

HPLC 法测定芦笋茎秆中芦丁、槲皮素及白藜芦醇含量

姚红娟¹, 周长生², 刘秀河^{1*}, 王君¹, 孙德林², 韩娇霞²

1. 齐鲁工业大学, 济南 250353;

2. 菏泽巨鑫源食品有限公司, 山东 菏泽 274415

摘要: 为了建立高效液相色谱法对芦笋茎秆中芦丁、槲皮素和白藜芦醇含量的测定方法。采用不同方法提取芦笋茎秆中的芦丁、槲皮素和白藜芦醇, 得出甲醇法提取芦丁、甲醇-HCl 法提取槲皮素以及乙醇法提取白藜芦醇得率最高; 确定了高效液相色谱法对 3 种物质的最佳色谱条件为流动相: 芦丁为 0.2 mol/L 乙酸钠-甲醇 (Me-OH:H₂O=35:65) 溶液 (用磷酸调 pH 2.80)、槲皮素为无水甲醇-0.4% 磷酸溶液 (55:45, V/V), 等梯度洗脱, 白藜芦醇为水和甲醇, 二元线性梯度洗脱; 检测波长分别为: 254 nm、360 nm 和 306 nm; 流速: 0.8 mL/min、1.0 mL/min、0.8 mL/min。通过该方法测得芦丁、槲皮素及白藜芦醇的平均回收率分别为: 98%、97%、98%。

关键词: 芦笋茎秆; 芦丁; 槲皮素; 白藜芦醇; 高效液相色谱

DOI: 10.3969/j.issn.2095-2341.2016.06.14

HPLC Determination of Rutin, Quercetin and Resveratrol Content in Asparagus Stems

YAO Hong-juan¹, ZHOU Chang-sheng², LIU Xiu-he^{1*}, WANG Jun¹, SUN De-lin², HAN Jiao-xia²

1. Qilu University of Technology, Jinan 250353, China;

2. Heze Juxinyuan Food Company, Shandong Heze 274415, China

Abstract: In order to establish a HPLC method to determinate its content of rutin, quercetin and resveratrol. The study used different methods to extract rutin, quercetin and resveratrol from asparagus stems, the results showed that methanol, methanol-HCl and ethanol had the best extraction rate for rutin, quercetin and resveratrol extraction. And it chose the optimum chromatographic conditions of HPLC method: The mobile phases of rutin and quercetin were 0.2 mol/L sodium acetate-methanol (Me-OH:H₂O=35:65) solution (pH 2.80 adjusted with phosphoric acid), anhydrous methanol-0.4% phosphoric acid solution (55:45, V/V), isocratic elution, and resveratrol mobile phase was water and methanol, binary linear gradient elution, respectively. Their detection wavelength was 254 nm, 360 nm and 306 nm, and velocity of flow was 0.8 mL/min, 1.0 mL/min and 0.8 mL/min. The average recoveries of rutin, quercetin and resveratrol were 98%, 97% and 98%.

Key words: asparagus stems; rutin; quercetin; resveratrol; HPLC

芦笋俗称石刁柏, 含有丰富的蛋白质、脂肪、碳水化合物、氨基酸, 具有防癌抗癌、降血压血脂、排毒利尿、健肾、增强免疫力等功效^[1-3], 其营养价值和保健价值是其他蔬菜和水果的几十倍甚至几十倍, 被世界卫生组织定为“世界十大蔬菜之首”, 已开发出芦笋罐头、芦笋酒、芦笋茶、芦笋饮料、芦笋调料、芦笋药品、芦笋保健品等产品。但

大量的芦笋茎秆被当作废弃物丢掉, 造成了资源的极大浪费。有资料显示, 芦笋茎秆中含有丰富的芦丁、槲皮素等黄酮类物质、皂苷及白藜芦醇等。其中, 芦丁是维生素 P 的重要组成部分, 具有增强血管抵抗力、降低其通透性等作用^[4], 同时可以祛痰、抗炎及治疗糖尿病型白内障^[5]。槲皮素多以甙的形式存在, 具有较好的化痰止咳功

收稿日期: 2016-01-19; 接受日期: 2016-05-24

作者简介: 姚红娟, 硕士研究生, 研究方向为食品质量与安全。E-mail: YQK0606@163.com。* 通信作者: 刘秀河, 教授, 研究方向为食品质量与安全。E-mail: liuxh661188@163.com

