

芹菜提取物中芹菜素的HPLC 与HPTLC定量分析研究

王克勤^{1,2}, 罗军武^{1,*}, 陈静萍², 陈亮²

(1. 湖南农业大学 茶学教育部重点实验室, 湖南 长沙 410128

2. 湖南省原子能农业应用研究所, 湖南 长沙 410125)

摘要: 通过采用高效液相色谱(HPLC)、紫外光谱和黄酮颜色特征反应对芹菜提取物主要成分芹菜素进行定性鉴定, 同时建立定量测量芹菜素的高效薄层色谱(HPTLC)方法。结果表明: 芹菜提取物的主要成分是黄酮醇-芹菜素, 与芹菜素标准品具有相同的光谱和色谱性质; 采用G60高效硅胶板, 以氯仿-甲醇-水(18:2.3:0.35)为展开剂, 芹菜素标样与试样有相同的 R_f 值为0.65; 用最小二乘法作线性回归, 芹菜素含量与斑点峰面积的标准曲线回归方程: $y=15138x+7594.8$, $R^2=0.993$, 线性范围: $0.332\sim0.996\mu\text{g/斑点}$ 。精密度实验 $\text{RSD}(n=5)=1.33\%$, 平均回收率 97.82% 。

关键词: 高效液相色谱(HPLC); 高效薄层色谱(HPTLC); 芹菜素; R_f 值

Study on Apigenin Quantitation Analysis from Celery Extractions by High-performance Liquid Chromatography (HPLC) and High-performance Lamina Chromatography (HPTLC)

WANG Ke-qin^{1,2}, LUO Jun-wu^{1,*}, CHEN Jing-ping², CHEN Liang²

(1. Key Laboratory of Tea Science, Ministry of Education, Changsha 410128, China;

2. Hunan Institute of Atomic Energy Application in Agriculture, Changsha 410125, China)

Abstract: By high-performance liquid chromatography (HPLC), UV spectrum and high-performance lamina chromatography (HPTLC) and color characteristic reaction to quantify the flavonoids, the basic components of thick celery extractions were identified as apigenin based on the quantitative analysis method with high-performance lamina chromatography (HPTLC). The results indicated that the main component of thick celery flavonoids is apigenin which has the same spectrum and chromatogram characteristics with the same R_f value (0.65) as the standard sample by the high-performance silica gel board G60 and the outspread solvent (chloroform-methanol-water, 18:2.3:0.35). The standard curve regress equation is: $y=15138x+7594.8$, $R^2=0.993$ with linearity scope: $0.332\sim0.996\mu\text{g per spot}$. The precision $\text{RSD}(n=5)$ is 1.33% , and the average callback rate is 97.82% .

Key words high-performance liquid chromatography (HPLC); high-performance lamina chromatography (HPTLC); apigenin; R_f value

中图分类号: TS201.21

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2008)04-0291-05

芹菜(*Apium graveolens* L.)是一种二年生的伞形科芹菜属的草本植物。芹菜开始用于药用,具有降血压、镇静健胃、利尿、润肺等功效,后来把它用作辛香蔬菜,驯化成肥大叶柄类型。2000年以前古希腊人最早栽培。15世纪芹菜由高加索传入中国,在中国东南沿海各地以及华北等地正在迅速发展。

从芹菜中提取黄酮类化合物,大都使用乙醇和乙酸乙酯作为溶剂,高金燕等^[1]采用乙醇溶剂法从西芹茎中提取的黄酮化合物进行了研究;毕丽君、李慧^[2]等则是采用乙醇溶剂法提取水芹菜中的黄酮化合物;张桂等^[3]也是利用该方法对芹菜的根、茎、叶三部分进行了提取研究,实验结果表明,芹菜茎叶中都含有较高的黄

收稿日期: 2007-03-28

基金项目: 湖南省财政资助项目 (60171)

