5 min)、缓冲溶液 (5 min),冲洗以保证重复性。

2.3.1 缓冲溶液 pH 值和浓度影响 pH 值和缓冲溶液浓度是影响 Zeta 电势、电渗流以及被分析物荷电大小的重要因素,从而影响了迁移时间和被分析物的分离情况。为了获得最优化的条件,首先对 pH 值和缓冲溶液浓度进行了研究。本实验电泳溶液为硼砂体系,在 25 mmol/L 硼砂,25 kV 的条件下比较了溶液 pH 值分别为 9.1、9.3、9.5、9.7、10.0 几种酚类化合物的分离情况(图 1)。pH 值 9.1 时,水杨酸和木犀草素未能基线分离;pH 值 9.5 时,各物质均完全分离;pH 值 9.7 时水杨酸和木犀草素未基线分离;pH 值 10.0 时,水杨酸和木犀草素、山柰酚和槲皮素、没食子酸和儿茶酸完全重合。因此,选



1-木犀草苷 2-芦丁 3-槲皮素-3-*O*-葡萄糖苷 4-槲皮苷 5-水杨酸 6-木犀草素 7-山柰酚 8-槲皮素 9-没食子酸 10-原儿茶酸 1-luteolin-7-*O*-glucoside 2-rutin 3-quercetin-3-glucoside 4-quercetin-3-rhamnoside 5-salicylic acid 6-luteolin 7-kaemferol 8-quercetin 9-gallic acid 10-protocatechuic acid

图 1 硼砂缓冲液 pH 值对酚类化合物分离的影响

Fig. 1 Effect of pH values of borate buffer on separation of phenolic compounds

择缓冲液 pH 值为 9.5。

在 pH 值 9.5, 电压 25 kV 的条件下优化了硼砂浓度(15、25、35 mmol/L, 图 2)。15 mmol/L 时木犀草素和山柰酚重合,25、35 mmol/L 时 10 个化合物均完全分离,但 35 mmol/L 时分析时间更长。结果表明,缓冲溶液浓度越大,分离度越好,同时电流越大,电渗流越小,分析时间越长,且产生的焦耳热越多,灵敏度也越低。所以选择缓冲溶液浓度 25 mmol/L。

2.3.2 分离电压的影响 在 pH 值 9.5, 硼砂浓度 25 mmol/L 时,比较了分离电压 20、25、30 kV 对鬼针草 80%乙醇提取液的影响(图 3), 25 kV 时槲皮素-3-O-葡萄糖苷与提取液中其他成分分离效果较好,

20、30 kV 时槲皮素-3-*O*-葡萄糖苷与其他成分重合。同时可看出,分离电压越大,分离时间越短,峰越窄,但焦耳热越多,噪声越大。实验选择分离电压 25 kV。

2.4 提取溶剂的优化

本实验考察了水及 20%、40%、60%、80%、100%乙醇对 10 种酚类化合物提取效率的影响,采用上述建立的方法,分析了 6 种不同溶剂的提取液,每种样品按 "2.1"项下供试品溶液制备方法制备,重复进行 3 次,实验报道的结果为 3 次分析数据的平均值。各种溶剂提取液电泳谱图见图 4,分析结果见表 1。水提取液中除木犀草素外,各化合物的量均较高,因此,本实验选择水作为提取溶剂。

