

反相高效液相色谱法 测定罗布麻叶中槲皮素和山萘酚

范维刚

(新疆计量测试研究院理化测试中心, 乌鲁木齐 830011)

摘 要: 采用反相高效液相色谱法(RP-HPLC)测定了罗布麻叶中槲皮素和山萘酚。色谱柱为 Nova-pak C₁₈ (15 cm ×4.6 mm i. d.), 流动相为 A. 甲醇、B. 1 % 乙酸, 流速为 0.6 mL/min, 检测波长为 360 nm。槲皮素在 0.0137~0.136 μg、山萘酚在 0.0053~0.0265 μg 范围内与峰面积呈良好的线性关系。相关系数分别为 0.9998 和 0.9980。槲皮素的回收率为 99.6 %, RSD 为 0.97 %; 山萘酚的回收率为 98.2 %, RSD 为 2.0 %。方法可用于罗布麻叶中槲皮素和山萘酚的测定。

关键词: 罗布麻叶; 槲皮素; 山萘酚; 反相高效液相色谱法

中图分类号: O657.7

文献标识码: A

文章编号: 1000-0720(2008)08-052-03

罗布麻又叫野麻、茶叶花, 分为红麻、白麻两种, 属夹竹桃科(Apocynum)多年生半灌木。因最早发现于新疆罗布泊, 故命名为罗布麻^[1, 2]。罗布麻内含黄酮类化合物、强心苷、生物碱、氨基酸和多种微量元素(如: K、Ca、Fe、Zn 等), 对预防和治疗高血压、高血脂、冠心病、哮喘病、气管炎等疾病有较好的效果^[3, 4]。黄酮类化合物具有维持血管正常的渗透压、防止血管脆化的生理作用, 对多种炎症、冠心病、心绞痛等均有良好疗效^[5]。目前对其测定方法主要有分光光度法、高效液相色谱法、薄层色谱法等^[6]。罗布麻叶中含有芦丁、槲皮素、山萘酚等黄酮类物质, 本文采用 C₁₈ 柱和二极管阵列检测器梯度洗脱, 建立了测定罗布麻叶中槲皮素和山萘酚的反相高效液相色谱方法。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Agilent HP1100 型高效液相系统, 配有二极管阵列检测器、四元梯度泵、真空脱气机、自动进样器、柱温箱、HP 化学工作站; 索氏提取器。

槲皮素和山萘酚(纯度 50 %)对照品: 中国药品生物制品检定所, 甲醇为色谱纯, 乙酸和乙醚均为分析纯, 罗布麻叶: 采于新疆库尔勒。

1.2 色谱条件

Nova-pak 色谱柱(15 cm ×4.6 mm i. d.) 为大连化物所制, 流动相为 A. 甲醇、B. 1 % 乙酸, 梯度洗脱, 洗脱程序见表 1; 流速为 0.6 mL/min, 检测波长为 360 nm, 参比波长为 480 nm, 柱温为 25 °C。色谱图见图 1 和图 2。

表 1 流动相梯度洗脱程序

Tab. 1 Gradient elution program of mobile phase

t/min	V(1 % CH ₃ COOH)	:	V(MeOH)
0	60		40
5	60		40
18	40		60
20	40		60
25	60		40
30	60		40

1.3 操作步骤

1.3.1 样品提取方法的选择 比较了索氏提取法、浸提法、超声法, 发现索氏提取法提取的最完全。因为乙醚脱脂比石油醚完全, 所以首先用乙醚脱脂, 然后用甲醇提取。

* 收稿日期: 2007-04-10; 修订日期: 2007-06-28

作者简介: 范维刚 (1976 -), 男, 工程师; E-mail: fan_weigang2004@yahoo.com.cn.

