

微柱高效液相色谱法测定杨梅黄酮类物质

胡秋芬^{1,2} 杨亚玲² 黄章杰² 杨光宇² 尹家元²

(¹玉溪师范学院化学系 玉溪 653100 ²云南大学化学系 昆明 650091)

摘 要 经固相萃取预分离,由微柱高效液相色谱法测定了几种杨梅树叶和树皮中的黄酮类物质。杨梅中主要的黄酮成分在 2.0min 内可达到基线分离;用紫外二极管矩阵检测器检测。方法标准回收率为 97%~103%,相对标准偏差为 1.6%~2.2%。

关键词 高效液相色谱 固相萃取 杨梅 黄酮

The Determination of Myrica Rubra Flavonoid by Microcolumn High Performance Liquid Chromatography

Hu Qiufen^{1,2}, Yang Yaling¹, Huang Zhangjie², Yang Guangyu², Yin Jiayuan²

(¹ Department of Chemistry, Yuxi Teacher's College, Yuxi 653100; ² Department of Chemistry, Yunnan University, Kunming 650091)

Abstract A microcolumn high performance liquid chromatography (HPLC) method for the determination of flavonoid in myrica rubra leaf and bark was studied. The flavonoid was separated on a Waters XterraTM RP₁₈ (1.0×30mm, 2.5μm) chromatographic column, with methanol and 0.05mol/L potassium dihydrogen phosphate buffer solution as mobile phase at a flow-rate of 0.2mL/min, and monitored with the photodiode array detector at 360nm. The recoveries of the flavonoid are 97%~103%, and relative standard deviations are 1.6%~2.2%.

Key words Microcolumn high performance liquid chromatography, Solid phase extraction, Flavonoid, Myrica rubra

杨梅的树叶和树皮均可入药,对一些疾病有治疗作用,其主要药效成分主要是黄酮类物质。目前杨梅黄酮的测定方法主要用光度法和色谱法,其中高效液相色谱法是最有效的方法^[1~4]。由于微柱高效液相色谱具有流动相消耗小、分析时间短、可不分流直接和质谱联用等特点,近几年来得到了迅速发展^[5]。笔者采用微柱高效液相色谱分析了杨梅黄酮,几种主要的黄酮成分在 2.0min 内可达到基线分离,结果满意。

1 实验部分

1.1 主要仪器与试剂

包括 2690 分离系统(四元泵、柱温箱及自动进样器)、996 紫外二极管矩阵检测器和 Millennium³² 色谱管理软件的美国 Waters 公司 Allaince 高效液相色谱仪。

胡秋芬 女, 30 岁, 副教授, 从事分析化学教学研究工作。E-mail: huqiufena@163.com

云南省教育厅(0211143)和玉溪师范学院(020024)科研基金资助项目

2003-11-30 收稿, 2004-03-15 接受

甲醇为 Fisher 公司生产的高效液相色谱专用试剂；水为石英亚沸蒸馏水并用 Milli-Q50(美国 Millipore 公司)超纯水仪处理,电阻 $\geq 18\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$ ；磷酸二氢钾为 Fluka 公司生产的 HPLC 专用试剂；芦丁、杨梅素、杨梅素-3-*O*- β -D-葡萄糖苷,杨梅素-3-*O*- α -L-鼠李糖苷、槲皮素、槲皮素 3-*O*- β -D-葡萄糖苷、槲皮素-3-*O*- α -L-鼠李糖苷标样分别购于 Fluka 公司、Sigma 公司和美国 CHROMADEX 公司,含量均 $>95\%$ 。

1.2 色谱条件

色谱柱是 Waters Xterra™ RP₁₈ (1.0 \times 30mm, 2.5 μm), Waters Sep-Pak-C₁₈ 固相萃取小柱(1cc, 30mg, 30 μm)；流动相为 0.05mol/L 磷酸二氢钾缓冲溶液-甲醇(体积比 40/60), 流速为 0.2mL/min；检测波长为 360nm, 进样体积 2.0 μL 。上述色谱条件下样品和标样在 360nm 波长处的色谱图见图 1。

