DOI:10.3969/j.issn.1000-9760.2016.05.004

HPLC-DAD 法同时测定苦荞麦保健品中芦丁 槲皮素 山奈酚含量*

任　强　吴　昊　聂其婷　刘　伟
（济宁医学院药学院，日照 276826）

摘　要　目的　建立 HPLC-DAD 方法，同时测定苦荞麦保健品中芦丁、槲皮素及山奈酚的含量。**方法**　采用色谱柱 TOSOH TSK gel ODS-100V（4.6 × 150 mm，3.0 μm），以乙腈-水（含 0.2% 冰醋酸）为流动相，梯度洗脱，柱温 35℃，流速 1.0 ml/min，检测波长 254 nm。**结果**　建立的 HPLC-DAD 分析方法，能够满足苦荞麦保健品中芦丁、槲皮素及山奈酚的完全分离，芦丁、槲皮素及山奈酚在 10 ~ 500 μg/ml 范围内有良好的线性关系 r^2 均大于 0.9997，重复性相对标准偏差（RSD）<2.3%，精密度 RSD <1.5%，加样回收率为 97.2% ~ 102.8%，检出限和定量限分别为 1μg/ml 和 5μg/ml。**结论**　该方法简便可行，测定结果准确，能够满足苦荞麦保健品中主要黄酮类化学成分测定的需要。

关键词　苦荞麦保健品；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（2016）10-317-04

Simultaneous determination of rutin, quercetin, and kaempferol in tartary buckwheat functional food by HPLC-DAD

REN Qiang, WU Hao, NIE Qiting, LIU Wei
(*School of Pharmaceutical Sciences, Jining Medical University, Rizhao* 276826, *China*)

Abstract: ***Objective***　To establish a high performance liquid chromatography with a diode array detector (HPLC-DAD) method for simultaneous determination of rutin, quercetin, and kaempferol in tartary buckwheat functional food. ***Methods***　The chromatographic separation was performed on a TOSOH TSK gel ODS-100V (4.6 × 150mm, 3.0μm) column. The mobile phase was composed of water containing 0.2% acetic acid (A) and acetonitrile (B) using gradient elution. The column temperature was maintained at 35℃; the flow rate was set at 1.0 ml/min; and UV absorbance was detected at a wavelength of 254 nm. ***Results***　The HPLC-DAD method was established and validated to determine the rutin, quercetin, and kaempferol in tartary buckwheat functional food. The calibration curves of rutin, quercetin, and kaempferol were in the range of 10 ~ 500μg/ml, with good linearity (r^2 >0.9997), repeatability (RSD <2.3%), precision (RSD <1.5%), recovery (97.2% ~ 102.8%), limit of detection (1μg/ml), and limit of quantification (5μg/ml). ***Conclusion***　The method is a simple, feasible, and accurate approach for the determination major flavonoids in tartary buckwheat functional food.

Keywords: Tartary buckwheat functional food; Flavonoids; HPLC-DAD; Determination

苦荞麦〔*Fagopyrum tataricum*（L.）Gaertn〕为蓼科（*Polygonaceae*）荞麦属（*Fagopyrum Mill*），一年生草本植物，又称鞑靼荞麦。主要分布于我国的云南省、四川省以及内蒙古自治区等地区。化学成分研究表明，苦荞麦中主要含有黄酮类、糖苷类及有机酸类等化学成分。黄酮类主要包括芦丁、槲皮苷、异槲皮苷、槲皮素、山奈酚等。糖苷类化学成分主要包括 Tatarisides A-G、Taroside 等[1-2]。药理研究表明，苦荞麦具有治疗糖尿病、降血糖、降低血脂以及抗氧化等作用[3-7]。

