

3 结论

3.1 三七上喷施烯酰吗啉可溶性粉剂, 其在三七块根内的半衰期为 6.2 d, 茎叶内的半衰期为 3.9 d, 在土壤中的半衰期为 5.0 d, 尤其在三七植株和土壤中的降解较快。

3.2 三七生长过程中, 按常规浓度和频次施用烯酰吗啉, 最后一次施药距采挖时间 25 d 以上, 其在三七及茎叶中烯酰吗啉残留量小于日本肯定列表规定三七中烯酰吗啉限量 ($\leq 0.1 \text{ mg/kg}$), 在土壤中的残留量为低于 0.02 mg/kg 。

按三七传统栽培方法, 为节约成本和降低农药残留, 在三七采挖前一月左右, 不再施用农药, 就烯酰吗啉而言, 只要控制好用药剂量和间隔期, 既可有效防治三七病害, 又可保证三七质量安全。

参考文献:

- [1] 宋春国, 于建垒, 李瑞娟, 等. 烯酰吗啉在黄瓜中的残留降解动态 [J]. 中国蔬菜, 2006, 11: 28-29
- [2] JAP-150 烯酰吗啉检测方法 [S]. 2006
- [3] 朴秀英, 吴凌云, 邹积鑫, 等. 烯酰吗啉在土壤中残留测定方法研究 [J]. 农药科学与管理, 2006, 27(1): 7-9

含羞草中 6 种黄酮苷的 RP-HPLC 测定

朱建鑫^{1,2}, 袁珂^{1*}

(1. 浙江林学院 天然药物研发中心, 浙江 临安 311300; 2. 河南中医学院药学院, 河南 郑州 450008)

摘要:目的 建立 RP-HPLC 法同时测定含羞草中 6 种黄酮苷的量。方法 采用高效液相色谱法, 色谱柱为 Waters XBridge C₁₈ 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相: 甲醇 (A)-1% 冰醋酸水溶液 (B) (25: 75), 体积流量 0.8 mL/min, 柱温 25 °C, 检测波长 340 nm。结果 6 个成分均能达到基线分离, 异荭草苷 (iv)、荭草苷 (㉔)、5, 7, 3', 4'-四羟基-8-G[α-L-鼠李糖 (1→2)]-β-D-葡萄糖苷 (㉕)、牡荆苷 (㉖)、异牡荆苷 (㉗)、5, 7, 3', 4'-四羟基-8-G[β-D-芹糖 (1→4)]-β-D-葡萄糖苷 (v) 的线性范围分别为 0.260~1.300 μg ($r=0.9999$), 0.490~2.450 μg ($r=0.9999$), 0.700~3.500 μg ($r=0.9999$), 0.276~1.380 μg ($r=0.9998$), 0.266~1.330 μg ($r=0.9999$), 0.750~3.750 μg ($r=0.9997$); 平均回收率分别为 98.6% (RSD=2.31%), 98.2% (RSD=2.04%), 96.4% (RSD=1.85%), 96.9% (RSD=1.47%), 97.3% (RSD=2.19%), 97.5% (RSD=1.76%)。结论 本研究所建立的方法操作简便、结果可靠, 为该类药材的入药及资源的质量评价提供了实验依据。

关键词: 含羞草; 黄酮苷; RP-HPLC

中图分类号: R282.6

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2009)05-0812-03

含羞草为豆科 (Leguminosae) 含羞草属植物含羞草 *Mimosa pudica* L. 的全草^[1]。原产于热带美洲, 现广泛分布于世界热带地区, 我国主要分布在华南、华东、西南等地的山坡丛林、湿地、路旁, 植物资源丰富。含羞草具有清热利尿、化痰止咳、安神止痛之功效, 临床多用于急性肝炎、肺结核咳血及带状疱疹等症^[2]。在前期研究中, 已从含羞草全草中分离得到了黄酮苷类、酚类等化合物^[3~7]。在上述研究的基础上建立了含羞草中 6 种黄酮苷的 HPLC 测定方法, 并对采自不同地区的含羞草叶及茎进行了定量测定分析, 为有效控制含羞草的质量及进一步开发利用含羞草资源提供了参考依据。

1 仪器、试剂与材料

Waters 2695 高效液相色谱仪, Waters 2996 PAD 检测器; Empower 色谱工作站; AB265-S 分析天平 (瑞士 Mettler Toledo 公司), Millipore 超纯水机 (法国 Millipore 公司), 甲醇、乙腈为色谱纯试剂, 水为超纯水, 其他试剂均为分析纯。

