

文章编号:1004-1656(2012)02-0282-05

高效液相色谱法测定野葱中黄酮类化合物

党军^{1,2}, 张兴旺^{1,2}, 陶燕铎¹, 邵贇¹, 梅丽娟¹, 王启兰^{1*}

(1. 中国科学院西北高原生物研究所, 青海 西宁 810008; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要:建立了测定野葱中芦丁、黄酮醇类化合物的高效液相色谱方法。80%乙醇超声提取, 高效液相色谱分析野葱中芦丁和黄酮醇类化合物的含量。芦丁检测条件: $V(\text{甲醇}) : V(0.2\% \text{磷酸水}) = 45 : 55$, 检测波长: 360 nm; 槲皮素、山奈酚、异鼠李素检测条件: $V(\text{甲醇}) : V(0.2\% \text{磷酸水}) = 40 : 60$, 检测波长: 360 nm。结果表明, 野葱中芦丁含量 0.22%, 槲皮素、山奈酚、异鼠李素含量依次为 0.42%、0.23%, 总黄酮醇类化合物含量为 1.63%。

关键词:野葱; 芦丁; 黄酮醇类化合物; 高效液相色谱
中图分类号: O657.72 文献标识码: A

Determination of flavonoid compounds in *Allium Chrysanthum* by high performance liquid chromatography

DANG Jun^{1,2}, ZHANG Xing-wang^{1,2}, TAO Yan-duo¹, SHAO Yun¹, MEI Li-juan¹, WANG Qi-lan^{1*}

(1. Northwest Institute of Plateau Biology Chinese Academy of Sciences, Xining 810008, China;
2. Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: A method for determination of rutin and flavonols in *Allium Chrysanthum* by high performance liquid chromatography was established. *Allium Chrysanthum* powder was extracted with ethanol of 80% by ultrasonic technique. Rutin and flavonols (quercetin, kaempferol and isorhamnetin) were detected by high performance liquid chromatography. The detecting condition of rutin was that the volume ratio of methanol and 0.2% phosphoric acid was 45:55 and detection wavelength was 360nm. The detection wavelength of flavonols was the same as rutin, but the volume ratio of methanol and 0.2% phosphoric acid was 40:60. The results showed that the rutin content was 0.22%, while the quercetin, kaempferol and isorhamnetin content reached 0.42%, 0.23% respectively, and the total flavonols content was 1.63% in *Allium Chrysanthum*.

Key words: *Allium Chrysanthum*; rutin; flavonols; high performance liquid chromatography

葱(*Allium*)为百合科(Liliaceae)多年生宿根草本植物^[1],含有丰富的蛋白质、糖类、氨基酸、矿物质、黄酮类等营养成分。野葱(*Allium Chrysanthum*)作为其中一种,学名黄花葱,生于高山草甸、高山灌木中,海拔3200~3600米,在青海主产于