作者简介: 王克勤(1964-)男,研究员,博士研究生,研究方向为核农学以及农产品贮藏与加工。E-mail: wkq6412@163.com

* 通讯作者: 罗军武(1957-),男,教授,研究方向为园艺栽培育种。E-mail: luojunwu11@sohu.com

酮化合物。本研究在定性实验的基础上建立一种相对简单、经济的芹菜中芹菜素的 HPTLC 定量分析方法。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

芹菜提取物: 本实验室干芹菜叶经 70% 乙醇回流提取浓缩后, 再经 XDA-1 大孔树脂纯化后浓缩干燥的样品。

乙醚、氯仿、甲醇、盐酸、无水乙醇均为分析纯; 乙腈为色谱纯; 芹菜素标准品(芹菜素含量 98%) 陕西慧科植物开发有限公司。

Linomat 5 点样器、CAMAG III 薄层层析仪、(REPROSTAR II) 薄层色谱扫描仪 瑞士卡玛公司; G60 高效硅胶板 青岛海洋化工厂; LC-10ATVP 高效液相色谱仪(含 SPD-10AP 紫外检测器、LC-10ATVP 泵、Class-VP 色谱工作站) 日本岛津公司; AG135 电子天平 瑞士特梅勒-托利多仪器有限公司。

1.2 方法

1.2.1 芹菜素标准溶液和芹菜提取物供试溶液的制备

芹菜素标准溶液: 精密称取芹菜素标准样品 16.6mg, 用无水乙醇溶于 100ml 容量瓶中, 定容、摇匀后备用。

芹菜提取物供试溶液: XDA-1 树脂纯化后的芹菜提取物粉末, 加入适量的 20% 盐酸溶液, 于 90℃ 水浴水解 1h 后, 用乙醚反复萃取, 回收乙醚并浓缩干燥, 用适量无水乙醇溶解, 即为 1 号样品液。

精确称取 0.50g 经 XDA-1 树脂纯化后的芹菜提取物粉末, 按上述处理方法处理后, 用无水乙醇溶解浓于容量瓶中, 并定容到 100ml, 即为 2 号样品液。

1.2.2 芹菜黄酮颜色特征反应实验

取适量制备好的 1 号样品液分别同盐酸-镁粉、氯化铝溶液和氢氧化钠溶液反应, 观察反应现象。

1.2.3 芹菜黄酮的薄层色谱扫描条件

光源为氙灯和钨灯, 扫描用计算机软件 CAMAGwinCATS4.04, 单波长反射法吸收扫描, 扫描速度 5mm/s, 狭缝 5.00 × 0.30mm, 扫描时间 3min。

1.2.4 薄层色谱展开剂的选择

根据 Touchstone J^[8] 的观点, 两种溶质不能被一定强度的展开剂分开时, 可被强度相当的不同组成的展开剂分开。利用这一理论, 根据芹菜素的极性, 选择不同极性的展开剂并调整其展开剂组成比来对样品进行展开, 从而确定最佳的展开剂及配比。

1.2.5 光谱扫描

对展开后的标准样品的斑点和芹菜提取物样品相对应处的斑点在 200~700nm 范围内进行光谱扫描。

1.2.6 芹菜黄酮的液相色谱分析和紫外光谱鉴别

色谱条件: 色谱柱: ODS C₁₈ (150mm × 4.6mm, 5μm); 流动相: 乙腈-水(35:65); 流速 1.0ml/min; 柱温 35℃; 检测器 PDA, 检测波长 270nm。分别吸取 10μl 芹菜素标准样品和 1 号样品分别进行检测, 观察标准样品的色谱峰和 1 号样品对应的色谱峰, 并进行光谱扫描。

