

HPLC-UV 测定荞麦中芦丁、槲皮素、山奈酚的含量

张春艳, 张丽娜

(中国农业科学院 作物科学研究所 重大平台中心, 北京 100089)

摘要: 荞麦 (学名: *Fagopyrum esculentum* Moench.) 为蓼科 (Polygonaceae) 荞麦属作物, 荞麦分为普通荞麦 (甜荞麦) 及其亲缘种苦荞麦 (鞑靼荞麦), 主要分布在我国的云南省、四川省以及内蒙古自治区等地。近年来研究表明荞麦中主要含有黄酮类、糖苷类及有机酸类等化学成分。黄酮类主要包含芦丁、槲皮素、槲皮苷、异槲皮苷、山奈酚等。文章建立高效液相色谱法同时测定荞麦中芦丁、槲皮素、山奈酚 3 种黄酮类成分含量, 对来自湖南不同产地的荞麦进行测定, 结果符合实验预期。

关键词: 荞麦; 芦丁; 槲皮素; 山奈酚

1 材料与方法

1.1 仪器与设备

试验主要使用设备如下:

仪器名称	型 号	厂 家
电子天平	2011F145-11	赛利多斯科学仪器 (北京) 有限公司
粉碎机	TUBE-MLL 100	艾卡 (广州) 仪器设备有限公司
超声波清洗仪	JP-040S	深圳市洁盟清洗设备有限公司
福立高效液相色谱仪	LC5090	浙江福立分析仪器股份有限公司
UV 紫外检测器	LC5090-UV	浙江福立分析仪器股份有限公司
Agilent XDB-C18 色谱柱	XDB-C18(4.6x250mm 5 μ m)	安捷伦科技 (中国) 有限公司
离心机	PICO17	赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司

1.2 材料与试剂

材料来源: 湖南苦荞, 来自于中国农业科学院作物科学研究所小棕作物课题高佳老师提供, 地方品种;

试剂: 乙醇, 甲醇 (HPLC Grade) 赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司; DMSO hplc 纯度 $\geq 99.7\%$ 。

1.3 试验方法

1) 芦丁、槲皮素、山奈酚标准曲线制作

精密称取芦丁标准品 20.0mg, 置于 10ml 容量瓶中, 加入 70%乙醇 1ml ,配置浓度为 2mg/ml 的芦丁母液。

精密称取槲皮素、山奈酚 10.0mg, 置于 10ml 容量瓶中, 加入 70%乙醇 1ml ,配置浓度为 1mg/ml 槲皮素、山奈酚母液。

取不同体积的两种标准品母液混合, 过 0.22um 膜,放置 2ml 液相小瓶中, 待测。

2) 芦丁、槲皮素、山奈酚提取方法

苦荞麦用艾卡(广州)仪器设备有限公司生产的 TUBE-MLL 100 高速粉碎机粉碎成细粉, 准确称取 20.0mg 苦荞麦粉末, 放入 2mlPE 管中, 加入 70%乙醇,称定重量, 放置超声清洗仪中 50℃进行提取, 放凉, 称重, 补足损失的提取液, 10000r/min 离心 10 分钟, 取上清, 过 0.22um 膜, 收集滤液, 放置 2ml 液相小瓶, 待测。

3) 色谱条件 色谱柱: Agilent XDB-C18 色谱柱 (4.6 mm×250 mm, 5.0 μ m); 柱温: 30.0℃; 进样体积: 10.0 μ L; 流速: 1.0 mL/min; 流动相: A: 乙腈; B: 0.1 %磷酸水溶液, 梯度洗脱: 0~7min, 18%—18.5%A; 7-16 min, 35%A; 16-18 min, 35%A; 检测波长: 芦丁 278 nm, 槲皮素, 山奈酚 365 nm。

