

## HPLC-MS 法测定波棱瓜籽中四种黄酮类化合物

王洪伦, 赵先恩, 尤进茂, 索有瑞\*

(中国科学院西北高原生物研究所, 西宁 810001)

**摘要:**利用高效液相色谱-质谱法分析测定了药材波棱瓜籽中芦丁、槲皮素、山奈酚、异鼠李素4种黄酮类化合物的, 色谱条件为 Eclipse XDB-C8 色谱柱(4.6 × 150 mm, 5 μm), 大气压化学电离源(APCI), 柱温 30℃, 检测波长为 258 nm。结果表明4种黄酮类化合物在 2.0 μmol/L ~ 1.0 mmol/L 浓度范围内具有良好的线性关系, 相关系数为 0.9998 ~ 0.999, 检测限为 0.77 ~ 15.50 pmol。方法为波棱瓜籽相关药物开发提供了依据。

**关键词:**波棱瓜籽; 黄酮; 超声提取; 微波提取; 高效液相色谱-质谱

波棱瓜籽(Herpetospermum seed)为葫芦科波棱瓜属波棱瓜(Herpetospermum pedunculatum (Ser.) Baill.)的干燥成熟种子, 为藏医常用药, 产于中国西藏、四川、云南等地及印度、尼泊尔等国<sup>[1]</sup>。藏医认为其能泻肝火、胆热、解毒、助消化, 用于治疗赤巴病、肝病及消化不良等<sup>[2]</sup>。波棱瓜籽是藏药中治疗肝病的首选药物之一, 在用于治疗肝病的藏药处方中, 绝大多数有波棱瓜配伍<sup>[3]</sup>。

现代研究证明黄酮类化合物具有抗氧化、抗炎、抗肿瘤、抗衰老、抗自由基、抗病毒、降低脂质过氧化反应、预防心血管疾病等作用<sup>[4-6]</sup>。为更好的研究及利用葫芦巴籽中的黄酮成分, 本文利用微波回流萃取法和超声萃取法提取波棱瓜籽中的黄酮化合物, 经高效液相色谱-二极管阵列检测器检测-大气压化学电离质谱(HPLC-DAD-APCI/MS)法进行分离测定四种黄酮类化合物, 从而为波棱瓜黄酮成分的开发利用提供科学依据。

### 1 实验部分

#### 1.1 仪器、材料与试剂

Agilent 1100 型高效液相色谱-质谱联用仪(Agilent 公司), 配备四元梯度泵, 在线真空脱气机, DAD 检测器, 100 位自动进样器, 大气压化学电离源(APCI)。KQ-200B 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司), XH-100A 型微波催化合

成/萃取仪(北京祥鹏科技发展有限公司)。

波棱瓜采自西藏自治区的林芝地区, 样品采集后, 拨开瓜壳, 取出波棱瓜籽晾干, 粉碎至 250 μm 左右备用。芦丁、槲皮素、山奈酚、异鼠李素购自中国药品生物制品鉴定所。甲醇、HCl 等均为分析纯。

#### 1.2 标准溶液配制

准确称取芦丁 0.0611 g, 槲皮素 0.0302 g, 山奈酚 0.0286 g, 异鼠李素 0.0316 g 分别用 70% 甲醇溶液溶于 10 mL 容量瓶中, 用 70% 甲醇溶液定容至刻度并摇匀, 即可得到浓度为 0.01 mol/L 的标准品溶液, 4℃ 冰箱保存备用。

#### 1.3 标准曲线制备及定量方法

将标准品母液准确稀释, 制得浓度为  $1 \times 10^{-3}$  ~  $2.0 \times 10^{-5}$  mol/L 的系列供试溶液, 在相同实验条件下, 依次进样 10 μL, 测得每个标品在各自浓度下的色谱峰面积, 以峰面积对进样量进行线性回归, 得到四个标品对应的线性方程, 以此线性方程对供试品进行定量分析。

#### 1.4 色谱质谱条件

色谱柱: Eclipse XDB-C8 (4.6 × 150 mm, 5 μm, Agilent 公司)。流动相 A: 5% 乙腈(含 0.1% 甲酸); B: 乙腈。梯度洗脱程序: 0 min = 100% A, 10 - 21 min = 75% A, 22 min = 0% A, 30 min = 0% A。流速 1.0 mL/min, 进样量 10 μL。

基金项目: 中科院“西部之光”联合学者项目和中科院院长基金项目资助

作者简介: 王洪伦(1979-), 男, 副研究员, 博士; E-mail: ynsuo@nwipb.cas.cn

柱温 30℃。检测波长为:258 nm。

质谱条件:大气压化学电离源(APCI),正离子模式,喷雾压力 0.41 MPa,干燥气流量为 5 L/min,干燥气温度 350℃,气化温度 450℃,毛细管电压 3500 V,电晕电流 4000 nA (Pos)。

