

doi:10.3969/j.issn.1000-9760.2015.03.003

## HPLC-DAD 法测定洋葱中黄酮类含量\*

任 强 丁玉莲 王亚楠 陈 迪 付英杰 王建安

(济宁医学院药学院, 山东日照 276826)

**摘要 目的** 建立高效液相色谱(HPLC-DAD)方法,对鲜洋葱中的主要黄酮类化合物进行含量测定。**方法** 采用色谱柱 Shimadzu VP-ODS (250mm × 4.6 mm, 5 μm),以乙腈-水为流动相,梯度洗脱,柱温 30℃,流速 1.0 ml/min,检测波长 350 nm。首先根据紫外光谱图,确定黄酮类化学成分。而后以芦丁为对照品建立标准曲线,对洋葱中黄酮类化学成分进行定量研究。**结果** 建立的高效液相色谱分析方法能够满足洋葱中主要黄酮类化学成分准确测定的要求,芦丁在 5.0~502.5 μg/ml 范围内有良好的线性关系( $r=0.9995$ ),重复性(RSD<4.1%),日内精密度和日间精密度(RSD<3.3%),加样回收率(95.1%~103.2%),检出限(0.3 μg/ml)和定量限(1.0 μg/ml)。含量测定表明洋葱中主要黄酮类化学成分的含量为 2.8 mg/g。**结论** 该方法简便可行,测定结果准确,能够满足洋葱中主要黄酮类化学成分准确测定的需要。

**关键词** 洋葱;黄酮类成分;高效液相色谱仪;含量测定

**中图分类号**:R917 **文献标识码**:A **文章编号**:1000-9760(2015)06-159-03

### Determination of flavonoids in onion by HPLC-DAD

REN Qiang, DING Yulian, WANG Yanan, CHEN Di, FU Yingjie, WANG Jianan

(School of Pharmaceutical Sciences, Jining Medical University, Rizhao, 276826, China)

**Abstract: Objective** To establish a high performance liquid chromatography coupled with a diode array detector (HPLC-DAD) method for the determination of major flavonoids in onion. **Methods** The chromatographic separation was performed in a SHIMADZU VP-ODS (250mm×4.6mm, 5 μm) column. The mobile phase was composed of water (A) and acetonitrile (B) using gradient elution. The column temperature was 30℃ with the flow rate 1.0 ml/min, and UV absorbance was detected at a wavelength of 350 nm. Firstly, the flavonoids were identified by maximum UV absorption wavelength. Then, the rutin was used as a standard substance to establish the standard curve to determine the major flavonoids in onion. **Results** The HPLC-DAD method was established and validated to determine the major flavonoids. The calibration curve was linear in the range of 5.0~502.5 μg/ml with good linearity ( $r=0.9995$ ), repeatability(RSD<4.1%), intra-day and inter-day precision(RSD<3.3%), recovery(95.1%~103.2%), limit of detection (0.3 μg/ml), and limit of quantification (1.0 μg/ml). The content of flavonoids in onion was 2.8 mg/g. **Conclusion** The method is convenient, feasible, and accurate for the determination of major flavonoids in onion.

**Keywords**: Onion; Flavonoids; HPLC-DAD; Determination

洋葱(*Allium Cepa* Linn)为百合科(Liliaceae)葱属,两年生草本植物,又称葱头、圆葱。药理研究表明洋葱具有消炎抑菌、抗癌、抗血小板凝聚、降血糖、降血脂和胆固醇、抗氧化等多种药理作用<sup>[1-5]</sup>。目前,对洋葱中黄酮类化学成分定量分析的研究较少<sup>[6-9]</sup>。

黄酮类化合物是植物中分布非常广泛的一类

天然产物,具有特征紫外吸收光谱,在 250~265nm 和 345~355 nm 有最大紫外吸收<sup>[10]</sup>。洋葱是黄酮类化合物含量较高的蔬菜之一,其中黄酮类化合物主要是黄酮醇及其苷类,主要包括槲皮素、山奈酚、槲皮素-4'-葡萄糖苷、槲皮素-3-葡萄糖苷、杨梅黄酮、桑色素等<sup>[7,9]</sup>。本文拟采用 HPLC-DAD 方法,以芦丁为对照品,对其中主要的黄酮类化学成分进行定量分析,为进一步合理食用以及洋葱加工品的质量控制提供参考。

\* [基金项目]山东省医药卫生科技发展计划项目(编号:2014WS0508)

## 1 仪器与实验材料

### 1.1 仪器

高效液相色谱仪为 Shimadzu LC-20AT, 配有双泵; SIL-20A 自动进样器; CTI-20AC 柱温箱; SPD-M20A 检测器; LC solution 数据处理工作站; Shimadzu VP-ODS (250mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱; 电子天平(准确至千分之一, 北京赛多利斯科学仪器有限公司); KQ-500DB 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); 溶剂过滤器(天津津腾公司); 循环水真空泵(郑州科创仪器有限公司)。