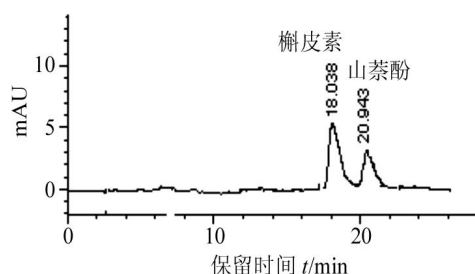


图 1 槲皮素和山萘酚对照品溶液色谱图

Fig. 1 Chromatograms of quercetin and kaempferol standards

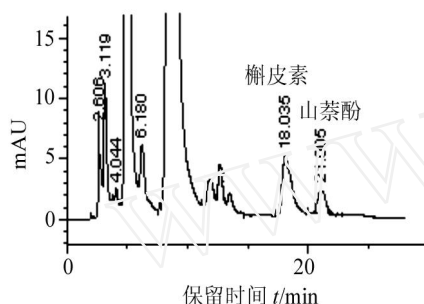


图 2 槲皮素和山萘酚样品溶液色谱图

Fig. 2 Chromatograms of quercetin and kaempferol samples

1.3.2 样品提取溶剂的选择 黄酮类物质可以被乙酸乙酯、甲醇、乙醇所提取,比较了这几种溶剂,发现乙酸乙酯提取不完全,甲醇和乙醇提取完全,但是乙醇提取的杂质较多,所以选用甲醇作为提取溶剂。

1.3.3 对照品溶液的配制 槲皮素对照品溶液 (0.34 g/L): 准确称取 0.0034 g 槲皮素,用甲醇溶解并定容于 10 mL 容量瓶中,然后准确吸取 1 mL,再用甲醇定容于 10 mL 的容量瓶中,摇匀待用。浓度为 34 mg/L。

山萘酚对照品溶液 (0.265 g/L): 准确称取 0.0053 g 纯度为 50 % 的山萘酚,用甲醇溶解并定容于 10 mL 容量瓶中,然后准确吸取 1 mL,再用甲醇定容于 10 mL 的容量瓶中,摇匀待用。浓度为 26.5 mg/L。

1.3.4 样品制备 将罗布麻叶干燥并粉碎,准确称取罗布麻叶 2.0 g。先将包好的罗布麻叶用乙醚在索氏提取器中完全脱脂,然后用无水甲醇回流提取至无色,冷却后用甲醇定容于 50 mL 容量瓶中,待测。进样前用 0.45 μ m 微孔滤膜过滤。

2 结果与讨论

2.1 测定波长和流动相的选择

槲皮素和山萘酚在 210、257、360 nm 有较大吸收,但是为了不受其它物质的干扰,选了 360 nm 为检测波长;用一定比例的甲醇与水作为流动相达不到很好的分离效果,因而选用梯度使其它组分分离。另外有拖尾现象,这主要是因为黄酮苷元的酚羟基产生电离,因此加入了乙酸来改善峰形,其体积分数为 1 %。

2.2 标准曲线及检出限

准确吸取 34 μ g/mL 的槲皮素对照品溶液 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 μ L, 注入色谱仪进行测定。以进样量 (m) 为横坐标,峰面积 (Y) 为纵坐标绘制标准曲线。得到回归方程: $Y = 8921.2m - 10.866$, 相关系数为 0.9998, 进样量在 0.0137~0.136 μ g 范围内线性关系良好。检出限为 1.36 ng。

准确吸取 26.5 μ g/mL 的山萘酚对照品溶液 0.2, 0.3, 0.5, 0.75, 1.0 μ L, 注入色谱仪进行测定。以进样量 (m) 为横坐标,峰面积 (Y) 为纵坐标绘制标准曲线。得到回归方程: $Y = 7692.5m - 1.1424$, 相关系数为 0.9980, 进样量在 0.0053~0.0265 μ g 范围内线性关系良好。检出限为 1.06 ng。