乐都、互助、祁连、门源^[2]。黄酮及黄酮醇类化合物(图1)是其重要的活性成分,在抗氧化、抗肿瘤及防治心脑血管疾病等方面有着潜在的疗效,极具开发价值^[3]。

收稿日期:2011-06-17; 修回日期:2011-07-28

基金项目:国家科技支撑计划项目(2007BAI45B00)资助

联系人简介:王启兰(1964-),女,副研究员,主要研究方向天然产物化学。E-mail: wql@nwipb.ac.cn

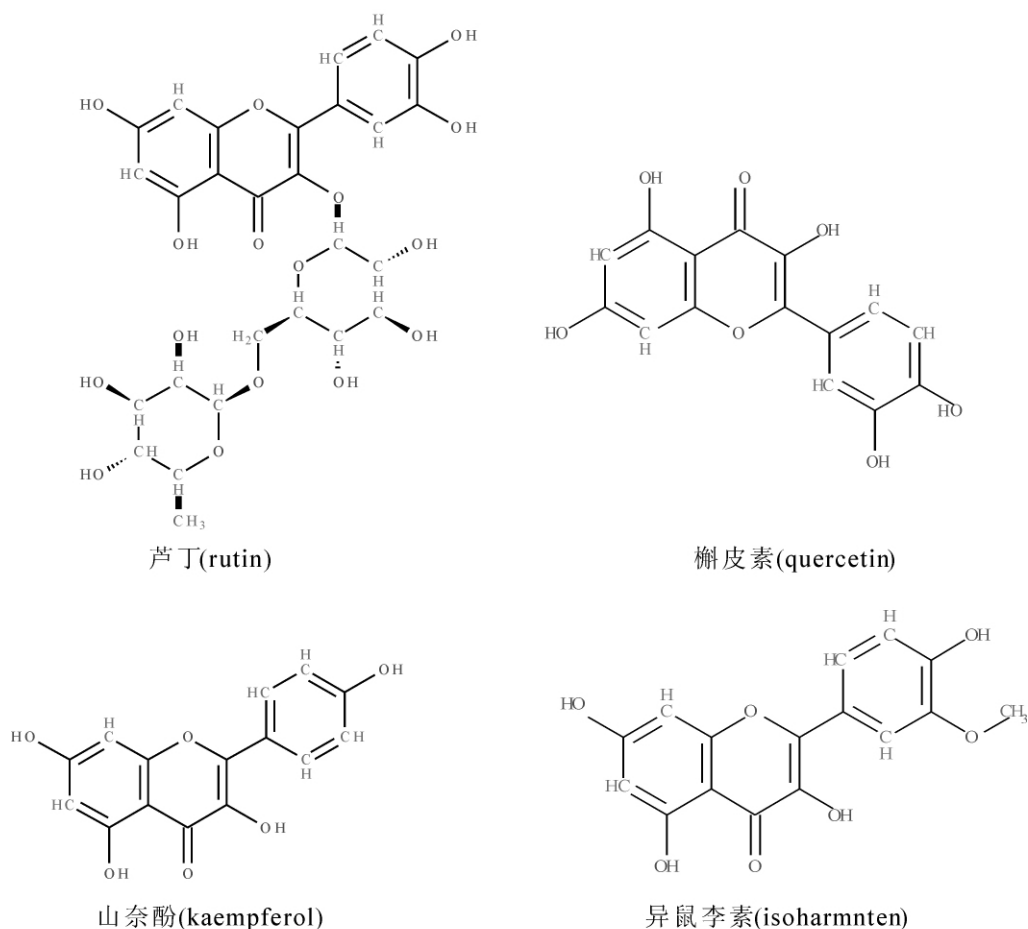


图 1 黄酮及黄酮醇类化合物及其结构

Fig. 1 Structures of flavonoid and flavonols compounds

青海盛产野葱属中其中 9 种,野生资源量大^[2]。国内外对葱属植物挥发油化学成分研究较多^[4-6]。对于黄酮类化合物分析方法,目前常用的有分光光度计法^[7]、高效液相色谱法^[8]、超高效液相色谱法^[9],综合各种方法后,本文建立了 HPLC 测定野葱中芦丁及黄酮醇类化合物含量的方法,为开发利用野葱资源提供参考。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Agilent1200LC 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司),SK5200HP 超声仪(上海科导超声仪器有限公司);RE-52 旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂);UPI-1-520T 超纯水器(成都超纯科技有限公司);AG204 电子分析天平;色谱甲醇、乙醇、

盐酸、磷酸(天津康科德科技公司)、18.25M·Ω 色谱纯水(UPI-1-520T 超纯水器制得)。

标准品:槲皮素(98%,中国药品生物制品检定所,批号 1100812200205),山奈素(98%,中国药品生物制品检定所,批号 1108612200606),异鼠李素(98%,中国药品生物制品检定所,批号 1108612200407),芦丁(98%,中国药品生物制品检定所,批号 100080200707)。

样品:全草于 2010 年 8 月采自青海省祁连县,经西北高原生物研究所梅丽娟工程师鉴定为野葱。

1.2 色谱条件

芦丁色谱检测条件:Platisil C₁₈ 色谱柱(250×4.6 mm 5 μm),流动相:V(甲醇):V(0.2% 磷酸水)=45:55,流速:1.0 mL/min,柱温:25℃,检测波长:360 nm,进样量:10 μL。对照品及样品色谱