1.2.7 薄层色谱条件

薄层板: G60 硅胶板(10cm × 10cm); 展开剂: 氯仿-甲醇-水(18:2.3:0.35); 检测波长 345nm。扫描条件: 光源为氙灯和钨灯, 扫描用计算机软件 CAMAGwinCATS4.04, 单波长反射法吸收扫描, 扫描速度 5mm/s, 狭缝 5.00 × 0.30mm, 扫描时间 3min。

2 结果与分析

2.1 芹菜提取物主要成分的定性鉴定

2.1.1 芹菜提取物的特征反应实验

取适量制备好的 1 号样品液分别同盐酸-镁粉、氯化铝溶液和氢氧化钠溶液反应, 观察反应现象, 结果如表 1 所示, 芹菜提取物中存在黄酮的特征颜色反应, 验证其含有主要黄酮成分。

2.1.2 薄层色谱展开剂的选择

表 1 芹菜提取物的颜色特征反应实验
Table 1 Experiment of color characteristic reaction of celery extract

反应类型	颜色反应现象	结 论
盐酸-镁粉	泡沫上显棕红色	可能含有黄酮、黄酮醇、二氢黄酮醇等黄酮类化合物
氯化铝	鲜黄色	主要成分可能是黄酮、黄酮醇
氢氧化钠	淡黄色	主要成分可能是黄酮

根据选择展开溶剂的相似相溶原理, 即根据被展开物质和展开溶剂的极性大小, 经过反复地调整溶剂比例, 确定薄层色谱展开剂。从表 2 可以看出, 1 组非极性溶剂不能展开, 2 组极性溶剂极性太强, R_f 值为 1。4 组溶剂和 7 组溶剂展开出现拖尾现象, 其 R_f 值偏大或偏小。以 8 组展开溶剂为最佳, 芹菜素的 R_f 较适中, 展开剂比较稳定, 能较好的将芹菜提取物中的各组分分开, 适于进行定量分析。最终确定以氯仿-甲醇-水(18:2.3:0.35)为展开剂进行展开, 其展开效果如图 1。

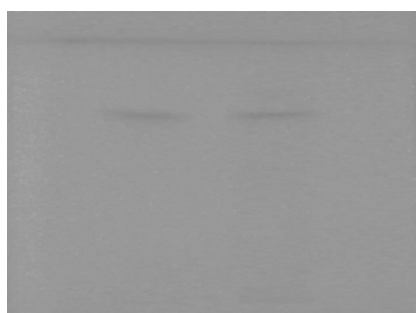
2.1.3 芹菜提取物与芹菜素标准样品的薄层光谱比较

芹菜提取物与芹菜素标准样品薄层展开后, 可以明显看出有相同的条带, 而在其它地方没有很明显的条带, 且有相同的 R_f, 可以证明为同一类物质。通过对两个薄层斑点进行 200~700nm 光谱扫描, 从图 2 可以看出, 两条带光谱极为相似, 分别在 270nm 和 345nm 处有吸收峰, 因此可以证明芹菜提取物中主要成分是芹菜素。可以看出, 345nm 处的峰形较 270nm 处更为规则,

故选择 345 nm 作为芹菜提取物薄层色谱的检测波长。

表 2 不同展开溶剂比例的 R_f 值
Table 2 R_f values of various proportional outspread solvents

组数	溶剂	溶剂比例	R_f 值	备注
1	氯仿(V)	20:0:0	0	
2	甲醇(V)	0:20:0	1	
3	氯仿-甲醇-水(V/V/V)	20:20:0.5	1	
4	氯仿-甲醇-水(V/V/V)	20:5:0.4	0.9	有拖尾现象
5	氯仿-甲醇-水(V/V/V)	20:5:0.3	0.82	
6	氯仿-甲醇-水(V/V/V)	20:4:0.35	0.8	
7	氯仿-甲醇-水(V/V/V)	20:2	0.6	有拖尾现象
8	氯仿-甲醇-水(V/V/V)	18:2.3:0.35	0.65	效果较好



