

二极管阵列反相高效液相色谱法测定松针提取物中二氢槲皮素含量的研究

张剑峰,陈彦凤,孙艳芳,刘静晶,金洪伟

(黑龙江省疾病预防控制中心,哈尔滨 150030)

摘要 目的: 建立一种采用反相高效液相色谱测定松针提取物中二氢槲皮素含量的测定方法。方法: 样品中的二氢槲皮素经甲醇提取、C₁₈反相液相色谱柱分离,在波长 290 nm 处检测。结果: 二氢槲皮素 5 μg/ml ~ 200 μg/ml 范围内呈良好线形,相关系数 $r=0.99998$,检出限为 0.2 μg/ml。平均回收率为 97.1%,RSD 为 1.0% ~ 1.2%。结论: 本方法操作简单,准确可靠,可用于检测松针提取物保健食品中的二氢槲皮素含量。

关键词 松针提取物; 二氢槲皮素; 反相高效液相色谱

中图分类号 O657.7+2 **文献标识码** A **文章编号** 1004-8685(2011)09-2167-02

Determination of dihydroquercetin in matsuba extraction by RP-HPLC-PCAD

ZHANG Jian-feng, CHEN Yan-feng, SUN Yan-fang, LIU Jing-jing, JIN Hong-wei

(Heilongjiang Provincial Center for Disease Control and Prevention, Harbin 150030, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a RP-HPLC method for detection of dihydroquercetin in matsuba extraction. **Methods:** Dihydroquercetin in samples were purified with methanol, separated by C₁₈ reversed phase column, and detected at wavelength of 290 nm. **Results:** The dihydroquercetin was shown to be linear in the range from 5 μg/ml to 200 μg/ml ($r=0.99998$), the limit of detection was 0.2 μg/ml. The recovery of the method was 97.1%, RSD was 1.0% ~ 1.2%. **Conclusion:** The method is simple, rapid, accurate and reliable, which could be used for detection of dihydroquercetin content in health food of matsuba extraction.

[Key words] Matsuba extraction; Dihydroquercetin; RP-HPLC

二氢槲皮素(Dihydroquercetin)属于二氢黄酮醇类,具有黄酮类化合物的生物活性,如抗氧化、抗病毒、抗菌、舒张血管等作用^[1],具有极大的研发价值和广阔的市场前景。目前国内主要以落叶松锯末、松针等为原料提取高纯度的二氢槲皮素^[2-4],但在保健食品及药品中使用的二氢槲皮素尚无国家标准检测方法和限量添加标准。本文旨在建立方便快捷的测定松针提取物中二氢槲皮素含量的高效液相色谱方法,为二氢槲皮素的科学研究、国家检测标准和限量标准的制定提供依据。

1 材料与方 法

1.1 仪器

Waters 2695 高效液相色谱仪(waters 公司),waters 2996 二极管阵列检测器(waters 公司);超声波清洗仪;纯水机。

1.2 试剂

甲醇(色谱纯),二氢槲皮素标准品(俄罗斯阿梅季斯,纯度>99.8%)。

松针提取物样品来自黑龙江省某保健品生产商。

1.3 液相色谱参考条件

色谱柱: DiamonsilTM(钻石) C₁₈柱(5 μ,150×4.6 mm);流

动相: 甲醇+0.3%冰乙酸=45%+55%;流速 1.0 ml/min;检测波长: 290 nm;进样量 10 μl;柱温 25℃。

1.4 标准曲线的配制

精密称量二氢槲皮素标准品 0.02000 g,加甲醇溶解并定容至 100 ml,分别准确移取 0.25 ml,0.5 ml,1.0 ml,2.5 ml,5.0 ml,10.0 ml 于 10 ml 容量瓶中用甲醇稀释到刻度,既得浓度为 5.0 μg/ml,10.0 μg/ml,20.0 μg/ml,50.0 μg/ml,100.0 μg/ml,200.0 μg/ml 标准系列。

1.5 试样制备及测定

准确称量松针提取物 0.0100 g,加适量甲醇溶解并移入 100 ml 容量瓶,超声 5 min,放至室温后加甲醇定容至刻度,过 0.45 μm 滤膜,供进样测定。

2 结果与讨论

2.1 检测波长的确定

用二极管阵列检测器在 200 nm~400 nm 下对标准溶液进行扫描,发现其在 289.1 nm 处有最大吸收(图 1),故选择 290 nm 为二氢槲皮素的测定波长。

2.2 流动相的选择

比较研究了不同体积比的甲醇/冰乙酸(0.3%)体系对二氢槲皮素的分离效果,在保证二氢槲皮素能够达到基线分离的条件下,流动相中甲醇体积百分比为 45%时,二氢槲皮素的保留时间最少。测定结果见图 2,图 3。