1.3 样品处理

样品粉碎后过 80 目筛,准确称取约 1.0g,加入 45mL 90%甲醇水溶液加热回流 45min,冷却,过滤并定容到 50mL,取 5mL 滤液,以 10mL/min 流速通过预活化好的 Waters Sep-Pak-C₁₈ 固相萃取小柱,弃去最初的 3mL,收集后面的 2mL 用 0.45 μm 针头过滤器过滤,进样 2.0 μL 分析。

2 结果与讨论

2.1 分离条件的选择

用甲醇-水作流动相,杨梅黄酮不能获得很好的分离,而且峰有拖尾；改用甲醇-磷酸二氢钾缓冲液作流动相可使分离效果和峰型得到较大改善。其效果随磷酸二氢钾缓冲溶液与甲醇的比例而异,其体积比为 40/60 时可让样品中的主要黄酮达到完全分离且分析时间较短,因此实验中选用该流动相。

2.2 主要黄酮的定性和光谱特征

由紫外二极管矩阵检测器 200~400nm 波长扫描可得各黄酮色谱峰的光谱图(图 2),各样品中各黄酮均由其保留时间及紫外光谱图与标样对照确定；由于各黄酮在 360nm 处均有较大吸收,因此实验选择检测波长为 360nm。

2.3 样品前处理

黄酮类物质在极性有机溶剂中具有较大的溶解度,在热甲醇液中溶解性较好,故实验选用 90% 甲醇为提取剂。对于 1.0g 左右的样品,用 40mL 70% 以上的甲醇溶液加热回流提取 0.5h 以上可提

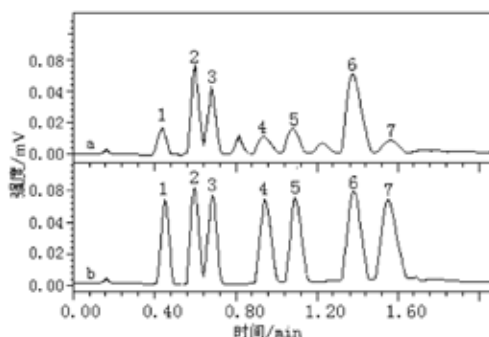


图 1 杨梅黄酮标样(b)和样品(a)色谱图

Fig.1 The Chromatogram of flavonoid standard (b) and myrica rubra leaf sample (a)

1:芦丁; 2:杨梅素-3-*O*- β -D-葡萄糖苷; 3:杨梅素-3-*O*- α -L-鼠李糖苷; 4:槲皮素-3-*O*- β -D-葡萄糖苷; 5:槲皮素-3-*O*- α -L-鼠李糖苷; 6:杨梅素; 7:槲皮素

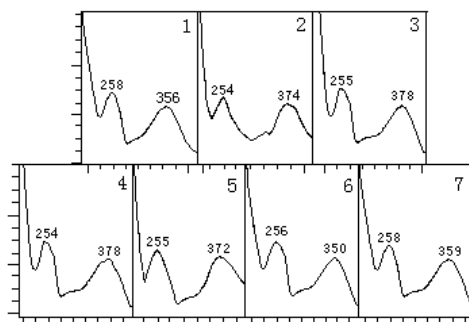


图 2 杨梅中主要黄酮光谱图

Fig.2 The spectrum of flavonoid in myrica rubra

1:芦丁; 2:杨梅素; 3:杨梅素-3-*O*- β -D-葡萄糖苷; 4:杨梅素-3-*O*- α -L-鼠李糖苷; 5:槲皮素; 6:槲皮素-3-*O*- β -D-葡萄糖苷; 7:槲皮素-3-*O*- α -L-鼠李糖苷