芹菜素标准品 芹菜提取物

图 1 芹菜提取物与芹菜素标准品的薄层色谱图

Fig.1 TLC lamina chromatogram of standard apigenin and celery extraction sample

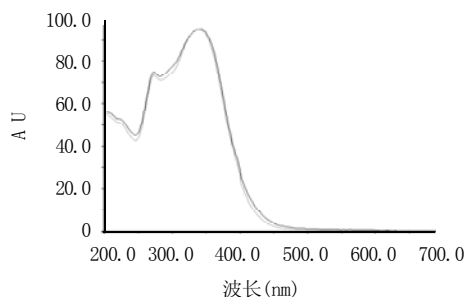


图 2 芹菜素标准品和芹菜提取物样品的光谱扫描图

Fig.2 Spectrum scan of apigenin standard and celery extraction samples

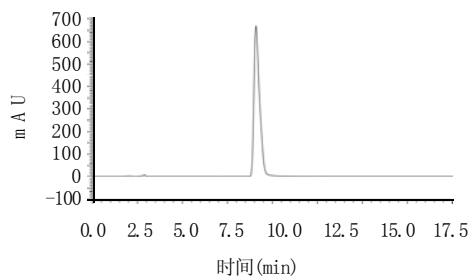


图 3 芹菜素标准品的 HPLC 色谱图

Fig.3 HPLC chromatogram of apigenin standard samples

2.1.4 芹菜提取物与芹菜素标准样品的液相色谱和紫外光谱比较

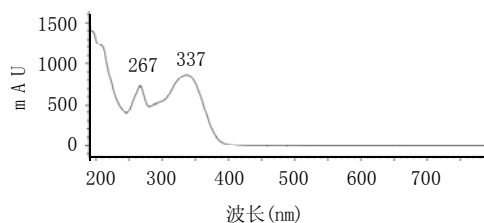


图 4 芹菜素标准品样品光谱图

Fig.4 Spectrogram of apigenin standard samples

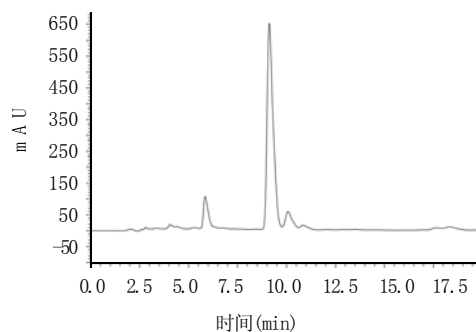


图 5 芹菜提取物样品的 HPLC 色谱图

Fig.5 HPLC chromatogram of celery extractions

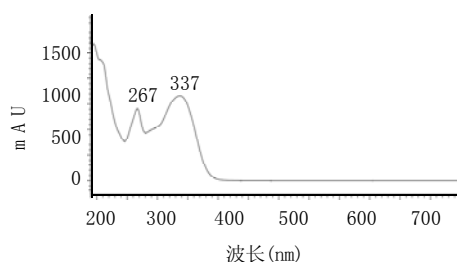


图 6 芹菜提取物色谱图中第二色谱峰的光谱图

Fig.6 Spectrogram of the second chromatogram peak of celery extracts

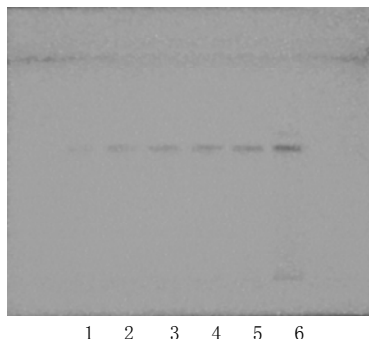
图 3、4 是芹菜素标准样品的 HPLC 色谱图和紫外光谱图，图 5、6 是芹菜提取物的 HPLC 色谱图和紫外光谱图。从图中可以看出，芹菜提取物和芹菜素标准品的液相色谱图及对应的光谱图基本一致，并且芹菜提取物的液相色谱图只有一个主要的色谱峰，即与芹菜素标准品的色谱峰相对应，实验结果进一步验证芹菜提取物的主要成分为芹菜素。

