

高效液相色谱法测定丰城鸡血藤中 四种黄酮类化合物

龙洲雄¹, 万春花¹, 余燕影², 曹树稳³, 胡海山¹

(1 江西省分析测试研究所, 江西 南昌 330029; 2 南昌大学 化学系, 江西 南昌 330047;
3 南昌大学 食品科学系, 江西 南昌 330047)

摘 要: 用 HPLC 法测定了丰城鸡血藤中的大豆黄酮、染料木黄酮、异甘草素、美皂异黄酮含量。鸡血藤中黄酮用 80% 乙醇溶液 (含盐酸 10%) 提取水解。采用 Symmetry C₁₈ 柱, 以 0.1% 磷酸 - 乙腈为流动相, 梯度洗脱, 流速 0.8 mL · min⁻¹, 紫外双波长检测: $\lambda_1 = 260$ nm (大豆黄酮、染料木黄酮、美皂异黄酮) 和 $\lambda_2 = 370$ nm (异甘草素)。大豆黄酮、染料木黄酮、异甘草素、美皂异黄酮线性范围分别为 2.08 ~ 208 mg · L⁻¹ ($r = 0.999\ 9$)、0.96 ~ 96 mg · L⁻¹ ($r = 0.999\ 9$)、1.12 ~ 44.8 mg · L⁻¹ ($r = 0.999\ 9$)、1.16 ~ 116 mg · L⁻¹ ($r = 0.999\ 9$), 回收率在 92% ~ 103% 之间, RSD ($n = 4$) 为 0.75% ~ 4.69%。实验结果表明该法快速、简便、准确可靠。

关键词: 高效液相色谱; 丰城鸡血藤; 大豆黄酮; 染料木黄酮; 异甘草素; 美皂异黄酮

中图分类号: O657.72 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004 - 4957(2006)06 - 0104 - 04

Determination of Flavones in *M illettia dielsiana* Hams Extract by High Performance Liquid Chromatography

LONG Zhou-xiong¹, WAN Chun-hua¹, YU Yan-ying², CAO Shu-wen³, HU Hai-shan¹

(1 Jiangxi Institute of Analysing and Testing, Nanchang 330029, China; 2 Department of Chemistry,
Nanchang University, Nanchang 330047, China; 3 Department of Food Science,
Nanchang University, Nanchang 330047, China)

Abstract A simple, rapid and reliable HPLC method for the separation and determination of Daidzein, genistein, isoliquiritigenin and biochanin in *M illettia dielsiana* Hams was developed. After extracting with a mixture of 80% ethanol and 10% hydrochloric acid solution, the flavones were then separated using a Symmetry C₁₈ column with acetonitrile - 0.1% H₃PO₄ as the mobile phase and gradient elution at a flow rate of 0.8 mL · min⁻¹. Daidzein, genistein, biochanin A were detected at 260 nm, respectively, and isoliquiritigenin at 370 nm with UV detector. The linear ranges of the calibration curves with correlation coefficients of 0.999 9 were 2.08 - 208 mg · L⁻¹, 0.96 - 96 mg · L⁻¹, 1.12 - 44.8 mg · L⁻¹ and 1.16 - 116 mg · L⁻¹ for daidzein, genistein, isoliquiritigenin and biochanin, respectively. Their recoveries were in the range of 92% - 103%, and their average RSD ($n = 4$) were 0.75% ~ 4.69%.

Key words: HPLC; *M illettia dielsiana* Hams; Daidzein; Genistein; Isoliquiritigenin; Biochanin A