* ［基金项目］山东省医药卫生科技发展计划项目（2014 WS 0508）

近年来,苦荞麦作为保健食品应用越来越广泛,比如苦荞麦茶、苦荞麦粉等。但是,对苦荞麦保健品中的芦丁、槲皮素、山奈酚等黄酮类化学成分同时定量分析的研究较少。本文拟采用 HPLC-DAD 方法,以芦丁、槲皮素及山奈酚为对照品,对苦荞麦保健品中的芦丁、槲皮素及山奈酚 3 个黄酮类化学成分进行定量分析,为提高苦荞麦保健品的质量提供参考。

1　仪器与实验材料

1.1　仪器

高效液相色谱仪:泵 LC-20AT(Shimadzu,日本),自动进样器 SIL-20A,柱温箱 CTI-20AC,检测器 SPD-M20A,工作站 LC solution;色谱柱 TOSOH TSK gel ODS-100V(4.6 × 150 mm,3.0μm);Thermo Scientific Finnpipette F3 单道移液器(赛默飞世尔上海仪器有限公司;电子天平(准确至 1/‰,Sartorius Application Company);SB-5200DTD 型超声波清洗机(宁波新芝生物科技股份有限公司);TGL-185 台式高速冷冻离心机(长沙平凡仪器仪表有限公司);一次性针头式过滤器尼龙膜针头滤器(杰岛科技公司)。

1.2　实验材料

对照品芦丁(批号:MUST-13040302),购自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;槲皮素(批号:C20J6Y1722)、山奈酚(批号:YY20110525),购自上海源叶生物科技有限公司。乙腈,色谱级,购于 Burdick & Jackson 试剂公司;乙酸,色谱级,购于 TEDIA 试剂公司;无水乙醇,分析纯,购自莱阳经济技术开发区精细化工厂;水,去离子水,购于杭州娃哈哈公司;苦荞麦保健品详细信息。见表 1。

表 1　苦荞麦保健品样品信息

样品代码	样品名称	生产厂家	来源
样品 1	荞麦粉	成都人民营养食品厂	重庆北碚超市
样品 2	苦荞麦粉	不详	日照秦楼集市
样品 3	苦荞茶	西昌三匠苦荞开发有限公司	京东网上商城
样品 4	黑苦荞全株茶	西昌三匠苦荞开发有限公司	京东网上商城
样品 5	野山荞养生茶	内蒙古和兴利食品有限公司	日照凯德超市

2　方法与结果

2.1　混合对照品溶液

取芦丁、槲皮素及山奈酚对照品适量,精密称定,加 70% 乙醇溶液超声使溶解,得到每 1ml 含有 1mg 的 3 种混合对照品的储备液。而后用 70% 乙醇稀释,得到系列浓度的 3 种混合对照品溶液。

2.2　供试品溶液

取样品约 0.1g,精密称定,置 2ml 离心管中,精密加入 70% 乙醇 1ml,摇匀,称定重量。浸泡 30min 后,超声(功率 100W,频率 40kHz)处理 30min,取出,放冷,再称定重量,用 70% 乙醇补足减失的重量,摇匀,用 10000rpm 离心 10min,取上清液,用 0.22μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.3　色谱条件

色谱柱 TOSOH TSK gel ODS-100V(4.6 × 150 mm,3.0μm);流动相:A 相为水(含 0.2% 冰醋酸),B 相为乙腈,梯度洗脱,程序为 0 ~ 30min 5% ~ 95% B,30 ~ 32min 95% ~ 5% B,32 ~ 40 min 5% B;流速为 1ml/min;柱温为 35℃;检测波长为 254nm;进样量为 5μl,上述色谱条件下,分析对照品和样品。对照品芦丁、槲皮素及山奈酚色谱图。见图 1。

