

高效液相色谱法测定刺苋中芦丁、槲皮素和山奈酚

秦红英, 周光明*, 彭贵龙, 李俊平, 陈军华

发光与实时分析教育部重点实验室 西南大学化学化工学院, 重庆 400715

摘要: 本文建立了以甲醇溶液为萃取剂, 结合超声辅助萃取, 利用高效液相色谱法同时分离测定刺苋中的芦丁、槲皮素和山奈酚三种黄酮的方法。色谱条件为: Phenomenex C₁₈ 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相为甲醇-0.2% 冰醋酸水溶液, 并采用梯度洗脱程序; 流速 1 mL/min; 紫外检测波长 360 nm; 柱温为 35 °C。结果表明该方法对芦丁、槲皮素和山奈酚均在 0.0025 ~ 62.5000 μg/mL 范围内线性关系良好, 相关系数(*r*) 分别为 0.99999、0.99997、0.99999; 最低检测限(S/N=3) 依次为 0.1411 ng/mL, 0.0795 ng/mL, 0.0188 ng/mL, 最低定量限(S/N=10) 依次为 0.4703 ng/mL, 0.2652 ng/mL, 0.0627 ng/mL; 样品回收率为 95.79% ~ 101.41%。本法灵敏度高、定量准确且操作简便, 为刺苋中芦丁、槲皮素和山奈酚的分离检测提供了有效方法。

关键词: 芦丁; 槲皮素; 山奈酚; 超声辅助萃取; 高效液相色谱法; 刺苋

中图分类号: O652.62

文献标识码: A

Determination of Rutin, Quercetin, Kaempferol in *Amaranthus spinosus* L. by High Performance Liquid Chromatography

QIN Hong-ying, ZHOU Guang-ming*, PENG Gui-long, LI Jun-ping, CHEN Jun-hua

Key Laboratory on Luminescence and Real-Time Analysis (Southwest University), Ministry of Education;

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

Abstract: A simple high performance liquid chromatography (HPLC) method was developed for the simultaneous determination of rutin, quercetin, kaempferol in *Amaranthus spinosus* L. using methanol as extractant with ultrasonic assisted extraction. Chromatographic separation was carried out using a Phenomenex C₁₈ column with a gradient elution, the mobile phase was methanol-0.2% acetic acid solution with the UV detection wavelength set at 360 nm and the flow rate of 1.0 mL/min. The linearity range for rutin, quercetin, kaempferol were found to be 0.0025-62.5000 μg/mL, and the correlation coefficients were 0.99999, 0.99997, 0.99999, respectively. The limits of detection (LOD, S/N = 3) were 0.1411 ng/mL, 0.0795 ng/mL, 0.0188 ng/mL, respectively. The limit of quantification (LOQ, S/N = 10) were 0.4703 ng/mL, 0.2652 ng/mL, 0.0627 ng/mL, respectively. Accuracy of the method was checked by conducting recovery studies at three different concentration levels for all the three compounds and the average recoveries were ranged from 95.79% to 101.41%. The developed HPLC method was found to be simple, precise, specific, sensitive and accuracy. It provided a new and scientific mean for routine quality control of *Amaranthus spinosus* L.

Key words: rutin; quercetin; kaempferol; ultrasonic-assisted extraction; high performance liquid chromatography; *Amaranthus spinosus* L.

刺苋为苋科 (*Amaranthaceae*) 苋属 (*Amaranthus* L.) 植物刺苋 (*Amaranthus spinosus* L.) 的全草, 别名刺苋菜、筋苋菜、假苋菜、野苋菜等, 广泛分布于陕西、河南、华东、华南、西南各省份, 性味甘凉, 具有清热解毒、利湿消肿、凉血止血、杀虫疗伤、止痒、止痛等功效, 可用于治疗痢疾、胃出血、胆囊炎、胃肠炎、咽喉肿痛等病症^[1,2]。近年来, 刺苋被广泛应用于

各种疾病中, 并在治疗肾结石、痔疮等方面取得了良好的疗效。现代药理学研究表明, 刺苋富含多种氨基酸和蛋白质, 具有潜在的营养价值^[3], 可作为饮食中膳食蛋白质的潜在来源^[4]; 此外还含有黄酮类、三萜皂苷类、甾醇类等多种活性物质^[5,6], 具有保肝^[7]、抗炎^[8]、退热、抗氧化^[9]、抗疟疾^[10]、抗糖尿病、抗高血脂^[11]、抗消化性溃疡^[12]等药理作用。目前虽已有刺苋中活性成分的测定研究报道, 如 Vijay L 等^[13]报道了高效液相色谱法和高效薄层色谱

