

刺梨中芦丁成分的定量测定

田宏哲, 周艳明, 赵瑛博, 臧建, 胡睿
(沈阳农业大学分析测试中心, 辽宁 沈阳 110161)

摘要: 建立了测定刺梨果实中芦丁含量的高效液相色谱方法。刺梨粉用乙醇超声提取, 提取液过滤后通过旋转蒸发仪浓缩, 浓缩液离心后取上清液, 过 $0.45\ \mu\text{m}$ 滤膜后用流动相稀释, 进行反相色谱测定。本方法线性范围为 $0.1\sim 200\ \mu\text{g/ml}$, 线性相关系数 $R^2 = 0.9988$ 。

关键词: 刺梨; 芦丁; 定量分析

Quantitative Analysis of Rutin in *Rosa roxburghii* Tratt Fruit by HPLC

TIAN Hong-zhe, ZHOU Yan-ming, ZHAO Ying-bo, ZANG Jian, HU Rui
(Analyzes and Testing Center, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, China)

Abstract: A method for determining rutin in *Rosa roxburghii* Tratt fruit by high performance liquid chromatography (HPLC) was developed. The powder of *Rosa roxburghii* Tratt fruit was extracted with ethanol under the assistance of ultrasonic, and the rutin extract was filtrated, concentrated by a rotary evaporator and centrifuged. The supernatant was filtered through a $0.45\ \mu\text{m}$ filter membrane, diluted with mobile phase, and analyzed by reversed-phase liquid chromatography. The linear range of this method was 0.1 to $200\ \mu\text{g/ml}$, and the determination coefficient was 0.9988 . The precision RSD was 2.10% ($n = 5$). The average spike recovery of rutin was 94.21% , and the RSD was 2.34% .

Key words: *Rosa roxburghii* Tratt; rutin; quantitative analysis

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2009)10-0203-03

刺梨是蔷薇属野生植物, 又名木梨子, 学名缙丝花(*Rosa roxburghii* Tratt), 主要分布于我国西南的云南、四川、贵州等山区^[1], 目前湖北、广东、江苏以及浙江等地也有种植。自上世纪40年代以来, 人们就开始研究刺梨的化学成分^[2], 进而对其药理药效进行了比较全面的研究^[3-4]。研究表明刺梨鲜果中富含多种维生素、微量元素、氨基酸及其他重要的生化分子^[5]。据分析, 每100g鲜果中含VC 2087.8mg、VP 5900mg、VE 2.35mg、胡萝卜素 1.80mg和烟酰胺 1.17mg, 其中VC和VP含量位居蔬菜水果榜首。其中VP中的芦丁(图1)可以起到强化血管、降低血管脆性的作用。一直以来普遍认为VP就是芦丁, 而实际上VP是一种复合物, 含有多种成分, 其中芦丁含量的多少直接影响刺梨在增强血管弹性方面的作用, 因此准确测定刺梨中芦丁的含量十分重要。过去对刺梨化学成分的研究主要采用紫外分光光度法测定总黄酮的含量, 芦丁的含量一直没有文献报道。

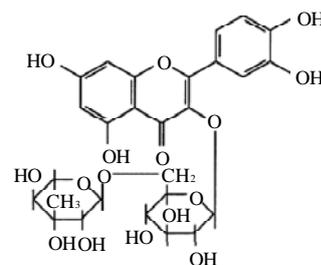


图1 芦丁的分子式

Fig.1 Molecular structure of rutin

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

芦丁 中国药品生物制品检定所; 刺梨 沈阳大众食品加工有限公司。

甲醇(色谱纯) Fisher公司; 乙醇、甲酸均为分析纯 沈阳化学试剂厂; 纯净水 杭州娃哈哈集团。

Agilent 1100液相色谱仪 美国Agilent公司; KQ-

收稿日期: 2008-07-18

作者简介: 田宏哲(1972-), 女, 讲师, 博士, 主要从事液相色谱-质谱联用方法开发及农药残留分析研究。

E-mail: tthz2@yahoo.com.cn

300DE 型医用数控超声波清洗器 昆山市超声仪器有限公司; TDL-40B 离心机 上海安亭科学仪器厂; RE-52AA 旋转蒸发器 上海亚荣生化仪器厂。

1.2 样品及标液制备

刺梨粉提取液的制备: 将刺梨果粉碎后烘干得到粗粉, 粗粉过 40 目筛子, 然后准确称取刺梨粉 3.0g, 置 150ml 具塞锥形瓶中, 加入 25ml 60% 乙醇(V/V)浸润 0.5h, 然后超声提取 2h(32℃)。提取液过滤, 残渣用 60% 乙醇清洗后, 合并滤液, 采用旋转蒸发器在 42℃ 蒸出乙醇至 10ml, 母液冷却后离心 5min(3000r/min), 取上清液用 0.45μm 滤膜过滤, 然后用流动相(已经 0.45nm 滤膜过滤)稀释准备色谱分析。