5, 7, 3', 4'-四羟基-8-G[α-L-鼠李糖 (1→2)]-β-D-葡萄糖苷、5, 7, 3', 4'-四羟基-8-G[β-D-芹糖 (1→4)]-β-D-葡萄糖苷、荭草苷、异荭草苷、牡荆苷、异牡荆苷 6 种对照品均由本实验室分离得到, 通过¹H-NMR 和¹³C-NMR、MS 测定^[3~7], 并与相关文献报道对比确证了结构, 且通过 HPLC 峰面积归一化法标定质量分数均在 98% 以上。含羞草样品于 2007 年 8 月分别采自三亚、南宁、广州及福州不同地区, 由海南大学药用

* 收稿日期: 2008-08-04

基金项目: 浙江省森林培育重中之重学科开放基金资助项目 (200607)

作者简介: 朱建鑫 (1984—), 男, 硕士, 主要从事中药化学成分研究。

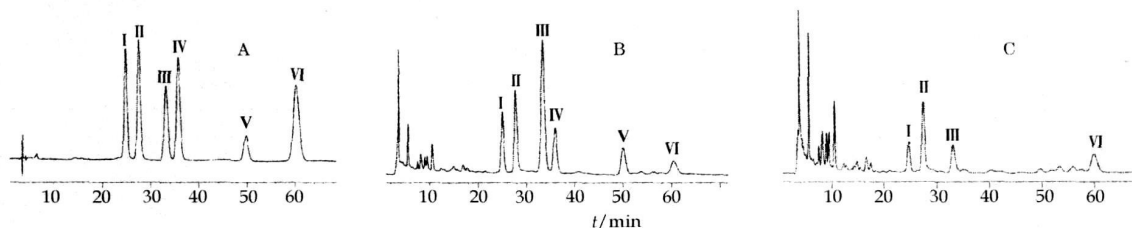
* 通讯作者 袁珂 Tel: (0571) 63743607 E-mail: yuan_ke001@163.com

植物学教授黄世满鉴定为豆科(Leguminosae) 含羞草属植物含羞草 *Mimosa pudica* L.。

2 方法与结果

2.1 色谱条件: 色谱柱为 Waters XBridge C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇 1% 冰醋酸水溶液

(25: 75); 洗脱时间: 60 min; 体积流量 0.8 mL/min; 检测波长为 340 nm, 柱温 25 °C。在此色谱条件下, 6 种黄酮苷类成分能达到较好分离, 与相邻色谱峰的分离度均大于 2.0, 理论塔板数均大于 10 000, 拖尾因子在 1.5~ 2.0。对照品溶液和样品溶液的色谱图见图 1。



iv- 异荭草苷 ⑤ 荭草苷 ④ 5, 7, 3', 4'-四羟基-8-*G*-[α-*L*-鼠李糖-(1→2)]-β-*D*-葡萄糖苷 ⑥ 牡荆苷
 ⑦ 异牡荆苷 v- 5, 7, 3', 4'-四羟基-8-*G*-[β-*D*-芹糖-(1→4)]-β-*D*-葡萄糖苷
 iv- isorientin ⑤ orientin ④ 5, 7, 3', 4'-trihydroxy-8-*G*-[α-*L*-rhamnopyranosyl-(1→2)]-β-*D*-glucopyranosyl flavone
 ⑦ vitexin ⑦ isovitexin v- 5, 7, 3', 4'-trihydroxy-8-*G*-[β-*D*-apiosyl-(1→4)]-β-*D*-glucopyranosyl flavone

图 1 对照品(A)、含羞草叶(B)和含羞草茎(C)的 HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC Chromatograms of reference substances (A), *M. pudica* leaves (B), and *M. pudica* stems (C)

2.2 对照品溶液的制备: 分别精密称取异荭草苷 1.63 mg、荭草苷 2.45 mg、牡荆苷 1.38 mg、异牡荆苷 1.33 mg、5, 7, 3', 4'-四羟基-8-*G*-[α-*L*-鼠李糖-(1→2)]-β-*D*-葡萄糖苷 3.50 mg、5, 7, 3', 4'-四羟基-8-*G*-[β-*D*-芹糖-(1→4)]-β-*D*-葡萄糖苷 3.75 mg, 混合后分别用 75% 甲醇水溶液超声溶解, 定容至 25 mL 的量瓶中, 制成质量浓度分别为 65.2、98.0、55.2、53.2、140.0、150.0 mg/mL 的混合溶液, 经 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 滤液作为对照品溶液。

