

超声提取 RP-HPLC 法测定柴达木枸杞叶中的总黄酮醇苷

刘增根^{1,2}, 陈晨^{1,2}, 党军^{1,2}, 江磊^{1,2}, 邵赞^{1*}, 梅丽娟¹, 陶燕铎¹
(1. 中国科学院西北高原生物研究所, 西宁 810001; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要:建立了超声提取同时测定柴达木枸杞叶中总黄酮醇苷(槲皮素、山柰素、异鼠李素)的反相高效液相色谱法。采用正交试验优化了超声提取柴达木枸杞叶中总黄酮醇苷的最佳工艺条件。色谱柱为 PLATISIL™-ODS(250×4.6 mm, 5 μm); 流动相为甲醇-0.3% H₃PO₄ 溶液(52:48); 流速为 1.0 mL/min; 检测波长为 360 nm。在 50℃ 时, 以 90% 乙醇为提取液, 料液比 1 g:6 mL, 超声 20 min, 重复处理 2 次。槲皮素的线性范围为 0.1~1.2 μg(r=0.9999), 山柰素的线性范围为 0.1~1.2 μg(r=0.9999), 异鼠李素的线性范围为 0.067~0.8 μg(r=0.9999), 平均加样回收率分别为 100.4%、100.2% 和 99.5%。本方法适合柴达木枸杞叶中总黄酮醇苷的含量测定, 并为柴达木枸杞叶中化学成分的研究提供了一定的科学依据。

关键词:柴达木枸杞叶; 高效液相色谱; 总黄酮醇苷; 超声提取; 含量测定

柴达木枸杞(*Lycium barbarum* L.) 简称柴杞, 又名青海枸杞, 其叶为茄科(Solanaceae)植物枸杞的叶, 俗称天精草, 是一味重要的中药材, 具有补虚益精、清热止渴、养肝明目之功效, 主治虚劳发热、目赤昏痛、热毒疮肿等疾病^[1-3]。

青海柴达木盆地以其独特的自然地理优势, 所产枸杞叶品质较好, 是柴达木枸杞的主要产地。枸杞叶中富含黄酮、甜菜碱以及多种氨基酸和微量元素等, 而芦丁、槲皮素等黄酮类化合物是枸杞叶中含量较高的主要活性物质^[4], 具有保护心脑血管, 利胆保肝, 抗癌等多种生物活性^[5,6]。本文采用超声提取, 利用 HPLC 对枸杞叶中的黄酮醇苷进行含量测定, 方法简便、快速、准确, 为枸杞叶中总黄酮醇苷的含量测定提供一定的科学依据。

1 实验部分

1.1 柴达木枸杞叶原料

枸杞叶于 2010 年 6 月采自青海省海西蒙古族藏族自治州柴达木地区, 由中国科学院西北高原生物研究所梅丽娟高级工程师鉴定为柴达木枸杞的叶; 将枸杞叶室内阴干, 粉碎, 过 0.38 mm 筛备用。

1.2 仪器与试剂

Agilent 1200LC 高效液相色谱仪(安捷伦科技有限公司); SK5200HP 超声波清洗器(上海科导超声仪器有限公司); UPT-II-10 优普超纯水机(成都超纯科技有限公司); N-1001 旋转蒸发器(上海爱朗仪器有限公司); HH-6 数显恒温水浴锅(国华电器有限公司); AG204 电子分析天平(梅特勒公司)。

槲皮素(批号:090426, 上海融禾医药科技有限公司)、山柰素(批号:090324, 上海融禾医药科技有限公司)、异鼠李素(批号:090311, 上海融禾医药科技有限公司)对照品; 甲醇(色谱纯, 山东禹王试剂公司); 蒸馏水; 超纯水; H₃PO₄(优级纯); HCl(分析纯), 其余试剂均为分析纯。

1.3 实验方法

1.3.1 色谱条件及系统适应性试验 色谱柱: PLATISIL™-ODS(250×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-0.3% H₃PO₄ 溶液(52:48); 流速: 1.0 mL/min; 柱温: 30℃; 检测波长: 360 nm; 进样 5 μL; 运行时间 30 min; 理论塔板数按槲皮素峰计算应不低

基金项目: 科技部国家科技支撑计划(2007BAI45B00)和中国科学院科技支撑项目(092B161211)资助
作者简介: 刘增根(1987-), 男, 硕士研究生; E-mail: lzg2005sk@126.com

于2500。

1.3.2 样品溶液制备 称取已过的干燥枸杞叶粉5 g左右,按料液比加入乙醇溶液,浸泡60 min,然后超声提取,趁热过滤,真空减压浓缩,干燥,即得枸杞叶提取物。取枸杞叶提取物适量,精密称定,加甲醇-25% HCl溶液(1:4)的混合溶液,超声溶解置水浴中加热回流90 min,迅速冷却至室温,转移至容量瓶中,用甲醇稀释至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,即为样品溶液。