标准溶液配制: 精密称取芦丁标准品 0.1g, 置于 100ml 容量瓶中, 用甲醇定容得到浓度为 1.0mg/ml 的芦丁储备液。分析前用流动相稀释, 配置成一系列不同浓度的标准工作溶液。

1.3 色谱条件

液相色谱柱: Diamonsil™ C₁₈ 柱(4.6mm × 200mm, 5μm); 流动相: 甲醇和 0.1% 甲酸水溶液, 梯度洗脱 0~5min 甲醇由 40% 到 60%, 5~10min 甲醇由 60% 到 90%, 然后用 90% 甲醇冲洗 2min, 在下次分析前用 40% 甲醇平衡 5min; 流速 1.0ml/min; 检测波长 200~400nm; 柱温 40℃; 进样量 10μl。

2 结果与分析

2.1 提取方法的选择

过去对刺梨果实和叶片中总黄酮化合物提取多采用甲醇。但由于芦丁属于黄酮苷类化合物, 极性相对较强, 因此, 在实验中采用 60% 乙醇水溶液进行提取, 液固比为 8.3:1。目前针对黄酮类化合物的提取方法有微波提取法、水煮浸提法、索氏提取法等, 但由于几种提取方法存在提取时间过长或者提取装置复杂等原因, 在此选择超声提取方法。超声提取的原理是利用超声波所产生的空化作用, 破坏植物的细胞膜, 有利于芦丁成分的释放, 从而达到提取的目的。该提取方法操作简单, 提取效率高, 在实验中对超声提取的时间、温度及超声频率进行了优化, 最后确定最佳提取时间为 2h, 超声频率 70%, 超声温度 32℃。

2.2 线性关系

用芦丁的储备液分别配制浓度 0.1、1.0、10.0、100.0 μg/ml 的标准溶液, 在 1.3 色谱条件下进行测定, 进样量 10 μl (图 2)。以峰面积为纵坐标, 标准溶液的浓度为横坐标作图, 线性方程为 $Y=12.434X$, 线性相关系数 $R^2=0.9988$ 。当信噪比(S/N)为 3 时, 芦丁的最小检测限为 0.05mg/L。

