

## HPLC 法同时测定齿叶白鹃梅叶子中芹菜素 -7-O- $\beta$ -D-新橙皮糖苷和芹菜素 -7-O- $\beta$ -D-葡萄糖苷的含量

才谦<sup>1</sup>, 王聪<sup>2</sup>, 刘玉强<sup>1</sup>

(1. 辽宁中医药大学, 大连 116600; 2. 铁岭卫生职业学院, 铁岭 112008)

**摘要** 目的: 建立同时测定齿叶白鹃梅叶子中芹菜素 -7-O- $\beta$ -D-新橙皮糖苷和芹菜素 -7-O- $\beta$ -D-葡萄糖苷含量的 HPLC 法。方法: 采用 Topsisil C<sub>18</sub> (5  $\mu$ m  $\times$  4.6 mm  $\times$  250 mm) 色谱柱, 流动相为乙腈 - 2% 醋酸水溶液 (23:77), 流速 1.0 mL  $\cdot$  min<sup>-1</sup>, 检测波长 267 nm。结果: 芹菜素 -7-O- $\beta$ -D-新橙皮糖苷和芹菜素 -7-O- $\beta$ -D-葡萄糖苷的线性范围分别为 1.424 ~ 8.544  $\mu$ g ( $r=0.9996$ ) 和 0.17 ~ 1.02  $\mu$ g ( $r=0.9995$ ); 平均回收率 ( $n=6$ ) 分别为 103.0% (RSD = 2.2%) 和 100.4% (RSD = 2.1%)。结论: 该方法准确、可靠, 可用于齿叶白鹃梅叶子的质量控制。

**关键词:** 齿叶白鹃梅; 高效液相色谱法; 黄酮成分; 芹菜素新橙皮糖苷; 芹菜素葡萄糖苷

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2011)10-1899-03

## HPLC determination of apigenin -7-O- $\beta$ -D-neospheroside and apigenin -7-O- $\beta$ -D-glucopyranoside in the leaves of *Exochorda serratifolia* S. Moore

CAI Qian<sup>1</sup>, WANG Cong<sup>2</sup>, LIU Yu-qiang<sup>1</sup>

(1. Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China; 2. Tieling health college, Tieling 112008, China)

**Abstract Objective:** To develop an HPLC method for determination of the contents of apigenin -7-O- $\beta$ -D-neospheroside and apigenin -7-O- $\beta$ -D-glucopyranoside in the leaves of *Exochorda serratifolia* S. Moore. **Methods:** Topsisil C<sub>18</sub> (5  $\mu$ m  $\times$  4.6 mm  $\times$  250 mm) column was adopted with a mobile phase of acetonitrile - 2% acetic acid (23:77) at the flow rate of 1.0 mL  $\cdot$  min<sup>-1</sup>. The UV detection was set at 267 nm. **Results:** The linear ranges of apigenin -7-O- $\beta$ -D-neospheroside and apigenin -7-O- $\beta$ -D-glucopyranoside were 1.424 - 8.544  $\mu$ g ( $r=0.9996$ ) and 0.17 - 1.02  $\mu$ g ( $r=0.9995$ ), respectively; The average recoveries of apigenin -7-O- $\beta$ -D-neospheroside and apigenin -7-O- $\beta$ -D-glucopyranoside were 103.0% (RSD = 2.2%) and 100.4% (RSD = 2.1%). **Conclusion:** The method is accurate and reliable and can be used to the quality control of leaves of *Exochorda serratifolia*.

**Key words:** *Exochorda serratifolia* S. Moore; HPLC; flavoroids; apigenin neospheroside; apigenin glucopyranoside

齿叶白鹃梅 (*Exochorda serratifolia* S. Moore) 为蔷薇科绣线菊亚科白鹃梅属的植物<sup>[1]</sup>, 生长在辽宁省朝阳、凌源、喀左等地区和河北一带。白鹃梅属的另一个种白鹃梅主要生长在我国的江苏、浙江、安徽一带, 以其根皮、树皮入药, 用于腰骨酸痛的治疗<sup>[2]</sup>; 齿叶白鹃梅的药用价值还不是很明确。但在朝阳市凌源县, 当地居民把齿叶白鹃梅的嫩叶作为一种野菜食用, 并且民间流传其具有治疗和预防糖尿病的功效。笔者通过对其化学成分进行系统分