1.3.3 标准曲线 分别取槲皮素、山柰素、异鼠李素对照品适量,精密称定,加甲醇制成每1 mL分别含100 μg、100 μg、67 μg的混合液,作为对照品溶

液。取对照品混合液,分别进样1.0~12.0 μL, HPLC检测。分别以标准品进样量 $X(\mu\text{g})$ 为横坐标,峰面积 $Y(\text{mAU})$ 为纵坐标,绘制标准曲线,得槲皮素、山柰素、异鼠李素的回归方程分别为: $Y = 3613.2X + 1.3184, r = 0.9999$; $Y = 4141.1X - 3.0478, r = 0.9999$; $Y = 3315.9X - 4.7838, r = 0.9999$ 。结果表明上述3种成分进样量分别在0.1~1.2 μg、0.1~1.2 μg和0.067~0.8 μg范围内与峰面积成良好的线性关系。

1.3.4 色谱行为 取槲皮素、山柰素和异鼠李素对照品混合溶液及枸杞叶提取物样品溶液,分别在上述色谱条件下进行测定,测定结果见图1。

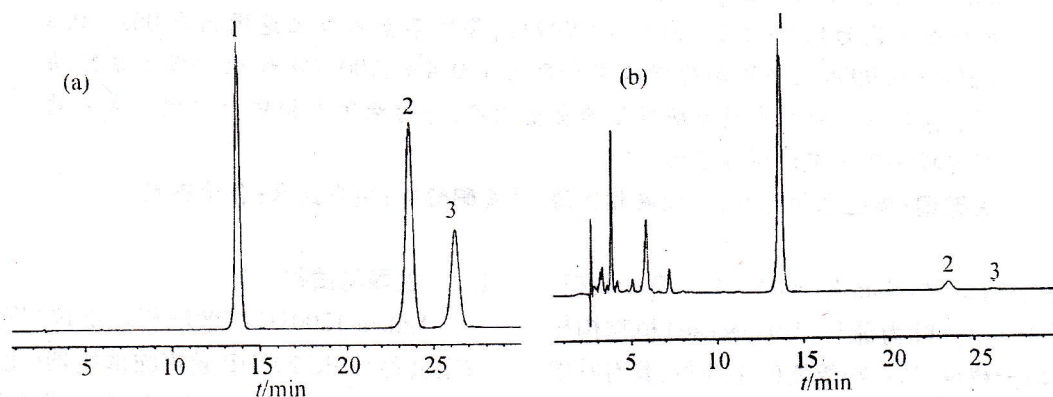


图1 对照品混合液及样品溶液 HPLC

a - 对照品混合液; b - 样品溶液; 1 - 槲皮素, 2 - 山柰素, 3 - 异鼠李素

1.3.5 黄酮醇苷含量计算 按样品溶液的制备方法制备溶液后,进行 HPLC 测定,记录峰面积,用标准曲线分别计算槲皮素、山柰素、异鼠李素的含量,以下式换算成总黄酮醇苷的含量^[7,8]:总黄酮醇苷含量 = (槲皮素含量 + 山柰素含量 + 异鼠李素含量) × 2.51

2 结果与讨论

2.1 正交实验

由于超声提取各因素之间相互交叉影响,因此

为全面考察超声提取法的工艺参数^[9,10],选取乙醇浓度、超声时间、超声温度和料液比等4个对提取枸杞叶中黄酮醇苷含量有影响的主要因素(表1),选用 $L_9(3^4)$ 正交实验表(表2)设计实验。与山柰素、异鼠李素比较,枸杞叶中槲皮素含量较高,且槲皮素含量测定结果受提取方法的影响比山柰素、异鼠李素更显著,因此用槲皮素含量进行直观分析。

从表2中结果分析得到:超声提取各因素对槲皮素含量影响的主次顺序为乙醇浓度、料液比、超

表1 因素水平设计

水平	因素			
	A 乙醇 φ/%	B 超声时间 t/min	C 超声温度 t/°C	D 料液比/(g:mL)
1	70	20	30	1:6
2	80	30	40	1:8
3	90	40	50	1:10

表2 L₉(3⁴) 正交实验结果

试验号	A 乙醇 φ/%	B 超声时间 t/min	C 超声温度 t/°C	D 料液比 /(g:mL)	含量 w/%		
					槲皮素	山柰素	异鼠李素
1	1	1	1	1	1.54	0.083	0.039
2	1	2	2	2	1.42	0.078	0.036
3	1	3	3	3	1.41	0.076	0.036
4	2	1	2	3	1.56	0.084	0.039
5	2	2	3	1	1.70	0.091	0.042
6	2	3	1	2	1.59	0.086	0.040
7	3	1	3	2	1.85	0.102	0.049
8	3	2	1	3	1.67	0.091	0.042
9	3	3	2	1	1.70	0.092	0.043
k1	1.46	1.65	1.60	1.65			
k2	1.62	1.60	1.56	1.62			
k3	1.74	1.57	1.65	1.55			
R	0.28	0.08	0.09	0.10			