法测定刺苋中的芦丁;Stintzing 等^[14]报道了高效液相色谱法质谱联用测定刺苋中的甜菜红素和酚类化合物。但同时分离测定刺苋中芦丁、槲皮素和山奈酚的方法尚未见报道,本研究首次建立了超声辅助萃取,高效液相色谱法分离测定刺苋中三种黄酮的方法。

1 材料、仪器与方法

1.1 材料与试剂

芦丁(MUST-12040302)、槲皮素(MUST-12072505)和山奈酚(MUST-12102503)对照品(纯度均 $\geq 99\%$,上海晶纯实业有限公司);1-丁基-3-甲基咪唑六氟磷酸盐([BMIM]PF₆,纯度 $\geq 99\%$,中科院兰州化学物理研究所);1-辛基-3-甲基咪唑六氟磷酸盐([OMIM]PF₆,纯度 $\geq 99\%$,中科院兰州化学物理研究所);1-己基-3-甲基咪唑六氟磷酸盐([HMIM]PF₆,纯度 $\geq 99\%$,中科院兰州化学物理研究所);甲醇、乙醇、冰醋酸(分析纯,重庆川东化工有限公司化学试剂厂);刺苋原药材购于当地药房(经西南大学周光明教授鉴定)。

1.2 仪器与设备

LC-20AT液相色谱输液泵、SPD-20A紫外检测器、CTO-10AS柱温箱、LC-Solution色谱数据处理系统(日本岛津公司);KH-3200B型超声波清洗器(昆山禾创超声仪器有限公司);TGL-16G高速离心机(上海安亭科学仪器厂);SZ-2自动双重纯化水蒸馏器(上海泸西分析仪器);LIDA pH计(上海理达仪器厂);FA2004A型分析天平。

1.3 实验方法

1.3.1 色谱条件

色谱柱为Phenomenex C₁₈(250 mm×4.6 mm,5 μm)。流动相为0.2%冰醋酸水溶液、甲醇。梯度洗脱程序:0~5 min,40%~60% B;5~10 min,60%~70% B;10~14 min,70% B;14~17 min,70%~40% B。流速:1 mL/min;进样量:20 μL;检测波长:360 nm;柱温:35 ℃。

1.3.2 对照品溶液的配制

对照品溶液的制备:分别精密称取芦丁、槲皮素和山奈酚对照品0.0050 g,甲醇溶解,分别配制成500 μg/mL对照品储备液,避光保存,待用。

混合对照品溶液:分别准确吸取三种对照品储备液适量,用流动相配制成一系列不同浓度的混合

对照品溶液,置于冰箱(4 ℃)内避光保存备用。

1.3.3 供试品溶液的制备

将刺苋药材置于60 ℃干燥至恒重后粉碎,过60目筛(0.5~1.2 mm),干燥条件下保存备用。准确称取0.1 g刺苋粉末,加入6 mL甲醇,浸泡2 h,超声萃取30 min,过滤取滤液,离心10 min(3500 r/min),取上清液经0.22 μm有机滤膜过滤,HPLC进样分析。

1.3.4 精密度实验

精密吸取芦丁、槲皮素和山奈酚的质量浓度分别为12.5 μg/mL的对照品混合液20 μL,按照1.3.1项下的色谱条件进行HPLC分析。重复进样6次,测定各个对照品的峰面积,结果芦丁峰面积RSD为1.53%,槲皮素峰面积RSD为1.90%,山奈酚峰面积RSD为1.77%,表明仪器精密度良好。

1.3.5 稳定性实验

精密吸取1.3.3项下供试品溶液20 μL,在避光条件下,于0、4、8、12、16、20、24 h、48 h分别进样,测定芦丁的峰面积RSD为1.23%,槲皮素的峰面积RSD为0.88%,山奈酚的峰面积RSD为1.12%,表明该方法稳定性良好。

1.3.6 重复性实验

精密称取同一批刺苋样品6份,按照1.3.3项下的方法制备,1.3.1项下的色谱条件测定。结果芦丁峰面积RSD为1.11%,槲皮素峰面积RSD为0.97%,山奈酚峰面积RSD为0.68%,表明该方法重复性良好。

1.3.7 回收率实验

精密称取已知含量的同一批紫苏样品0.1 g 9份,分成三组,每组按照低、中、高三个标准准确加入对照品混合液,按1.3.3项下的方法制备,1.3.1项下的色谱条件测定。芦丁、槲皮素和山奈酚的回收率测定结果见表2。

2 结果与分析

2.1 色谱条件的选择

本实验分别比较了甲醇-水,甲醇-乙酸,乙腈-乙酸三种流动相体系对芦丁、槲皮素、山奈酚三种目标分析物的分离效果。当流动相为甲醇-水体系时,不断调节流动相比比例,芦丁、槲皮素和山奈酚三种目标物组分峰能够完全分离,但槲皮素和山奈酚两种组分峰均存在不同程度拖尾现象。当流动相为甲醇-

