

全自动加压溶剂萃取 ——高效液相色谱法测定洋葱中芦丁和槲皮素含量

刘新艳¹, 张延国¹, 邹积鑫², 徐东辉¹, 李凌云¹, 刘肃¹

1. 农业部蔬菜品质监督检验测试中心(北京), 北京 100081
2. 中国人民公安大学, 北京 100038

摘要 通过与水浴回流法比较,建立了全自动加压溶剂萃取法,可简单、快速测定洋葱中保健活性物质芦丁和槲皮素含量。采用高效液相色谱仪在 368nm 波长处测定芦丁和槲皮素含量。色谱柱为 C₁₈ 柱,流动相为甲醇-磷酸溶液(58:42, 体积比),以 1.0ml/min 流速等度洗脱,外标法定量。结果表明,在芦丁和槲皮素质量浓度为 0.1~200mg/L 时,其线性相关系数均大于 0.999。在 2.0~100mg/kg 的添加水平下,芦丁和槲皮素的平均回收率分别为 83.5%~94.2%和 84.8%~91.2%;相对标准偏差分别为 2.9%~7.4%和 4.2%~6.9%(n=6)。全自动加压溶剂萃取法的检出限(LOD),芦丁和槲皮素分别为 0.05, 0.03mg/kg。定量限(LOQ),芦丁和槲皮素分别为 0.2, 0.1mg/kg。研究建立的运用全自动加压溶剂萃取仪提取、高效液相色谱测定洋葱中芦丁和槲皮素的方法,线性良好,重现性较好,灵敏度较高,能够满足蔬菜和水果等农产品中芦丁和槲皮素的快速检测。

关键词 全自动加压溶剂萃取仪;高效液相色谱法;芦丁;槲皮素

中图分类号 O658.2

文献标识码 A

doi 10.3981/j.issn.1000-7857.2011.01.07

Determination of Contents of Rutin and Quercetin in Onion by Automated Pressurized Liquid Extractor and High Performance Liquid Chromatography

LIU Xinyan¹, ZHANG Yanguo¹, ZOU Jixin², XU Donghui¹, LI Lingyun¹, LIU Su¹

1. Supervision and Testing Center for Vegetable Quality, Ministry of Agriculture, Beijing 100081, China
2. Chinese People's Public Security University, Beijing 100038, China

Abstract As compared with the water circumfluence method, a simple and rapid method was developed for the determination of contents of rutin and quercetin in onion by Automated Pressurized Liquid Extractor (APLE). The contents of rutin and quercetin were first determined by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) in 368nm and analyzed on the C18 column by a isocratic elution, using a mixture of methanol-phosphoric acid solution (58:42, V/V) as the mobile phase with a flow rate of 1.0mL/min. The method is calibrated by an external standard method. Under the optimal conditions, the correlation coefficient of rutin and quercetin in the concentration range of 0.1~200mg/L is more than 0.999. The average recovery rates of rutin and quercetin in the spiked range of 2.0~100mg/kg are 83.5%~94.2% and 84.8%~91.2%, respectively. And the relative standard deviations are 2.9%~7.4% and 4.2%~6.9%, respectively (n=6). Using the automated pressurized liquid extractor method, the detection limit (LOD) of rutin and quercetin are 0.05mg/kg and 0.03mg/kg, respectively, and the quantitative limits (LOQ) of rutin and quercetin are 0.2mg/kg and 0.1mg/kg, respectively. Therefore, the method developed for the determination of rutin and quercetin in onion by automated pressurized liquid extractor and high performance liquid chromatography gives a good linearity, repeatability and high sensitivity, and is suitable for the rapid determination of rutin and quercetin in vegetables and fruits.