2 实验结果

2.1 标准液测定

不同浓度梯度荞麦、槲皮素、山奈酚标准曲线如图 1、2、3、4 所示。

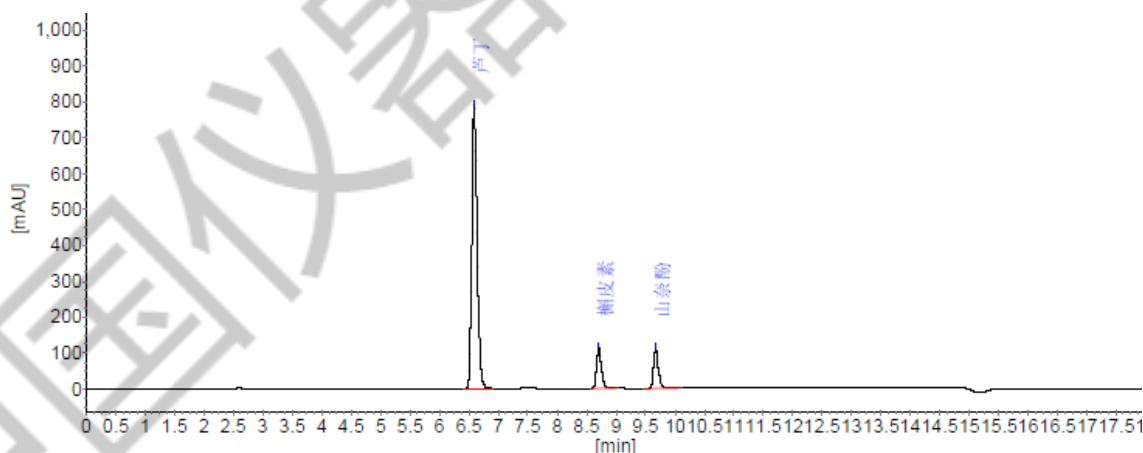


图 1 芦丁、槲皮素、山奈酚标准品谱图

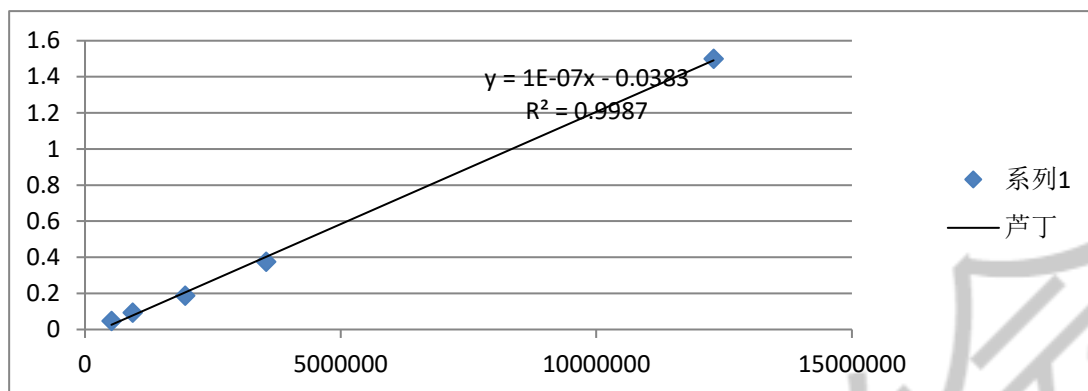


图 2 芦丁标准曲线

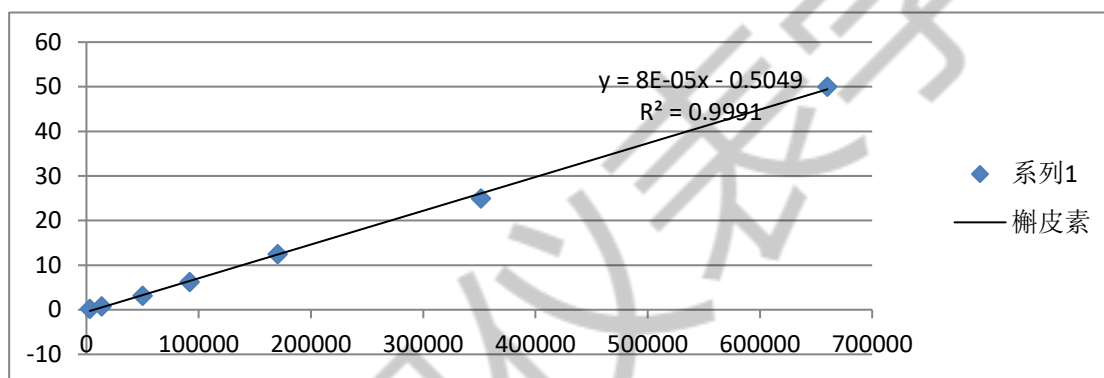


图 3 槲皮素标准曲线

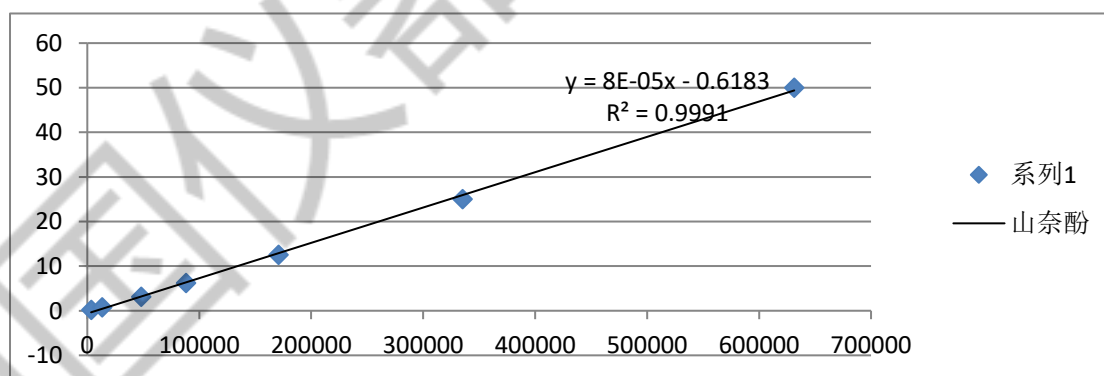


图 4 山奈酚标准曲线

2.2 实验方法验证

从检出限、定量限、精密度、重复性、限性、日内实验及日间实验进行了验证，验证结

果如表 1 所示，结果表明检测方法线性良好，提取方法可靠。

表 1 分析方法评估

Analyte	LOD (ppm)	LOQ (ppm)	Linear interval (ppm)	Intraday repeatability (RSD%)	Interday repeatability (RSD%)	Recovery reproducibility (%)
Rutin	0.118	0.353	47–1500	0.538	0.890	88.79-100.15
Quercetin	0.053	0.169	0.195–50	0.521	2.345	96.97-105.09
Kaempferol	0.054	0.173	0.195–50	1.828	0.609	93.44-124.42