图见图2。

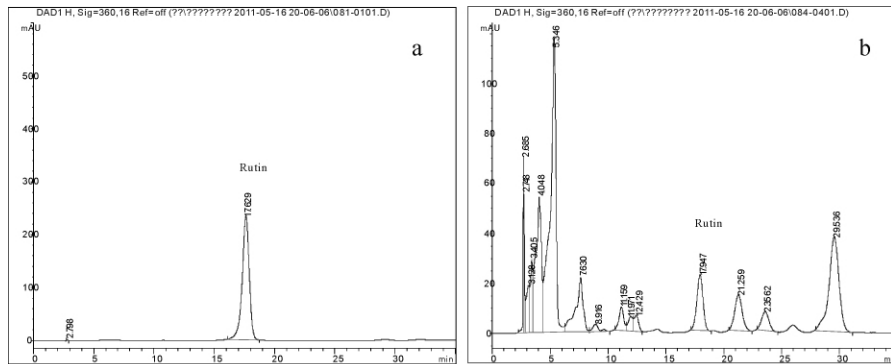


图2 芦丁标准品(a)与芦丁样品(b)色谱图

Fig. 2 HPLC chromatograms of standard substances (c) and samples (d) of rutin

黄酮醇类化合物色谱检测条件: Platisil C₁₈ 色谱柱(250×4.6 mm 5 μm), 流动相: V(甲醇):V(0.2% 磷酸水) = 40:60, 流速: 0.9 mL/min, 柱温:

30℃, 检测波长: 360 nm, 进样量: 10 μL。对照品及样品色谱图见图3。

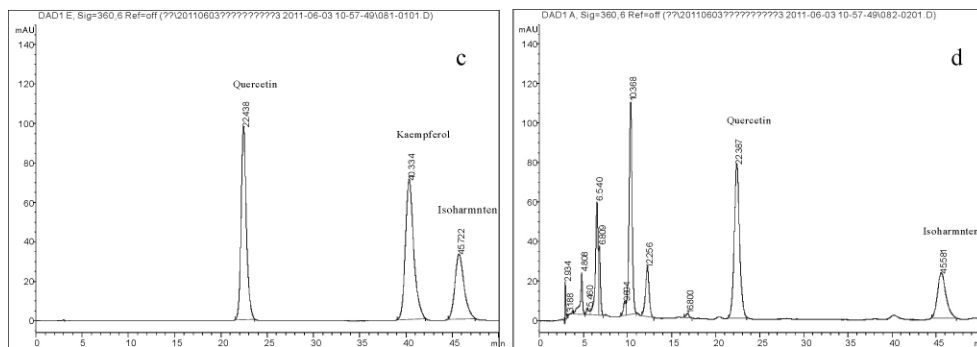


图3 槲皮素、山奈酚、异鼠李素标准品(c)与槲皮素、山奈酚、异鼠李素样品(d)色谱图

Fig. 3 HPLC chromatograms of standard substances (c) and samples (d) of quercetin kaempferol and isoharmnten

1.3 标准品溶液的制备

芦丁标准品: 称取芦丁标准品 12.5 mg 于 100 mL 烧杯中, 加适量色谱甲醇溶解, 转移至 25 mL 容量瓶中定容, 得浓度 0.500 mg/mL 芦丁标准品溶液, 置于 4℃ 冰箱中, 上样前过 0.45 μm 微孔滤膜。

黄酮醇类化合物标准品: 分别称取槲皮素、山奈酚、异鼠李素各 2.50 mg、2.50 mg、1.70 mg 于 100 mL 烧杯中, 加适量色谱甲醇溶解, 转移至 25 mL 容量瓶中定容, 得浓度分别为 0.100 mg/mL, 0.100 mg/mL, 0.0680 mg/mL 的槲皮素、山奈酚、异鼠李素标准品溶液, 置于 4℃ 冰箱中, 上样前过 0.45 μm 微孔滤膜。

1.4 样品的前处理

芦丁样品溶液的制备: 称取 5.00 g 野葱粉末(阴干, 粉碎后过 60 目筛)于 500 mL 锥形瓶中, 加

入 80% 乙醇 100 mL(料液比 1:20) 超声提取(工作频率 53 KHz、100% 功率、槽内温度 37℃), 提取三次, 每次 30 min, 合并提取三次的滤液, 减压浓缩至干, 加甲醇溶解并定容至 250 mL 容量瓶中, 取少量过 45 μm 滤膜后检测芦丁含量。

黄酮醇类化合物样品溶液的制备: 称取 5.00 g 野葱粉末(阴干, 粉碎后过 60 目筛)于 500 mL 锥形瓶中, 加入 80% 乙醇 100 mL(料液比 1:20) 超声提取(工作频率 53 KHz、100% 功率、槽内温度 37℃), 提取三次, 每次 30 min, 合并提取三次的滤液, 减压浓缩至干, 加入体积比 V(甲醇):V(25% 盐酸溶液) = 4:1 水解液 200 mL, 70℃ 回流水解 30 min^[10], 放冷, 转移至 250 mL 容量瓶中并用甲醇定容, 过 0.45 μm 微孔滤膜后用于检测黄酮醇类化合物含量。