效^[6],同时,对于冠心病、高血压有一定的治疗作用^[7]。此外,芦笋茎秆中含有的白藜芦醇,属于植物体内用于抵抗病原侵染的多酚物质,具有多种生物活性^[8],除可以保护心血管系统、减少血小板凝集、延缓衰老外,还是预防癌症的天然药物^[9-11]。

近年来,国内外对于芦丁、槲皮素和白藜芦醇的分析方法的研究有很多,主要有紫外分光光度法、HPLC法等^[12-14],但关于芦笋茎秆中芦丁、槲皮素和白藜芦醇的测定方法研究鲜有报道。本文采用不同的方法提取了芦笋茎秆中的芦丁、槲皮素和白藜芦醇等营养成分,并建立了HPLC测定方法,以期建立更精确简便的测量方法提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

实验材料:芦笋茎秆来源于菏泽巨鑫源食品有限公司芦笋基地,经洗涤、烘干、切断、粉碎和过筛(40目)处理,贮存于干燥器内待用;试剂:芦丁对照品(东京化成工业株式会社)、槲皮素对照品(SIGMA-ALDRICH)、白藜芦醇对照品(上海同田生物对照品)、甲醇(色谱纯)、乙醇、乙酸钠、盐酸、磷酸均为分析纯,实验用水为二次去离子水。

1.2 仪器与设备

LC-20A 高效液相色谱仪(日本岛津),紫外检测器;恒温水浴锅(江苏省金坛市友联仪器研究所);pH计(上海凯达实验仪器有限公司);FJ-200 高速分散均质机(上海标本模型厂);TDL-40B 台式离心机(上海安亭科学仪器厂);分析天平(上海精密仪器仪表公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 芦丁的提取 精密称取 1.0 g 芦笋茎秆样品于 50 mL 容量瓶中,加入 40 mL 甲醇,在 50℃ 的水浴锅中提取 5 h,提取过程中每隔 30 min 振荡一次,然后用甲醇定容至刻度,过 0.45 μm 滤膜,待测。

1.3.2 槲皮素的提取 称取约 0.6 g 芦笋茎秆样品,精确称定,置于 25 mL 容量瓶中,先加 4 mL 25% HCl 溶液进行溶解,再加入 16 mL 甲醇。最后将容量瓶放入 65℃ 水浴锅中,避光水解 8 h。

冷却后,用甲醇定容至刻度,摇匀,用微孔滤膜(0.45 μm)滤过,即得。

1.3.3 白藜芦醇的提取 精密称取 3 g 左右的芦笋茎秆样品,置于 100 mL 离心管中,加入 30 mL 60%乙醇提取液,于均质机中提取 2 min,再以 3 000 r/min 离心 10 min,将上清液转入 50 mL 容量瓶中,残渣再用 15 mL 提取液提取 1 次,合并两次滤液,用 60%乙醇提取液定容至刻度,摇匀后,过 0.45 μm 有机滤膜,待测。

1.4 色谱条件

采用 HPLC 法对芦笋茎秆中的芦丁、槲皮素及白藜芦醇含量进行测定时,为了更准确地获得其含量,分别选用了适合自身的色谱条件。

1.4.1 芦丁色谱条件 芦丁色谱条件为紫外检测器;色谱柱:Agilent C₁₈柱(250 mm×4.6 mm,5 μm);柱温:50℃;流动相:0.2 mol/L 乙酸钠-甲醇(Me-OH:H₂O=35:65)溶液,用磷酸调 pH 2.80;流速:0.8 mL/min;检测波长:254 nm;进样量:10 μL。

1.4.2 槲皮素色谱条件 槲皮素色谱条件为紫外检测器;色谱柱:Agilent C₁₈柱(250 mm×4.6 mm,5 μm);柱温:30℃;流动相:无水甲醇-0.4%磷酸溶液(55:45,V/V);检测波长:360 nm;流速:1 mL/min;进样量:10 μL。

1.4.3 白藜芦醇 白藜芦醇的色谱条件是 Agilent C₁₈(250 mm×4.6 mm,5 μm)的色谱柱;检测波长:306 nm;柱温:45℃;进样量:10 μL;流速:0.8 mL/min;梯度洗脱:前 5 min 流动相 B(甲醇)由 35%变为 60%,5~11 min 又变为 90%,11~15 min 变为 100%,15~16 min 由 100%降为 35%,16~30 min 保持 35%不变。