2.2 芹菜提取物中芹菜素的 HPTLC 定量分析

2.2.1 芹菜素标准样品薄层斑点的线性的关系

从图 7 的薄层图可以看出，斑点的 R_f 值基本一致，斑点痕迹随点样量的增加而增加。图 8 所示的芹菜素标准品(左 1~5)和芹菜提取物样品薄层色谱三维扫描图可以看出，峰形均匀，并随着点样量的增加，峰高增加。表 4 为所测得的斑点峰面积积分值。以斑点面积积分值为纵坐标，以对照品含量为横坐标作图如图 9 所示。用最小二乘法作线性回归，得芹菜素含量与峰面积的标准

曲线回归方程: $y=15138x+7594.8$, $R^2=0.993$, 线性范围: $0.332\sim0.996\mu\text{g/斑点}$ 。



1~5. 芹菜素标准品, 点样量分别为 2、3、4、5、6 μl ; 6. 芹菜提取物, 点样量为 4 μl 。图 8 同此。

图 7 芹菜素标准品(左 1~5)和芹菜提取物的薄层色谱图

Fig.7 Lamina chromatogram of apigenin standard samples (left 1~5) and celery extracts

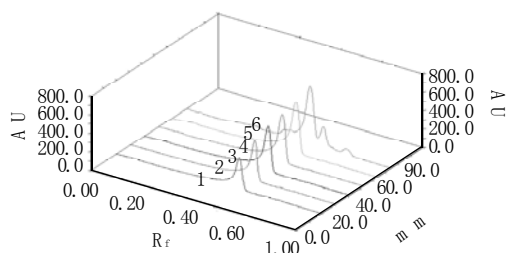


图 8 芹菜素标准品和芹菜提取物样品薄层色谱的三维扫描图

Fig.8 Three-dimension-scan lamina chromatograms of apigenin standard samples and celery extract sample

表 4 芹菜素标准品含量与斑点峰面积积分值线性关系

Table 4 Linearity relationship of apigenin standard sample content with integral value of spot peak area

芹菜素含量 (μg)	0.332	0.489	0.664	0.830	0.996
峰面积 (AU)	12228.3	15673.8	17684.2	20030.8	22614.1

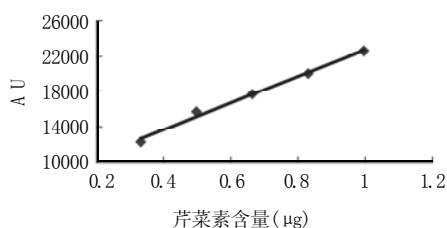


图 9 芹菜素标准样品的薄层标准曲线

Fig.9 Lamina standard curve of apigenin standard sample

2.2.2 稳定性实验

用 CAMAG 点样器 Linomat 5 分吸取 5 μl 1 号样品液, 点样展开后按设定的时间间隔 0、10、20、30 min 4 次扫描样品斑点, 不同时间扫描斑点测得的峰面积变化情

况如表 3 所示。结果表明该检测方法在半个小时内稳定性良好, RSD 为 0.25%。

表 3 稳定性实验结果

Table 3 Results of stability experiment

时间 (min)	0	10	20	30	RSD (%)
峰面积 (AU)	21336.7	21209.6	21291.3	21265.1	0.25

2.2.3 精密度实验

分别精确吸取 5 μl 标准品溶液点于同一板上, 展开后测得板内各斑点的峰面积如表 5 所示。结果表明该方法精密度良好。其 RSD 为 1.33%。

表 5 精密程度实验结果

Table 5 Results of precision

样品号	1	2	3	4	5	RSD (%)
峰面积 (AU)	19273.1	19588.2	19712.4	20001.4	19686.1	1.33

2.2.4 回收率实验

采用加样回收实验, 取适量 1 号样品, 分成两份, 往其中一份中加入一定量标准品, 分别精确吸取适量两份样品点样, 展开后按前面确定的方法分别测定其芹菜素含量如表 6 所示。样品平均回收率为 97.82%, RSD 为 2.28%。