丰城鸡血藤, 学名 *M illettia dielsiana* Hams, 有悠久的入药历史, 为江西省特色药材。据《中药大辞典》记载, 鸡血藤具有补血行血、通经活络等作用。研究表明因产地不同、植物种类不同, 鸡血藤化学成分也有较大差别^[1]。目前, 天然产物中黄酮类化合物的测定方法主要有比色法、高效液相色谱法、液相色谱 - 质谱联用及高效毛细管电泳法^[2-6]。有关大豆黄酮、染料木黄酮、异甘草素、美皂异黄酮含量测定也已有文献报道^[7-11], 但主要是测定大豆及其产品中的其中 2 种或 3 种成分含量。对这 4 种黄酮化合物含量的同时测定, 尤其是对丰城鸡血藤中黄酮类化合物含量的测定还未见文献报道。为此, 本文研究建立了 HPLC 法同时测定丰城鸡血藤中大豆黄酮、染料木黄酮、异甘草素、美皂异黄酮含量的方法。实验结果表明, 该方法快速、简便、灵敏度高, 结果令人满意。

收稿日期: 2006 - 02 - 12; 修回日期: 2006 - 06 - 16

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

作者简介: 龙洲雄 (1963 -), 男, 湖南祁东人, 高级工程师, Tel: 0791 - 8331971, E-mail: 8512501@sina.com

1 实验部分

1.1 主要仪器与试剂

Waters1525高效液相色谱仪, 配有 2487紫外检测器, 美国沃特斯公司。超声波清洗器: 2200H型, 上海科导超声仪器有限公司。

对照品: 大豆黄素 (daidzein, $\geq 98\%$), 染料木黄酮 (genistein, $\geq 98\%$), 异甘草素 (isoliquiritigenin), 美皂异黄酮 (biochanin A), 均为 Sigma公司产品。

甲醇、乙腈 (HPLC级), 磷酸 (GR), 乙酸乙酯、氯仿、盐酸、醋酸铵 (AR), 超纯蒸馏水。

1.2 色谱条件

Waters Symmetry C₁₈柱 (150 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m), 流动相: A泵 0.1%磷酸, B泵乙腈; 流速 0.8 mL/min; 梯度洗脱 (A泵 0~15 min 75%, 15~15.5 min 65%, 15.5~21.0 min 65%, 21.0~22.0 min 50%, 22.0~31.0 min 50%, 31.0~32.0 min 75%); 双波长同时检测: 大豆黄素、染料木黄酮、美皂异黄酮为 260 nm, 异甘草素为 370 nm; 进样量: 20 μ L。

1.3 实验方法

1.3.1 标准溶液的配制 分别准确称取大豆黄素对照品 5.2 mg、染料木黄酮 2.4 mg、异甘草素 2.8 mg、美皂异黄酮 2.9 mg于 25 mL容量瓶中, 加 20 mL甲醇, 超声 5 min, 用甲醇定容到刻度, 4种对照品储备液质量浓度分别为 208、96、112、116 mg/L, 于 2 $^{\circ}$ C的冰箱中保存。

1.3.2 样品的制备 将丰城鸡血藤藤茎 (干基物) 粉碎后, 称取一定量的粉末于 250 mL锥形瓶中, 用 80% (ϕ) 的乙醇溶液 (含盐酸 10%) 加热回流提取 2次, 合并提取液用碳酸氢钠中和后过滤, 滤液分别用氯仿或乙酸乙酯提取^[2], 提取液经浓缩后分别得到氯仿浸膏 (1 $^{\#}$ 样品)、乙酸乙酯浸膏 (2 $^{\#}$ 样品)。

1.3.3 样品测定 称取 1 $^{\#}$ 和 2 $^{\#}$ 样品约 1 g (精确到 0.000 1 g) 于 25 mL容量瓶中, 加甲醇 20 mL超声 30 min, 冷至室温后用甲醇定容。用定性滤纸过滤后, 再过 0.45 μ m滤膜, 按色谱条件上机测定。

2 结果与讨论

2.1 色谱条件的选择

2.1.1 测量波长的选择 紫外-可见分光光度计在 190~400 nm范围内进行扫描, 得出大豆黄素的吸收最大吸收波长为 249~250 nm, 染料木黄酮为 260~262 nm, 异甘草素为 369~372 nm, 美皂异黄酮为 260~262 nm, 综合考虑各因素选择 260 nm为测定大豆黄素、染料木黄酮和美皂异黄酮的检测波长, 370 nm为异甘草素的检测波长。

