

液相色谱法测定洋甘菊中芹菜苷质量浓度研究

陈丽春^{1,2},王菲菲¹

(1. 浙江科技学院 生物与化学工程学院, 杭州 310023; 2. 浙江省农产品化学与生物加工技术重点实验室, 杭州 310023)

摘要: 探讨了用高效液相色谱仪检测洋甘菊中芹菜苷质量浓度的方法,并测定了样品中芹菜苷的质量浓度。采用依利特 Sinochrom ODS-BP 柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm),流动相为甲醇-1%乙酸(体积比为 60:40),流速 1.0 mL/min,柱温 25 °C,检测波长 333 nm,作为测定样品中芹菜苷质量浓度的条件。结果表明,芹菜苷在 0.999 9~99.99 μg/mL 质量浓度线性范围内线性关系良好, $R^2=0.999 9$, 平均回收率为 1.04%, RSD=1.87%,测得芹菜苷在洋甘菊中的质量浓度为 83.205 mg/L。此方法快速、简便、准确,可用于洋甘菊中芹菜苷的 HPLC 测定。

关键词: 高效液相色谱法;洋甘菊;芹菜苷;黄酮

中图分类号: R284.1;O657.72

文献标志码: A

文章编号: 1671-8798(2013)01-0038-04

Determination of apigenin in chamomile by HPLC

CHENG Lichun^{1,2}, WANG Feifei¹

(1. School of Biological and Chemical Engineering, Zhejiang University of Science and Technology, Hangzhou 310023, China; 2. Zhejiang Provincial Key Laboratory for Chemical and Biological Processing Technology of Farm Produces, Hangzhou 310023, China)

Abstract: We mainly discuss the method of using high performance liquid chromatograph detect to determine apigenin in chamomile. HPLC separation was carried out in a Sinochrom ODS-BP column (4.6 mm×250 mm, 5 μm) of elite with methanol-1% acetic acid (volume ratio 60:40) as mobile phase at a flow rate of 1.0 mL/min. The column temperature was 25 °C and the detection wavelength was 333 nm, as the conditions to detect determination of apigenin in chamomile. The results showed there is a good linear range in 0.999 9—99.99 μg/mL, $R^2=0.999 9$, and the average recovery is 1.04%, RSD=1.87%. The determination of apigenin in chamomile by this method is 83.205 mg/L. This method is rapid, accurate and reproducible for determination of apigenin in chamomile by HPLC.

Key words: HPLC; chamomile; apigenin; flavone

收稿日期: 2012-12-11

基金项目: 浙江省科技计划项目(2012C22026)

作者简介: 陈丽春(1975—),女,副教授,硕士,主要从事天然产物与功能性食品的研究与开发。

洋甘菊又称母菊,主要分德国洋甘菊和罗马洋甘菊两种。为菊科甘菊属的花序或全草,一年生或两年生草本植物。主要产于东欧、埃及、北美、比利时、英国等国家,为一种重要的药用植物和香料植物。洋甘菊在欧洲、美国及日本等地早已被广泛利用,成为众所周知的药用植物和香料植物,不少国家加以大面积机械化生产。洋甘菊花朵具有水果香,主要含有挥发油、黄酮类、愈创萘内酯、香豆素类等成分。作为一种引进植物,洋甘菊在中国尚未得到充分的开发及利用^[1-3]。大量的实验表明,洋甘菊具有消炎、抑制真菌、解痉等作用^[4-6],具有显著的社会经济效益。

芹菜苷为洋甘菊中的一种活性黄酮类物质^[7],可作为平滑肌的解痉剂,醛糖还原酶抑制剂和镇静剂。由于对洋甘菊中芹菜苷质量浓度的研究较少,本研究采用高效液相色谱法(HPLC)^[8-11]建立了 HPLC 测定芹菜苷质量浓度的方法,为更好地研究洋甘菊的药用价值和具体成分提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

芹菜苷标准品(批号 20110908,上海永恒生物科技有限公司),色谱甲醇(Tedia, United States of America),优级纯乙酸(上海国药集团化学试剂有限公司),其他试剂均为分析纯,洋甘菊(新疆种植,购于杭州滨江艺福堂)。

