

微柱高效液相色谱法测定葛根中的几种黄酮类成分

杨亚玲^{*2}, 胡秋芬^{1,2}, 杨国荣², 林 强², 缪明明², 杨光宇¹

(1. 云南大学化学系, 昆明 650091; 2. 昆明理工大学化学学院, 昆明 650224)

摘 要:研究了用微柱高效液相色谱法测定葛根中的四种黄酮类成分。样品中的黄酮用甲醇超声振荡提取, 然后用 Waters XterraTM RP₁₈ (50 × 1.0 mm, 3.5 μm) 微柱吸附, 以 1 % 的乙酸溶液和甲醇为流动相梯度洗脱分离, 用紫外二极管阵列检测器检测, 结果满意。

关键词:微柱高效液相色谱; 固相萃取; 葛根; 黄酮

中图分类号:O657.7⁺2

文献标识码:A

葛根是卫生部颁布的药用植物之一。葛根中主要有效成分是葛根素、大豆甙元、大豆甙和 4',7-二葡萄糖基大豆甙元等黄酮类物质, 因此测定葛根中的黄酮类物质具有一定的意义。高效液相色谱法是测定葛根黄酮最常用的方法。由于微柱高效液相色谱具有流动相消耗小, 分析时间短, 可不分流直接与质谱联用等特点, 近几年来得到了迅速发展。本文提出了用微柱高效液相色谱分析葛根中黄酮类成分的方法, 葛根中四种主要黄酮成分在 5 min 内可达到基线分离。

1 实验部分

1.1 主要仪器与试剂

美国 Waters 公司 Alliance 高效液相色谱仪, 包括 2690 分离系统(四元泵、柱温箱及自动进样器), 996 紫外二极管阵列检测器, Millennium 色谱管理软件。

葛根素, 大豆甙元, 大豆甙和 4',7-二葡萄糖基大豆甙元标样(分别购于 Fluka 公司和美国 CHROMA-DEX 公司, 含量 > 95 %); 甲醇为高效液相色谱专用(Fisher 公司); 水为石英亚沸蒸馏水并用 Milli-Q50 (美国 Millipore 公司)超纯水器处理, 电阻 $\geq 18 \Omega \cdot \text{cm}^{-1}$ 。

1.2 色谱条件

色谱柱为 Waters XterraTM RP₁₈ (50 × 1.0 mm, 3.5 μm), 固相萃取柱为 Waters Sep-Pak-C₁₈ 固相萃取小柱(1 cc, 30 mg, 30 μm); 流动相为: A, 甲醇; B, 1 % 乙酸溶液, 按 0 min (A 30 % + B 70 %), 2.5 min (A 50 % + B 50 %), 4.0 min (A 80 % + B 20 %), 5 min (A 30 % + B 70 %) 的线性梯度条件, 平衡 5 min 后进下一个样, 流速为 0.15 mL/min, 进样体积 2 μL, 检测波长为 250 nm。在上述色谱条件下, 4',7-二葡萄糖基大豆甙元、葛根素、大豆甙元和大豆甙的保留时间分别为: 1.412、2.024、2.725 和 3.853 min。

1.3 样品处理

样品粉碎后过 80 目筛, 准确称取约 0.200 g, 加入 45 mL 甲醇超声振荡浸取 45 min, 过滤并用甲醇定容到 50 mL, 取 5 mL 滤液, 以 10 mL/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 3 mL 溶液, 收集后面的 2 mL 溶液, 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 色谱测定条件

葛根黄酮用甲醇和 1 % 乙酸溶液梯度洗脱具有较好的分离效果, 实验表明按 0 min (A 30 % + B

70 %) ,2.5 min(A 50 % + B 50 %) , 4.0 min(A 80 % + B 20 %) 的线性梯度条件可使样品中的待测组分达到基线分离且分离时间短 ,因此实验选用该流动相。

由于各黄酮均在 250 nm 左右有较大吸收 ,因此实验择检测波长为 250 nm。

2.2 样品前处理

黄酮类物质在甲醇中溶解性较好 ,故实验选用甲醇为提取溶剂。实验表明 ,用 45 mL 甲醇超声振荡萃取 45 min 左右 ,能使样品中的黄酮类成分完全提取出 ,实验选用 45 mL 甲醇超声浸取 45 min。

葛根中除含有黄酮类物质外 ,还含有少量油脂类、蜡质等弱极性物质。该类物质在实验的流动相条件下不能完全洗脱 ,在色谱柱上残留积累。因此实验采用固相萃取来分离样品提取液中的脂类、蜡质等弱极性物质。样品甲醇提取液通过 Waters Sep- Pak-C₁₈ 小柱可让弱极性脂类、蜡质等物质保留在小柱上 ,而黄酮类物质在小柱上不保留 ,这样可快速地达到样品预分离。

2.3 回归方程、相关系数及检出限

分别配制浓度为 0.16、0.8、4.0、20、100 μg/ mL 的标准溶液 ,进样后根据不同浓度 (mg/ mL) 的峰面积 (A) 计算出回归方程 ,结果见表 1。根据信噪比 S/ N = 3 ,得到各组分的检出限 ,结果见表 1。

Table 1 Regression equation, coefficient and detection limit			
Components	Regression equation	Correlation coefficient	Detection limit (ng/ mL)
4',7-diglucosyl daidzein	$c = 1.97 \times 10^{-7} A - 0.001\ 12$	0.9992	8
Puerarin	$c = 1.82 \times 10^{-7} A + 0.001\ 18$	0.9993	6
Daidzein	$c = 1.72 \times 10^{-7} A + 0.001\ 63$	0.991	5
Daidzin	$c = 1.85 \times 10^{-7} A + 0.001\ 47$	0.9994	6

2.4 样品分析

用建立的方法测定了四种葛根样品 (昆明植物研究所提供) 中黄酮含量。样品烘干后粉碎 ,过 80 目筛 ,测定时每个样品准确称取相同的两份 ,其中一份为基准 ,另一份加入 10 mg 的各黄酮标样 ,然后按 1.3 样品前处理的方法提取 ,每个样品平行测定 5 次 ,计算回收率 ,并计算相对标准偏差 ,各黄酮标准回收率在 97 % ~ 102 % 之间 ,相对标准偏差在 1.6 % ~ 2.3 % 之间。

Determination of Flavonoid in Pueraria Lobata by Microcolumn High Performance Liquid Chromatography

YANG Ya-ling^{*2} , HU Qiu-fen^{1,2} , YANG Guo-rong² , L IN Qiang²
MIAO Ming-ming² , YANG Guang-yu¹

(1. Department of Chemistry , Yunnan University , Kunming 650091 ;

2. Biologic and Chemical Engineering , Kunming University of Technology , Kunming 650024)