离, 从中分离得到多个黄酮类化合物<sup>[3-4]</sup>。本论文以芹菜素 -7-O- $\beta$ -D-新橙皮糖苷和芹菜素 -7-O- $\beta$ -D-葡萄糖苷这 2 个含量较高的黄酮类化合物为指标进行了含量测定方法的研究<sup>[5-7]</sup>, 为齿叶白鹃梅叶子的深入开发奠定基础。

### 1 仪器与试剂

Agilent 1100 series 高效液相色谱仪, 包括真空脱气机、四元泵、柱温箱、VWD、HP 1100 化学工作站, 美国安捷伦科技有限公司; UV-3010 型紫外可

见分光光度计,日本东芝公司; CP225D 型电子天平,北京赛多利斯仪器系统有限公司; KH-300B 型超声波清洗器,昆山禾创超声仪器有限公司。

实验用齿叶白鹃梅叶子:采于辽宁省朝阳市凌源县,经辽宁中医药大学植物教研室王冰教授鉴定为齿叶白鹃梅(*Exochorda serratifolia* S. Moore.) 的叶子。

对照品芹菜素-7-O-β-D-新橙皮糖苷(apigenin-7-O-β-D-neosperoside)和芹菜素-7-O-β-D-葡萄糖苷(apigenin-7-O-β-D-glucopyranoside)为自制(采用波谱数据对化合物进行结构鉴定<sup>[3]</sup>),采用 HPLC 法测定纯度达到 98% 以上;乙腈为色谱纯(天津市科密欧化学试剂有限公司),冰醋酸为分析纯(天津市凯信化学工业有限公司),三级水(娃哈哈有限公司)。

## 2 方法与结果

**2.1 对照品溶液的制备** 精密称取对照品芹菜素-7-O-β-D-新橙皮糖苷及芹菜素-7-O-β-D-葡萄糖苷适量,分别用甲醇配制成每 1 mL 含芹菜素-7-O-β-D-新橙皮糖苷 0.7 mg 的对照品溶液和每 1 mL 含芹菜素-7-O-β-D-葡萄糖苷 0.1 mg 的对照品溶液,即得。

**2.2 供试品溶液的制备** 精密称取齿叶白鹃梅叶子粉末(40 目) 2.5 g,加入甲醇约 50 mL,索氏提取 4 h,加压回收溶剂,以甲醇定容至 50 mL 量瓶中,过 0.45 μm 微孔滤膜,即得。

**2.3 色谱条件** 采用 Topsil C<sub>18</sub>(5 μm 4.6 mm × 250 mm) 色谱柱[月旭材料科技(上海)有限公司],流动相为乙腈-2% 醋酸水溶液(23:77),流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>,检测波长 267 nm,进样量 5 μL。在上述色谱条件下,芹菜素-7-O-β-D-新橙皮糖苷的理论塔板数为 11998,分离度为 1.8;芹菜素-7-O-β-D-葡萄糖苷的理论塔板数为 9993,分离度为 2.43。样品及对照品色谱图见图 1。

### 2.4 线性关系考察

精密吸取浓度为 0.712 mg·mL<sup>-1</sup> 的芹菜素-7-O-β-D-新橙皮糖苷对照品溶液 2, 4, 6, 8, 10, 12 μL 注入液相色谱仪,测定峰面积。以进样量为横坐标,峰面积为纵坐标绘制标准曲线,其回归方程为:

$$Y = 1.308 \times 10^3 X + 512.3 \quad r = 0.9996$$

表明芹菜素-7-O-β-D-新橙皮糖苷进样量在 1.424 ~ 8.544 μg 范围内线性关系良好。

另精密吸取浓度为 0.085 mg·mL<sup>-1</sup> 的芹菜素-7-O-β-D-葡萄糖苷对照品溶液 2, 4, 6, 8, 10, 12 μL 注入液相色谱仪,测定峰面积。以进样量为横坐