2.1.2 流动相的选择及梯度条件的确定 本实验分别采用了甲醇-0.01 mol/L醋酸铵 (pH=4~5) 和乙腈-0.1%磷酸为流动相, 结果表明, 采用前者等度及梯度洗脱时, 4种黄酮的混合标准溶液均不能很好地分离。采用 0.1%磷酸-乙腈为流动相, “1.2节的梯度条件, 不但 4种标准化合物能很好地分离, 且待测物与其它峰也能较好分离 (图 1~2)。

2.2 方法线性范围

按“1.3.1 配制 6个不同浓度的 4种化合物的混合标准溶液, 按“1.2 所述条件进行测定, 以峰面积 (Y) 对相应的标准质量浓度 (X, mg/L) 作线性回归, 回归方程及相关系数见表 1所示。

2.3 标准溶液放置稳定性试验

考虑到许多天然提取物在配成溶液后, 易失效及变化的特点, 对同一份混合标准使用液, 进行为期 3个月的稳定性实验, 观察其峰面积变化情况, 结果发现, 放在冰箱内使用液中的 4种黄酮性质均很稳定, 3个月内未见明显变化。

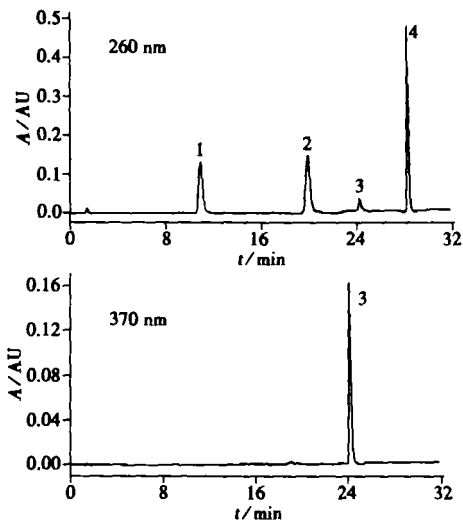


图 1 4种黄酮混合标准色谱图
Fig. 1 The chromatogram of four flavones standards
1. 大豆黄素 (daidzein); 2. 染料木黄酮 (genistein); 3. 异甘草素 (isoliquiritigenin); 4. 美皂异黄酮 (biochanin A)

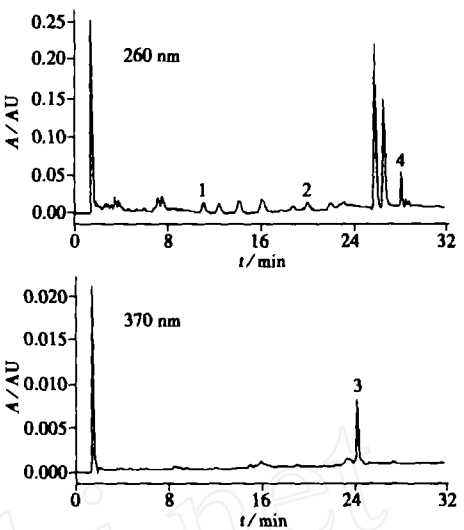


图 2 乙酸乙酯浸膏色谱图
Fig. 2 The chromatogram of sample extract with ethyl acetate
1. 大豆黄素 (daidzein); 2. 染料木黄酮 (genistein); 3. 异甘草素 (isoliquiritigenin); 4. 美皂异黄酮 (biochanin A)

表 1 四种黄酮的校正曲线
Table 1 Regression analysis of calibration curves of four flavones

Compound	Retention time t/min	Regression equation	Correlation coefficient r	Linear range $\rho / (\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$
Daidzein (大豆黄素)	11. 0	$Y = 142\ 183\ X - 22\ 406$	0. 999 9	2. 08 ~ 208
Genistein (染料木黄酮)	20. 1	$Y = 197\ 144\ X + 8\ 386$	0. 999 9	0. 96 ~ 96
Isoliquiritigenin (异甘草素, 370 nm)	24. 3	$Y = 189\ 509\ X + 13\ 898$	0. 999 9	1. 12 ~ 44. 8
Biochanin A (美皂异黄酮)	28. 3	$Y = 188\ 076\ X + 46\ 151$	0. 999 9	1. 16 ~ 116