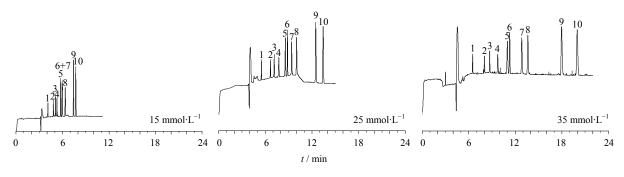


图 2 硼砂缓冲液浓度对酚类化合物分离的影响

Fig. 2 Effect of borate concentration on separation of phenolic compounds

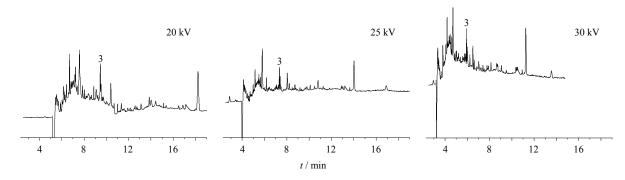


图 3 分离电压对鬼针草提取液的影响

Fig. 3 Effect of separation voltage on extracting solution of B. bipinnata

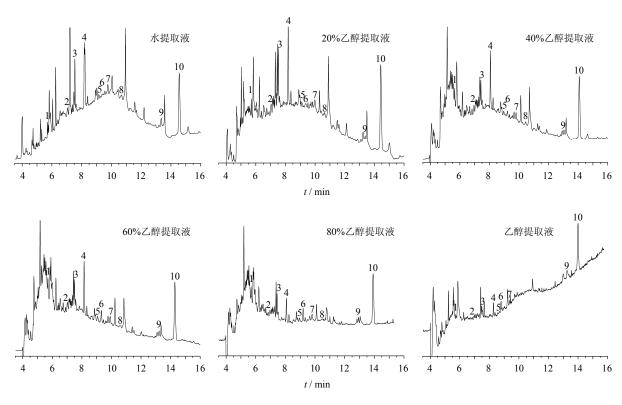


图 4 鬼针草样品溶液 HPCE-DAD 谱图

Fig. 4 HPCE-DAD electropherograms of extracting solution of B. bipinnata

2.5 方法学考察

2.5.1 线性关系考察、检出限和定量限试验 在优化条件下,分析测定了 1.0~120 mg/L 不同浓度的混合对照品溶液,以峰面积积分值 (Y) 对质量浓度 (X) 作图,得到线性方程、线性范围和相关系数 (0.998 4~0.999 9),并根据 3 倍信噪比和 10 倍信噪比对应质量浓度确定其检出限和定量限。结果表明线性关系良好,最小检出限为 0.5 mg/L,最小定量限为 1.0 mg/L,见表 2。

2.5.2 精密度试验 在上述优化条件下,将 10 mg/L 的混合对照品溶液在同 1 天内重复进样 6 次,

计算峰面积的 RSD,表示精密度。结果表明精密度 RSD≤5.17%,见表 2。

2.5.3 稳定性试验 取供试品水提取液在 0、2、4、6、8、12 h 测定 10 种化合物的峰面积,得 RSD 分别为 4.17%、2.11%、4.39%、1.62%、2.73%、4.27%、1.08%、4.55%、1.28%、1.77%,表明供试品溶液在12 h 内稳定。

2.5.4 重复性试验 取同一批供试品粉末 6 份,制备水提取液,进样测定,计算各化合物的质量分数,得 RSD 为 2.41%、1.31%、4.30%、1.78%、4.31%、5.37%、1.74%、4.31%、2.58%、4.38%。

Table 1 Assay results for six kinds of samples $(n=3)$						
提取溶剂 -	质量分数 / (μg·g ⁻¹)					
	木犀草苷	芦丁	槲皮素-3-O-葡萄糖苷	槲皮苷	水杨酸	
水	95.24 ± 2.67	106.04 ± 4.91	176.56 ± 8.35	178.78 ± 7.62	65.72 ± 1.84	
20%乙醇	93.02 ± 3.85	94.66 ± 2.88	151.92 ± 4.77	174.08 ± 6.61	66.31 ± 1.61	
40%乙醇	88.79 ± 0.94	94.18 ± 2.45	118.64 ± 5.17	164.12 ± 7.90	65.23 ± 0.53	
60%乙醇	96.66 ± 5.32	95.31 ± 2.99	119.96 ± 10.50	166.69 ± 6.67	67.36 ± 0.62	
80%乙醇	85.48 ± 2.85	80.98 ± 1.98	96.65 ± 4.81	103.15 ± 3.27	63.08 ± 0.81	
乙醇	74.56 ± 1.03	72.00 ± 0.41	71.96 ± 3.62	65.95 ± 3.07	_	
提取溶剂			质量分数 / (μg·g ⁻¹)			
延\化剂 -	木犀草素	山柰酚	槲皮素	没食子酸	原儿茶酸	
水	_	91.82 ± 4.36	74.11 ± 3.16	86.13 ± 3.35	133.96 ± 7.94	
20%乙醇	70.83 ± 1.83	71.75 ± 1.07	68.45 ± 0.32	75.56 ± 2.16	124.32 ± 2.90	
40%乙醇	73.74 ± 0.82	73.54 ± 3.84	69.05 ± 0.90	79.27 ± 3.18	115.68 ± 5.11	
60%乙醇	81.28 ± 1.17	72.83 ± 1.39	69.13 ± 1.69	78.12 ± 0.80	117.55 ± 6.01	