2 结果与分析

2.1 提取方法的选择

目前关于提取芦丁、槲皮素和白藜芦醇的方法有很多,但这些方法提取时间较长,效果不明显。本文分别选取甲醇、甲醇-25% HCl 及 60%乙醇作为芦丁、槲皮素和白藜芦醇的提取溶剂,与 80%乙醇法和热水浸提法提取芦丁,甲醇法和热水浸提法提取槲皮素,碱提酸沉法和冷浸提取法提取白藜芦醇的效果进行了比较,结果表明(表 1),芦丁提取得率:甲醇法>80%乙醇提取法

>热水浸提法,槲皮素提取得率:甲醇-HCl法>甲醇法>水浸提取法,白藜芦醇提取得率:60%乙醇法>碱提酸沉法>冷浸提取法。故本实验最终选用甲醇提取芦笋茎秆中芦丁,甲醇-25% HCl提取槲皮素,60%乙醇提取白藜芦醇。

2.2 各对照品的 HPLC 图谱分析

分别精确称取一定量的芦丁、槲皮素和白藜

芦醇对照品,用甲醇配成一系列的浓度梯度。按照 1.4 色谱条件进行测定,色谱图见图 1~3。得到的回归方程为:芦丁 $A = 31\ 604C - 5\ 815.2$ ($r = 0.999\ 9$),槲皮素 $A = 49\ 234C - 1\ 494.6$ ($r = 0.998\ 6$),白藜芦醇 $A = 131\ 881C - 27\ 249$ ($r = 0.998\ 4$)。

表 1 不同提取方法提取营养成分的含量

Table 1 The nutrients content of different extraction methods.

提取方法	芦丁含量(mg/100g)	槲皮素含量(mg/100g)	白藜芦醇含量(mg/100g)
热水浸提	10.78±0.92 a		
甲醇提取	24.85±1.34 b		
80%乙醇法	20.13±1.57 c		
甲醇法		0.98±2.01 a	
水浸提取法		0.54±0.49 a	
甲醇-HCl法		1.17±0.80 a	
冷浸提取法			1.84±1.37 a
碱提酸沉法			2.14±0.75 a
60%乙醇提取			2.56±0.13 a

注:同一列中不同字母代表差异显著($P < 0.05$)。

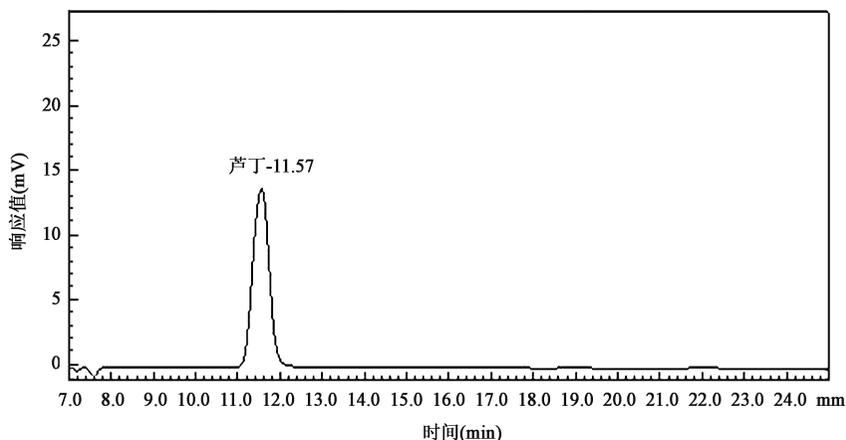


图 1 芦丁对照品色谱图

Fig.1 The chromatogram of rutin standard solution.

2.3 精密度试验

分别将浓度为 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的芦丁对照品、4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的槲皮素对照品和 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的白藜芦醇对照品按照 1.4 色谱条件重复进样 5 次,记录各成分的保留时间及测定量,并进行统计分析,结果如表 2。3 种物质的保留时间及含量的 RSD 均低于 3%,表明该实验的精密度良好。

2.4 稳定性试验

将按 1.3 方法制备的 3 份芦笋茎秆样品溶液,于 1.4 色谱条件下每 1 h 进一次样,每份样液共进样 5 次,通过峰面积计算其含量,结果测得芦丁、槲皮素和白藜芦醇的含量见表 3。样液中芦丁、槲皮素和白藜芦醇含量的 RSD 均低于 3%,表明样品溶液在 5 h 内稳定性良好。

