

高效液相色谱-二极管阵列检测法测定 白首乌中的4种苯乙酮类成分

孙印石¹, 刘政波¹, 王建华^{1*}, 王 迎², 周红英¹,
张文立¹, 王 俊¹, 乔 贵¹

(1. 山东农业大学农学院, 山东 泰安 271018; 2. 泰山林业科学研究院, 山东 泰安 271000)

摘要 :建立了白首乌中4种苯乙酮类化合物(I :4-羟基苯乙酮, II :2,5-二羟基苯乙酮, III :白首乌二苯酮, IV :2,4-二羟基苯乙酮)的高效液相色谱检测方法。采用 Symmetry-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm)分离,流动相为甲醇-水(体积比为26:74),流速1.0 mL/min;采用二极管阵列检测器检测,化合物 I、III、IV的检测波长为280 nm,化合物 II的检测波长为224 nm,测定温度为30 ℃。4种苯乙酮类化合物 I ~ IV的线性范围分别为0.080 ~ 0.560 μg, 0.080 ~ 0.560 μg, 0.100 ~ 0.700 μg 和 0.092 ~ 0.644 μg ($r = 0.9996 \sim 0.9999$);平均加样回收率($n = 3$)为98.0% ~ 104.0%,相对标准偏差为0.8% ~ 2.6%。该方法简便快速、结果准确、重现性好,可作为白首乌药材质量控制的一个有效方法。

关键词 :高效液相色谱;二极管阵列检测;苯乙酮类化合物;白首乌

中图分类号 :O658 文献标识码 :A 文章编号 :1000-8713(2009)01-0114-03 栏目类别 :技术与应用

Determination of four acetophenones in *Radix Cynanchi bungei* by high performance liquid chromatography-photodiode array detection

SUN Yinshi¹, LIU Zhengbo¹, WANG Jianhua^{1*}, WANG Ying², ZHOU Hongying¹,
ZHANG Wenli¹, WANG Jun¹, QIAO Gui¹

(1. College of Agronomy, Shandong Agricultural University, Taian 271018, China;

2. Taishan Academy of Forestry, Taian 271000, China)

Abstract : A high performance liquid chromatographic (HPLC) method was developed for the determination of four acetophenones, namely 4-hydroxyacetophenone (I), 2,5-dihydroxyacetophenone (II), baishouwubenzophenone (III) and 2,4-dihydroxyacetophenone (IV), in *Radix Cynanchi bungei*. The HPLC with photodiode array (PDA) detection was carried out on a Symmetry-C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) column with CH₃OH-H₂O (26:74, v/v) as the mobile phase at the flow rate of 1.0 mL/min and 30 ℃. The compounds I, III, IV were monitored at 280 nm, and the compound II was at 224 nm. Four acetophenones (I - IV) had good linearities ($r = 0.9996 - 0.9999$) at the ranges of 0.080 - 0.560 μg, 0.080 - 0.560 μg, 0.100 - 0.700 μg and 0.092 - 0.644 μg, respectively. The average recoveries were from 98.0% to 104.0% with relative standard deviations (RSD) ranging from 0.8% to 2.6%. The method is of quick, simple and accurate. The method can be used for the quality control of this product.

Key words : high performance liquid chromatography (HPLC); photodiode array detection; acetophenones; *Radix Cynanchi bungei*

白首乌为萝藦科鹅绒藤属植物白首乌(*Radix Cynanchi bungei*)的块根^[1]。主产于我国泰山,与紫草、黄精、四叶参并称为“泰山四大名药”,具有抗

肿瘤、抗氧化、降血脂和免疫调节等作用^[2-5]。李军和林爱群等^[6,7]的研究表明,白首乌的主要成分为戟叶牛皮消苷和苯乙酮类化合物。白首乌是泰山特

* 通讯联系人:王建华,教授,博士生导师。E-mail:sdauwangjh@yahoo.cn.