表 6 回收率实验结果

Table 6 Result of recovery rate

样品编号	已知样品含量 (mg)	加入样品量 (mg)	测得芹菜素量 (mg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
1	0.1933	0.0443	0.2355	95.26		
2	0.1933	0.0443	0.2371	98.87	97.82	2.28
3	0.1933	0.0443	0.2373	99.32		

2.2.5 芹菜提取物样品中芹菜素含量的测定

精确吸取 2 号样品液 4 μl 点于同一薄板, 用上面建立的方法测定其峰面积, 计算斑点芹菜素含量, 测定结果如表 7 所示。2 号样品液中芹菜素含量为 0.2433 mg/ml, 其 RSD 为 0.21%, 芹菜提取物样品中芹菜素含量为 48.66 mg/g, 芹菜提取物芹菜素纯度为 48.66%。

表 7 芹菜提取物样品芹菜素含量测定结果

Table 7 Determination results of apigenin contents in celery extract samples

点样号	峰面积 (AU)	含量 (mg/ml)	平均值 (mg/ml)	RSD (%)
1	22333.3	0.2434		
2	22356.2	0.2438	0.2433	0.21
3	22297.2	0.2428		

3 讨论

目前天然产物中有效成分的检测多依赖HPLC, 薄层色谱多用于定性分析。随着薄层扫描法的应用, HPTLC开始逐渐应用于天然产物的定量分析。徐静等^[4]采用高效液相色谱测定了芹菜中主要的3种黄酮成分, 分别为槲皮素、芹菜素和木犀草素。韩小丽等^[5]采用薄层荧光扫描法测定花生茎中白黎芦醇的含量。何新益等^[6]采用高效薄层色谱分析方法定量测量苦瓜中胡萝卜甙昔。赵大成等^[7]采用薄层扫描法测定蚂蚁药材及其风湿克酒中亮氨酸的含量。本研究在定性试验的基础上建立了一种相对简单经济的芹菜中芹菜素的HPTLC定量分析方法, 并对该方法进行了方法学上的评价, 试验证明该方法能较快较准确地测定芹菜黄酮中芹菜素的含量。

参考文献:

- [1] 高金燕, 曾小花, 王毅辉, 等. 从芹菜中提取黄酮类物质的初步研究[J]. 中国食品添加剂, 2004(3): 19-21.
- [2] 毕丽君, 李慧. 水芹中黄酮类化合物最佳提取工艺的研究[J]. 食品科学, 1999(12): 35-37.
- [3] 张桂, 畅天狮, 刘俊果, 等. 芹菜中提取黄酮类物质的研究[J]. 食品科学, 2002, 21(8): 121-125.
- [4] 徐静, 郭长江, 韦京豫. 蔬菜中类黄酮物质的高效液相色谱测定法[J]. 营养学报, 2005, 27(4): 276-279.
- [5] 韩小丽, 邵鹏, 李明静, 等. 薄层荧光扫描法测定花生茎中白黎芦醇的含量[J]. 天然产物研究与开发, 2006, 18(4): 628-630.
- [6] 何新益, 刘仲华, 王克勤, 等. 苦瓜中胡萝卜甙昔的高效薄层色谱分析方法研究[J]. 食品与机械, 2006, 22(2): 92-94.
- [7] 赵大成, 秦雪梅, 申国华, 等. 薄层扫描法测定蚂蚁药材及其风湿克酒中亮氨酸的含量[J]. 中国药房, 2004, 15(2): 111-112.
- [8] 霍燕兰. 药物分析技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005.