### 1.2 实验材料

芦丁(批号: MUST-13040302)北京恒元启天化工技术研究院 & 北京世纪奥科生物技术有限公司; 乙腈, 色谱级, 购于 Burdick & Jackson 公司; 水, 去离子水, 购于杭州娃哈哈公司; 圆葱购买日照大润发超市。

## 2 方法与结果

### 2.1 对照品溶液的制备

精密称取芦丁对照品各约 10.05 mg, 置于 10 ml 容量瓶中, 加 80% 乙醇溶液使溶解并稀释定容至刻度, 摇匀, 得到约 1.005 mg/ml 的对照品储备液。用 80% 乙醇溶液按一定比例稀释, 得到系列浓度的对照品标准曲线溶液(5.0 μg/ml、10.0 μg/ml、50.2 μg/ml、100.5 μg/ml、251.2 μg/ml、502.5 μg/ml)。

### 2.2 供试品溶液的制备

取洋葱 1.0 g, 精密称定, 置具塞圆底玻璃试管中, 精密加入 80% 乙醇 5 ml, 密塞, 称定重量。室温浸泡 15 min 后, 超声提取(功率 100 W, 频率 40 kHz)30 min, 放冷, 再称定重量, 用 80% 乙醇补足减失的重量, 用 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 得供试品溶液。

### 2.3 色谱条件及系统适用性试验

Shimadzu VP-ODS (250mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱; 流动相 A 为水, 流动相 B 为乙腈, 梯度洗脱程序为 0~20 min 5%~95% B, 20~21 min 95%~5% B, 21~25 min 5% B; 流速 1 ml/min; 柱温 30°C; 检测波长为 350 nm; 进样量 20 μL, 上述色谱条件下, 分析对照品和样品。对照品芦丁和洋葱样品色谱图分别见图 1 和 2。

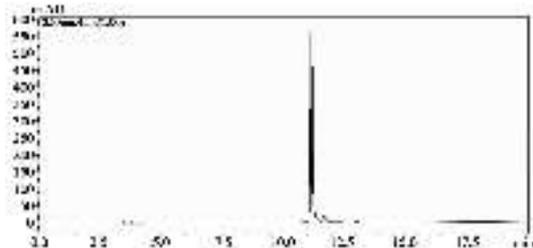


图1 对照品芦丁的色谱图

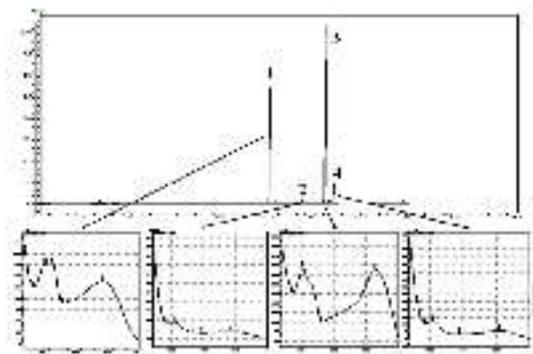


图2 样品的色谱图及4个主要黄酮类化合物的紫外光谱图

### 2.4 含量测定方法学验证

**2.4.1 线性关系考察** 将系列浓度的标准曲线样品溶液 (5.0 μg/ml、10.0 μg/ml、50.2 μg/ml、100.5 μg/ml、251.2 μg/ml、502.5 μg/ml), 按照“2.3 项下”, 从低浓度到高浓度连续进样, 以被测物浓度(X)为横坐标, 被测物的峰面积(Y)为纵坐标, 按最小二乘法进行标准曲线的拟合, 得标准曲线线性回归方程和线性相关系数 r 值。得到芦丁的回归方程  $Y = 12155X - 58108$ , 线性相关系数 r 均大于 0.9995。

**2.4.2 精密度试验** 通过测定日内及日间质控样品(芦丁对照品溶液)的峰面积相对标准偏差(RSD)来验证方法的精密度, 日内精密度要求同一日内低、中、高 3 种浓度水平(10 μg/ml、50 μg/ml、250 μg/ml)的质控样品连续测定 6 次; 日间精密度要求低、中、高 3 种浓度水平的质控样品连续测定 6d, 每天测定 1 次。结果日内精密度 RSD 小于 2.1%, 日间精密度 RSD 小于 3.3%, 表明仪器的精密度良好, 可以满足含量测定的要求。

**2.4.3 重复性试验** 称取同一份洋葱样品 6 份, 按照“2.2 项下”方法制备供试品溶液, 按照“2.3 项下”进行测定, 以洋葱样品色谱图中 4 个黄酮类化学成分峰面积计算, 4 个黄酮类的精密度 RSD 值小于 4.1%, 表明该方法的重复性符合含量测定的要求。

**2.4.4 稳定性试验** 将洋葱样品,按照“2.2 项下”方法制备供试品溶液,室温放置,分别于 0、2、4、8、12、24 h 按照“2.3 项下”测定,以洋葱样品色谱图中 4 个黄酮类化学成分峰面积计算,结果 RSD 均小于 2.7%,表明供试品溶液在室温放置 24 h 稳定性。