1.2 仪器与设备

仪器设备:日本岛津高效液相色谱仪(型号规格:LC-20AD,配有 SPD-20A 可变波长紫外检测器,CTO-20A 柱温箱,手动进样阀),超纯水器(Direct-Q®3, MILLIPORE, made in France),KQ-50E 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司),玻璃砂芯过滤装置(上海兴亚净化材料厂),GZX-9076MBE 电热鼓风干燥箱(上海博讯实业有限公司)。

1.3 标准品储备液和供试品的制备

标准品储备液的配置:精密称取 5.05 mg 芹菜苷标准品(质量分数大于 99%),用色谱级甲醇溶解配置质量浓度为 0.499 95 mg/mL 芹菜苷标准品储备液,摇匀,用 0.22 μm 膜过滤。根据实验需要,稀释配成所需质量浓度。

供试品的制备:精密称取干燥洋甘菊(过 40 目筛)126.4 g,以 70%乙醇,料液比为 1:18,在 70 $^{\circ}\text{C}$ 下回流浸提 2.5 h,抽滤,再称定质量,70%乙醇补足失重,摇匀,用微孔滤膜(0.22 μm)过滤,取续滤液,即得。

1.4 色谱条件

色谱柱:依利特 Sinocrom ODS-BP 柱(4.6 mm \times 250 mm,5 μm);流动相为甲醇(A)-1%乙酸水溶液(B),洗脱条件为: $V(\text{A}):V(\text{B})=40:60$;流速:1.0 mL/min;柱温:25 $^{\circ}\text{C}$;检测(紫外)波长:333 nm;进样量:10 μL 。

2 结果与分析

2.1 方法学试验

2.1.1 线性关系考察

用移液枪精密量取上述标准品储备液配置成质量浓度分别为 0.999 9、1.999 8、3.999 6、4.999 5、24.997 5、39.996 0、49.995 0、99.990 0 $\mu\text{g/mL}$ 的标准品溶液。在上述色谱条件下检测峰面积,平行测定 5 次,以质量浓度为横坐标,峰面积为纵坐标作图,绘制标准曲线。芹菜苷的线性回归方程为: $y=41\,616x-3\,013.3$, $R^2=0.999\,9$ 。结果表明,芹菜苷在 0.999 9~99.99 $\mu\text{g/mL}$ 间线性关系良好(图 1)。

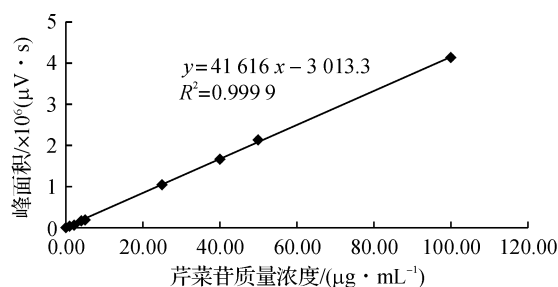


图1 芹菜苷标准曲线图

Fig. 1 Standard curve of apigenin

2.1.2 精密度考察

日内精密度：在上述色谱条件下，将 2.999 7 $\mu\text{g/mL}$ 的标准品溶液在 0、2、4、6、8 h，进行测定，记录色谱峰面积，连续进样 5 次，测定峰面积，计算峰面积的 $\text{RSD}\% = 1.68\%$ 。

日间精密度：在上述色谱条件下，将对照品溶液连续 3 d，每天进样 2 次，测定峰面积，计算峰面积的 $\text{RSD}\% = 1.94\%$ 。结果表明，此方法的精密度良好。

2.1.3 重现性考察

取洋甘菊提取液 1 mL 置于 10 mL 容量瓶中，用色谱甲醇定容至刻度，平行制备 5 份溶液，分别取适量溶液于 1.5 mL 进样瓶中，用 0.45 μm 微孔滤膜过滤，在上述色谱条件下进行 HPLC 分析，分别测定峰面积，计算峰面积的 $\text{RSD}\% = 2.11\%$ 。结果表明，此方法的重复性良好。