基金项目:国家科技基础条件平台项目(2005DKA21000)、泰安市中药现代化科技专项(5012100999)、泰安市科技发展计划[2007]10和山东农业大学青年科技创新基金项目(23489)。

收稿日期:2008-05-14

产药材,具有良好的开发前景,然而对白首乌药效成分质量评价方面的研究不够深入,尤其是化学成分定量分析方面还是一个空白。高效液相色谱法检测中多采用单一波长的紫外检测器^[8,9],这使得同时测定的化合物种类和灵敏度受到了一定的限制。本文采用高效液相色谱-二极管阵列检测法(HPLC-PDA)对白首乌中 4 种苯乙酮类成分进行测定,为建立白首乌的质量评价体系提供了依据。

1 实验部分

1.1 主要仪器与试剂

Waters 600E 高效液相色谱仪(美国 Waters 公司),包括 600E 四元梯度泵,2996 二极管阵列检测器,中文 Empower 色谱管理系统,四通道脱气机。

对照品 4-羟基苯乙酮(I)、2,5-二羟基苯乙酮(II)、白首乌二苯酮(III)和 2,4-二羟基苯乙酮(IV)皆为本文作者从白首乌中分离纯化得到,采用核磁共振(¹H NMR 和 ¹³C NMR)、质谱(MS)和文献^[6,7]确证其结构,峰面积归一化法计算其纯度大于 98%,符合定量要求。甲醇(分析纯,天津永大试剂厂),水为二次蒸馏水。

1.2 色谱条件

色谱柱:Symmetry-C₁₈柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相甲醇-水(体积比为 26:74),流速 1.0 mL/min,检测温度为 30 °C,化合物 I、III、IV 的检测波长为 280 nm,化合物 II 的检测波长为 224 nm,进样量 20 μL。

1.3 对照品溶液的制备

精确称取对照品 I 2.0 mg, II 2.0 mg, III 2.5 mg 和 IV 2.3 mg 置于 10 mL 量瓶中,用甲醇定容,摇匀,制成混合对照品溶液,保存于 4 °C 冰箱中。

1.4 样品溶液的制备

白首乌样品分别采自莱芜苗山栽培种、泰山野生种和泰安栽培种。样品经 FW 177 型中草药粉碎机粉碎,过 40 目筛。精确称取干燥的白首乌粉末 5 g,加入 100 mL 甲醇,超声波提取 30 min,过滤提取上清液。将残渣重复提取 3 次,合并上清液,减压浓缩并用甲醇定容于适当体积(测定化合物 I 和 III 时定容于 100 mL,测定 II 时定容于 10 mL,测定 IV 时定容于 50 mL)的量瓶中,摇匀,分别经 0.45 μm 微孔滤膜过滤后供 HPLC 检测。

2 结果与讨论

2.1 样品前处理方法的选择

采用超声提取法对比了使用甲醇和乙醇的提取效果,结果表明甲醇的提取率明显高于乙醇,因此选

用甲醇为提取剂。另外考察了不同固液比(即白首乌粉末质量(g)与提取剂甲醇的体积(mL)之比)分别为 1:10, 1:15, 1:20 和 1:25 对 4 种物质提取率的影响,结果表明在固液比为 1:20 时,提取率最高。

2.2 检测波长的选择

采用 PDA 检测器在 210 ~ 400 nm 范围内比较各波长下各组分吸收光谱的差异,可看出 4 种化合物的最大吸收波长有很大差异,化合物 I、III 和 IV 在 280 nm 左右都有很大吸收,化合物 II 在 280 nm 几乎没有吸收,而在 224 nm 下吸收很强。另外,虽然 4 种化合物在 210 nm 下都有很强吸收,但在此波长处流动相有较强的末端吸收,基线不够平稳,所以综合考虑化合物 I、III、IV 选择为 280 nm,化合物 II 选择为 224 nm。在此条件下可在消除背景干扰的同时保证检测的灵敏度,色谱图见图 1。

