

RP-HPLC 法测定槐角提取物中染料木素的含量

王剑波¹, 郭 萍², 赵小兵¹, 谢艳华^{1*}

(1. 第四军医大学药物研究所, 陕西 西安 710033; 2. 武警四川消防总队医院 药械科, 四川 成都 610072)

摘要: 目的 建立测定槐角提取物中染料木素含量的方法。方法 高效液相色谱法。采用 Luna C₁₈ 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 甲醇-水 (60:40) 为流动相, 流速 1.0 mL/min, 检测波长 260 nm。结果 染料木素与共存的杂质能很好分离, 在 40.2~201 μg/mL 与峰面积呈线性关系, 平均回收率为 98.93%, RSD 为 0.81% (n=5), 最小检测量为 0.02 μg。结论 该法简便、快速、准确, 适用于染料木素的含量测定。

关键词: 槐角提取物; 染料木素; 高效液相色谱

中图分类号: R286.02

文献标识码: B

文章编号: 0253-2670(2004)04-0402-02

Determination of genistein in Fructus Sophorae extract by RP-HPLC

WANG Jian-bo¹, GUO Ping², ZHAO Xiao-bing¹, XIE Yan-hua¹

(1. Institute of Materia Medica, Fourth Military Medical University, Xi'an 710033, China; 2. Department of Medicine and Apparatus, Sichuan Provincial Fire Control Corps Hospital, Chinese People's Armed Police Forces, Chengdu 610072, China)

Key words: Fructus Sophorae extract; genistein; HPLC

染料木素为异黄酮类化合物, 具有明显防治骨质疏松症、心血管疾病和抗肿瘤等多种药理作用^[1~3]。主要存在于豆科植物中。由于在大豆中含量较高, 目前大多采取从大豆中提取获得染料木素的方法。但大豆含植物蛋白和油脂太多, 得到高纯度染料木素相当困难, 工艺复杂、成本高, 若作为药品开发使用, 必然受到限制。

槐角为豆科植物槐 *Sophora japonica* L. 的果实, 性寒、味苦、入肝经, 有清热泻火、凉血止血的功能。从槐角中提取染料木素早在 20 世纪 80 年代已有研究^[4,5], 但仅报道简易的分离、提纯、结晶方法和对结果进行分析。本实验室采用特殊工艺从槐角中提取开发染料木素, 方法简单, 收率高 (>0.54%), 已申请专利并向国家食品药品监督管理局申报一类中药新药。有关槐角提取物中染料木素的定量分析及质量检测标准尚未见文献报道。为制定染料木素质量控制标准, 本实验建立了 RP-HPLC 法检测槐角提取物中染料木素的方法。

1 仪器、试剂与药品

美国 Beckman Golden 系统高效液相色谱仪 (包括 125 高压双泵, 168 二极管阵列检测器)、Golden 色谱数据系统, SK250LH 超声清洗器 (上海

科导超声波仪器公司)。

染料木素对照品 (Sigma 公司, 纯度 >98%), 甲醇为色谱纯, 实验用水均为 Milli-Q 去离子水, 槐角提取物 (第四军医大学药物研究所植化研究室)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适用性试验: 色谱柱: Luna C₁₈ 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-水 (60:40); 流速: 1.0 mL/min; 检测波长: 260 nm; 进样量: 20 μL; 灵敏度: 0.02 AUFS; 柱温: 室温 (27℃)。理论板数按染料木素峰计算应不低于 2000。

2.2 溶液的配制

2.2.1 对照品溶液的制备: 精密称取减压干燥至恒重的染料木素对照品 10.5 mg 于 25 mL 量瓶中, 加甲醇 15 mL 超声处理 5 min, 用甲醇稀释至刻度, 配制成 402 μg/mL 的染料木素母液。精密吸取适量于 10 mL 量瓶中, 加甲醇稀释成 120 μg/mL 的溶液, 经 0.45 μm 滤膜滤过, 即得。

2.2.2 供试品溶液的制备: 取槐角提取物适量, 精密称定, 置 50 mL 量瓶中, 加甲醇 15 mL, 超声处理 5 min, 用甲醇稀释至刻度, 制成 0.12 mg/mL 的供试品溶液, 摇匀, 滤过, 取续滤液过 0.45 μm 滤膜, 即得。

* 收稿日期: 2003-06-28

基金项目: 陕西省中医药管理局资助课题 (2001053)

作者简介: 王剑波 (1965—), 男, 四川宜宾人, 副主任药师, 药理学硕士, 主要从事药物分析与新药开发, 在国内刊物发表论文 20 余篇。

Tel: (029) 83373752 E-mail: yyswjb@fmmu.edu.cn

2.3 标准曲线和线性范围: 分别从染料木素对照品母液中精密吸取 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 mL 于 10 mL 量瓶中, 以甲醇稀释至刻度, 摇匀, 经 0.45 μ m 滤膜滤过, 依次进样 20 μ L, 重复 3 次, 记录色谱图。以峰面积对浓度进行线性回归, 得回归方程: $A = 2.6782C + 1.022$, $r = 0.9999$, 染料木素在 40.2~201 μ g/mL 与峰面积线性良好。染料木素的检出限为 0.02 μ g。