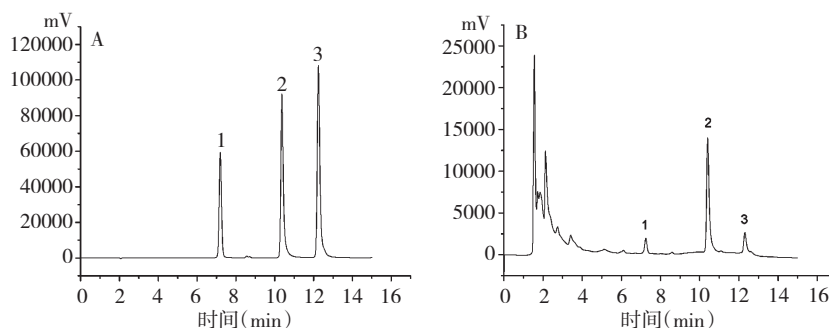
表2 回收率实验结果

Table 2 Recoveries (%) of three compounds

化合物 Compound	样品含量 Original amount (μg)	加入量 Added amount (μg)	测得量 Detected amount (μg)	回收率 Recoveries (%)	RSD (%)
芦丁 Rutin	7.22	6.09	13.05	95.76	0.87
	7.22	7.34	14.46	98.65	1.93
	7.22	8.65	15.83	99.49	1.54
槲皮素 Quercetin	4.08	3.57	7.60	98.60	1.20
	4.08	4.50	8.68	102.30	1.26
	4.08	5.86	9.76	96.98	1.05
山奈酚 Kaempferol	5.58	4.27	9.90	101.14	1.05
	5.58	5.34	10.80	97.80	1.28
	5.58	6.73	12.19	98.18	0.92

乙酸时,在合适的梯度条件下,三种目标物不仅分离度好,且峰形对称性良好。在以乙腈-乙酸为流动相时,不断改变梯度条件,目标分析物峰形和分离度均无明显改善,且乙腈毒性远远大于甲醇,故选择甲

醇-乙酸体系为流动相。在色谱柱允许的 pH 范围内,考察了醋酸比例对峰形的影响,当醋酸比例为 0.2% (V/V) 时,峰形最佳,分离度最好(见图 1A),故最终选择甲醇-0.2% 乙酸体系为流动相。



1-芦丁(rutin);2-槲皮素(quercetin);3-山奈酚(kaempferol)

图1 混合对照品(A)及刺苋样品(B)的HPLC色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of mixed standards (A) and *Amaranthus spinosus* L. sample (B)

2.2 提取溶剂的选择

本实验分别采用离子液体 [BMIM] PF₆、[OMIM] PF₆、[HMIM] PF₆ 以及水、甲醇、乙醇溶液为提取剂,在相同萃取条件下比较对目标分析物的提取效果。结果表明,以离子液体为萃取剂时,三种目标分析物芦丁、槲皮素、山奈酚的提取率均明显下降,且离子液体会影响 HPLC 进样分析时的分离度;当以甲醇溶液作为提取剂时,芦丁、槲皮素、山奈酚的提取率较好,以水、乙醇作提取剂时提取效果均不如甲醇,故最终选择甲醇作为提取剂。此外,本实验还考察了不同浸泡时间对提取效果的影响,通过浸泡不同时间后提取分析比较,表明浸泡 2 h 提取效果最佳。

2.3 固液比的选择

为了得到最佳的提取效果,本实验考察了不同

的固液比对刺苋中芦丁、槲皮素和山奈酚三种目标分析物提取率的影响。当固液比分别为 1:20、1:40、1:60、1:80、1:100 g/mL 时,当固液比未达到 1:60 g/mL 时,三种目标分析物的提取率随着固液比的减小而显著提高,继续减小时三种目标分析物的提取率无明显变化,因此,本实验以 1:60 g/mL 为最佳固液比(见图 2)。

2.4 线性关系的考察

分别精密量取 1.3.2 项下的混合对照品溶液,用甲醇稀释至不同浓度。从低浓度到高浓度,依次进样,每个浓度进样三次,进样量 20 μL ,按 1.3.1 项下的色谱条件进行 HPLC 分析,以峰面积(Y)为纵坐标,对照品质量浓度(X)为横坐标,进行线性回归。回归方程、相关系数和线性范围见表 1。

表1 线性关系实验结果($n=3$)Table 1 Regression equations, linear range, LODs and LOQs($n=3$)