Keywords automated pressurized liquid extractor; high performance liquid chromatography; rutin; quercetin

收稿日期:2010-09-15;修回日期:2010-11-08

基金项目:中国博士后科学基金项目(20080440459)

作者简介:刘新艳,助理研究员,研究方向为农产品营养品质检测与仪器分析,电子信箱:xyliu8112@163.com;刘肃(通信作者),研究员,研究方向为食品安全与农药残留,电子信箱:liusu@mail.caas.net.cn

0 引言

洋葱是一种保健型蔬菜,所含的类黄酮是起保健作用的生物活性物质之一。类黄酮属植物次生代谢产物,食品界现已将它作为保健功能因子应用于保健食品的加工中。目前已知的主要功能包括消除自由基、扩张血管、改善微循环、降血脂、降胆固醇及防治心脑血管疾病等。已有研究表明,一些类黄酮,如槲皮素的抗氧化活性远高于传统的抗氧化物质(V_C 、 V_E)^[1]。类黄酮广泛分布在植物组织细胞中,在花、叶、果实中,多以类黄酮苷的形式存在,而在木质部组织中,多以游离的类黄酮苷元的形式存在^[2]。类黄酮在蔬菜作物中的分布也十分广泛,含量较高的蔬菜种类为百合科葱属蔬菜、十字花科蔬菜^[3]。蔬菜中主要存在5种形式的类黄酮,即槲皮素、山奈黄素、杨梅黄酮、芹菜素、毛地黄黄酮,前三种属于黄酮醇,后两种属于黄酮^[4]。洋葱为百合科葱属植物,其主要的类黄酮物质是芦丁和槲皮素。芦丁为槲皮素的糖苷,在酸性条件下可水解成槲皮素。

类黄酮物质的化学稳定性不高,在样品提取和加工中经常因化学作用而降解和变色,影响变色反应的条件包括pH值、温度、光照、氧、酶、金属离子、氧化剂等。目前国内外对芦丁和槲皮素的研究大多集中在中草药和水果的提取与测定两个方面^[5-9]。常用的提取方法为超声提取法和水浴回流法。超声提取法中,由于溶剂温度随超声时间的长短产生不同的变化,可控性不强,可引起提取效率的不同,影响含量测定的精密度。白凤梅等^[10]利用水浴回流法对洋葱中槲皮素的含量进行研究,该方法步骤繁琐,萃取时间长达数小时,溶剂消耗量大,准确性偏低。全自动加压溶剂萃取仪是一种专用于固体、半固体样品的快速样品前处理装置,能同时提取样品中的各类微量有机物质,萃取时间短,消耗溶剂少,非常适合于色谱、色质联用等常规分析仪器的样品预处理。测定方面,国内的相关分析多集中于总类黄酮含量的测定,常用的方法为比色法和高效液相色谱法(HPLC)^[11-12]。比色法的干扰因素较多,结果准确度不高,但操作简单,成本低;高效液相色谱法能够准确测定样品含量,是目前检测机构常用的方法。因此,对于类黄酮物质的研究,建立稳定快速的提取方法是研究的关键。本文以洋葱为研究对象,建立了利用全自动加压溶剂萃取仪进行芦丁和槲皮素提取,以及利用HPLC法进行测定的方法,以期为今后的科学研究提供有力的技术支撑。

1 材料、仪器和方法

1.1 仪器与试剂

APLE-2000型全自动加压溶剂萃取仪(北京吉天仪器有限公司);高效液相色谱仪,配二级管阵列检测器(美国Agilent公司);色谱柱为Agilent Diamonsil C_{18} (250mm×4.6mm i.d., 5 μ m);Mettler AE 240型万分之一天平(梅特勒仪器(上海)有限公司);Mettler Toledo PL 602-S型电子天平(梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司);电热恒温鼓风干燥箱(天津市中环实验电炉有限公司);Pulverisette 2型实验室白式研磨仪(德

国Fritsch公司);Milli-Q纯水器(美国Millipore公司);旋转蒸发仪(瑞典Buchi公司);电热恒温水浴锅(北京科伟永兴仪器有限公司)。

芦丁标准品,纯度 $\geq 95\%$ (Sigma公司);槲皮素标准品,纯度 $\geq 99\%$ (Sigma公司);甲醇(HPLC级,J. T. Baker公司);石油醚(分析纯,北京化学试剂公司);磷酸(分析纯,北京化工厂);实验用水为Milli-Q超纯水。