**2.4.5 回收率试验** 称取洋葱样品 9 份,每份各 1.0g,分别精密加入芦丁对照品溶液(10 μg/ml、50 μg/ml、250 μg/ml)各 5 mL,每个浓度制备 3 份,置于通风橱下,待溶液挥干,按照“2.2 项下”供试品溶液制备方法处理后,进行 HPLC-DAD 分析,带入标准曲线,结果显示,3 个浓度的回收率在 95.1%~103.2% 范围内,RSD 小于 3.7%,表明该方法能够较好的对黄酮类成分进行含量测定准确度较高。

**2.4.6 最低检测限 (LLOD) 和最低定量限 (LLOQ)** 取标准曲线的最低浓度(5.0 μg/ml)标准曲线工作溶液,用 80% 乙醇逐级稀释,进行 HPLC-DAD 分析,记录信号强度与噪音的比值,信噪比  $S/N \geq 3$  时的溶液浓度确定为 LLOD, $S/N \geq 10$  时的溶液浓度确定为 LLOQ。结果该方法的最低检测限为 0.3 μg/ml,最低定量限为 1.0 μg/ml。

**2.5 样品测定**

取洋葱样品 3 份,按照“2.2 项下”方法制备供试品溶液,按照“2.3 项下”HPLC-DAD 分析方法,将峰面积值带入相应的线性回归方程计算浓度,结果洋葱中 4 个主要的黄酮类化学成分的含量约为 2.8mg/g。

**3 讨论**

本实验分别采用甲醇-水和乙腈-水,进行等度洗脱和梯度洗脱,对流动相和洗脱方式进行筛选和优化,结果表明,在乙腈-水的流动相中梯度洗脱,4 个黄酮类化学成分的色谱峰的峰形和分离度均优于甲醇-水系统。因此,选择乙腈-水水作为流动相。黄酮类化学成分的极性相对较大,供试品溶液的制备过程中,采用 80% 乙醇溶液,提取效率较高。而提取方式方面,超声提取方法比加热回流提取方法更为方便,所以采用超声提取。一般总黄酮的含量测定,多采用分光光度法,以芦丁为对照

品,但存在其他具有紫外吸收化学成分的干扰,影响含量测定结果的准确性,同时也不能提供黄酮种类的信息。本实验首先通过色谱分离,使各个化学成分获得较好的分离,而后通过二极管阵列检测器获得化学成分的紫外光谱图,推测其中的黄酮类成分,而后以芦丁为对照品,对其中的总黄酮进行定量分析,结果比较准确,能够提供洋葱中黄酮的种类信息。如果与质谱检测器联用,还可以初步推测其中可能黄酮类化学成分的结构式。

本实验建立的方法操作简便,具有优良的稳定性、精确度和重现性,能够较好的测定洋葱中总黄酮的含量,为进一步合理食用以及洋葱加工品的质量控制提供参考。

**参考文献:**

[1] 冯长根,吴悟贤,刘霞,等. 洋葱的化学成分及药理作用研究进展[J]. 上海中医药杂志,2003,37(7): 63-64.  
 [2] 刘良科,赵丽娟. 洋葱生物活性物质的研究进展[J]. 怀化学院学报,2009,28(5): 55-58.  
 [3] 袁玲. 洋葱和洋葱籽化学成分的研究[D]. 北京:北京协和医学院,2008.  
 [4] 祁英,丁江涛,苏景秀,等. 洋葱中黄酮类化合物的分布及其抗氧化活性的研究[J]. 中国食物与营养,2010,6(5): 67-71.  
 [5] 张强,孙玉军,储俊,等. 洋葱中黄酮类化合物的提取及其体外抗氧化活性研究[J]. 中国食品添加剂,2009,20(3): 74-79.  
 [6] 徐德峰,张卫明,孙晓明,等. 洋葱皮中黄酮类化合物的初步分析[J]. 食品科技,2006,31(8): 275-279.  
 [7] 王大力,金东日,廖世国. 高效液相色谱-质谱法鉴定洋葱中黄酮类化合物[J]. 延边大学学报(自然科学版),2007,33(3): 188-190.  
 [8] 张仁堂,秦静,孙欣,等. 洋葱皮中黄酮类物质的提取及分离纯化研究[J]. 中国食物与营养,2012,18(8): 50-54.  
 [9] 张维冰,王智聪,张凌怡. 超高效液相色谱-光电二极管阵列检测-串联四级杆质谱法测定红洋葱中黄酮醇及其糖苷类化合物[J]. 分析化学,2014,42(3): 415-422.  
 [10] Ren Q, Wu C S, Ren Y, et al. Characterization and identification of the chemical constituents from tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum* Gaertn) by high performance liquid chromatography/photodiode array detector/linear ion trap FTICR hybrid mass spectrometry[J]. Food Chemistry, 2013, 136 (3-4) 1377-1389.

(收稿日期 2015-05-06)