2 结果与讨论

2.1 标准曲线及线性范围

吸取芦丁标准品溶液 2、4、6、8、10、12 μ L, 在“芦丁色谱检测条件”下依次进样, 以进样量(X)为横坐标, 峰面积(Y)为纵坐标绘制标准曲线, 得线性回归方程: $Y = 1944.30X + 104.43$, $r^2 = 0.9995$, 结果表明: 芦丁在 1~6 μ g 范围内成良好的线性关系。

吸取黄酮醇类化合物标准品溶液 2、4、6、8、10、12 μ L, 在“黄酮醇类化合物色谱检测条件”下依次进样, 以进样量(X)为横坐标, 峰面积(Y)为纵坐标绘制标准曲线, 得线性回归方程依次为: $Y = 776.86X - 3.51$, $r^2 = 1$; $Y = 899.32X - 18.72$, $r^2 = 0.9999$; $Y = 456.87X - 11.202$, $r^2 = 0.9999$, 结果表明: 槲皮素、山奈酚、异鼠李素分别在 0.200~1.20 μ g、0.200~1.20 μ g、0.136~0.816 μ g 范围内成良好的线性关系。

2.2 精密度实验

精密吸取芦丁、黄酮醇类化合物标准品溶液 10 μ L, 按“1.2.3”项下色谱条件测定 5 次, 结果芦丁峰面积的 RSD 值为 1.82%, 槲皮素、山奈酚、异鼠李素峰面积的 RSD 值依次为 0.92%、1.08%、

1.54%, 表明仪器精密度良好。

2.3 稳定性试验

准确吸取芦丁、黄酮醇类化合物供试品溶液 10 μ L, 0、2、4、8、12 h 测定, 芦丁峰面积的 RSD 值为 0.52%; 槲皮素、山奈酚、异鼠李素峰面积的 RSD 值分别为 0.31%、0、0.82%, 表明样品溶液在 12 h 内稳定。

2.4 重复性试验

精密称取野葱粉末 5.00 g, 按上述样品溶液的制备方法和测定条件, 重复测定 5 份, 结果芦丁峰面积的 RSD 值为 1.28%, 槲皮素、山奈酚、异鼠李素峰面积的 RSD 值依次为 1.02%、0、1.58%, 表明重复性良好。

2.4 加样回收率试验

分别各取 5 份已知含量的芦丁、黄酮醇类化合物样品溶液 10 mL, 向芦丁样品溶液中加入 0.500 mg/mL 芦丁标准品溶液 1 mL, 向黄酮醇类化合物样品溶液中加入 0.100 mg/mL 槲皮素、0.100 mg/mL 山奈酚、0.0680 mg/mL 异鼠李素混标溶液 1 mL, 按照芦丁、黄酮醇类化合物色谱检测条件检测, 计算芦丁平均回收率为 99.3%, RSD 值为 0.63%; 槲皮素、山奈酚、异鼠李素平均回收率为 98.8%、100.0%、98.4%, RSD 分别为 0.43%、0.32%、0.17% (见表 1)。

表 1 芦丁及黄酮醇类化合物(槲皮素、山奈酚、异鼠李素)加样回收率

Table 1 Recovery rate of Rutin and flavonols (Quercetin, Kaempferol and Isorhamnetin)

	样品中含量 (mg)	加入量 (mg)	测得量 (mg)	回收率 (%)	平均值 (%)	RSD (%)
芦丁	0.4357	0.5	0.9286	98.6	99.3	0.63
	0.4256	0.5	0.9174	98.4		
	0.4428	0.5	0.9419	99.8		
	0.4196	0.5	0.9201	100.1		
	0.4308	0.5	0.9282	99.5		
槲皮素	0.0827	0.1	0.1818	99.1	98.8	0.43
	0.0819	0.1	0.1801	98.2		
	0.0819	0.1	0.1803	98.4		
	0.0831	0.1	0.1822	99.1		
	0.0830	0.1	0.1824	99.4		
山奈酚	0	0.1	0.1001	100.1	100.0	0.32
	0	0.1	0.0999	99.9		
	0	0.1	0.0996	99.6		
	0	0.1	0.1008	100.8		
	0	0.1	0.0998	99.8		
异鼠李素	0.0465	0.068	0.1136	98.8	98.4	0.17
	0.0452	0.068	0.1119	98.1		
	0.0468	0.068	0.1137	98.4		
	0.0459	0.068	0.1129	98.5		
	0.0450	0.068	0.1119	98.4		