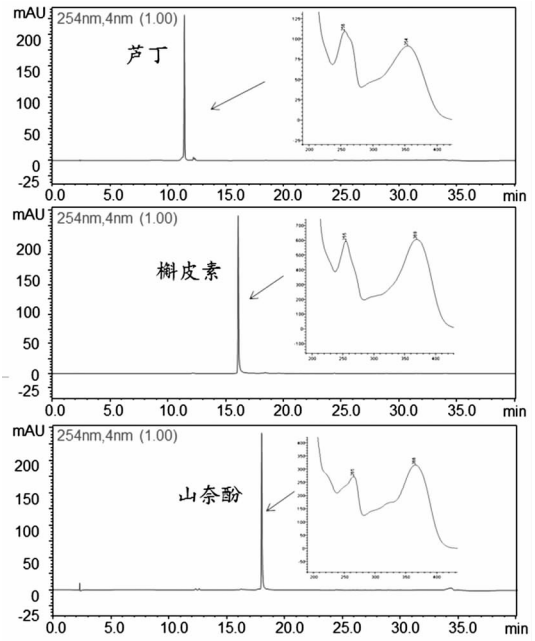

图 1　对照品芦丁、槲皮素及山奈酚的色谱图及紫外光谱图

2.4　含量测定方法学验证

2.4.1　线性关系考察　分别将系列浓度的 3 种混合对照品溶液(10μg/ml、25μg/ml、50μg/ml、125μg/ml、250μg/ml、500μg/ml),按照“2.3 项下”的色谱条件,从低浓度到高浓度,注入高效液相色谱仪,记录色谱图峰面积,以 3 种待测物浓度(X)

为横坐标,3 种待测物的峰面积(Y)为纵坐标,用 EXCEL 软件进行线性回归计算,得到线性回归方程和相关系数 r^2 值。3 种对照品(芦丁、槲皮素及山奈酚)的回归方程分别为 Y = 8782X - 4896.7, Y = 22389X - 55588, 及 Y = 15197X - 54953, 线性相关系数 r^2 均 > 0.9997。

2.4.2　精密度试验　通过测定低、中、高 3 种浓度水平(10μg/ml、50μg/ml、250μg/ml)的质控样品连续测定 6 次,计算相对标准偏差(RSD),结果精密度 RSD < 1.5%,表明方法的精密度良好,可以满足含量测定的要求。

2.4.3　重复性试验　分别称取同一份苦荞麦茶(样品 3),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,分别计算芦丁、槲皮素及山奈酚,3 个黄酮类化学成分峰面积,结果 3 种成分的精密度 RSD 值均 < 2.3%,表明该方法的重复性符合《中国药典》规定的含量测定的要求。

2.4.4　稳定性试验　将苦荞麦茶(样品 3),按照"2.2 项下"方法制备供试品溶液,室温放置,分别于 0、4、8、12、24、48 h 按照"2.3 项下"测定,分别计算苦荞麦茶样品色谱图中芦丁、槲皮素及山奈酚的色谱峰面积,结果 RSD 均 < 1.9%,表明经过样品前处理方法制备的溶液,在室温放置 48 h 稳定性良好。

2.4.5　回收率试验　称取苦荞麦茶(样品 3),6 份,每份各 0.05 g,精密加入芦丁、槲皮素及山奈酚 3 种混合对照品溶液各 1 ml,置于通风橱下,待所加溶液挥干,按照"2.2 项下"供试品溶液制备方法处理后,进行 HPLC-DAD 分析,将所得的 3 种待测物的色谱峰面积,带入相应的标准曲线,计算结果回收率在 97.2% ~ 102.8% 范围内,RSD < 2.9%。表明该方法测定准确度较高,可以满足含量测定要求。

2.4.6　最低检测限(LLOD)和最低定量限(LLOQ)　取 3 种混合对照品最低浓度(10μg/ml)溶液,用 70% 乙醇进行稀释,而后进行 HPLC-DAD 分析,记录信号强度与噪音的比值,信噪比 S/N ≥ 3 时的溶液浓度确定为 LLOD, S/N ≥ 10 时的溶液浓度确定为 LLOQ。结果该方法测定 3 种黄酮类成分的 LLOD 为 1μg/ml, LLOQ 为 5μg/ml。

