

## RP-HPLC 法测定丰城鸡血藤提取物中大豆黄酮、染料木素、刺芒柄花素和美皂异黄酮

余燕影<sup>1</sup>, 章丽华<sup>1</sup>, 曹树稳<sup>2</sup>

(1. 南昌大学 化学系, 江西南昌 330047; 2. 南昌大学 食品科学教育部重点实验室, 江西南昌 330047)

**摘要:**目的 研究 RP-HPLC 法分离丰城鸡血藤提取物的条件并建立其中 4 种异黄酮活性成分的测定方法。方法 以乙腈-0.1%磷酸为流动相, 采用 Spherisorb ODS 柱 (250 mm×4 mm, 5 μm), 梯度洗脱, 体积流量 0.8 mL/min, 检测波长 260 nm, 研究流动相组成和梯度变化对丰城鸡血藤提取物分离效果的影响。结果 大豆黄酮、染料木素、刺芒柄花素和美皂异黄酮的线性范围、相关系数和平均加样回收率分别为 6.24~31.2 μg/mL,  $r=0.999\ 9$ 、99.32%; 10.00~130.0 μg/mL,  $r=0.999\ 7$ 、102.20%; 5.99~125.9 μg/mL,  $r=0.999\ 9$ 、100.08% 和 6.96~34.8 μg/mL,  $r=0.999\ 3$ 、99.52%。各组分的加样回收率 RSD 分别为 1.79%、1.51%、1.54% 和 2.01% ( $n=5$ )。

**结论** 该法可用于丰城鸡血藤提取物中成分的分离及其中 4 种异黄酮活性成分的测定。

**关键词:** 丰城鸡血藤; 异黄酮; 大豆黄酮; 染料木素; 刺芒柄花素; 美皂异黄酮; 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(2006)11-1655-02

### Determination of daidzein, genistein, formononetin, and biochanin A in *Milletlta nitida* var. *hirsutissima* extract by RP-HPLC

YU Yan-ying<sup>1</sup>, ZHANG Li-hua<sup>1</sup>, CAO Shu-wen<sup>2</sup>

(1. Department of Chemistry, Nanchang University, Nanchang 330047, China; 2. Key Laboratory of Food Science of Ministry of Education, Nanchang University, Nanchang 330047, China)

**Key words:** *Milletlta nitida* Benth. var. *hirsutissima* Z. Wei; isoflavones; daidzein; genistein; formononetin; biochanin A; HPLC

丰城鸡血藤又名香花崖豆藤 *Milletlta nitida* Benth. var. *hirsutissima* Z. Wei, 是传统地产中药材, 入药历史悠久。有补血活血、舒经活络之功效, 用于治疗月经不调、血虚萎黄、麻木瘫痪、风湿痹痛等症<sup>[1]</sup>。丰城鸡血藤主要含黄酮类活性成分<sup>[1,2]</sup>, 且多为异黄酮苷元。丰城鸡血藤的研究仅见有关其化学成分和药理研究的报道<sup>[3~6]</sup>。本实验旨在研究 RP-HPLC 法分离丰城鸡血藤提取物中成分的条件并建立其中 4 种异黄酮活性成分的测定方法, 对其进行定量分析。

#### 1 仪器与试剂

Agilent 1100 高效液相色谱仪, G2180AA (LC 色谱工作站), G1313A 自动进样器, DAD 检测器。

大豆黄酮、美皂异黄酮 (质量分数 ≥ 95%, Sigma 公司); 染料木素、刺芒柄花素 (质量分数 ≥ 98%, HPLC 测定, 陕西慧科植物开发有限公司); 乙腈 (色谱纯, Merck 公司), 水为超纯水, 其他试剂均为分析纯。

丰城鸡血藤采自江西丰城市罗山乡, 经南昌大学生物系杨柏云教授鉴定。

#### 2 方法及结果

2.1 色谱条件: 色谱柱: Spherisorb ODS (250 mm×4 mm, 5 μm); 体积流量: 0.8 mL/min; 检测波长: 260 nm; 进样量: 10 μL; 流动相: 乙腈 (A)-0.1% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (B), 梯度洗脱: A: 0~10 min, 0%~10%; 10~16 min, 10%~15%; 16~21 min, 15%; 21~32 min, 15%~20%; 32~42 min, 20%~25%; 42~43 min, 25%~30%; 43~48 min, 30%; 48~58 min, 45%; 58~64 min, 60%; 64~70 min, 60%~0%。

2.2 提取物的制备: 鸡血藤干料用 90% 乙醇和 2% HCl 回流提取, 滤过, 滤液用 NaHCO<sub>3</sub> 中和后再滤过, 滤液旋转蒸除乙醇, 剩余物用醋酸乙酯回流提取, 提取液旋转浓缩至干, 所得提取物浸膏真空干燥备用。

2.3 供试品溶液的制备: 称取适量真空干燥后的提取物浸膏用 70% 乙醇溶解并定容, 微孔滤膜 (0.45

收稿日期: 2006-01-19

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (20262004, 20562008); 江西省教育厅资助项目 (赣财教 [2003] 73 号)

作者简介: 余燕影, 女, 42 岁, 副教授, 研究方向为天然产物分离及其生物活性研究。E-mail: cswyyy@nc.jx.cn

μm)滤过,即得。

2.4 工作曲线制备:分别精密称取干燥至恒重的大豆黄素、染料木素、刺芒柄花素和美皂异黄酮适量,用无水乙醇配制成质量浓度分别为 31.20、250.0、299.9、34.80 μg/mL 的储备液。分别精密移取一定量上述储备液于 10 mL 量瓶中,配制一系列不同质量浓度的对照品混合溶液,取 10 μL 进样,测定。以峰面积对质量浓度进行线性回归,结果见表 1。