表 1 6 种样品液的分析结果 (n=3)

80%乙醇

乙醇

 77.03 ± 1.52

 72.71 ± 0.81

 72.21 ± 3.54

表 2 线性关系、检出限、定量限及精密度 Table 2 Results of linear relationship, LOD, LOQ, and RSD

化合物	线性方程	r	线性范围 / (mg·L ⁻¹)	检测限 / (mg·L ⁻¹)	精密度 RSD / %
木犀草苷	Y = 749.32 X + 221.12	0.9994	5.0~120	2.5	4.50
芦丁	Y = 792.10 X + 152	0.998 4	5.0~120	2.5	3.74
槲皮素-3-O-葡萄糖苷	Y = 896.70 X + 663.04	0.999 0	5.0~120	2.5	4.16
槲皮苷	$Y=1\ 109.2\ X+544.94$	0.9994	5.0~120	2.5	4.21
水杨酸	$Y=2\ 228.8\ X+1\ 679.5$	0.999 9	1.0~120	0.5	3.71
木犀草素	$Y=2\ 264.5\ X+749.52$	0.999 2	2.5~120	1.0	4.23
山柰酚	Y=1772.5 X+1346.3	0.998 6	5.0~120	2.5	5.17
槲皮素	Y=2405.0 X+1218.6	0.999 7	2.5~120	1.0	5.03
没食子酸	$Y=4\ 214.9\ X+228.73$	0.999 9	2.5~120	1.0	4.24
原儿茶酸	Y=4098.0 X+3024.8	0.9997	2.5~120	1.0	3.97

2.5.5 加样回收率试验 精密称取 6 份 1.0 g 样品,分别精密加入相当量的对照品溶液,按 "2.1"项下水提取液制备方法制备,在优化条件下分析测定,计算加样回收率。结果木犀草苷、芦丁、槲皮素-3-O-葡萄糖苷、槲皮苷、水杨酸、木犀草素、山柰酚、槲皮素、没食子酸、原儿茶酸的加样回收率分别为99.83%、101.07%、100.37%、99.69%、99.09%、100.49%、100.49%、98.913%、100.96%、98.85%;其 RSD 分别为 0.94%、4.33%、1.48%、1.07%、1.30%、

1.49%, 1.07%, 0.40%, 0.72%, 0.32%.

2.6 样品测定

在选定的实验条件下,取不同批次鬼针草药材的样品溶液进样测定峰面积,根据线性回归方程计算出各化合物的质量分数,结果见表3。

 74.11 ± 1.11

 73.53 ± 1.95

 99.89 ± 3.65

 79.13 ± 3.45

3 讨论

本实验考察了不同体积分数的乙醇对 10 种酚 类化合物提取效率的影响,结果表明,芦丁、槲皮 素-3-O-葡萄糖苷、槲皮苷、原儿茶酸随乙醇体积分

[&]quot;一"未定量

[&]quot;-" not be quantitative

表 3	鬼针草提取液中酚类化合物的质量分数 $(n=3)$

Table 3 Determination of phenolic compounds in extracting solution of B. bipinnata (n=3)