2.5　样品测定

取 5 种苦荞麦样品,具体信息详见表 1。按照"2.2 项下"方法制备供试品溶液,按照"2.3 项下" HPLC-DAD 分析方法进行分析。5 种苦荞麦样品中芦丁、槲皮素及山奈酚的含量见表 2。

表 2　苦荞麦保健品样品中 3 个黄酮类化学成分含量测定结果(mg/g)

对照品名称	样品 1	样品 2	样品 3	样品 4	样品 5
芦丁	26.24	5.70	0.72	0.71	5.92
槲皮素	0.76	0	8.03	8.10	0.26
山奈酚	0	0	0.51	0.50	0

3　讨论

苦荞麦中主要含有槲皮素和山奈酚两种黄酮苷元。槲皮素在 250 ~ 260nm 和 365 ~ 375nm 有最大吸收;而山奈酚在 260 ~ 270nm 和 360 ~ 370nm 有最大紫外吸收,最终选择 254nm 为测定波长。

笔者分别采用甲醇-水、甲醇-水-冰醋酸、乙腈-水、乙腈-水-冰醋酸,进行梯度洗脱,对流动相和洗脱程序进行筛选和优化,发现在乙腈-水-冰醋酸的流动相中梯度洗脱,3 个黄酮类化学成分的色谱峰峰形和分离度较好,这可能与冰醋酸能较好地抑制黄酮类成分解离的原因有关。因此,本实验采用乙腈-水-冰醋酸作为流动相。

经过对苦荞麦样品的分析,发现样品 1、2、5 中主要含有芦丁,含量相对较高。而样品 3 和 4 中主要含有槲皮素类化学成分。化学成分及含量的差异可能是由于加工方式的不同,使芦丁水解为苷元的形式即槲皮素。

此外,本实验建立的方法操作简便,具有良好的精确度和准确度,能够较好地满足苦荞麦样品中黄酮类化学成分的含量测定,为进一步合理食用和质量控制提供一定的参考。

参考文献:

[1]　Zheng CJ, Hu CL, Ma XQ, et al. Cytotoxic phenylpropanoid glycosides from Fagopyrum tataricum (L.) Gaertn[J]. Food Chem, 2012, 132(1): 433-438. DOI: 10.1016/j.foodchem.2011.11.017.

[2]　Ren Q, Wu CS, Ren Y, Zhang JL. 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 Chem, 2013, 136(3-4): 1377-1389. DOI: 10.1016/j.foodchem.2012.09.052.

(下转第 323 页)

而且还可以通过提高 caspase 的活性或降低 Erk1/2 的磷酸化作用使胰腺癌细胞凋亡增加[9]。转染了 B7-H4-siRNA 的间充质干细胞株 C3H10 与小鼠淋巴瘤细胞株 EL-4 共培养,结果发现 C3H10 能抑制 EL-4 的增殖[10]。

本研究人工设计并合成 B7-H4-siRNA,成功转染卵巢癌 SKOV-3 细胞,采用 MTT 法检测 siRNA 对细胞生长的抑制作用,细胞计数法计算细胞倍增时间,结果显示 B7-H4-siRNA 组与转染试剂对照组、随机乱码组和未转染组相比,细胞生长抑制作用明显,细胞倍增时间延长,提示 siRNA 沉默 B7-H4 基因能明显抑制 SKOV3 细胞的增殖能力。

综上所述,利用 siRNA 沉默 B7-H4 基因能明显抑制卵巢癌细胞株 SKOV3 的增殖能力,可以使细胞生长受到抑制,倍增时间延长,特异性干扰 B7-H4 基因的表达有望成为治疗卵巢癌的一种新手段。

参考文献:

[1] 王丽,许国峰,欧阳俊等. 卵巢肿瘤中 B7-H4 分子的表达及临床意义[J]. 现代免疫学,2013,33(6):446-450. DOI:1001-2478(2013)06-0446-05.