2.4 回收率与精密度实验

分别称取一定量的 1[#]氯仿浸膏和 2[#]乙酸乙酯浸膏各 4份于 25 mL容量瓶中，分别加入 4种黄酮混合标准，按实验方法进行测定，回收率及 RSD (n=4)结果见表 2。结果表明，4种待测物的平均回收率分别为：大豆黄素 96.5%，染料木黄酮 96%，异甘草素 99%，美皂异黄酮 98%。

表 2 样品的加标回收试验
Table 2 Results of recovery for the flavones in different sample extracts

Compound	Sample *	Original m_O / mg	Added m_A / mg	Found m_F / mg	Recovery R / %	RSD $s_r / \%$
Daidzein (大豆黄素)	1 [#]	0. 129, 0. 115, 0. 117, 0. 108	0. 208	0. 330, 0. 318, 0. 329, 0. 311	97, 98, 102, 98	2. 40
	2 [#]	0. 205, 0. 191, 0. 199, 0. 192	0. 208	0. 403, 0. 386, 0. 395, 0. 390	95, 94, 94, 95	0. 75
Genistein (染料木黄酮)	1 [#]	0. 111, 0. 098, 0. 100, 0. 092	0. 096	0. 200, 0. 187, 0. 197, 0. 185	93, 93, 101, 97	4. 01
	2 [#]	0. 173, 0. 161, 0. 168, 0. 162	0. 096	0. 271, 0. 249, 0. 258, 0. 256	102, 92, 94, 98	4. 69
Isoliquiritigenin (异甘草素)	1 [#]	0. 017, 0. 015, 0. 015, 0. 014	0. 112	0. 128, 0. 128, 0. 119, 0. 124	99, 101, 93, 98	3. 52
	2 [#]	0. 037, 0. 035, 0. 036, 0. 035	0. 112	0. 152, 0. 146, 0. 148, 0. 142	103, 99, 100, 96	2. 99
Biochanin A (美皂异黄酮)	1 [#]	0. 178, 0. 159, 0. 161, 0. 149	0. 116	0. 288, 0. 271, 0. 276, 0. 266	95, 97, 99, 101	2. 75
	2 [#]	0. 153, 0. 143, 0. 149, 0. 144	0. 116	0. 263, 0. 262, 0. 258, 0. 258	95, 103, 94, 98	4. 03

* 1[#]: sample extract with chloroform; 2[#]: sample extract with ethyl acetate

2.5 样品含量测定

按实验方法对丰城鸡血藤提取物 1[#]和 2[#]样品分别进行 5次平行测定，计算出鸡血藤干物和提取物中的大豆黄素、染料木黄酮、异甘草素、美皂异黄酮的含量，并求出其平均值。结果见表 3。从表 3可知，鸡血藤藤茎用 80%的乙醇溶液 (含盐酸 10%) 加热水解回流提取后，采用乙酸乙酯作为提取黄酮的溶剂更为适宜。

表 3 鸡血藤测定结果
Table 3 Results of different extracts of *M illettia dielsiana* Hams

Compound	1 [#] extraction of	Dry <i>M illettia</i>	2 [#] extraction of	Dry <i>M illettia</i>
	chloroform	<i>dielsiana</i> Hams	ethyl acetate	<i>dielsiana</i> Hams
	w / (mg · g ⁻¹)	w / (mg · g ⁻¹)	w / (mg · g ⁻¹)	w / (mg · g ⁻¹)
Daidzein (大豆黄素)	1. 29	17. 80	1. 94	36. 47
Genistein (染料木黄酮)	1. 10	15. 18	1. 64	30. 83
Isoliquiritigenin (异甘草素)	0. 17	2. 35	0. 35	6. 58
Biochanin A (美皂异黄酮)	1. 78	24. 56	1. 45	27. 26

