

## RP-HPLC 法测定怀槐中染料木素和芒柄花黄素含量

黄文哲, 韦佳, 王峰涛, 周荣汉

(中国药科大学, 江苏南京 210038)

**RP-HPLC determination of genistein and formononetin in various parts of *Maackia amurensis*** HUANG Wen-zhe, WEI Jia, WANG Zheng-tao, ZHOU Rong-han (China Pharmaceutical University, Nanjing 210038, China), *J. Plant Resour. & Environ.* 2004, 13(2): 60-61

**Abstract:** A method for the determination of genistein and formononetin in *Maackia amurensis* Rupr. et Maxim. by HPLC was reported. The RP-HPLC methods were used as follows: Hypersil ODS C<sub>18</sub> column; The mobile phase is MeOH-1% acetic acid solution (gradient), genistein and formononetin were determined by UV detector at 261 nm and 249 nm respectively. The results showed that average recovery and precision (RSD) for genistein and formononetin were 100.4%, 101.8% and 2.65%, 2.16% respectively. The method is appropriate for determination of genistein and formononetin in *M. amurensis*.

**关键词:** 怀槐; 反相高效液相色谱法; 染料木素; 芒柄花黄素

**Key words:** *Maackia amurensis* Rupr. et Maxim.; RP-HPLC; genistein; formononetin

中图分类号: Q946.8 文献标识码: A 文章编号: 1004-0978(2004)02-0060-02

怀槐 (*Maackia amurensis* Rupr. et Maxim.) 广泛分布于中国东北三省及内蒙古等地, 尤以黑龙江省为多。怀槐作为民间药, 其茎、枝可治疗风湿性关节炎; 叶、枝皮可治疗肿瘤; 内皮可治疗深度伤口及久不愈合的溃疡。另外, 怀槐树皮在民间还作为祛风湿、消炎、镇痛、健胃、止血等药广泛应用, 疗效甚佳。从怀槐的根、枝、叶、果实和心材中分别分得异黄酮、生物碱、萜类化合物, 据报道, 其中的异黄酮类化合物表现出对心血管系统的复合作用和明显的抗肿瘤活性<sup>[1]</sup>。作者在对怀槐进行系统的化学成分研究过程中, 分离鉴定了 9 个异黄酮类化合物<sup>[2,3]</sup>, 并进行了抑制肿瘤细胞增殖作用研究<sup>[4]</sup>, 其中, 染料木素 (genistein) 对胃腺癌细胞 (BGC) 增殖有一定程度的抑制作用, 芒柄花黄素 (formononetin) 则对白血病细胞 (HL-60) 增殖有一定的抑制作用。染料木素和芒柄花黄素作为马鞍树属 (*Maackia* Rupr.) 植物中普遍存在的 2 个异黄酮类化合物, 其活性研究日益受到重视。采用 HPLC 法测定染料木素等异黄酮类化合物含量在大豆等其他植物中曾有文献报道<sup>[5]</sup>。为了尽早开发怀槐资源, 同时为其资源的综合利用提供科学依据, 本文采用 HPLC 法对怀槐不同部位的染料木素和芒柄花黄素 2 个有效成分进行了含量测定。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

1.1.1 仪器 惠普 HP-1100 型高效液相色谱仪、脱气机及紫外检测器; HS V4.0 色谱工作站 (杭州英谱科技开发有限公司); 50  $\mu$ L 微量进样器 (SGE)。

1.1.2 试剂 对照品染料木素、芒柄花黄素为本实验室自制, 纯度 98.3% 及 98.6%。色谱纯乙腈为 Fisher 公司生产, 色谱纯甲醇为准阴汉邦科技有限公司生产。

1.1.3 实验材料 怀槐 (*Maackia amurensis* Rupr. et Maxim.) 木部、枝、叶均取自黑龙江省汤原县, 经佳木斯大学王良信教授鉴定。

#### 1.2 实验方法

1.2.1 色谱及检测条件 色谱柱: Hypersil ODS 5  $\mu$ m, 250mm  $\times$  4.6mm HP; 预柱: Hypersil ODS HP; 柱温: 室温; 检测波长: 261 nm (genistein) 和 249 nm (formononetin)。

流动相条件如下: 测定木部和枝条样品的流动相条件为: 0 min,  $V(1\% \text{醋酸}) : V(\text{甲醇}) = 60 : 40$ ; 10 min,  $V(1\% \text{醋酸}) : V(\text{甲醇}) = 70 : 30$ ; 20 min,  $V(1\% \text{醋酸}) : V(\text{甲醇}) = 80 : 20$ ; 30 min,  $V(1\% \text{醋酸}) : V(\text{甲醇}) = 85 : 15$ 。流速为 0.5 mL  $\cdot$  min<sup>-1</sup>。

测定叶样品的流动相条件为: 0 min,  $V(1\% \text{醋酸}) : V(\text{乙腈}) = 75 : 25$ ; 20 min,  $V(1\% \text{醋酸}) : V(\text{乙腈}) = 70 : 30$ ; 25 min,  $V(1\% \text{醋酸}) : V(\text{乙腈}) = 65 : 35$ ; 30 min,  $V(1\% \text{醋酸}) : V(\text{乙腈}) = 75 : 25$ 。流速为 0.6 mL  $\cdot$  min<sup>-1</sup>。

1.2.2 测定波长选择 将染料木素和芒柄花黄素分别溶解于甲醇中, 在 200 ~ 400 nm 波长范围内进行紫外扫描, 结果显示染料木素和芒柄花黄素分别在 261 和 249 nm 有最大吸收, 故染料木素的测定波长为 261 nm, 芒柄花黄素的测定波长为 249 nm。