[2] 史亚飞,韩晓菲,李磊,等. 乳腺癌分子分型在新辅助化疗中的疗效预测[J]. 济宁医学院学报,2015,38(5):327-330. DOI:10.3969/j.issn.1000-9760.2015.05.007.

[3] Salceda S, Tang T, Kmet M, et al. The immunomodulatory protein B7-H4 is overexpressed in breast and ovarian cancers and promotes epithelial cell transformation[J] Exp Cell Res, 2005, 306(1):128-141. DOI:10.1016/j.yexcr.2005.01.018.

[4] Smith JB, Stashwick C, Powell DJ Jr. B7-H4 as a potential target for immunotherapy for gynecologic cancers: a closer look[J]. Gynecol Oncol, 2014, 134(1):181-189. DOI:10.1016/j.ygyno.2014.03.553.

[5] Dangaj D, Scholler N. Blocking the B7-H4 pathway with novel recombinant antibodies enhances T cell-mediated antitumor responses[J]. Oncoimmunology, 2013, 2(8): e25913. DOI:10.4161/onci.25913.

[6] Dangaj D, Lanitis E, Zhao A, et al. Novel recombinant human b7-h4 antibodies overcome tumoral immune escape to potentiate T-cell antitumor responses[J]. Cancer Res, 2013, 73(15):4820-4829. DOI:10.1158/0008-5472.CAN-12-3457.

[7] 张羽,陈曾燕. B7-H4 在上皮性卵巢癌中的表达及意义[J]. 临床肿瘤学杂志,2013,18(12):1104-1107. DOI:1009-0460(2013) 12-1104-04.

[8] Peng HX, Wu WQ, Yang DM, et al. Role of B7-H4 siRNA in Proliferation, Migration, and Invasion of LOVO Colorectal Carcinoma Cell Line[J]. Biomed Res Int, 2015, 2015:326981. DOI:10.1155/2015/326981.

[9] Qian Y, Hong B, Shen L, et al. B7-H4 enhances oncogenicity and inhibits apoptosis in pancreatic cancer cells[J]. Cell Tissue Res, 2013, 353(1):139-151. DOI:10.1007/s00441-013-1640-8.

[10] Yang AP, Tang LT, Chen JM. Inhibitory effect of bone marrow mesenchymal stem cells on lymphoma cell proliferation[J]. Zhongguo shi yan xue ye xue za zhi, 2014, 22(6):1610-1615. DOI:10.7534/j.issn.1009-2137.2014.06.020.

(收稿日期　2016-04-15)

(上接第 319 页)

[3] Liu CL, Chen YS, Yang JH, et al. Antioxidant Activity of Tartary(Fagopyrum tataricum(L.) Gaertn.) and Common (Fagopyrum esculentum Moench) Buckwheat Sprouts[J]. J Agric Chem, 2008, 56(1):173-178. DOI:10.1021/jf072347s.

[4] Wang M, Liu JR, Gao JM, et al. Antioxidant Activity of Tartary Buckwheat Bran Extract and Its Effect on the Lipid Profile of Hyperlipidemic Rats[J]. J Agric Chem, 2009, 57(11):5106-5112. DOI:10.1021/jf900194s.

[5] Li D, Li XL, Ding XL. Composition and Antioxidative Properties of the Flavonoid-rich Fractions from Tartary Buckwheat Grains[J]. Food Science and Biotechnology, 2010, 19(3):711-716. DOI:10.1007/s10068-010-0100-4.

[6] Guo XD, Ma YJ, Parry J, et al. Phenolics Content and Antioxidant Activity of Tartary Buckwheat from Different Locations[J]. Molecules, 2011, 16(12):9850-9867. DOI:10.3390/molecules16129850.

[7] Qin PY, Wu L, Yao Y, et al. Changes in phytochemical compositions, antioxidant and α-glucosidase inhibitory activities during the processing of tartary buckwheat tea[J]. Food Research International, 2013, 50(2):562-567. DOI:10.1016/j.foodres.2011.03.028.

(收稿日期　2016-02-29)