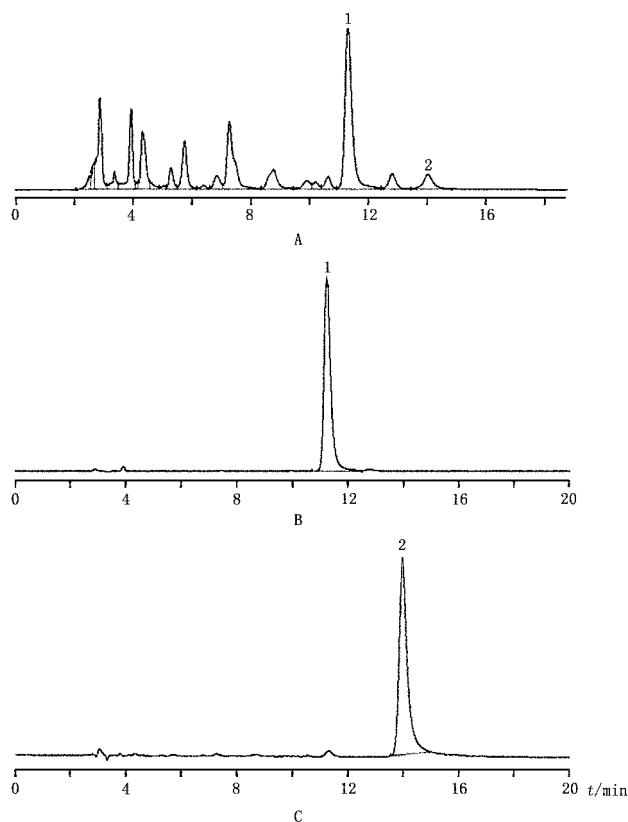


图 1 样品(A)及对照品(B,C) HPLC 色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms of sample(A) and reference substances(B, C)

1. 芹菜素-7-O-β-D-新橙皮糖苷(apigenin-7-O-β-D-neosperoside) 2. 芹菜素-7-O-β-D-葡萄糖苷(apigenin-7-O-β-D-glucopyranoside)

标峰面积为纵坐标绘制标准曲线,其回归方程为:

$$Y = 1.984 \times 10^3 X - 103.1 \quad r = 0.9995$$

表明芹菜素-7-O-β-D-葡萄糖苷进样量在 0.17 ~ 1.02 μg 范围内线性关系良好。

**2.5 精密度试验** 取同一供试品溶液连续进样 6 次,测定峰面积,计算芹菜素-7-O-β-D-新橙皮糖苷、芹菜素-7-O-β-D-葡萄糖苷的 RSD( $n=6$ ) 分别为 2.1% 和 2.7%。结果表明,该方法精密度符合要求。

**2.6 稳定性试验** 配制供试品溶液后分别在 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 h 进样,测定峰面积,计算芹菜素-7-O-β-D-新橙皮糖苷和芹菜素-7-O-β-D-葡萄糖苷 RSD( $n=7$ ) 均为 2.7%。结果表明,供试品溶液在 12 h 内稳定。

**2.7 重复性试验** 取同一样品 6 份,按“2.2”项下方法制备供试品溶液,进样测定峰面积,计算芹菜素-7-O-β-D-新橙皮糖苷和芹菜素-7-O-β-D-葡萄糖苷的平均含量( $n=6$ ) 分别为 15.13 mg

• g<sup>-1</sup>和 1.83 mg • g<sup>-1</sup>, RSD 分别为 2.3% 和 2.2%。表明该方法重复性好。

**2.8 回收率试验** 取“2.7”项下已测知含量的样品 6 份,每份 1.25 g 精密称定,分别加入芹菜素-7-O-β-D-新橙皮糖苷对照品溶液(浓度为 1.89 mg • mL<sup>-1</sup>) 10 mL 和芹菜素-7-O-β-D-葡萄糖苷对照品溶液(浓度为 0.229 mg • mL<sup>-1</sup>) 10 mL,按“2.2”项下方法制备供试溶液,进样测定。结果芹菜素-7-O-β-D-新橙皮糖苷和芹菜素-7-O-β-D-葡萄糖苷平均回收率(n=6)分别为 103.0% 和 100.4%,RSD 分别为 2.2% 和 2.1%。

**2.9 样品测定** 取 4 批样品各 3 份,分别按“2.2”项下方法制备供试品溶液,进样测定,采用外标两点法计算样品中芹菜素-7-O-β-D-新橙皮糖苷和芹菜素-7-O-β-D-葡萄糖苷含量,结果见表 1。

表 1 样品中芹菜素-7-O-β-D-新橙皮糖苷及芹菜素-7-O-β-D-葡萄糖苷的含量(n=3)

Tab 1 Contents of apigenin-7-O-β-D-neospheroside and apigenin-7-O-β-D-glucopyranoside in the samples

样品号 (sample No.)	芹菜素-7-O-β-D-新橙皮糖苷(apigenin-7-O-β-D-neospheroside)		芹菜素-7-O-β-D-葡萄糖苷(apigenin-7-O-β-D-glucopyranoside)	
	含量 (content) /%	RSD /%	含量 (content) /%	RSD /%
20100504	1.86	2.1	0.208	1.9
20100506	1.74	2.0	0.170	2.0
20100508	1.25	2.1	0.103	2.0
20100511	1.61	2.0	0.190	2.0