2.3 样品溶液的制备: 将含羞草样品置 50 °C 烘箱中干燥至恒定质量, 粉碎成细粉, 过 100 目筛。精密

称取各待测样品 1.0 g, 加入 70% 甲醇 30 mL 浸泡 6 h 后, 每次加入 70% 甲醇 30 mL, 超声提取 2 次, 每次 30 min, 滤过。合并滤液, 浓缩干后用适量水分散, 分别用乙醚、醋酸乙酯萃取。分去有机层, 水层减压浓缩至干, 用 75% 甲醇水溶液溶解定容, 经 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 滤液作为样品溶液, 备用。

2.4 线性关系考察: 对照品混合溶液采用自动梯度进样, 进样量分别为 5、10、15、20、25 μL, 按照“2.1”项下的色谱条件测定。以对照品进样量为横坐标, 色谱峰面积值为纵坐标绘制标准曲线, 计算回归方程, 见表 1。

表 1 6 种黄酮苷的回归方程

Table 1 Regression equation of six kinds of glycosyl flavones

黄酮苷	回归方程	<i>r</i>	线性范围/μg
异荭草苷(iv)	$Y = 2.61 \times 10^3 X - 1.57 \times 10^5$	0.999 9	0.260~ 1.300
荭草苷(⑤)	$Y = 4.62 \times 10^3 X - 1.04 \times 10^5$	0.999 9	0.490~ 2.450
5, 7, 3', 4'-四羟基-8- <i>G</i> -[α- <i>L</i> -鼠李糖-(1→2)]-β- <i>D</i> -葡萄糖苷(④)	$Y = 2.23 \times 10^3 X - 1.05 \times 10^5$	0.999 9	0.700~ 3.500
牡荆苷(⑥)	$Y = 4.46 \times 10^3 X - 7.63 \times 10^4$	0.999 8	0.276~ 1.380
异牡荆苷(⑦)	$Y = 4.62 \times 10^3 X - 1.04 \times 10^5$	0.999 9	0.266~ 1.330
5, 7, 3', 4'-四羟基-8- <i>G</i> -[β- <i>D</i> -芹糖-(1→4)]-β- <i>D</i> -葡萄糖苷(v)	$Y = 2.15 \times 10^3 X - 7.96 \times 10^4$	0.999 7	0.750~ 3.750

2.5 精密度试验: 精密吸取混合对照品溶液, 按“2.1”项下的色谱条件连续进样 5 次, 进样量为 10 μL, 记录 6 种黄酮苷的峰面积, 计算 RSD 值。结果 iv~ v 的 RSD 分别为 2.83%、1.86%、2.27%、2.63%、2.62%、2.79%。

2.6 重现性试验: 精密称取同一批含羞草样品 5 份, 每份 1 g, 按“2.3”项下样品溶液的制备方法制备样品溶液, 每种样品溶液测定 3 次, 每次进样 10 μL, 取平均值。按照“2.1”项下的色谱条件进行分析, 计算 6

种黄酮苷质量分数, 结果 iv~ v 的 RSD 分别为 1.16%、1.35%、1.48%、2.52%、1.76%、2.44%。

2.7 稳定性试验: 取“2.3”项下的样品溶液, 室温放置, 分别于 0、2、4、6、8、10、12 h, 按照“2.1”项下的色谱条件进样 10 μL 测定, 记录峰面积值。结果 iv~ v 的 RSD 分别为 0.86%、1.32%、2.12%、1.96%、2.08%、1.94%, 表明样品溶液在 12 h 内稳定。

2.8 加样回收率试验: 精密称取 5 份已测定的同一批含羞草样品, 每份分别精密加入“2.2”项下的对照

品溶液 5 mL,按照“2.3”项下样品溶液的制备方法制得样品溶液,按“2.1”项下的色谱条件进行测定。结果 iv~v 6 个成分的平均回收率分别为 98.6%、98.2%、96.4%、96.9%、97.3%、97.5%,RSD 分别为 2.31%、2.04%、1.85%、1.47%、2.19%、1.76% ($n=5$)。

表 2 含羞草中 6 种黄酮苷的测定结果 ($n=3$)

