

文章编号: 1000-5471(2008)04-0039-04

# 反相高效液相色谱法测定金樱子中的芦丁和槲皮素<sup>①</sup>

刘 焱<sup>1</sup>, 高智席<sup>1</sup>, 周光明<sup>2</sup>

1. 遵义师范学院 化学系, 贵州 遵义 563002; 2. 西南大学 化学化工学院, 重庆 400715

**摘要:** 建立了用反相高效液相色谱法测定金樱子中芦丁和槲皮素的方法. 色谱条件: 色谱柱 Shim-pack VP-ODS 200 mm×4.6 mm, 流动相为甲醇:水(含 0.2%磷酸)为 60:40 的溶液, 流速为 0.8 mL/min, 检测波长 260 nm. 结果表明芦丁和槲皮素达到基线分离, 分别在 0.03~15 μg/mL( $r=0.999\ 0$ )和 0.04~20 μg/mL( $r=0.999\ 4$ ) 的浓度范围内与峰面积呈良好线性关系, 检测限分别为 12.6 和 15.2 ng/mL, 方法可用于金樱子中芦丁和槲皮素的测定.

**关键词:** 反相高效液相色谱法; 金樱子; 芦丁; 槲皮素

**中图分类号:** O657.7<sup>+2</sup>

**文献标识码:** A

金樱子(*Rosa laevigata* Mickx)又名糖桔子、蜂糖罐、刺梨子、山石榴等, 属蔷薇科蔷薇, 属常绿蔓性灌木野生果树, 在我国西南、华南、华中、华东均有分布, 尤其以贵州分布广, 产量高<sup>[1]</sup>. 《本草纲目》记载金樱子“性酸, 涩, 平, 无毒; 主治脾泻下痢, 止水便利, 涩精气, 久服令人耐寒轻身, 补血益精, 有奇效”<sup>[2]</sup>. 金樱子果实可做利尿剂、镇咳剂, 也可用于皮肤肿瘤、烧烫伤、神经衰弱、高血压、神经性头痛、慢性肾炎等的治疗<sup>[3]</sup>.

金樱子中黄酮类物质<sup>[4, 5]</sup>对人体健康有重要作用, 受到研究者的重视<sup>[6]</sup>. 黄酮的分析方法有分光光度法<sup>[7-9]</sup>、荧光法<sup>[10]</sup>、电化学分析法<sup>[11, 12]</sup>、微波提取法<sup>[13]</sup>等, 但用高效液相色谱(HPLC)法测定金樱子中黄酮类化合物尚未见报道.

应用高效液相色谱法对金樱子中芦丁和槲皮素进行分离与测定, 结果表明, 方法的线性范围宽、检测限低, 并成功应用于贵州金樱子中的芦丁和槲皮素的含量测定, 为贵州药用植物的开发利用提供科学依据.

## 1 试验部分

### 1.1 仪器及试剂

#### 1.1.1 仪器

日本 Shimadzu LC-2010AT 型高效液相色谱仪, LCsolution 色谱工作站, CBM-20A 系统控制器, SPD-M20A 二极管阵列检测器, UV8500 紫外分光光度计, KQ-50 超声波清洗器, Shim-pack VP-ODS 200 mm×4.6 mm 色谱柱.

#### 1.1.2 试剂

槲皮素及芦丁(98%, AR, 均购自陕西省西安慧科植物有限开发公司)标准溶液: 分别准确称取 0.010 0 g 槲皮素及芦丁置于 100 mL 容量瓶中, 用乙醇(分析纯)溶解并定容至 100 mL, 浓度为  $10^{-4}$  g/mL, 根据需要逐级稀释. 二次蒸馏水. 所有溶液使用前均经 0.45 μm 孔径滤膜过滤.

① 收稿日期: 2007-10-05

基金项目: 遵义市科技局资助项目(遵市科合社字(2008)23号).

作者简介: 刘焱(1959-), 男, 贵州遵义人, 副教授, 主要从事色谱与化学发光的应用研究.