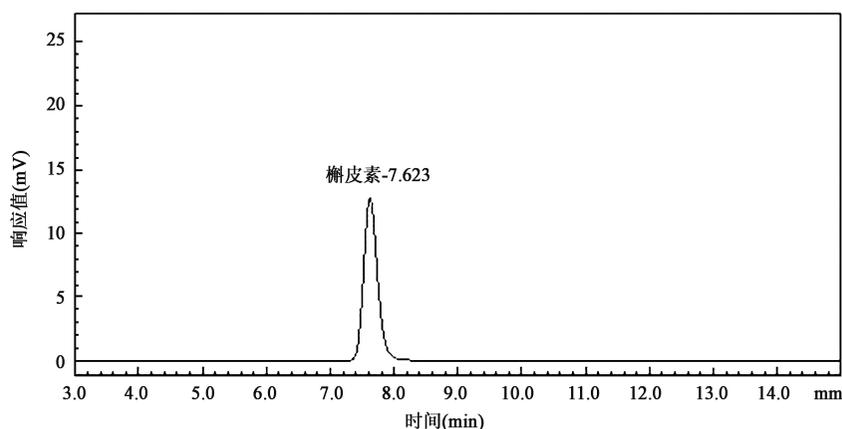


图2 槲皮素对照品色谱图

Fig.2 The chromatogram of quercetin standard solution.

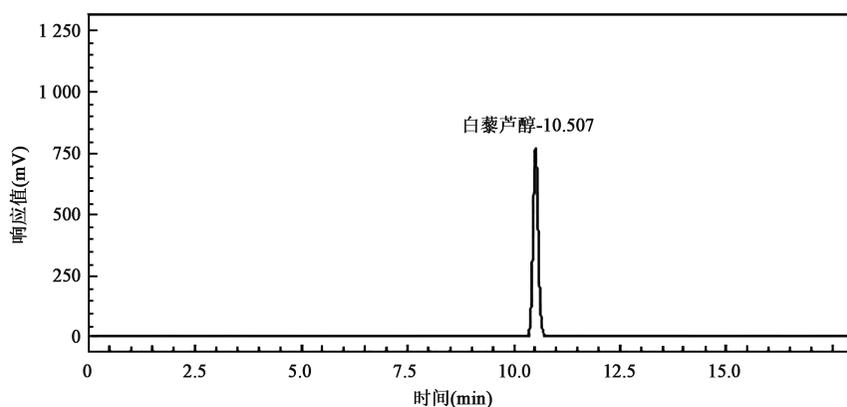


图3 白藜芦醇对照品色谱图

Fig.3 The chromatogram of resveratrol standard solution.

表2 各对照品成分的精密度试验

Table 2 The precision of each reference components.

对照品名称	保留时间(min)	RSD%(n=5)	平均含量(μg)	RSD%(n=5)
芦丁	11.569±0.071	0.61	0.078 3±0.000 8	1.09
槲皮素	7.621±0.070	0.92	0.039 7±0.000 3	0.76
白藜芦醇	10.506±0.060	0.57	0.194 0±0.004 7	2.44

表3 芦笋茎秆中各营养成分的稳定性试验

Table 3 Stability testing of nutrients in asparagus stalk.

营养成分名称	平均含量(mg/g)	RSD%(n=5)
芦丁	0.244 1±0.003 3	1.38
槲皮素	0.011 8±0.000 3	2.54
白藜芦醇	0.026 6±0.000 5	1.97

2.5 方法的回收率试验

选取已知芦丁、槲皮素和白藜芦醇含量的芦

笋茎秆样品,相应加入各对照品 0.2 mg、0.011 7 mg 和 0.05 mg,按 1.3 提取方法制备样液,每个营养成分的测定做 5 个重复,通过外标法定量测定回收率和方法的重复性,结果见表 4。样品色谱图见图 4~6。

结果显示,芦丁、槲皮素和白藜芦醇的回收率在 95%~100%之间,RSD 均小于 2%,表明该法的回收率和精密度可满足芦笋茎秆中芦丁、槲皮素和白藜芦醇含量的测定需求。

表 4 回收率试验结果

Table 4 The results of the recovery experiment.