2.5 样品中芦丁、黄酮醇类化合物含量的测定

取芦丁、黄酮醇类化合物供试品溶液,过0.45 μm 的微孔滤膜,分别进样 10 μL,测定(n = 3) 取 3 次测定的平均值,结果见表 2。

表 2 野葱中芦丁与黄酮醇类化合物含量测定结果

Table 2 Contents of rutin and flavonols(Quercetin , Kaempferol and Isorhamnetin) in *Allium Chrysanthum*

样品	芦丁供试液	黄酮醇类化合物供试液			总黄酮醇类化合物 ^[11]
		槲皮素	山奈酚	异鼠李素	
含量(%)	0.22	0.42	0	0.23	1.63

参考文献:

- [1] 陈心启. 中国植物志 [M]. 北京: 科学出版社, 1980: 253-257.
- [2] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志 [M]. 北京: 科学出版社, 1875: 255.
- [3] 赵春艳, 敖长金, 缪亚娟, 等. 沙葱中黄酮类化合物分离提取工艺的研究 [J]. 黑龙江畜牧兽医科技版, 2010, (1): 131-133.
- [4] Kuo M C, Ho C T. Volatile constituents of the solvent extracts of Welsh onions (*Allium fistulosum* var. *Maichuon*) and scallions (*Allium fistulosum* var. *Caespitosum*) [J]. *Agricultural Food*, 1992(40): 1906-1910.
- [5] Kuo M C, Ho C T. Volatile constituents of the distilled oils of Welsh onions (*Allium fistulosum* L. variety *Maichuon*) and scallions (*Allium fistulosum* L. variety *Caespitosum*) [J]. *Agricultural Food*, 1992(40): 111-117.
- [6] Block E, Naganathan S, Putman P et al. HPLC analysis of thiosulfonates from onion, garlic, wild garlic (ramson), leek, scallion, shallot, elephant (great-headed) garlic, chive and Chinese chive. Uniquely high allyl to methyl ratios in some garlic samples [J]. *Agricultural food*, 1992

3 讨论

野葱作为青海一种野生植物资源,人为利用率非常低。近年来,越来越多的研究集中在沙葱^[12]、洋葱^[13]等。对于野葱的研究,仅限于其挥发油成分的研究上,本研究采用 80% 乙醇超声提取野葱中黄酮类化合物,以芦丁、槲皮素、山奈酚、异鼠李素作为高效液相色谱检测指标,得出野葱中芦丁含量为 0.22%; 槲皮素、山奈酚、异鼠李素含量分别为 0.42%、0.23%,总黄酮醇类化合物含量为 1.63%。该方法操作简便、快速,可为进一步研究葱属植物黄酮及类黄酮类化合物提供参考。

(40): 2413-2430.

- [7] 张槐苓, 葛翠英. 烟草分析与检测 [M]. 郑州: 河南科技出版社, 1994: 252.
- [8] 王 岚, 方瑞斌, 杨光宇, 等. 固相萃取光度法测定烟草中的挥发酚 [J]. 分析试验室, 2002, 21(3): 31.
- [9] 郭巧珍, 杜振霞. 超高效液相色谱法同时测定盐酸丁丙诺啡舌下含片中丁丙诺啡和纳洛酮的含量 [J]. 分析试验室, 2011, 30(1): 87-89.
- [10] 于瑞涛, 陶燕铎, 邵赞, 等. 大孔树脂 AB_8 分离纯化白刺叶中的总黄酮醇类化合物 [J]. 分析试验室, 2008, 27(5): 95-96.
- [11] Mary Mandels, Raymond Andreotti. Measurement of saccharifying cellulose [J]. *Charles Roche. Biotech and Bio-eng. Symp*, 1976: 20(6): 21.
- [12] 扈瑞平, 张兴夫, 杜玲, 等. 沙葱多糖对 S180 腹水瘤小鼠抗肿瘤和免疫作用的实验研究 [J]. 饲料工业, 2005, 31(10): 34-36.
- [13] 徐怀德, 陈佳, 包蓉, 等. 大孔吸附树脂分离纯化洋葱皮黄酮的研究 [J]. 食品科学, 2009, 32(13): 133-138.

(责任编辑 李 方)