### 1.5 供试品溶液准备

超声波提取:称取 5.000 g 粉碎的波棱瓜籽,加入到 100 mL 容量瓶中,加入 60 mL 甲醇,浸泡提取 24 h,期间间隔 3 次超声震荡提取(100 W, 2 h × 3 次),过滤后定容至 100 mL 待测。

微波回流提取:称取 5.000 g 粉碎的波棱瓜籽,放入 100 mL 的三口烧瓶中,加入 60 mL 甲醇,放入磁子,连接好冷凝回流装置,设定萃取条件为功率 500 W,温度 68℃,萃取 20 min,过滤,定容到 100 mL 待测。

### 1.6 黄酮提取液水解

从文献报道和理论上判断,上述方法提取的黄酮化合物中,一部分是黄酮和一些糖的结合物,也称为苷,一部分是不带糖的黄酮骨架结构,也称苷元。因此,有必要水解,使糖与苷元分离,水解方法如下:取上述提取溶液 1600 μL 置于 3 mL 的安培瓶中,加入 400 μL 20% 的盐酸溶液,封口后在 75℃ 水浴中水解 90 min,直接进样分析。

## 2 结果与讨论

### 2.1 DAD 检测波长选择

经 HPLC-DAD 检测器在线光谱扫描,发现 4 种黄酮的紫外吸收光谱的最大吸收波长分别为:芦丁

204 nm, 258 nm, 355 nm; 槲皮素 202 nm, 257 nm, 373 nm; 山奈酚 196 nm, 265 nm(吸收值约等于 258 nm 处), 368 nm; 异鼠李素 202 nm, 254 nm(吸收值约等于 258 nm 处), 373 nm。也就是存在三个区域:200 nm, 258 nm, 370 nm, 但 200 nm 左右溶剂紫外吸收较强,干扰严重;258 nm 处紫外吸收强度较 370 nm 处略强,并且四种黄酮在 258 nm 处吸收都等于或接近该区域的最大吸收,所以最终选择 258 nm 作为 HPLC 定量分析的 DAD 检测波长。

### 2.2 色谱分离条件优化

在流动相中添加 0.1% HCOOH,既改善了色谱分离度和色谱峰形,又给柱后质谱鉴定的电离带来了氢质子,提高了质谱检测的灵敏度。通过调整梯度洗脱程序,使得四种黄酮获得较好的分离度,并且不受实际样品杂质的干扰。

### 2.3 HPLC 色谱分离及质谱鉴定

按前述优化的实验条件,4 种黄酮化合物标品获得完全分离,色谱图见图 1。各组分经液相色谱分离 DAD 检测后,直接进入柱后质谱进行定性鉴定,各组分 MS 数据见表 1,质谱图见图 2。芦丁的一级质谱分子离子峰  $[M+H]^+$  应为  $m/z$  609.5,失去一分子戊糖的苷元的正离子  $m/z$  301.7,由于糖苷键作用力较弱,在 APCI 离子化时容易断裂,导致了离子峰中较多存在的是苷元的正离子形式,所以仪器给出的质谱图就把  $m/z$  301.7 作为了分子离子峰。

表 1 黄酮化合物的线性回归方程、相关系数、检出限、一级质谱

黄酮	$Y = AX + B$ (Y: 峰面积; X: 进样量)	相关系数 R	检出限 LOD /pmol	MS [M+H] <sup>+</sup>
芦丁	$Y = 0.26X + 11.31$	0.9999	0.77	609.5
槲皮素	$Y = 0.17X - 7.76$	0.9998	0.92	301.7
山奈酚	$Y = 0.10X - 0.02$	0.9999	15.50	285.5
异鼠李素	$Y = 0.17X - 3.47$	0.9998	9.70	315.5

### 2.4 重现性

在相同实验条件下,对同一份黄酮混合标品平行六次进样分析,计算保留时间和峰面积重现性,保留时间 RSD 小于 1.35%,峰面积 RSD 小于 4.0%,该实验条件能够满足 HPLC 定量分析的要求。

### 2.5 线性回归与检出限

进样浓度在 2.0 μmol/L ~ 1.0 mmol/L 范围内(进样 10 μL),依据峰面积和实际进样量进行线性回归,所得各个黄酮化合物的线性回归方程、相关系数和检出限见表 1。各黄酮化合物的线性相关系数在 0.9998 ~ 0.9999 之间,检测限在 0.77 ~ 15.50 pmol 之间 (S/N = 3:1)。