取完全, 实验中选用 90% 甲醇 45mL 加热回流提取 45min。

杨梅树叶和树皮中除含有黄酮类物质外, 还含有脂类、蜡质、色素等弱极性物质, 它们会影响黄酮类物质的检测, 并且在本实验的流动相条件下不能完全洗脱而残留积累在 C₁₈ 柱上, 使色谱系统的反压增大, 并降低柱效, 故样品分析前需作脱脂处理。一般文献报道用正己烷, 石油醚等非极性有机溶剂进行脱脂^[2,4], 但是用有机溶剂脱脂时间长且操作麻烦, 还会在一定程度上造成黄酮类物质损失, 影响分析结果。因此, 采用先用 90% 甲醇回流提取样品中的黄酮类成分, 然后提取液用 C₁₈ 固相萃取小柱脱脂的方法。用 Waters SPE 真空提取装置, 每次可同时处理 20 个样, 小柱活化和样品预分离的流速均为 10mL/min, 小柱用 3mL 甲醇活化, 然后用 10mL 水洗净小柱上的甲醇, 取 90% 甲醇的样品提取液通过小柱, 弱极性脂类、蜡质、色素物质可保留在小柱上, 而黄酮类物质在该流动相条件下并不保留, 从而可简便快速地达到样品预分离的目的。固相萃取脱过脂的样品可直接进行色谱分析。

2.4 回归方程、相关系数及检测限

分别配制浓度为 100、20、4.0 及 0.8μg/mL 的标准溶液, 进样后根据不同浓度的峰面积计算出回归方程。根据信噪比 $S/N=3$, 测得各组分最低检测浓度, 结果见表 1。

表 1 回归方程、相关系数及检测限
Tab.1 Regression equation, coefficient and detect limit

组分	回归方程	相关系数	检测限/(ng/mL)
芦丁	$A=1.76 \times 10^5 C+102$	0.9991	18
杨梅素	$A=2.32 \times 10^5 C-97$	0.9992	10
杨梅素-3-O-β-D-葡萄糖苷	$A=2.08 \times 10^5 C+78$	0.9994	15
杨梅素-3-O-α-L-鼠李糖苷	$A=1.98 \times 10^5 C-108$	0.9995	15
槲皮素	$A=3.41 \times 10^5 C-115$	0.9993	10
槲皮素 3-O-β-D-葡萄糖苷	$A=2.2.06 \times 10^5 C+82$	0.9992	15
槲皮素-3-O-α-L-鼠李糖苷	$A=2.11 \times 10^5 C-84$	0.9991	15

C: 浓度/(μg/mL), A: 峰面积

2.5 样品分析结果

杨梅树叶和树皮采集后按 1.3 样品前处理的方法处理进样测定, 测定时每样等量称取两份, 其中一份加入已知量黄酮标样, 另一份不加, 平行测定 5 次, 通过加入标准的测出量除以标准加入量计算回收率, 并根据 5 次平行测定的结果计算相对标准偏差。四种样品测定的相对标准偏差为 1.8%~2.2%。标准回收率为 97%~103%, 结果令人满意。

3 结论

本方法在 Waters Xterra™ RP₁₈ (1.0×30mm, 2.5μm) 微柱上, 用 0.05mol/L 磷酸二氢钾缓冲溶液-甲醇(体积比 40/60)为流动相, 可在 2.0min 内完全分离杨梅树叶和树皮中的主要黄酮类物质, 和常规色谱柱相比, 大大缩短了分析时间; 而且, 流动相流速只需 0.2mL/min, 比常规色谱柱(流动相流速 0.5~2.0mL/min)流动相消耗大大减少。本方法还采用 90% 甲醇回流提取杨梅树叶和树皮中的黄酮类物质, 用固相萃取预分离脱脂, 克服了用有机溶剂脱脂时间长、操作麻烦以及会造成黄酮类物质损失的缺点, 而且固相萃取可实现操作自动化, 使样品前处理操作更为简便快速。

参考文献

- [1] 明东升, 徐宏喜, 董 辉 等. 药学报, 2000, 35(7): 552~558.
- [2] 邹耀洪, 李桂荣. 分析化学, 1998, 26(5): 531~534.
- [3] 陈继光, 王玫馨, 蔡沛祥 等. 中药材. 1997, 20(1): 23~25.
- [4] 张友胜, 杨伟丽. 中草药, 2001, 32(11): 983~984.
- [5] 傅若农. 国外分析仪器技术与应用, 2000, (4): 1~10.