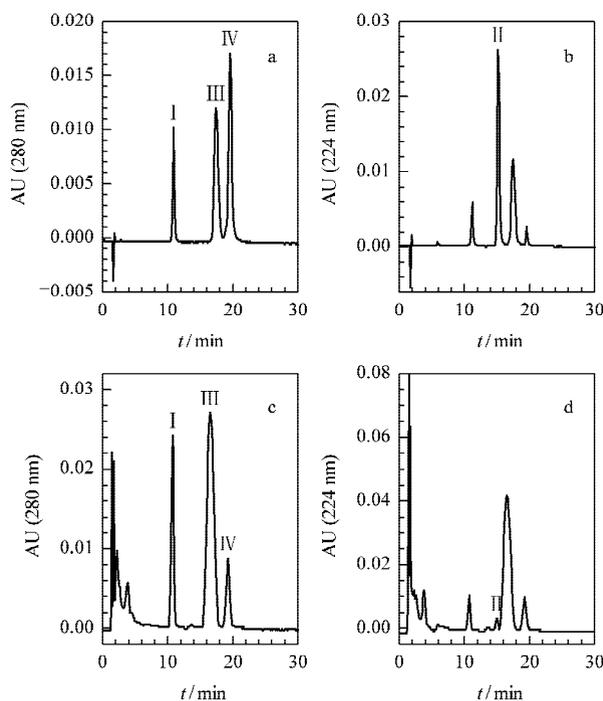


图 1 (a, b) 对照品和 (c, d) 样品的色谱图
Fig. 1 Chromatograms of (a, b) a mixture of four acetophenone standards and (c, d) a crude sample

2.3 标准曲线的制作和方法的检出限

分别精密吸取 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2, 1.4 mL 的混合对照品溶液置于 10 mL 量瓶中,加甲醇定容。分别精密吸取 20 μL 上述溶液进样,按“1.2”节中色谱条件,以峰面积为纵坐标 Y,对照品浓度为横坐标 X(g/L),进行线性回归。化合物 I、II、III、IV 的线性方程分别为 $Y = 100\,359X + 8\,587$ ($r = 0.9997$), $Y = 65\,247X - 8\,351$ ($r = 0.9996$), $Y = 128\,795X + 571.7$ ($r = 0.9999$), $Y = 106\,821X - 12\,519$ ($r = 0.9998$), 其线性范围分别为 0.080 ~

0.560 μg ,0.080 ~ 0.560 μg ,0.100 ~ 0.700 μg 和 0.092 ~ 0.644 μg。以 3 倍信噪比(S/N)确定最低检出限,化合物 I ,II ,III ,IV在白首乌中的检出限依次为 1.6 ,0.1 ,0.5 和 1.6 mg/kg。

2.4 精密度试验

取 4-羟基苯乙酮(0.020 g/L)、2,5-二羟基苯乙酮(0.020 g/L)、白首乌二苯酮(0.025 g/L)和 2,4-二羟基苯乙酮(0.023 g/L)的混合对照品溶液重复进样 6 次,测定峰面积。上述 4 种苯乙酮化合物峰面积的相对标准偏差(RSD)依次为 0.4% ,0.7% ,1.3% ,1.1% ,表明仪器的精密度较好。

2.5 重复性试验

称取同一批泰安栽培种白首乌样品 6 份,按“ 1.4 ”节操作,平行制备 6 份试液后进样。4 种苯乙酮类化合物(I ~ IV)平均含量分别为 81.1 ,7.0 ,447.5 ,69.3 μg/g,RSD 分别为 1.4% ,0.8% ,2.4% ,1.7% ,表明方法的重复性良好。

2.6 稳定性试验

取同一份样品溶液(泰安栽培种),分别放置 0 ,2 ,4 ,6 ,8 h 后进样。在 8 h 内 4 种苯乙酮类化合物的峰面积无明显变化,RSD 分别为 0.1% ,0.4% ,0.2% ,0.3% ,表明供试品溶液稳定性良好。