地区	含羞草叶/(mg·g ⁻¹)						含羞草茎/(mg·g ⁻¹)					
	iv	Ⓐ	Ⓑ	Ⓒ	Ⓓ	v	iv	Ⓐ	Ⓑ	Ⓒ	Ⓓ	v
三亚	0.853	1.283	2.450	0.575	0.623	2.250	0.658	0.821	1.640	—	—	1.590
广州	0.792	1.061	2.361	0.421	0.596	2.146	0.536	0.721	1.425	—	—	1.206
南宁	0.821	1.170	2.436	0.612	0.606	2.179	0.612	0.798	1.539	—	—	1.527
福州	0.683	0.982	2.075	0.386	0.564	1.632	0.513	0.693	1.327	—	—	1.009

3 讨论

3.1 流动相的选择:以甲醇-水系统洗脱,6 种黄酮苷成分不能完全分离,色谱峰的峰形及分离度均较差。冰醋酸可以抑制样品的电离,改善拖尾现象,因此在流动相中加入冰醋酸进行考察。分别用 0.1%、0.5%、1.0% 的冰醋酸水溶液进行实验,流动相比比例选用 35:65 和 25:75,结果表明当冰醋酸浓度为 1.0%,比例为 25:75 时,6 种黄酮苷成分达到了较好的分离,拖尾现象明显改善。

3.2 检测波长、柱温和体积流量的选择:利用二极管阵列检测器检测,得到 200~500 nm 各波段的三维色谱及光谱图。结果表明,6 种黄酮苷成分在 340 nm 波长下均有较大吸收,且响应值适中,各峰分离效果好,故选择 344 nm 作为检测波长。对柱温 20、25、30 ℃和体积流量 0.5、0.8、1.0 mL/min 进行考察,在柱温 25 ℃,体积流量 0.8 mL/min 时各峰的出峰时间及分离度较好。

根据上述实验结果,选择以甲醇(A)-1% 醋酸水溶液(B),洗脱比例:25(A),75% (B);洗脱时间:60 min;体积流量 0.8 mL/min;检测波长为 340 nm;柱温 25 ℃为色谱优化条件。

3.3 由表 2 可以看出,不同地区的样品由于生长环境(土壤、温度和光照等)不同,其有效成分的量有一定差异。总体上看黄酮苷的量以海南三亚为最高;

2.9 样品测定:分别取采自不同产地的含羞草样品(叶和茎),按照“2.3”项下样品溶液的制备方法进行提取,经 0.45 μm 微孔滤膜滤过,分别制成样品溶液,按照“2.1”项下的色谱条件进行测定,进样量 20 μL,采用外标法以峰面积计算 6 种黄酮苷的质量分数,结果见表 2。

从同一地区的样品来看,含羞草叶比茎中有效成分的量明显高出许多。

我国含羞草资源丰富,在民间作为一种草药偶有临床应用,但由于对其化学成分及其量分布不够明确,因此一直以来影响了含羞草的开发利用。本实验在明确其化学成分的基础上,建立了含羞草中 6 种黄酮苷的 HPLC 定量测定方法,并对采自不同地区、不同部位含羞草样品中 6 种黄酮苷成分的量进行了同时测定与分析。该研究结果为进一步了解不同产地、不同自然环境条件下含羞草中黄酮苷量的分布规律以及对其进一步开发利用提供了理论及科学依据。

参考文献:

[1] 江苏新医学院. 中药大辞典 [M]. 上册. 上海: 上海科技出版社, 1986

[2] 全国中草药汇编编写组. 全国中草药汇编 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1975

[3] 袁珂, 吕洁丽, 殷明文. 海南含羞草中黄酮碳苷类化学成分的研究 [J]. 药学学报, 2006, 41(5): 435-438

[4] 袁珂, 贾安, 吕洁丽. 含羞草中酚性成分的分离及结构鉴定 [J]. 中国中药杂志, 2006, 31(12): 1029-1030

[5] 袁珂, 吕洁丽, 贾安. 含羞草化学成分的研究 [J]. 中国药理学杂志, 2006, 41(17): 1293-1295

[6] 袁珂, 贾安, 吕洁丽, 等. 含羞草中新黄酮碳苷的结构鉴定 [J]. 分析化学, 2007, 35(5): 739-742

[7] Yuan K, L J L, Jia A, et al. Two new e glycosylflavones from *Mimosa pudica* [J]. Chin Chem Lett, 2007, 18(10): 1231-1234