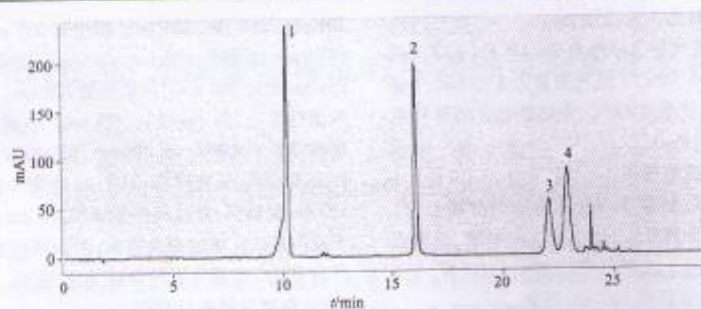


图1 样品黄酮化合物的HPLC-DAD色谱分离图  
1-芦丁;2-槲皮素;3-山奈酚;4-异鼠李素

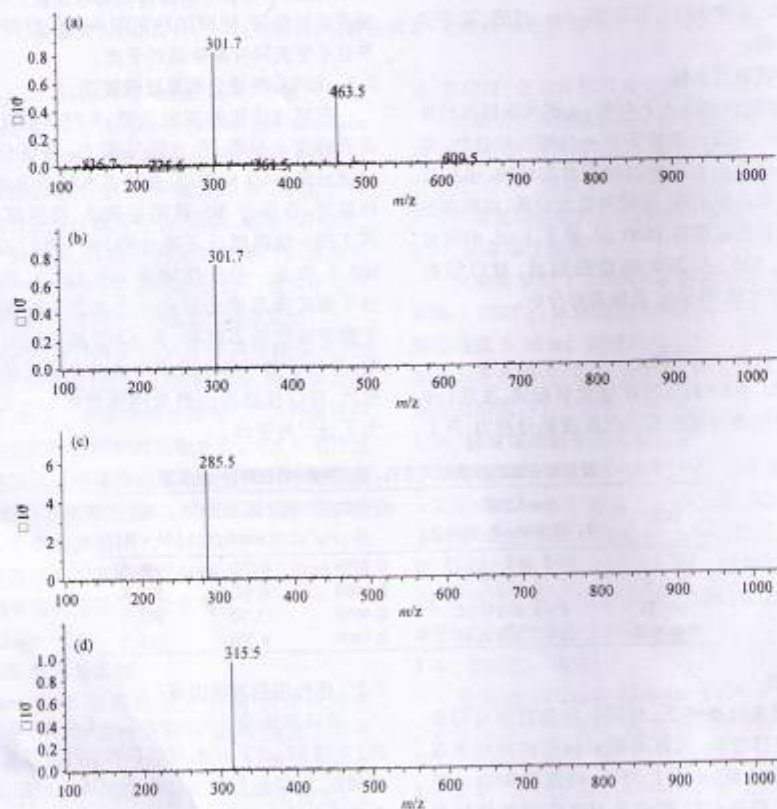


图2 四种黄酮化合物的质谱图(APCI-MS)  
1-芦丁;2-槲皮素;3-山奈酚;4-异鼠李素

### 2.6 波棱瓜籽中黄酮的测定

按前述的实验方法,经 HPLC-DAD 检测对波棱瓜籽超声提取和微波回流提取的黄酮进行测定,实验结果见表 2,微波提取并水解的波棱瓜籽黄酮

化合物色谱图见图 3。结果表明,微波提取的含量高于超声提取,说明微波提取具有更高的提取效率,特别是对于山奈酚与异鼠李素的提取,微波提取的效果更佳。

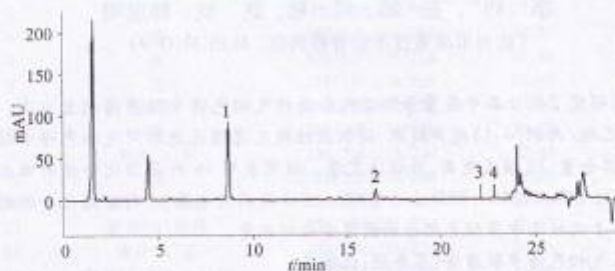


图3 波棱瓜籽中黄酮化合物的 HPLC-DAD 色谱分离图

1-芦丁;2-槲皮素;3-山奈酚;4-异鼠李素

表2 波棱瓜籽中四种黄酮化合物的含量

黄酮	超声提取水解 w/( $\mu\text{g/g}$ )	微波提取水解 w/( $\mu\text{g/g}$ )
芦丁	3422.44	3795.03
槲皮素	440.52	454.14
山奈酚	-	39.99
异鼠李素	-	55.82

#### 参考文献

[1] 中国科学院西北高原生物研究所. 藏药志. 青海: 青海人民出版社, 1991

[2] 青海省药品检验所. 中国藏药. 上海: 上海科技出版社, 1996  
[3] 蒂玛尔, 丹增彭措. 晶珠本草. 上海: 上海科技出版社, 1986  
[4] 郭菁菁, 杨秀芬. 中国药理学通报, 2008, 24(1):5  
[5] Schindler R, Mentlein R. Jnutz, 2006, 136(6):1477  
[6] 刘江, 董智, 张再超, 等. 华东师范大学学报: 自然科学版, 2008, 6(11):128  
[7] 吕庆章, 李小娟, 牛静, 等. 河南师范大学学报: 自然科学版, 2009, 37(3):81  
[8] Liu S. Toxicol Vitro, 2009, 4:7