化合物 Compound	线性方程 Linear equation	线性范围 Linear range ($\mu\text{g/mL}$)	相关系数 Correlation coefficient	最低检测限 LOD (ng/mL)	最低定量限 LOQ (ng/mL)
芦丁(rutin)	$Y = 3937.13 + 39687.33X$	0.0025-62.5	0.99999	0.1411	0.4703
槲皮素(quercetin)	$Y = -14423.31 + 74767.48X$	0.0025-62.5	0.99997	0.0795	0.2652
山奈酚(kaempferol)	$Y = 6456.01 + 87013.60X$	0.0025-62.5	0.99999	0.0188	0.0627

2.5 样品含量的测定

取同一批刺苋样品3份,按照1.3.3项下方法

制备,1.3.1项下色谱条件测定,样品含量测定结果见表2。记录刺苋样品色谱图,见图1(B)。

表2 样品含量测定结果($\mu\text{g/g}$, $n=3$)Table 2 Determination result of content of samples($\mu\text{g/g}$, $n=3$)

化合物 Compound	样品1(RSD) Sample 1 (RSD)	样品2(RSD) Sample 2 (RSD)	样品3(RSD) Sample 3 (RSD)
芦丁 Rutin	7.68(0.94)	7.15(1.11)	7.50(1.60)
槲皮素 Quercetin	4.31(1.33)	3.79(1.29)	4.54(1.45)
山奈酚 Kaempferol	5.80(1.72)	5.76(1.37)	5.28(1.91)

3 结论

实验首次提出了以甲醇溶液为萃取剂,结合超声辅助对刺苋中的芦丁、槲皮素、山奈酚进行有效提取,高效液相色谱测定。在优化的最佳实验条件下,三种有效成分萃取率高,分离完全。该方法操作简便、定量准确、分离效果良好,为刺苋中有效生物活性成分的提取检测提供了一种新的科学方法。

参考文献

- 1 Editorial board of Chinese Materia Medica(中华本草编辑委员会). Chinese Materia Medica(中华本草). Shanghai: Shanghai Scientific & Technical Publishers, 1999. Vol II, 846.
- 2 Liao L(廖里), Zheng ZW(郑作文). Pharmacological studies of *Amaranthus spinosus* L. *J Guangxi Coll TCM* (广西中医学院学报), 1999, 16:107-109.
- 3 Srivastava R. Nutritional quality of some cultivated and wild species of *Amaranthus* L. *Int J Pharm Sci Res*, 2011, 2:3152-3156.
- 4 Adewolu MA, Adamson AA. *Amaranthus spinosus* leaf meal as potential dietary protein source in the practical diets for *Clarias gariepinus*, Burchell, 1822, fingerlings. *Int J Zool Res*, 2011, 7:128-137.
- 5 Balakrishnan S, Natarajan B, Arumugam B, et al. Pharmacognostical evaluation of *Amaranthus spinosus* L. *Phcog J*, 2011, 3(19):13-18.
- 6 Mishra SB, Verma A, Mukerjee A, et al. Pharmacognostic

standardization and phytochemical screening of leaves of *Amaranthus spinosus* L. *Phcog J*, 2011, 3(26):34-38.

- 7 Zeashan H, Amresh G, Singh S, et al. Hepatoprotective activity of *Amaranthus spinosus* in experimental animals. *Food Chem Toxicol*, 2008, 46:3417-3421.
- 8 Olajide OA, Ogunleye BR, Erinle TO. Anti-inflammatory properties of *Amaranthus spinosus* leaf extract. *Pharm Biol*, 2004, 42:521-525.
- 9 Kumar BSA, Lakshman K, Jayaveera KN, et al. Antioxidant and antipyretic properties of methanolic extract of *Amaranthus spinosus* leaves. *Asian Pac J Trop Med*, 2010, 9:702-706.
- 10 Hilou A, Nacoulma OG, Guiguemde TR. *In vivo* antimalarial activities of extracts from *Amaranthus spinosus* L. and *Boerhaavia erecta* L. in mice. *J Ethnopharmacol*, 2006, 103:236-240.
- 11 Sangameswaran B, Jayakar B. Anti-diabetic, anti-hyperlipidemic and spermatogenic effects of *Amaranthus spinosus* Linn. on streptozotocin-induced diabetic rats. *J Nat Med*, 2008, 62:79-82.
- 12 Ghosh D, Mitra P, Ghosh T, et al. Anti peptic ulcer activity of the leaves of *Amaranthus spinosus* L. in rats. *Mint J Pharm Med Sci*, 2013, 2(3):52-53.
- 13 Suryavanshi VL, Sathe PA, Vaidya VV, et al. RP-LC determination of rutin in *Amaranthus spinosus* Linn. whole plant powder. *Chromatographia*, 2008, 67:189-192.
- 14 Stintzing FC, Kammerer D, Schieber A, et al. Betacyanins and phenolic compounds from *Amaranthus spinosus* L. and *Boerhaavia erecta* L. *Z Naturforsch, C: Biosci*, 2004, 59(1-2):1-8.