2.3 稳定性的测定

取上述对照品溶液,每隔 2 h 按上述色谱条件测定峰面积,结果表明在 24 h 内基本稳定。

2.4 精密度的测定

取上述对照品溶液 10 μ L, 连续重复进样 6 次,按上述色谱条件测定峰面积值,结果槲皮素 RSD 为 0.75 %, 山萘酚 RSD 为 0.94 %, 表明本方法在此条件下精密度良好。

2.5 重复性的测定

取 1 号样品溶液 10 μ L, 在相同色谱条件下,测定槲皮素、山萘酚,重现性良好, RSD 分别为 0.45 %、0.56 %。

2.6 回收率的测定

取已知量的样品溶液 3 份,准确加入一定量的对照品溶液,按色谱条件测定,并计算回收率,结果见表 2。

2.7 样品测定

分别移取样品溶液 10 μ L, 注入高效液相色谱仪,在 360 nm 处测定峰面积,根据线性回归方程,计算罗布麻叶槲皮素和山萘酚的质量分数,结果见表 3。

表 2 回收率实验 ($n = 5$)

Tab. 2 Recovery test of quercetin and kaempferol

	样品编号	已知量 $m/\mu\text{g}$	加入量 $m/\mu\text{g}$	测定值 $m/\mu\text{g}$	回收率/ %	RSD/ %
槲皮素	1	0.04269	0.068	0.1106	99.8	0.97
	2	0.04269	0.068	0.1110	100.5	
	3	0.04269	0.068	0.1098	98.6	
山萘酚	1	0.006973	0.006625	0.01343	97.5	2.0
	2	0.006973	0.006625	0.01339	96.7	
	3	0.006973	0.006625	0.01363	100.5	

表 3 样品分析结果

Tab. 3 Content of quercetin and kaempferol in *Apocynum venetum* L.

	样品号	样品量 m/g	测定值 $w/(\text{mg}/\text{g})$	平均值 $w/(\text{mg}/\text{g})$
槲皮素	1	2.0068	0.126	0.123
	2	2.0209	0.121	
	3	2.0137	0.124	
山萘酚	1	2.0068	0.027	0.026
	2	2.0209	0.026	
	3	2.0137	0.026	

参考文献

- [1] 中国科学院植物志编委会. 中国志(第 63 卷). 北京: 科学出版社, 1977. 87
- [2] 方学良. 植物生态学与地植物学学报, 1986, 10(1): 52
- [3] 张振杰. 中草药通讯, 1974(1): 21
- [4] 邢声远. 北京纺织, 2000, 22(2): 15
- [5] 南京药学院. 药物化学. 北京: 人民卫生出版社, 1978. 102
- [6] 刘金旗. 中草药, 2002, 9(4): 611

Determination of quercetin and kaempferol in *Apocynum venetum* L. by reversed-phase high performance liquid chromatography

FAN Wei-gang (Physics Chemistry Detecting Center, Xinjiang Research Institute of Measurement and Testing, Urumqi 830011), Fenxi Shiyanshi, 2008, 27(8): 52~54

Abstract: A method for determining quercetin and kaempferol in *Apocynum venetum* L. by RP-HPLC was described. The determination was carried out on a Nova-pak C_{18} column (15 cm $\times$ 4.6 mm) at room temperature. 1% CH_3COOH and MeOH was used as the mobile phase at a flow rate of 0.6 mL/min and detection wavelength was set at 370 nm. The calibration curves were linear in the concentration range of 0.0137~0.136 μg for quercetin and 0.0053~0.0265 μg for kaempferol. Correlation coefficients of quercetin and kaempferol were 0.9998 and 0.9980 respectively. The recoveries of quercetin and kaempferol were 99.6% (RSD = 0.97%, $n = 3$) and 98.2% (RSD = 2.04%, $n = 3$) respectively. This method is simple, specific and accurate for monitoring concentrations of quercetin and kaempferol in *Apocynum venetum* L.

Key words: *Apocynum venetum* L.; Quercetin; Kaempferol; Reversed-phase high performance liquid chromatography