表 2 不同产地样品检测结果

样品来源	芦丁（mg/g）	槲皮素（mg/g）	山奈酚(ug/g)
湖南荞麦-小棕作物高佳	12. 56	0. 37	4. 26
湖南本地苦荞-小棕作物高佳	14. 52	0. 44	6. 88
湖南本地苦荞-小棕作物高佳	13. 48	0. 44	7. 43
湖南苦荞-小棕作物高佳	12. 86	0. 38	3. 28

对不同产地荞麦中芦丁、槲皮素、山奈酚进行测定，结果符合实验预期。

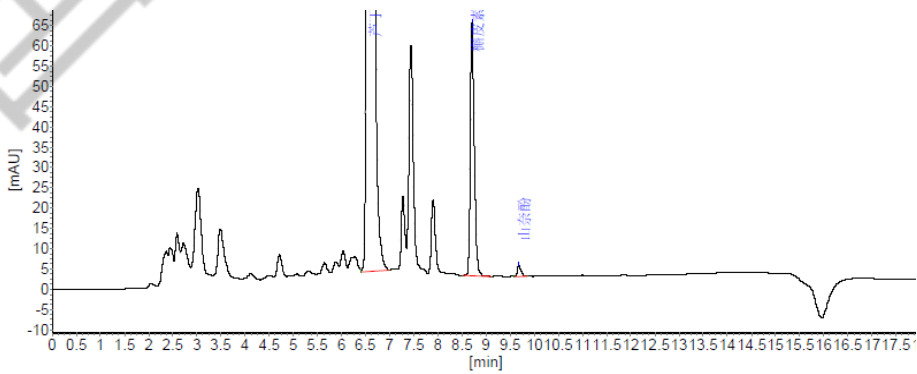


图 5 样品测定谱图

3 结论

本文通过福立 LC5090 高效液相色谱分析仪建立同时测定荞麦中芦丁、槲皮素、山奈酚的方法。结果显示,建立的 HPLC-UV 方法满足荞麦中芦丁、槲皮素、山奈酚的完全分离。芦丁在 0.047-1.5mg/ml 有良好的线性关系、槲皮素、山奈酚在 0.195-50ug/ml 有良好的线性关系, R^2 均大于 0.99, 重复性 RSD% <2%, 提取液 4℃放置稳定性 RSD% ≤2.3%, 加样回收率 88.79%-105.09%之间, 检出限芦丁 0.118ppm、槲皮素、山奈酚 0.05ppm, 定量限芦丁 0.35ppm、槲皮素、山奈酚 0.17ppm。

上述结果表明,此方法简便可行,满足荞麦黄酮类主成分日常检测需要,该方法的优点在于对微量的槲皮素和山奈酚提取更有效。

参考文献:

- [1]P Naveen¹,H B Lingaraju²,Anitha¹, K ShyamPrasad² Simultaneous determination of rutin, isoquercetin, and quercetin flavonoids in Nelumbo nucifera by high-performance liquid chromatography method.Int J Pharm Investig,2017 Apr-Jun;7(2):94-100.
- [2]SabbiJan¹,JavaidAhmad¹,MohdMasaratDar²,AijazAWani¹,InayatullahTahir³,AzraN Kamili⁴Development and validation of a reverse phase HPLC-DAD method for separation, detection & quantification of rutin and quercetin in buckwheat (Fagopyrum spp).J Food Sci Technol.2022 Jul;59(7):2875-2883.
- [3]罗凤莲^{1,2},蒲培瑶¹,超声波辅助提取苦苦荞麦总黄酮工艺研究.农产品加工.2018,(02)
- [4]王丽^{1,2},魏茂琼^{1,3},邵金良^{1,2},杜丽娟^{1,2},林昕^{1,3},汪禄祥^{1,2},苦苦荞麦类黄酮成分的含量测定与分析研究食品安全质量检测学报.2018,9(20).
- [5]张继斌,王玉,徐浪,陈志元,丁苗.不同产地苦苦荞麦中黄酮类成分的含量测定与分析.食品研究与开发 2018 年 12 月 第 39 卷第 24 期.
- [6]JiaGao¹,TingtingWang^{1,2},MinxuanLiu¹,et al.Transcriptome analysis of filling stage seeds among three buckwheat species with emphasis on rutin accumulationPLOS One.2017;12(12):e0189672.Published online 2017 Dec 20.

[7]任强、吴昊、聂其婷、刘伟.HPLC-DAD 法同时测定苦荞麦保健品中芦丁槲皮素山奈酚含量.济宁医学院学报 2016,39(05).

中国仪器仪表杂志