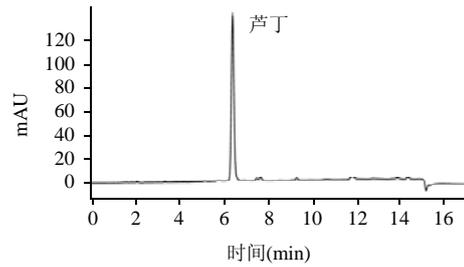


图 2 芦丁标样的液相色谱图

Fig.2 HPLC chromatogram of standard rutin solution

2.3 实际样品测定

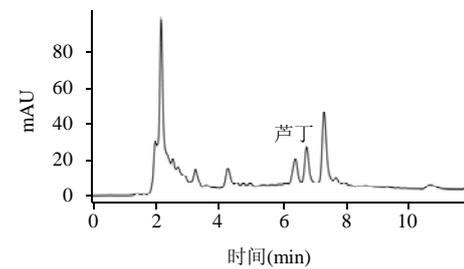


图 3 实际样品的液相色谱图

Fig.3 HPLC chromatogram of rutin from *Rosa roxburghii* Tratt

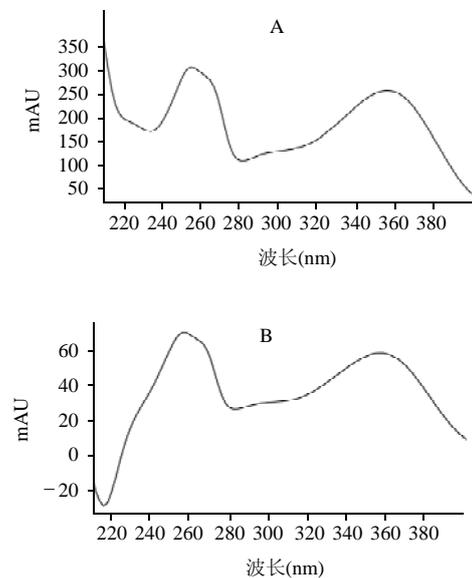


图 4 芦丁标准品和实际样品中谱峰 1 的紫外光谱图

Fig.4 UV absorption spectra of standard rutin (A) and peak 1 in real sample (B) separated by HPLC (shown in Fig.3)

将实验中所建立的刺梨中芦丁提取方法和色谱分离方法应用于市售刺梨果实中的芦丁含量测定, 实际样品测定谱图见图 3。通过保留时间进行定性, 芦丁标样的保留时间为 6.494min, 实际样品中谱峰 1 的保留时间是

6.49min, 可以初步推断在刺梨果中含有芦丁成分。根据二极管阵列检测器提供的芦丁标样的紫外光谱图与实际样品中谱峰1的紫外光谱图进行比较(图4A和图4B), 可见两个色谱峰所对应的紫外吸收曲线十分相似, 具有黄酮类化合物的两个特征吸收谱带, 最大吸收波长分别为255nm和360nm, 进一步可以推断在实际样品中存在芦丁成分。最后向实际样品中加入芦丁标样, 谱峰1的峰高明显增高, 从而确定了谱峰1就是芦丁的色谱峰, 所以可断定刺梨样品中含有芦丁成分。根据外标法和实际样品的峰面积对芦丁进行定量测定, 最后可以计算出刺梨果中含有 $6 \pm 0.01\text{g/kg}$ (五次测定, $\text{RSD}=2.10\%$)的芦丁成分。精密称取已知含量的样品五份, 分别加入一定含量的芦丁标准溶液, 然后按照实验方法进行提取和色谱分离, 测得芦丁的平均回收率为94.21%, RSD 值为2.34%(表1), 由此可见该方法有很高的准确度和精密度。

表1 实际样品中芦丁的添加回收率

Table 1 Average spike recovery of rutin in real samples and RSD

样品编号	本底值(g/kg)	添加量(g/kg)	测定量(g/kg)	回收率(%)	平均回收率(%)	RSD(%)
1	6.10	20	24.91	94.05		
2	5.90	20	25.39	97.47		
3	6.06	20	24.31	91.25	94.21	2.34
4	5.84	20	24.69	94.26		
5	6.12	20	24.92	94.02		

3 结论

本实验采用超声提取和反相色谱法对刺梨果实中芦丁的含量进行了测定, 该方法操作简便、样品前处理简单、提取效率高、色谱分析速度快、分离效果好、谱峰对称, 完全排除了基质成分对芦丁的定性和定量分析的干扰。从实验结果可以看出, 芦丁作为VP的主成分在刺梨中含量较少, VP中仍有很多未知成分亟待确定。随后的工作中, 将采用液相色谱-质谱联用方法对刺梨中其他几种黄酮成分进行定性和定量分析, 进一步确定刺梨中黄酮的种类和含量, 从而为明确刺梨中对人体健康有益的主要化学成分提供可靠的参考。

参考文献:

- [1] 方修贵, 李嗣彪, 郑益清. 刺梨的营养价值及其开发利用[J]. 食品工业科技, 2004, 25(1): 137-138.
- [2] 杜薇, 刘国文. 刺梨总黄酮的含量测定及资源利用[J]. 食品科学, 2003, 24(1): 112-114.
- [3] 胡文尧, 白焰, 韩宪法, 等. 刺梨抗动脉粥样硬化作用的研究[J]. 中国药理学杂志, 1994, 29(9): 529-532.
- [4] ZHANG C, LIU X, QIANG H, et al. Inhibitory effects of rosa roxburghii trutt juice on in vitro oxidative modification of low density lipoprotein and on the macrophage growth and cellular cholesteryl ester accumulation induced by oxidized low density lipoprotein[J]. Clin Chim Acta, 2001, 313(1/2): 37-43.
- [5] 杜薇, 任永全. 刺梨中微量元素和总黄酮的含量测定[J]. 中国医院药学杂志, 2003, 23(9): 530-532.