2.1.4 稳定性考察

取一份样品溶液，用 0.22 μm 微孔滤膜过滤，取适量溶液于 1.5 mL 进样瓶中，分别在 0、2、4、8、12、24 h 进样，在上述色谱条件下进行 HPLC 分析，分别进行峰面积的测定，计算峰面积的 $\text{RSD}\% = 2.28\%$ 。结果表明，此方法在室温下 24 h 内的稳定性良好。

2.1.5 加样回收试验

取 1 mL 洋甘菊提取物，稀释 10 倍定容，加入芹菜苷标准品 37.3 μg ，用 5 mL 的容量瓶定容，即为加标试样。平行制备 5 组溶液，用 0.22 μm 微孔滤膜过滤，在上述色谱条件下进行 HPLC 分析，分别测定峰面积，从而计算平均回收率为 1.04%， $\text{RSD}\% = 1.87\%$ （表 1）。

$$\text{平均加标回收率} = \frac{\text{加标试样测定值} - \text{试样测定值}}{\text{加标量}} \times 100\%$$

表 1 芹菜苷加样回收试验结果

Table 1 Sample recovery test of apigenin

样品	试样中芹菜苷质量浓度 的峰面积/ $(\mu\text{V} \cdot \text{s})$	样品稀释 5 倍 的芹菜苷量/ μg	加标试样中芹菜苷质量 浓度的峰面积/ $(\mu\text{V} \cdot \text{s})$	芹菜苷总测 得量/ μg	回收率/ $\%$	平均回 收率/ $\%$	RSD/ $\%$
1	338 194.4	16.398	233 334 5.7	56.140 9	1.07	1.04	1.87
2	342 437.6	16.602	231 881 4.7	55.791 7	1.05		
3	343 820.9	16.668	231 331 3.2	55.659 5	1.05		
4	345 724.3	16.760	228 022 0.8	54.864 3	1.02		
5	346 095.1	16.778	228 652 3.5	55.015 8	1.03		

3 分析与讨论

3.1 样品的测定与分析

在上述色谱条件下进行 HPLC 分析，测定峰面积，保留时间在 23.748 min 处为芹菜苷，代入标准曲线计算芹菜苷的质量浓度。测得芹菜苷在洋甘菊中的质量浓度为 83.205 mg/L （图 2，图 3）。