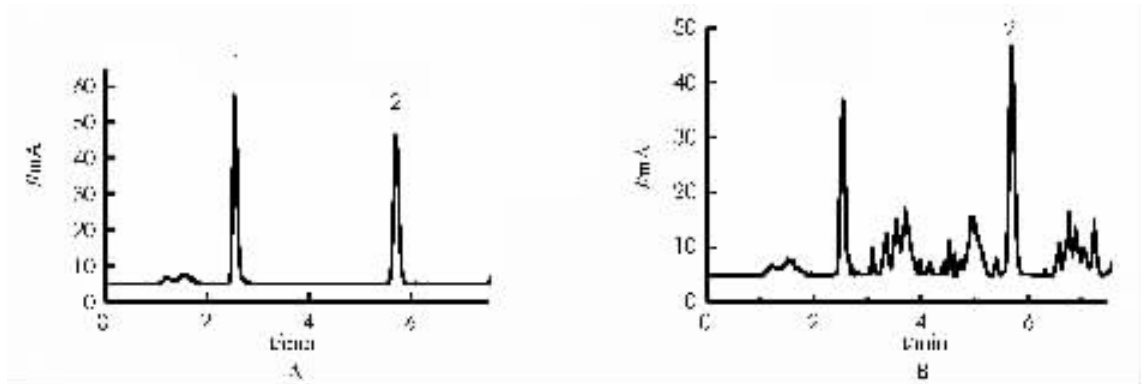
通讯作者: 周光明, 教授.

## 1.2 样品溶液的配制

精密称取过 40 目筛干燥的金樱子粉末 0.75 g, 加 60% 乙醇 20 mL, 超声(70 W, 40 kHz)提取 30 min, TGL-16G(10 000 r/min)离心机离心 10 min, 取上清液, 重复提取 2 次, 合并上清液, 残渣经 0.45  $\mu\text{m}$  滤膜滤过, 再用 60% 乙醇定容至 50 mL, 作为供试品溶液。

## 1.3 色谱条件

色谱柱: Shim-pack VP-ODS 200 mm $\times$ 4.6 mm; 流动相: V(甲醇):V(水)(含 0.2% 磷酸)=60:40 的溶液; 流速: 0.8 mL/min, 检测波长 260 nm; 柱温: 25  $^{\circ}\text{C}$ ; 进样量: 20  $\mu\text{L}$ . 在该色谱条件下, 取得了较好的分离效果(图 1)。



1. 芦丁; 2. 槲皮素.

图 1 对照品(a)和贵州产样品(b)色谱图

## 2 结果与讨论

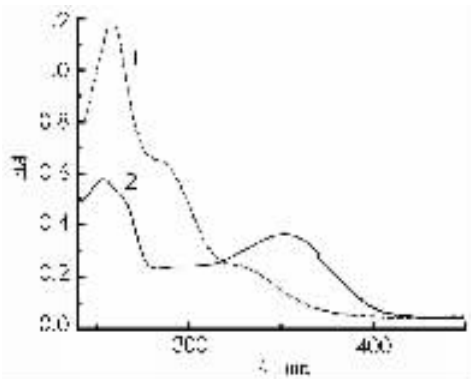
### 2.1 吸收波长和流动相的选择

以甲醇和水(V(甲醇):V(水)=60:40)作试剂空白, 在 UV8500 紫外分光光度计上测定上述黄酮类化合物的紫外吸收光谱(图 2). 结果表明槲皮素在 260 nm 和 370 nm 处均有较强吸收, 芦丁在 260 nm 处有较强吸收, 故选择测定波长为 260 nm.

黄酮类物质<sup>[14]</sup>都微溶于水, 且溶于有机溶剂, 当选用甲醇-水溶液作溶剂时分离效果最佳. 当 V(甲醇):V(水)>70:30 时, 分离效果不好; 当 V(甲醇):V(水)<50:50 时, 分析时间明显增长, 峰形扩展严重. 而在 V(甲醇):V(水)=60:40 时, 能取得较好的分离效果, 但是色谱峰稍有拖尾现象, 通过加入 0.2% 的磷酸溶液能消除峰拖尾, 故本实验流动相选择 V(甲醇):V(水)(含 0.2% 磷酸)=60:40.