营养成分名称	样品含量(mg)	加标量(mg)	测定量(mg)	回收率(%)	RSD%(n=5)
芦丁	0.242 5	0.200 0	0.435 1	98	0.91
槲皮素	0.011 4	0.011 7	0.022 3	97	1.05
白藜芦醇	0.025 6	0.050 0	0.073 8	98	0.99

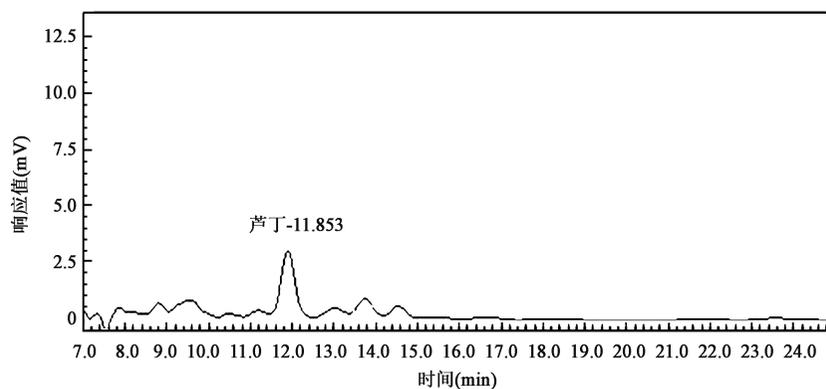


图 4 芦笋茎秆中芦丁色谱图

Fig.4 The chromatogram of rutin in asparagus stems.

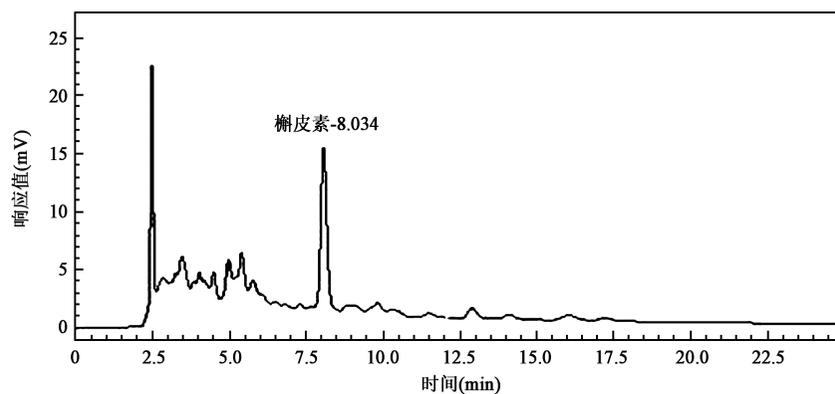


图 5 芦笋茎秆中槲皮素色谱图

Fig.5 The chromatogram of quercetin in asparagus stems.

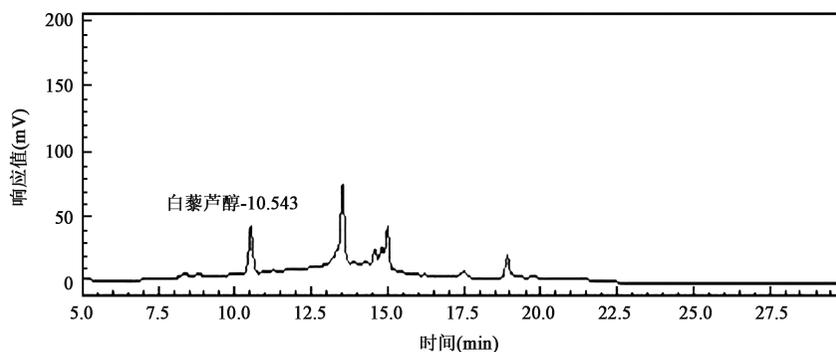


图 6 芦笋茎秆中白藜芦醇色谱图

Fig.6 The chromatogram of resveratrol in asparagus stems.

3 讨论

芦笋作为“蔬菜之王”,其废弃茎秆中含有的芦丁、槲皮素以及白藜芦醇成分,具有维护心血管健康、抗肿瘤以及调节脂蛋白等功效。选择有效的提取方法以及合适的检测方法对其含量进行测定对以后芦笋茎秆的开发利用具有重要的意义。

由于芦丁、槲皮素和白藜芦醇难溶甚至不溶于水,而易溶于有机溶剂,因此在选取样品提取剂时,综合考虑经济因素和提取率问题,本实验分别选择甲醇和乙醇作为提取溶剂,尤其在槲皮素提取时,由于纯甲醇提取得到的槲皮素纯度较低,多以甙的形式存在,因此需加入 25% HCl 进行酸水解^[15]。