1.2.3 对照品溶液制备 取染料木素对照品 2 mg, 精密称定, 加甲醇溶解并定容至 10 mL, 作为对照品溶液。精密吸取该对照品溶液 0.25、0.50、1.00、2.50 和 5.00 mL, 加甲醇至 10 mL, 配成染料木素系列标准溶液。

收稿日期: 2003-04-01

作者简介: 黄文哲 (1968 - ), 女, 江苏苏州人, 在职博士生, 副研究员, 主要从事天然药物资源化学研究。

取芒柄花黄素对照品 1 mg, 精密称定, 加甲醇溶解并定容至 2 mL, 作为对照品溶液。精密吸取该对照品溶液 0.2、0.5、1.0、2.5 和 5.0 mL, 加甲醇至 10 mL, 配成芒柄花黄素系列标准溶液。

1.2.4 标准曲线制备 将对照品溶液分别进样, 进样量为 20  $\mu\text{L}$ , 以浓度对峰面积积分值进行线性回归。染料木素回归方程为:  $y = 11\,486x - 30\,170$ ,  $r = 0.999\,9$ , 在  $5.19 \sim 207.60\,\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  浓度范围内线性关系良好。芒柄花黄素回归方程为:  $y = 16\,711x - 104\,093$ ,  $r = 0.999\,5$ , 在  $9.11 \sim 227.75\,\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  浓度范围内线性关系良好。

1.2.5 样品溶液制备 取怀槐木部、叶各 75 mg, 枝 100 mg, 精密称定, 加甲醇 20 mL, 超声提取 30 min, 放冷至室温, 过滤, 并用甲醇 15 mL 洗涤残渣及滤器, 合并洗液及滤液, 水浴蒸干, 加 70% 甲醇使残渣溶解并分别定容至 10 mL, 即得怀槐木部、叶和枝样品溶液。

1.2.6 精密度实验 取相同的叶样品溶液, 连续进样 7 次, 每次 20  $\mu\text{L}$ 。对染料木素和芒柄花黄素的含量进行测定, 计算其 RSD 分别为 2.89% 和 1.97%, 精密度较好。

1.2.7 重现性实验 精称木部样品按样品溶液制备项下操作, 同法制备 5 份。测定峰面积积分值, 计算含量及 RSD。结果显示 RSD 为 1.88%, 重现性较好。

1.2.8 回收率测定 采用加样回收法, 取已知含量的木部样品约 50 mg, 加入一定量的染料木素对照品, 按样品溶液制备项下操作, 并测定其中染料木素的含量, 计算回收率为 100.4%, RSD 为 2.65%。另取已知含量的叶样品约 70 mg, 加入一定量的芒柄花黄素对照品, 按样品溶液制备项下操作, 并测定其中芒柄花黄素的含量, 计算回收率为 101.8%, RSD 为 2.16%。

1.2.9 怀槐不同部位样品的含量测定 利用 HPLC 法对怀槐木部、叶和枝的样品溶液中染料木素和芒柄花黄素含量进行测定, 计算峰面积积分值, 用外标一点法计算含量。

## 2 结果与分析

怀槐不同部位中染料木素和芒柄花黄素的含量见表 1。

表 1 怀槐不同部位中染料木素和芒柄花黄素的含量  
Table 1 Contents of genistein and formononetin in different parts of *Maackia amurensis* Rupr. et Maxim.

部位 Part	样品 质量/mg Weight of sample	染料木素含量/% Content of genistein		芒柄花黄素含量/% Content of formononetin	
		含量 Content	均值 Average	含量 Content	均值 Average
Wood	75.00	0.132 6	0.133 6	0.209 1	0.214 1
	70.00	0.134 0		0.216 2	
	73.60	0.134 1		0.216 9	
Leaf	74.89	0.162 1	0.162 8	0.109 2	0.110 2
	75.97	0.164 1		0.112 7	
	75.00	0.162 3		0.108 7	
Branch	115.0	0.071 1	0.070 0	0.150 6	0.149 4
	122.5	0.068 7		0.146 3	
	116.3	0.070 1		0.151 3	

怀槐的主要成分为异黄酮类化合物, 异黄酮在紫外区有明显的吸收, 故采用紫外检测器。紫外扫描得出染料木素的吸收最大吸收波长为 261 nm, 芒柄花黄素的最大吸收波长为 249 nm。

从含量测定结果看, 染料木素的含量以叶中为最高, 达到 0.16%, 枝中含量最低, 只有 0.06%, 相差近 3 倍; 芒柄花黄素含量以木部为最高, 达到 0.21%, 而在叶子中为最低, 仅为 0.11%; 怀槐的树叶中 2 种成分的含量分别可达到 0.11% 和 0.16%, 因此, 加强对怀槐树叶的综合开发利用具有重要意义, 与其木部相比, 叶片的资源再生周期明显缩短。

### 参考文献:

- [1] 王良信. 怀槐化学成分及其生物活性[J]. 国外医药-植物药分册, 1996, 11(1): 19.
- [2] 黄文哲, 段金旻, 李正亮. 怀槐的化学成分研究 I[J]. 中国药科大学学报, 2000, 31(1): 8-10.
- [3] 黄文哲, 段金旻, 李正亮. 怀槐的化学成分研究 II[J]. 中国中药杂志, 2001, 26(6): 403-404.
- [4] 黄文哲, 赵小辰, 王峥涛, 等. 异黄酮类化合物抗肿瘤细胞增殖作用[J]. 现代中药研究与实践, 2003, 17(1): 50-51.
- [5] 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): 118-119.