表 1 4 种异黄酮的回归方程

Table 1 Regression equation of four isoflavones

异黄酮	线性方程	r	线性范围/(μg·mL <sup>-1</sup> )
大豆黄素	Y=80 171.474 X-7.450	0.999 9	6.24~31.2
染料木素	Y=81 641.333 X+25.067	0.999 7	10.00~130.0
刺芒柄花素	Y=65 916.972 X-20.250	0.999 9	5.99~125.9
美皂异黄酮	Y=10 2709.770 X-63.200	0.999 3	6.96~34.8

2.5 精密度试验:取同一份供试品溶液,取 10 μL 进样,重复 5 次,计算得大豆黄素、染料木素、刺芒柄花素和美皂异黄酮的峰面积 RSD 分别为 1.47%、1.69%、1.01% 和 1.84%。

2.6 稳定性试验:同一供试液品溶液 24 h 内测定 5 次,计算得大豆黄素、染料木素、刺芒柄花素和美皂异黄酮的峰面积 RSD 分别为 1.71%、1.52%、1.40% 和 1.98%,结果表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

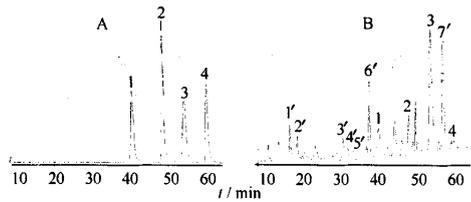
2.7 重现性试验:取 5 份同一批提取物样品,制备供试品溶液测定,结果样品中大豆黄素、染料木素、刺芒柄花素和美皂异黄酮质量分数的 RSD 分别为 1.89%、2.91%、1.66% 和 2.15%。

2.8 加样回收率试验:取供试品溶液的制备中的一半样品量,加入相应质量的对应对照品,制备供试品溶液,并定容至 50 mL。大豆黄素、染料木素、刺芒柄花素和美皂异黄酮对照品的加入量分别为 680.40、588.10、3 073.15、302.15 μg。结果平均回收率分别为 99.32% (RSD 为 1.79%, n = 5)、102.20% (RSD 为 1.51%, n = 5)、100.08% (RSD 为 1.54%, n = 5)、99.52% (RSD 为 2.01%, n = 5)。

2.9 样品测定:取供试样品 5 批,测得样品中大豆黄素、染料木素、刺芒柄花素和美皂异黄酮的平均质量分数(以丰城鸡血藤干基计)分别为 38.2、33.4、172.5、8.4 μg/g,色谱分析图见图 1。

### 3 讨论

溶剂组成和梯度条件变化对丰城鸡血藤提取物的分离效果影响较大。在 0~7~15 min,当乙腈比例为 0%~15%~25%时,丰城鸡血藤提取物的 HPLC 图谱中的 1' 与 2' 峰重叠(分离度 R=0.552),



1-大豆黄素 2-染料木素 3-刺芒柄花素 4-美皂异黄酮  
1-daidzein 2-genistein 3-formononetin 4-biochanin A

图 1 混合对照品(A)和丰城鸡血藤提取物(B)的 HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC Chromatograms of isoflavones reference substances (A) and *M. nitida* var. *hirsutissima* extract (B)

3', 4' 和 5' 3 个峰之间的分离度分别为 0.230 和 0.372, 6' 峰与相邻小峰重叠(R=0.506), 峰形较宽, 不尖锐。在 42~52~57 min, 当乙腈比例变化为 30%~50%~70% 时, 染料木素和刺芒柄花素峰与其相邻小峰均有重叠(分离度分别为 0.204 和 0.073), 峰形宽, 不对称, 整个图谱偏离基线较高; 若将乙腈的比例改为 30%~30%~60%, 则刺芒柄花素峰形拖尾严重, 7' 峰不对称, 美皂异黄酮峰漂移基线较高。

根据试验摸索, 在 42 min 以前, 由于出峰的化合物极性相对较强, 根据相似相溶原理, 流动相的极性应相对较强, 因而乙腈比例不能太高, 且乙腈随时间的梯度变化要缓慢, 否则, 各峰容易发生重叠, 峰形较宽, 不尖锐, 分离效果差; 在 43 min 以后出现的色谱峰, 出峰的化合物极性相对弱, 同理, 流动相的极性应相对较弱, 因而乙腈比例应相对较高, 且随时间变化不能太慢, 否则色谱峰容易出现拖尾和基线漂移现象。

### References:

- [1] Cui Y J, Chen R Y. Progress of chemistry and pharmacology of *Caulis Spatholobi* [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2002, 15(4): 72-78.
- [2] Yan Q X, Li P. Study on HPLC fingerprint of *Caulis Spatholobi* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2004, 35(5): 553-559.
- [3] Wang R, Geng P W, Fu S A B. Study on chemical constituents of *Milletia dielsiana* Harm [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1989, 22(2): 15-17.
- [4] Wang R, Geng P W, Fu S A B. Study on chemical constituents of *Milletia dielsiana* Harm (I) [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1990, 21(9): 5-7.
- [5] Song J X, Luo S D, Hu W Y. Study on chemical constituents of *Milletia dielsiana* Harm [J]. *J Southwest Forest Coll* (西南林学院学报), 1992, 12(1): 40-41.
- [6] Xu C H, Wang M, Zhang W J. Effects of Chinese herbs on DNA duplication of hepatocytes *in vitro* [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 1990, 15(11): 52-55.