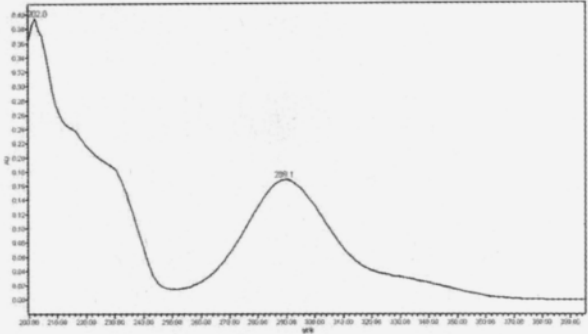


图 1 二氢槲皮素标准溶液扫描光谱图

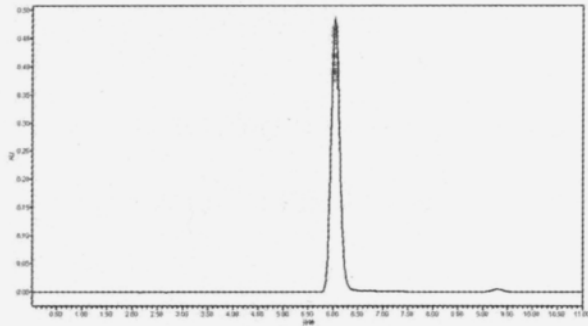


图 2 标准谱图

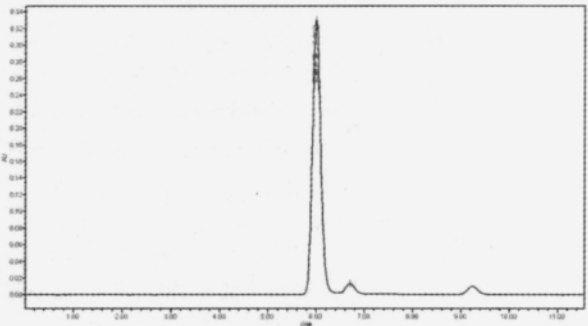


图 3 样品谱图

2.3 线性范围和最低检出限

在规定的色谱条件下,对二氢槲皮素标准系列溶液进行测定,在 5 μg/ml ~ 200 μg/ml 范围内具有良好的线性关系,回归方程是 $Y = 27057.29X + 13405.99$,相关系数 $r = 0.99998$,以 3 倍信噪比计,检出限为 0.2 μg/ml。

2.4 精密度试验

选择单一浓度的二氢槲皮素标准品溶液和松针提取物溶液按上述色谱条件进行检测,分别连续进样 6 次,标准品和松针提取物溶液的二氢槲皮素峰面积 RSD 分别为 1.0% 和 1.2%,结果显示本试验精密度较高。

2.5 稳定性试验

取松针提取物溶液,室温放置,每隔 1 h(共 6 h)按上述色谱条件进样检测峰面积,RSD 为 2.5% ($n = 7$),表明松针提取物溶液二氢槲皮素含量在 6 h 内稳定。

2.6 加标回收试验

准确量取已知二氢槲皮素含量的松针提取物溶液 2.0 ml, 5.0 ml 各 3 份,置于 10 ml 容量瓶中,分别加入不同体积的二氢槲皮素标准品储备液,加甲醇定容至刻度,超声混匀后按上述色谱条件进行检测,其回收率见表 1。

表 1 二氢槲皮素加标回收率试验结果($n = 6$)

样品体积 (ml)	样品含量 (mg)	标准品体积 (ml)	标准品含量 (mg)	理论值 (mg)	平均测定值 (mg)	平均回收率 (%)	RSD (%)
2.0	0.18	1.0	0.20	0.38	0.36	94.7	2.5
2.0	0.18	2.0	0.40	0.58	0.56	96.6	2.3
2.0	0.18	3.0	0.60	0.78	0.75	96.2	2.0
5.0	0.45	4.0	0.80	1.25	1.22	97.6	2.1
5.0	0.45	5.0	1.00	1.45	1.43	98.6	2.0
5.0	0.45	6.0	1.20	1.65	1.63	98.8	1.8

2.7 样品含量测定

取不同批次的松针提取物按照上述方法制备样品溶液并进行检测,按照外标法(以峰面积计)计算二氢槲皮素的含量。结果见表 2。

表 2 松针提取物中二氢槲皮素含量的测定结果($n = 3$)

生产批次	二氢槲皮素含量(%)
20101008	90.0
20101018	90.5
20101028	91.2

3 结论

本文所建立松针提取物中二氢槲皮素的二极管阵列反相高效液相色谱方法操作简单,线性范围宽,检出限低,精密度和准确度高,可以满足对二氢槲皮素定量分析的要求,适用于相关保健食品及药品中二氢槲皮素含量的测定。

参考文献

[1] 全瑶瑶,王文艳,张林琪,等. HPLC - MS/MS 法测花旗松素在 Beagle 犬血浆中的浓度及其药代动力学研究 [J]. 质谱学报, 2004, 30(增刊): 116 - 117.

[2] 金建忠,申屠超. 落叶松中二氢槲皮素的提取及鉴定 [J]. 浙江林业科技, 2004, 24(5): 15 - 17.

[3] 王宇,王遂. RP - HPLC 法测定落叶松中二氢槲皮素的含量 [J]. 化学工程师, 2009, 166(2): 22 - 24.

[4] 樊铁波,刘红煜,汤青,等. HPLC 法测定松针中二氢槲皮素含量 [J]. 中国药师, 2009, 12(8): 1046 - 1048.

(收稿日期: 2011 - 05 - 25)