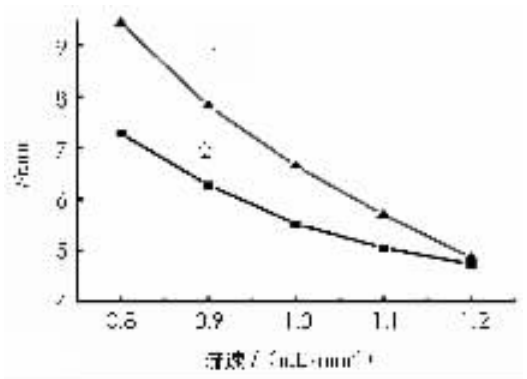
### 2.2 流速对分离的影响

流动相流速对保留时间的影响见图 3. 随流速增加各峰的保留时间减少, 流速在 0.4~0.8 mL/min 之间<sup>[15]</sup>, 均能很好分离, 但流速在 0.5 mL/min 以下时, 色谱峰逐渐扩展, 检测灵敏度下降. 流速在 0.8 mL/min 以上时, 芦丁峰与相邻峰重叠, 分离度下降. 本文选择实验流速为 0.8 mL/min.



1. 芦丁; 2. 槲皮素

图 2 吸收光谱



1. 芦丁; 2. 槲皮素

图 3 流动相流速对芦丁和槲皮素保留时间的影响

### 2.3 线性关系考察

精密量取2种对照品储备液1,3,5,7,9,10 mL,分别置10 mL量瓶中,加流动相稀释至刻度,摇匀,制成系列溶液.按1.3色谱条件进样20  $\mu\text{L}$ ,以峰面积 $Y$ 对黄酮类成分含量 $X(\mu\text{g})$ 计算线性方程、相关系数及检测限.结果见表1.

表1 线性方程和检测限

组分	线性范围/ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	回归方程	$r$	检测限/ $(\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1})$
芦丁	0.03~15	$Y=6.915 \times 10^4 X+2.063 \times 10^3$	0.999 0	12.6
槲皮素	0.04~20	$Y=8.989 \times 10^4 X+115.2$	0.999 4	15.2

### 2.4 精密度试验

精密吸取芦丁和槲皮素对照品浓度分别为2.40,12.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的溶液各20  $\mu\text{L}$ ,进样测定,结果芦丁和槲皮素相对标准偏差( $n=6$ )分别为1.8%,2.0%.

### 2.5 回收率

对金樱子样品按前述方法处理后进行测定,并进行加标回收实验,测得样品的回收率为98.3%和100.3%(表2).

表2 回收率实验结果

测定对象	样品含量/ $(\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1})$	加入量/ $(\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1})$	测得值/ $(\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1})$	回收率/%	平均回收率/%
芦丁	1.52	2.00	3.63	103.1	98.3
	1.52	4.00	5.16	93.5	
	1.52	6.00	7.38	98.2	
槲皮素	2.24	1.00	3.17	97.8	100.3
	2.24	2.00	4.41	104.0	
	2.24	3.00	5.19	99.0	

## 3 结 论

研究表明,以 $V(\text{甲醇}):V(\text{水})(\text{含}0.2\% \text{磷酸})=60:40$ 的溶液为流动相,在Shim-pack VP-ODS 200 mm $\times$ 4.6 mm色谱柱上,实现了快速分离测定芦丁和槲皮素的方法,该法所用试剂简单易得、操作简便迅速、分离不需梯度洗脱,准确度和精密度均较理想,可用于中药材金樱子中芦丁和槲皮素的分离与测定.