2.7 加样回收率试验

取已知含量的白首乌样品(泰安栽培种),分别添加一定量的对照品溶液,按“ 1.4 ”节方法进行样品处理后测定加样回收率,结果见表 1。

表 1 4 种苯乙酮化合物的回收率(n = 3)
Table 1 Recoveries of 4 acetophenones (n = 3)

Component	Background/ mg	Added/ mg	Recovery/ %	RSD/ %
I	0.400	0.200	104.0	0.8
	0.400	0.400	102.3	0.9
	0.400	0.600	103.7	1.5
II	0.035	0.020	100.0	1.6
	0.035	0.030	103.3	0.9
	0.035	0.040	102.5	1.1
III	2.240	1.000	99.5	2.6
	2.240	2.000	98.8	1.5
	2.240	3.000	103.6	0.8
IV	0.345	0.200	98.0	2.0
	0.345	0.300	101.7	2.3
	0.345	0.400	101.8	1.5

I : 4-hydroxyacetophenone ; II : 2,5-dihydroxyacetophenone ; III : baishouwubenzophenone ; IV : 2,4-dihydroxyacetophenone.

2.8 样品测定

采用上述 HPLC 方法对莱芜苗山栽培种、泰山野生种和泰安栽培种(采自山东农业大学中药植物园)3 个不同产地的白首乌样品进行含量测定,结果见表 2。其中一个样品的液相色谱图见图 1-c 和图 1-d。

表 2 3 批白首乌样品中 4 种苯乙酮化合物的含量测定结果(n = 3)
Table 2 Determination results of 4 acetophenones in three Radix Cynanchi bungei samples (n = 3) μg/g

Origin	Species	I	II	III	IV
Laiwu , Shandong	cultivated	81.4	8.2	239.9	65.3
Taishan , Shandong	wild	90.7	9.6	507.3	74.6
Taian , Shandong	cultivated	80.8	8.1	447.0	67.0

For components I - IV , see Table 1.

3 结论

本文所建立的白首乌中 4 种苯乙酮同时测定的 HPLC 方法,可在 20 min 内将 4 种目标物完全分离。方法简单、快速,精确度和灵敏度高,能够满足实际样品检测的需要。

参考文献 :

[1] Xiao P G. Records of Chinese traditional medicine (New Edition). Beijing : Chemical Industry Press (肖培根. 新编中药志. 北京 : 化学工业出版社), 2002 : 525

[2] Xu L C , Zhang H , Xu C S. Study Journal of Traditional Chinese Medicine (徐凌川, 张华, 许昌盛. 中医药学刊), 2003 , 21(11) : 1 893

[3] Zhang R S , Ye Y P , Liu X L. Chinese Traditional and Herbal Drugs (张如松, 叶益萍, 刘雪莉. 中草药), 2000 , 31(8) : 599

[4] Song J M , Ding X L. Food Science (宋俊梅, 丁霄霖. 食品科学), 1997 , 18(9) : 61

[5] Gao L J , Wang J H , Cui J H , et al. China Journal of Chinese Materia Medica (高丽君, 王建华, 崔建华, 等. 中国中药杂志), 2005 , 30(17) : 352

[6] Li J , Kadota S , Kawata Y , et al. Chemical Pharmaceutical Bulletin , 1992 , 40(12) : 3 133

[7] Lin A Q. [Master dissertation]. Jinan : Shandong University of Traditional Chinese Medicine (林爱群. [硕士学位论文]. 济南 : 山东中医药大学), 2005

[8] Sheng L S , Wang Y , Ma R L , et al. Chinese Journal of Chromatography (盛龙生, 王颖, 马仁玲, 等. 色谱), 2003 , 21(6) : 549

[9] Wang Z L , Wang H , Chen S Z. Chinese Journal of Chromatography (王占良, 王弘, 陈世忠. 色谱), 2003 , 24(4) : 325