1.2 标准溶液的配制

分别准确称取10mg(精确至0.1mg)芦丁和槲皮素标准品,加入少量甲醇溶解,移至25mL容量瓶,用甲醇定容,混匀,得到400mg/L标准储备液。取适量标准储备液,用甲醇稀释成200,50,10,1,0.1mg/L系列标准溶液。置于-20℃冰箱保存。

1.3 样品前处理方法

样品为市售紫皮洋葱。去外皮,切碎,于65℃电热恒温鼓风干燥箱烘24h,磨碎。样品处理分别用两种方法:水浴回流法、全自动加压溶剂萃取法。

1.3.1 水浴回流法

参考白凤梅等^[10]方法,称取烘干磨碎的洋葱样品1.00g于150mL圆底烧瓶中,加入石油醚15mL,50℃水浴回流1h,除去脂溶性物质,然后旋转蒸干石油醚,加入75%甲醇80mL,90℃水浴回流3h。取出圆底烧瓶,自然冷却,过滤于100mL容量瓶中,用少量75%甲醇清洗滤渣,合并滤液,75%甲醇定容。滤液经0.45 μ m微孔滤膜过滤后,上机检测。

1.3.2 全自动加压溶剂萃取法

将全自动加压溶剂萃取仪上的萃取池取下,装填适量玻璃珠,上层放入滤片。将称取的洋葱样品1.00g放置于滤片上,拧上萃取池的上盖,放置于仪器卡槽上。

(1) 除杂过程:石油醚去脂。

萃取溶剂:石油醚;萃取压力:10MPa;预热时间:120s;加热时间:120s;萃取时间:60s;加热温度:100℃;淋洗体积:40%;氮吹时间:60s;循环次数:1。

(2) 萃取过程:甲醇提取类黄酮物质。

萃取溶剂:甲醇;萃取压力:10MPa;预热时间:0s;加热时间:300s;萃取时间:300s;加热温度:120℃;淋洗体积:40%;氮吹时间:100s;循环次数:2。

萃取完成后,取下样品收集瓶,转移至100mL容量瓶中,用少量75%甲醇清洗样品收集瓶,合并滤液,75%甲醇定容。滤液经0.45 μ m微孔滤膜过滤后,上机检测。

1.4 色谱条件

色谱柱:Agilent Diamonsil C_{18} 柱(4.6mm×250mm,5 μ m);流动相:甲醇-0.4%磷酸溶液(pH=3,体积比58:42),等度洗脱;检测波长368nm;流速1.0mL/min;柱温30℃;进样量10 μ L。根据色谱峰的保留时间定性,外标法定量。

2 结果与讨论

2.1 色谱条件优化

实验比较了乙腈-水、甲醇-水、乙腈-磷酸溶液、甲醇-磷

酸溶液 4 种流动相体系, 发现甲醇-磷酸溶液的分离效果较好, 且有效地改善了峰形, 避免拖尾峰的出现。

为了考查磷酸浓度对保留时间的影响, 分别采用体积浓度为 0.4%, 1.0%, 2.0% 磷酸溶液。结果表明, 磷酸浓度对样品的分离效果并没有显著影响。考虑到流动相酸性强度对色谱柱的损害, 最终选用甲醇-0.4% 磷酸溶液 (体积比 58:42) 作为流动相。

在第 1.4 节的色谱条件下, 芦丁和槲皮素标准品的 HPLC 图谱如图 1 所示, 芦丁保留时间为 4.629min; 槲皮素保留时间为 9.493min。洋葱样品中芦丁、槲皮素的色谱峰与溶剂峰及干扰峰完全分离, 如图 2 所示。

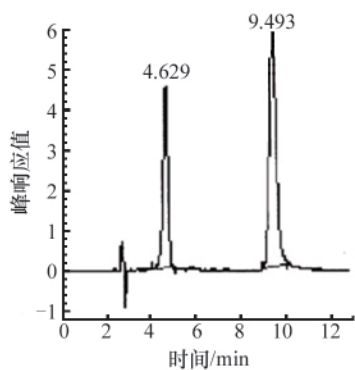


图 1 芦丁和槲皮素标样的液相色谱图
Fig. 1 HPLC chromatogram of rutin and quercetin standard sample