样品	质量分数 / (μg·g ⁻¹)						
作自由	木犀草苷	芦丁	槲皮素-3-O-葡萄糖苷	槲皮苷	水杨酸		
1	98.00 ± 1.67	110.45 ± 4.36	177.96 ± 7.68	186.17± 5.84	66.54 ± 2.40		
2	95.04 ± 2.09	100.75 ± 4.86	167.60 ± 7.32	179.21 ± 4.92	63.61 ± 2.07		
3	95.24 ± 2.67	106.04 ± 4.91	176.56 ± 8.35	178.78 ± 7.62	65.72 ± 1.84		
4	115.04 ± 4.50	84.42 ± 2.52	104.64 ± 3.79	280.12 ± 12.95	64.71 ± 1.88		
5	105.84 ± 5.13	78.03 ± 3.16	96.45 ± 3.66	261.81 ± 10.01	62.06 ± 2.86		
6	98.58 ± 2.50	82.50 ± 2.91	110.11 ± 4.66	300.00 ± 8.41	66.10 ± 1.76		
样品			质量分数 / (μg·g ⁻¹)				
1十111	木犀草素	山柰酚	槲皮素	没食子酸	原儿茶酸		
1	71.18 ± 2.53	92.81 ± 4.04	77.43 ± 1.84	88.47 ± 3.77	142.43 ± 4.29		
2	71.50 ± 3.31	87.05 ± 4.07	71.14 ± 2.45	82.29 ± 2.37	126.69 ± 6.13		
3	_	91.82 ± 4.36	74.11 ± 3.16	86.13 ± 3.35	133.96 ± 7.94		
4	71.30 ± 2.44	85.76 ± 3.92	70.68 ± 1.70	72.15 ± 2.60	111.50 ± 3.01		
5	72.85 ± 1.70	77.39 ± 2.66	68.27 ± 3.79	68.47 ± 2.58	107.24 ± 5.15		
6	71.08 ± 0.30	95.30 ± 2.83	73.63 ± 1.76	72.12 ± 3.20	123.01 ± 2.61		

数增高,提取效率下降;木犀草苷、水杨酸、木犀草素、山柰酚、槲皮素、没食子酸的量偏低,在各提取液中量相差很小。

检测结果表明,HPCE-DAD 是分析鬼针草酚类 化合物的一种可以选择的方法,选择合适的提取溶 剂很重要,中药中化合物的提取效率与其溶解性、 在中药中的量均有关。为保证实验的重复性,毛细 管一定要进行充分的冲洗,本实验中乙醇提取液比 较容易吸附于毛细管壁,增加碱液冲洗非常重要。

参考文献

- [1] 王 玲, 崔东安, 周绪正, 等. 鬼针草的化学成分与药理作用 [J]. 现代药物与临床, 2009, 24(3): 147-150.
- [2] 江苏新医学院. 中药大辞典 (下册) [M]. 上海: 上海科

学技术出版社, 1986.

- [3] 张 丽, 徐国兵, 陈卫东. 中药黄酮类化合物分析方法 研究进展 [J]. 安徽中医学院学报, 2011, 30(6): 76-80.
- [4] 邓亚宁, 刘文娟, 曲婷丽. HPLC 法测定鬼针草总黄酮 部位中芦丁的含量 [J]. 山西医科大学学报, 2011, 42(11): 896-898.
- [5] 胡 伟, 陈飞虎, 吴繁荣, 等. HPLC 法测定鬼针草药 材中金丝桃苷的含量 [J]. 安徽医科大学学报, 2008, 43(6): 712-713.
- [6] 李玉兰,李 军,刘 敏,等. 小花鬼针草的毛细管电泳特征图谱研究 [J]. 药物分析杂志, 2009, 29(2): 179-183.
- [7] 仝战旗,高建义,陈丙跃. 高效毛细管电泳法测定复方 苦参结肠溶胶囊中氧化苦参碱 [J]. 中草药, 2010, 41(5): 725-727.