1[#]: sample extract with chloroform; 2[#]: sample extract with ethyl acetate

参考文献：

[1] 赵庆芳, 夏 泉, 孔 杰, 等. 商品鸡血藤的研究进展 [J]. 中草药, 2001, 32(5): 462 - 464

[2] 徐任生. 天然产物化学 (第二版) [M]. 北京: 科学出版社, 2004: 526 - 566

[3] 李会军, 李 萍. 紫外分光光度法测定酸枣仁中总黄酮的含量 [J]. 中国药科大学学报, 2001, 32(1): 73 - 74

[4] 郑敏燕, 魏永生. 油菜蜂花粉黄酮含量的 HPLC测定 [J]. 分析测试学报, 2004, 23(2): 95 - 97

[5] WU Q L, WANG M F, SMON JAMES E. Determination of isoflavones in red clover and related species by high-performance liquid chromatography combined with ultraviolet and mass spectrometric detection [J]. J Chromatogr, A, 2003, 1016: 195 - 209

[6] 吴惠勤, 程 青, 张桂英, 等. 南雄银杏叶中银杏黄酮含量的 HPLC测定 [J]. 分析测试学报, 2001, 20(6): 53 - 54

[7] 张 立. RP - HPLC法测定大豆提取物中大豆苷元、染料木素、大豆苷、染料木苷的含量 [J]. 中草药, 2001, 32(2): 118 - 120

[8] M ITANI K, NAR MATSU S, KATAOKA H. Determination of daidzein and genistein in soybean foods by automated on-line in-tube solid-phase microextraction coupled to high-performance liquid chromatography [J]. J Chromatogr, A, 2003, 986: 169 - 177

[9] KLEJDUS B, MIKELOVÁ R, ADAM V, et al. Liquid chromatographic - mass spectrometric determination of genistin and daidzin in soybean food samples after accelerated solvent extraction with modified content of extraction cell [J]. Anal Chim Acta, 2004, 517: 1 - 11

[10] HUTABARAT L S, GREENFIELD H, MULHOLLAND M. Isoflavones and coumestrol in soybeans and soybean products from Australia and Indonesia [J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2001, 14: 43 - 58

[11] 毛峻琴, 宓鹤鸣, 姜子洋, 等. HPLC法测定淡豆豉中异黄酮的含量 [J]. 第二军医大学学报, 2000, 21(10): 955 - 957

欢迎订阅 欢迎投稿 欢迎刊登广告

《分析测试学报》

国内刊号：CN 44 - 1318/TH 国际标准刊号：ISSN 1004 - 4957
国际刊名代码 CODEN: FCXES 邮发代号：46 - 104
国外代号：BM 6013 广告经营许可证：粤 010029

《分析测试学报》是由中国分析测试协会、中国广州分析测试中心共同主办的全国性学术刊物，中文核心期刊。刊登电子显微学、质谱学、光谱学、色谱学、波谱学及电化学等方面的分析测试新理论、新方法、新技术的研究成果，介绍新仪器装置及在医药、化工、商检、食品检验等方面实用性强的实验技术。适合科研院所、大专院校、医疗、卫生、商检以及厂矿企业分析测试工作和管理人员阅读。

本刊一直列入中国科技期刊统计源，2004年继续入选为化学类核心期刊；1987年以来常年入选美国化学文摘千种表，入选俄罗斯《文摘杂志》；此外还被英国皇家化学学会《分析文摘》(AA)及《质谱公报》(MBS)系统摘录。

本刊为双月刊，国内外公开发行。大 16开，单价：12.00 元/册，全年 72 元。请在全国各地邮局订阅。未在邮局订到者可直接向本编辑部补订。补订办法：请从邮局汇款至广州市先烈中路 100 号《分析测试学报》编辑部，邮编：510070，写明订户单位、详细地址、收刊人姓名、邮编及补订份数(全年或某期)，电话：(020) 87684776 或 37656606，E - mail: fxcxb@china.com，http: //www. fxcxb.com。