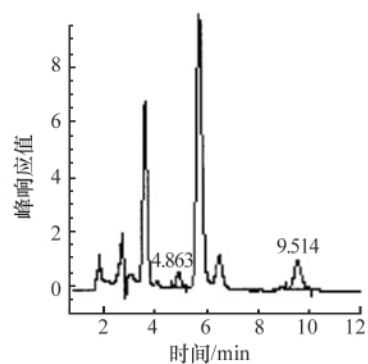


图 2 洋葱样品的液相色谱图
Fig. 2 HPLC chromatogram of rutin and quercetin in onion sample

2.2 方差分析

在第 1.3 节的样品前处理中, 分别称取同一洋葱样品 6 份, 其中 3 份用于水浴回流法, 另外 3 份采用全自动加压溶剂萃取法。比较两种提取方法所测定的芦丁和槲皮素含量, 结果见表 1。经方差分析, 芦丁与槲皮素的 F 值均小于 $F_{0.05}$, 表明两种前处理方法对实验结果没有显著差异。

表 1 两种提取方法的方差分析
Table 1 Analysis of variance between two extracted methods

化合物名称	提取方法	含量 $/(mg \cdot kg^{-1})$	平均含量 $/(mg \cdot kg^{-1})$	方差	F	$F_{0.05}$
芦丁	水浴回流法	47.4	47.3	0.16	2.61	7.71
		46.9				
		47.7				
	全自动加压溶剂萃取法	47.5	47.9	0.16		
		48.3				
		47.8				
槲皮素	水浴回流法	64.4	64.6	0.32	1.04	7.71
		65.2				
		64.1				
	全自动加压溶剂萃取法	65.6	65.0	0.30		
		64.5				
		65.0				

2.3 线性关系与检出限

将芦丁和槲皮素标准溶液 0.1, 1, 10, 50, 200mg/L, 按照质量浓度从低到高依次进样, 分别以芦丁和槲皮素标样的质量浓度为横坐标, 以峰面积为纵坐标, 得到标准曲线。由表 2 可知, 芦丁和槲皮素在 0.1~200mg/L 范围具有良好的线性关系。在空白样品中添加芦丁和槲皮素标准溶液, 分别按照信噪比 (S/N) 等于 3 和大于 10, 计算全自动加压溶剂萃取法的检出限 (LOD) 和定量限 (LOQ), 如表 2 所示, 该方法线性范围较宽, 灵敏度较高。

2.4 回收率与相对标准偏差

称取洋葱样品 1.00g, 加入芦丁和槲皮素标准溶液, 后续操作与第 1.3.2 节相同。实验选择 2.0, 20, 100mg/kg 3 个水平进行添加回收实验, 每个水平重复 6 次测定, 结果见表 3。芦丁和槲皮素的平均回收率分别为 83.5%~94.2% 和 84.8%~91.2%; 相对标准偏差 (RSD) 分别为 2.9%~7.4% 和 4.2%~6.9%。

表 2 芦丁和槲皮素的回归方程、相关系数、方法检出限和定量限

Table 2 Regression equations, correlation coefficients, detection limits and quantitation limits for rutin and quercetin

化合物名称	回归方程	相关系数	LOD/ $(mg \cdot kg^{-1})$	LOQ/ $(mg \cdot kg^{-1})$
芦丁	$y=13.697x+10974$	0.9998	0.05	0.2
槲皮素	$y=36.048x-29.685$	0.9999	0.03	0.1

表 3 不同添加浓度下芦丁和槲皮素的回收率
与相对标准偏差 ($n=6$)

Table 3 Recovery rates and RSDs of rutin and quercetin
in different spiked levels ($n=6$)

化合物名称	添加浓度/($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)	平均回收率/%	RSD/%
芦丁	2.0	83.5	7.4
	20	93.7	2.9
	100	94.2	5.8
槲皮素	2.0	84.8	5.7
	20	91.2	4.2
	100	89.6	6.9