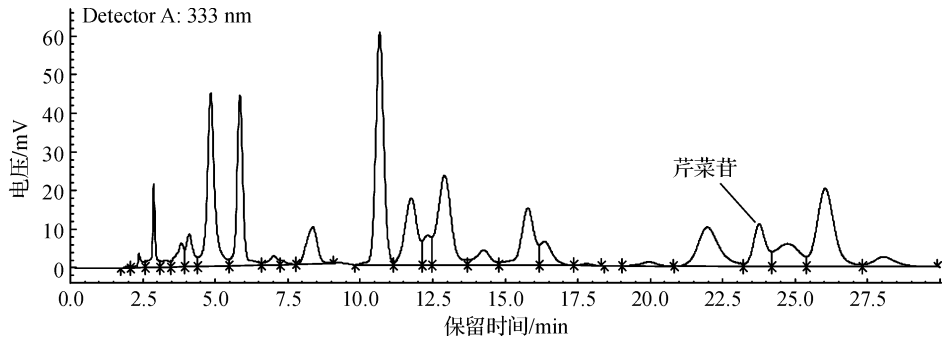


图 2 洋甘菊提取物的 HPLC 图谱

Fig. 2 HPLC chromatogram of chamomile extract

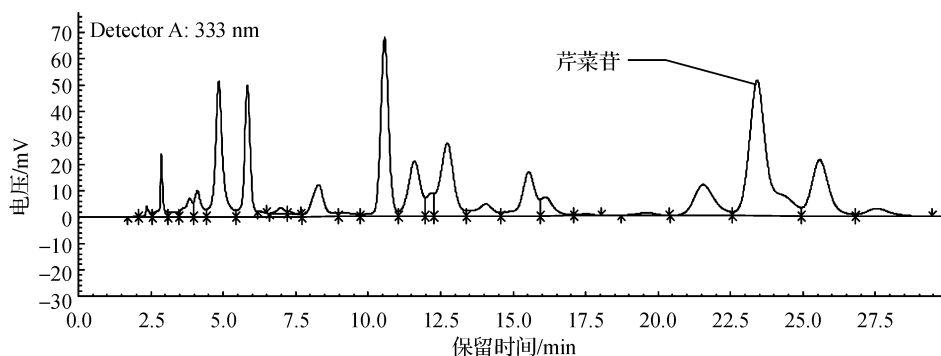


图3 洋甘菊提取物加芹菜苷标准品的 HPLC 图谱

Fig. 3 HPLC chromatogram of chamomile extract adding apigenin standard substance

3.2 讨论

3.2.1 提取溶剂的选择

本研究考察了乙醇-水混合溶剂作为提取溶剂对提取效果的影响。结果发现,当乙醇与水体积比为 70 : 30 时,提取效果较好,芹菜苷质量浓度较高。因此,选用了乙醇与水体积比为 70 : 30。

3.2.2 检测波长的选择

用 UV-5500PC 型紫外/可见分光光度计进行全波长扫描发现,芹菜苷在 267 nm 和 333 nm 处有特征吸收峰,其在 333 nm 处吸收峰达最大。所以,本次实验选取的检测波长为 333 nm。

3.2.3 流动相比比例的选择

查阅相关文献,经过比较选择了甲醇-乙酸为流动相,考察了不同比例甲醇-乙酸对芹菜苷和其他组分的分离情况。发现甲醇与 1% 乙酸的体积比为 40 : 60 时,芹菜苷能与其他组分完全分离。

4 结 语

试验结果表明,该 HPLC 方法稳定,测得结果准确,重复性好,能用于测定洋甘菊中芹菜苷的质量浓度。对所测得数据进行分析可得,洋甘菊中芹菜苷的质量浓度较低,资料显示芹菜中有着较高的芹菜苷的质量浓度。另外在样品的提取时,通过对原料和产品的检测发现,大孔树脂能起到初步富集洋甘菊中芹菜苷的作用,且 AB-8 型大孔树脂效果最好。

参考文献:

- [1] 杨彦松,潘浪胜. 洋甘菊中黄酮类成分的分离与结构确定[J]. 应用化工,2008,37(6):697-698.
- [2] 郑汉臣,全山丛,张虹,等. 值得重视的归化药用和香料植物:母菊(洋甘菊)[J]. 中草药,1996,27(9):568-571.
- [3] 沙红,廖康. 药用植物洋甘菊的组织培养研究[J]. 新疆农业大学学报,2004,27(4):16-18.
- [4] 周伯庭,李新中. 母菊的化学成分研究[J]. 湖南中医学院学报,2001,21(1):27-28.
- [5] Heidari M R, Dadollahi Z, Mehrabani M, et al. Study of antiseizure effects of *matricaria recutita* extract in mice [J]. Annals of the New York Academy of Science,2009,1171:300-304.
- [6] Avallone R, Zanolli P, Kleinsohnitz M, et al. Pharmacological profile of apigenin, a flavonoid isolated from *matricaria chamomill*[J]. Biochemical Pharmacology,2000,59(11):1387-1394.
- [7] 贾佳,谢静莉,许学书. 芹菜苷体外活性的研究[J]. 食品科学,2008,29(12):99-101.
- [8] 陈静萍,尹梦晨,陈亮,等. 湖南芹菜中芹菜苷和 3'-甲氧基芹菜苷含量的测定[J]. 湖南农业科学,2009,25(9):33-35,45.
- [9] 徐静,郭长江,韦京豫,等. 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.
- [10] 王克勤,罗军武,陈静萍,等. 高效液相色谱法测定芹菜中芹菜素含量[J]. 食品与机械,2009,25(2):74-77.
- [11] 谢程,李琳,段书涛,等. HPLC 测定海风藤药材中海风藤酮的含量[J]. 天然产物研究与开发,2010,22(6):1077-1080.