声温度、超声时间,并且最佳的提取工艺条件为 A₃D₁C₃B₁,即采用6倍量90%的乙醇超声提取20 min,提取温度控制在50 °C。

2.2 提取次数的确定

准确称取5g样品,按最优提取方案进行超声提取。分别测定提取1次、2次、3次、4次提取物水解液中槲皮素、山柰素和异鼠李素的含量。结果显示随着提取次数的增加,槲皮素、山柰素和异鼠李素的含量增加量很小,从提取效果、节省时间和节约溶剂及能耗的角度考虑,选定提取次数为2次。

2.3 精密度

精密吸取槲皮素、山柰素和异鼠李素质量浓度分别为0.1、0.1、0.067 mg/mL的对照品溶液,按上述色谱条件日内连续进样5次,并测定5 d,记录峰面积,计算日内、日间精密度。结果槲皮素、山柰素和异鼠李素的日内精密度分别为0.81%、0.94%、2.0% (n=5);日间精密度分别为0.92%、1.7%、1.8% (n=5)。

2.4 重复性

取相同样品按优化方案平行提取5组后测定,测得槲皮素、山柰素和异鼠李素峰面积的RSD分别为1.6%、2.0%、1.9% (n=5),表明实验方法的重复性良好。

2.5 稳定性

取相同样品溶液分别在0,2,6,8,12,16,24 h按上述色谱条件测定,记录色谱图,测定峰面积。结果表明,槲皮素、山柰素、异鼠李素的峰面积稳

定,计算RSD分别为1.5%、1.8%、1.9%,表明样品溶液至少在24 h内稳定。

2.6 加样回收率

精密称取已知含量的样品适量,精密加入槲皮素、山柰素、异鼠李素对照品溶液5 mL,按优化提取方案进行试验,分别测定槲皮素、山柰素和异鼠李素的含量,计算加样回收率,如表3所示。结果平均回收率槲皮素为100.4% (RSD=1.5%, n=5),山柰素为100.24% (RSD=1.95%, n=5),异鼠李素为99.5% (RSD=2.3%, n=5)。

表3 回收率实验结果(n=5)

	样品含量 m/mg	加入量 m/mg	实测量 m/mg	回收率 /%
槲皮素	1.992	0.500	2.458	98.60
	2.021	0.500	2.516	99.00
	2.015	0.500	2.521	101.20
	2.027	0.500	2.537	102.00
	2.046	0.500	2.551	101.00
山柰素	0.106	0.500	0.609	100.60
	0.108	0.500	0.601	98.60
	0.108	0.500	0.622	102.80
	0.109	0.500	0.615	101.20
	0.108	0.500	0.598	98.00
异鼠李素	0.0504	0.333	0.373	96.78
	0.0505	0.333	0.377	97.95
	0.0508	0.333	0.389	101.46
	0.0506	0.333	0.381	99.12
	0.0506	0.333	0.391	102.12

2.7 样品含量测定

分别称取干燥枸杞叶粉末3份,按“2.2”项下方法制备样品溶液,利用上述色谱条件测定,计算样品溶液中总黄酮醇苷含量,结果见表4。

表4 含量测定结果(n=3)

样品批次	采集地点	海拔/m	总黄酮醇苷含量/%
1	大风山	3010	4.21
2	茶冷口	2760	4.48
3	锡铁山	3796	2.85
4	德令海市	3425	4.70
5	察尔汗	2717	5.43
6	乌兰柯柯镇	2961	5.00
7	格尔木市	2928	6.13
8	诺木洪农场	2793	8.35
9	都兰巴隆乡	3293	5.77
10	都兰察汗乌苏镇	3500	6.77

参考文献

- [1] 赵国平. 中药大辞典(下). 上海:上海科学技术出版社,2005:38
- [2] 张颖,张立睦,周红英,等. 中国中医药科技, 2004,11(2):102
- [3] 文怀秀,邵赟,蒋福全,等. 资源与环境学报, 2006,15(3):75
- [4] Dong J Z, Lu D Y, Wang Y. Plant Foods Hum Nutr, 2009, 64:199
- [5] 贺晓慧,贾孟辉,俞维,等. 时珍国医国药,2007, 18(5):1111
- [6] 陈振林,黄永艺,莫显瑞,等. 农产品加工,2005, 9:166
- [7] 中华人民共和国国家药典委员会. 2010年版《中国药典》一部. 北京:中国医药科技出版社,2010:392
- [8] 韩立路,孙兴力,龙红萍,等. 中国医药指南, 2009,7(12):5
- [9] Hemwimol S, Pavasant P, Shotipruk A, et al. Ultrason Sonochem, 2009, 13:543
- [10] Buszewski B, Kawka S, Wolski T, et al. Chromatographia, 1993, 35:311