### 参考文献:

- [1] 蔡金腾,丁筑红.金樱子果汁饮料的加工工艺[J].食品科学,1996(3):42-44.
- [2] 李时珍.本草纲目(下册)[M].北京:人民卫生出版社,1978:2096-2097.
- [3] 江苏新医学院.中药大字典(上册)[M].上海:上海人民出版社,1977:1406-1408.
- [4] 肖凯军,刘晓红.金樱子果实的化学成分及其应用[J].现代食品与药品杂志,2006,16(4):1-3.
- [5] 吴家红,彭小冰,席希晔.金樱子不同炮制品中总黄酮含量的测定[J].贵阳中医学院学报,2006,28(5):60-62.
- [6] 曹伟国,刘志勤,邵云.黄酮类化合物的药理作用研究进展[J].西北植物学报,2003,23(12):2241-2247.
- [7] 张淑敏,郝春香.槲皮素-铁配合物的光度法研究[J].光谱实验室,2001,18(3):329-331.
- [8] 李满秀,张静,张海蓉.等吸收紫外光度法同时测定槐米中的芦丁和槲皮素[J].光谱实验室,2005,22(1):42-45.
- [9] Castro Gt, Blanco S E. Structural and Spectroscopic Study of 5, 7 - Dihydroxy-Flavone and its Complex with Aluminum [J]. Spectrochimica Acta Part A, 2004; 10(60): 2235 - 2241.
- [10] 姚本林,时小波.槲皮素-铝的络合反应及槲皮素的荧光光度测定[J].理化检验(化学分册),2002,38(4):186-187.
- [11] 陈刚,叶剑农,张剑霞.槐米中芦丁和槲皮素的毛细管电泳-电化学检测[J].华东师范大学学报(自然科学版),2001,4:82-86.
- [12] Guan-Ping Jin, Jian-Bo He, Ze-Bao Rui, et al. Electrochemical Behavior and Adsorptive Stripping Voltammetric Determination of Rutin and Quercetin in Hawthorn [J]. Journal of Electroanalytical Chemistry, 2005, 585: 105-110.

nation of Quercetin at Multi-Wall Carbon Nanotubes Modified Paraffin-Impregnated Graphite Disk Electrode [J]. *Electrochimica Acta*, 2006, 21(51): 1-6.

- [13] 薛梅, 王自军, 闫豫君, 等. 金樱子中总黄酮和多糖的微波提取与含量测定 [J]. *食品工业科技*, 2005, 26(10): 134-137.
- [14] 吴永平, 高智席, 周光明. HPLC-CL 测定吊石苣苔中石吊兰素的含量 [J]. *西南师范大学学报(自然科学版)*, 2007, 32(3): 48-51.
- [15] 高智席, 周光明, 黄成, 等. 离子增强-反相高效液相色谱法快速测定落羽杉中莽草酸 [J]. *西南师范大学学报(自然科学版)*, 2005, 30(6): 1082-1085.

## Determination of Rutin and Quercetin in *Rosa Laevigata* by Reversed-phase High Performance Liquid Chromatography

LIU Yan<sup>1</sup>, GAO Zhi-xi<sup>1</sup>, ZHOU Guang-ming<sup>2</sup>

1. Department of Chemistry, Zunyi Normal College, Zunyi, Guizhou 563002, China;

2. School of Chemistry and Chemical Engineering, Southwest University, Chongqing 400715, China

**Abstract:** A reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) method for the separation and determination of the rutin and quercetin was developed. The separation was carried out on a Shim-pack VP-ODS 200 mm×4.6 mm column with a mobile phase of CH<sub>3</sub>OH-H<sub>2</sub>O(60:40). The flow rate was 0.8 mL/min and the wavelength of detection was 260 nm. The method had good linear relationship within the range 0.03-15 μg/mL( $r=0.9990$ ) and 0.04-20 μg/mL( $r=0.9994$ ) of rutin and quercetin, respectively. The detection limit was 12.6 ng/mL and 15.2 ng/mL for rutin and quercetin, respectively. This method was applied for separating and determining quercetin and rutin in *Rosa Laevigata*.

**Key words:** reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC); *Rosa Laevigata*; rutin; quercetin

责任编辑 潘春燕