2.4 精密度试验: 精密吸取供试品溶液, 按选定的色谱条件连续进样测定 5 次, 测定色谱峰面积, 结果染料木素色谱峰面积的 RSD 为 0.71%。

2.5 稳定性试验: 取供试品溶液每 2 h 进样 1 次, 测定峰面积, 结果供试品溶液在 10 h 内稳定, 染料木素峰面积的 RSD 为 0.36% ($n = 6$)。

2.6 回收率试验: 精密称取已知含量的样品 5 份 (含染料木素 3.0 mg), 置于 50 mL 量瓶中, 分别加入不同量的染料木素对照品 (约 3.0 mg), 以适量甲醇超声处理 5 min, 再用甲醇定容于 50 mL 量瓶, 摇匀, 过 0.45 μ m 微孔滤膜, 进样测定, 记录色谱图。采用外标法以峰面积计算染料木素的回收率, 结果平均回收率为 98.93%, RSD 为 0.81% ($n = 5$)。

2.7 染料木素的含量测定: 分别取各供试品溶液和对照品溶液, 各进样 20 μ L, 记录色谱图, 按外标法以峰面积计算, 测定样品, 结果见表 1。色谱图见图 1。

表 1 槐角提取物中染料木素的含量测定结果 ($n = 3$)

Table 1 Genistein in Fructus Sophorae extract ($n = 3$)			
批号	染料木素/%	批号	染料木素/%
20001101	97.110	20010102	99.170
20001201	98.435	20010106	97.375
20001208	98.245	20010110	99.135

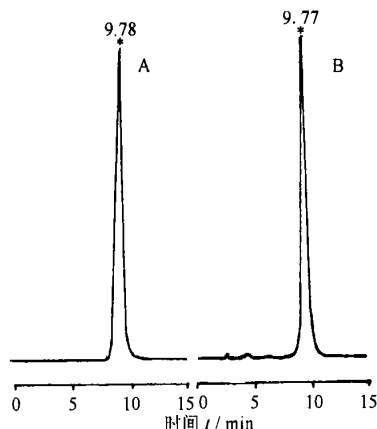


图 1 染料木素对照品(A)和槐角提取物(B)的 HPLC 图谱

Fig 1 HPLC chromatogram of genistein reference substance (A) and Fructus Sophorae extract (B)

3 讨论

3.1 提取溶剂的选择: 染料木素在一般的有机溶媒中溶解度较差^[6], 而易溶于二甲基亚砜, 在甲醇、乙醇中亦有一定的溶解度。但由于二甲基亚砜流动性差, 对色谱柱和泵均有影响, 不宜作为溶媒。乙醇提取率虽略高于甲醇, 但色谱峰峰形不好。甲醇作为液相色谱测定常用的流动相配比之一, 更适合作为提取溶液, 因此选择甲醇作为提取溶媒。

3.2 提取方法的比较: 在以甲醇为提取溶剂的基础上进行提取方法的比较, 结果以峰面积计超声提取 > 静置浸泡 > 热回流。故选择超声提取的方法。在提取时间的考察上, 超声时间以峰面积计 10 min > 20 min > 5 min, 可见, 以超声提取 10 min 为佳。

3.3 流动相的比较: 参考有关文献^[7,8]中测定大豆异黄酮的方法, 比较了甲醇-水-乙腈-磷酸 (23 59 18 0.1)、甲醇-水-甲酸 (30 3.5 66.5)、甲醇-水 (45 55)、甲醇-水 (60 40)。结果发现: 流动相在弱酸条件下, 色谱峰无明显改善, 但甲醇浓度过高或过低, 分离效果均不理想, 按本实验建立的配比, 样品峰保留时间适中, 峰形较好, 并可与杂质完全分离。

3.4 根据本品含量测定的结果, HPLC 法可以较好地分离出染料木素的主成分峰和杂质峰, 能反映样品的真实含量, 方法简便、准确、灵敏, 有利于药品质量的控制。

References

- [1] Adlercreutz H, Mazur W. Phytoestrogens and western disease [J]. *Ann Med*, 1997, 29: 95-120.
- [2] Messina M, Persky V, Setchell K D R, et al. Soy intake and cancer risk: a review of the *in vitro* and *in vivo* data [J]. *Nutr Cancer*, 1994, 21: 113-131.
- [3] Messina M. Modern applications of an ancient bean: soybeans and the prevention and treatment of chronic disease [J]. *J Nutr*, 1995, 125: 567s-569s.
- [4] Liu J S, Ding J M, Huang M F. Studies on the efficacious constituents of *Fructus Sophorae* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1980, 11(4): 145-146.
- [5] He L X, Xu Y X, Xue H Z, et al. Studies on the contraceptive of *Fructus Sophorae* [J]. *Reprod Contracept* (生殖与避孕), 1982, 2(2): 23-27.
- [6] Ji Y B. *Active Constituents of Chinese Drugs and Its Application* (中药有效成分与应用) [M]. Harbin: Heilongjiang Science and Technology Publishing House, 1995.
- [7] Jiang H Y, Lü F J. Isoflavones in the soybeans were determined by high performance liquid chromatography [J]. *Food Sci* (食品科学), 2001, 21(4): 57-58.
- [8] Zhang L. RP-HPLC determination of daidzein, genistein, daidzin, and genistin in soybean extract [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2001, 32(2): 118-120.