此外,本研究建立了高效液相色谱法对芦笋茎秆中的芦丁、槲皮素以及白藜芦醇含量进行检测分析,并对色谱条件进行了优化。在测定芦丁含量时,选取 0.2 mol/L 乙酸钠-甲醇(Me-OH:H₂O=35:65)溶液(用磷酸调 pH 2.80)作为流动相,较朱立华等^[16]采用甲醇-磷酸(60:40,V/V)为流动相,峰型更理想。对槲皮素流动相进行选择时,发现在甲醇中加入 0.4% 磷酸,较刘明月等^[17]以纯甲醇为流动相,更利于改善其分离度。而采用甲醇-水的梯度洗脱,与吴向阳等^[9]以甲醇-水(45:55,V/V)的等梯度洗脱相比,不仅可以提高白藜芦醇的分离能力,还有利于改善峰型、抑制拖尾的现象。本方法方便、快捷,样品回收率和精密度高,可用于芦笋茎秆中芦丁、槲皮素以及白藜芦醇含量的测定。

参 考 文 献

[1] 周钰珊.芦笋废弃秸秆的资源化利用[D].杭州:浙江大学,

硕士学位论文,2014.

- [2] Tabar A I, Alvarez-Puebla M J, Gomez B, *et al.* Diversity of asparagus allergy: Clinical and immunological features [J]. *Clin. Exp. Allergy*, 2004, 34:131-136.
- [3] Suzanne H. Asparagus [J]. *Better Nutr.*, 2005:22-23.
- [4] 贾冬冬,李淑芬,杨鸿玲,等. RP-HPLC 法测定桑叶中的芦丁和异槲皮苷含量[J]. *食品科学*, 2008, 29(8):499-501.
- [5] 田振坤,顾媛媛,宋成贵,等. HPLC 法测定风仙透骨草中的芦丁、槲皮素和山奈酚的含量[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2012, 18(18):106-108.
- [6] 张晓琦,陈颖怡. 高效液相色谱法测定银杏叶提取中槲皮素的含量[J]. *色谱*, 1994, 12(4):302-303.
- [7] Gansans, Faris A N, Comstock A T, *et al.* Quercetin prevents pro-gression of disease in elastase/LPS-exposed mice by negatively regulating MMP expression [J]. *Respir. Res.*, 2010, 11(1):131.
- [8] 杨汉荣,李来生,陈雄泉. 高效液相色谱法测定虎杖中白藜芦醇、白藜芦醇苷和游离大黄素[J]. *理化检验-化学分册*, 2008, 44(3):234-236.
- [9] 吴向阳,王彩霞,笄祖林,等. HPLC 法测定花生根茎叶中白藜芦醇的含量[J]. *食品科学*, 2009, 30(16):240-242.
- [10] Kuršvietienė L, Stanevičienė I, Mongirdienė A, *et al.* Multiplicity of effects and health benefits of resveratrol [J]. *Article Press*, 2016, 3(3):1-5.
- [11] 段朝辉. 中国葡萄野生种白藜芦醇含量分析的研究[D]. 陕西杨凌:西北农林科技大学, 硕士学位论文, 2002, 1-3.
- [12] 李晓芳. 紫外分光光度法测定银杏叶提取物中芦丁含量[J]. *时珍国医国药*, 2001, 12(3):204.
- [13] 蒋立娣, 宣贵达, 吴好好, 等. 桑叶提取物中槲皮素和山奈酚的含量测定[J]. *浙江大学学报*, 2009, 36(6):705-713.
- [14] Xiang H Y, Zhou C S, Lei Q F, *et al.* Determination of resveratrol in peanut root by HPLC [J]. *Nat. Prod. Res. Dev.*, 2005, 17(2):179-181.
- [15] 施 瑛, 孟 花, 李加祝, 等. 云南野櫻桃中槲皮素提取方法的研究[J]. *玉溪师范学院学报*, 2013, 29(8):60-63.
- [16] 朱立华, 孙 萍, 曹国红, 等. 反相高效液相色谱法测定芦笋各段芦丁的含量[J]. *济南大学学报*, 2007, 21(1):53-55.
- [17] 刘明月, 薛贵平, 张翠双, 等. 菟丝子中槲皮素含量的高效液相色谱法测定[J]. *时珍国医国药*, 2012, 23(2):269-270.