### 3 讨论

**3.1 试验中考察了甲醇、乙醇、水 3 种提取溶剂** 结果表明甲醇提取 2 种黄酮的含量最高,故选定甲醇为该试验的提取溶剂。同时考察了超声提取、回流提取、索氏提取 3 种方法,提取时间分别考察了超声提取 30 min、回流提取 30 min、回流提取 1 h、回流提取 2 h、索氏提取 4 h。结果选定索氏提取 4 h,芹菜素-7-O-β-D-新橙皮糖苷及芹菜素-7-O-β-D-葡萄糖苷的含量明显高于其他方法。

**3.2 试验中尝试采用流动相甲醇-0.03% 磷酸水溶液、甲醇-0.05% 醋酸水溶液、甲醇-2% 醋酸水溶液、乙腈-2% 醋酸水溶液。**结果采用乙腈-2% 醋酸水溶液系统,芹菜素-7-O-β-D-新橙皮糖苷及芹菜素-7-O-β-D-葡萄糖苷的分离度及对称性均良好,所以选择该系统。通过对乙腈-2%

醋酸水溶液不同比例的选择,确定乙腈-2% 醋酸水溶液比例为 23:77,分离效果最好,保留时间适中;试验中检测波长的选择是通过紫外 200~400 nm 扫描,在 267 nm 处芹菜素-7-O-β-D-新橙皮糖苷和芹菜素-7-O-β-D-葡萄糖苷均有最大吸收,所以确定检测波长为 267 nm。

**3.3 小结** 笔者对齿叶白鹃梅叶子进行了系统分离,在分离得到的化合物中黄酮类化合物居多,并且对分得的所有化合物与齿叶白鹃梅叶子的 HPLC 色谱峰进行对比标定,得知芹菜素-7-O-β-D-新橙皮糖苷和芹菜素-7-O-β-D-葡萄糖苷为齿叶白鹃梅叶子中 2 种含量较高的成分,所以对二者进行了含量测定。通过实验首次建立了齿叶白鹃梅叶子的含量测定方法,为齿叶白鹃梅的深入研究奠定了基础。

### 参考文献

- FU Pei-yun(傅沛云). Clavis Plantarum Chinese Borealiorientalis (东北植物检索表). 2nd Ed(第二版). Beijing(北京): Science Press(科学出版社), 1959. 283
- China National Corp. of Traditional & Herb Medicine(中国药材公司). Compendium of Chinese Medicinal Resources(中国中药资源志要). Beijing(北京): Science Press(科学出版社), 1994. 508
- CAI Qian(才谦), WANG Cong(王聪), LIU Yu-qiang(刘玉强). Chemical constituents of the leaves of *Exochorda serratifolia* S. Moore (齿叶白鹃梅叶中黄酮类化学成分的分离与结构鉴定). *J Shenyang Pharm Univ*(沈阳药科大学学报) 2011, 28(3): 190
- WANG Cong(王聪), LIU Yu-qiang(刘玉强), CAI Qian(才谦). Study on chemical constituents of leaves of *Exochorda serratifolia* S. Moore (齿叶白鹃梅叶化学成分研究). *J Liaoning Univ Tradit Chin Med*(辽宁中医药大学学报) 2011, 13(5): 245
- TAN Xing-qi(谭兴起), CHEN Hai-sheng(陈海生), QIAN Zheng-sheng(钱正生) et al. Content determination of apigenin-7-O-β-D-neospheroside in *Trachelospermum jasminoides* (Lindl.) Lem by HPLC(反相高效液相色谱法测定络石藤中芹菜素-7-O-β-D-新橙皮糖苷的含量). *China J Chin Mater Med*(中国中药杂志) 2005, 30(12): 1958
- YU Yun-qiu(郁韵秋), GONG Wei-jia(龚祎珈), LI Duan(李端) et al. Content determination of hyperoside, isoquercitrin and quercetin in the extracts of *Apocynum venetum* L. by HPLC(高效液相色谱法同时测定罗布麻浸膏粉中金丝桃苷、异槲皮苷、槲皮素的含量). *J Fudan Univ*(复旦学报) 2007, 46(6): 417
- LI Hua(李化), YANG Bin(杨滨). Study on the content determination of flavonoids in hawthorn by RP-HPLC(RP-HPLC法测定山楂中黄酮类成分的含量). *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志), 2006, 26(7): 881

(本文于 2010 年 10 月 27 日收到)