3 结论

采用水浴回流法、全自动加压溶剂萃取法提取洋葱中芦丁和槲皮素含量,经方差分析没有显著差异。水浴回流法操作步骤繁琐,萃取时间较长,溶剂消耗量大,不利于类黄酮物质的准确测定。运用全自动加压溶剂萃取仪,在高温(50~200℃)、高压(10~20MPa)条件下,加快待测物从基体上的解吸和溶解动力学过程,有效地缩短了提取时间,同时由于加热的溶剂具有较强的溶解能力,也可节约溶剂用量。本文建立的运用全自动加压溶剂萃取仪提取、高效液相色谱测定洋葱中芦丁和槲皮素的方法,线性良好,重现性较好,灵敏度较高,适用于蔬菜和水果等农产品中芦丁和槲皮素的快速测定。

参考文献 (References)

- [1] Vinson J A, Dabagh Y A, Serry M M. Plant flavonoids, especially tea flavonols, are powerful antioxidants using an invitro oxidation model for heart disease [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1995, 43 (11): 2800-2804.
- [2] 阚建全. 食品化学[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2002: 297-300.
Kan Jianquan. Food chemistry[M]. Beijing: China Agricultural University Press, 2002: 297-300.
- [3] 陈贵林, 李建文, 何洪巨. 蔬菜类黄酮研究进展 [J]. 中国食物与营养,

2007(1): 57-59.

Chen Guilin, Li Jianwen, He Hongju. *Food and Nutrition in China*, 2007 (1): 57-59.

- [4] Hertog M G L, Hollman P C H, Katan M B. Content of potentially anti-carcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in the Netherlands [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1992, 40(12): 2379-2383.
- [5] 茅力, 金念祖, 陈景衡. 反相高效液相色谱法测定苹果中槲皮素的含量[J]. 色谱, 2005, 23(3): 282-284.
Mao Li, Jin Nianzu, Chen Jingheng. *Chinese Journal of Chromatography*, 2005, 23(3): 282-284.
- [6] 朱丽华, 蒋国强, 杨水新. 高效液相色谱法测定菟丝子中芦丁、槲皮素及山奈酚的含量[J]. 浙江中医学院学报, 2001, 25(4): 65-66.
Zhu Lihua, Jiang Guoqiang, Yang Shuixin. *Journal of Zhejiang College of Traditional Chinese Medicine*, 2001, 25(4): 65-66.
- [7] Jia Z, Tang M, Wu J. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals [J]. *Food Chemistry*, 1999, 64(4): 555-559.
- [8] Mattila P, Astola J, Kumpulainen J. Determination of flavonoids in plant material by HPLC with diode-array and electro-array detections[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2000, 48(12): 5834-5841.
- [9] Mian K H, Mohamed S. Flavonoid (myricetin, quercetin, kaempferol, luteolin and apigenin) content of edible tropical plants[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2001, 49(6): 3106-3112.
- [10] 白凤梅, 闫红, 蔡同一. 利用 HPLC 对不同品种洋葱中槲皮素含量的研究[J]. 食品工业科技, 2000, 21(2): 66-68.
Bai Fengmei, Yan Hong, Cai Tongyi. *Science and Technology of Food Industry*, 2000, 21(2): 66-68.
- [11] 王敏, 魏益民, 高锦明, 等. 反相高效液相色谱法测定苦荞中的芦丁和槲皮素 [J]. 中国食品学报, 2005, 5(3): 113-116.
Wang Min, Wei Yimin, Gao Jinming, et al. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2005, 5(3): 113-116.
- [12] 孙莲, 严雷, 石晓呢, 等. RP-HPLC 测定桑叶、桑枝和桑花中槲皮素和山奈酚的含量[J]. 药物分析杂志, 2005, 25(10): 1230-1233.
Sun Lian, Yan Lei, Shi Xiaoni, et al. *Chinese Journal of pharmaceutical analysis*, 2005, 25(10): 1230-1233.

(责任编辑 吴晓丽)

·学术动态·

“第九届全国微型化学实验研讨会暨 第七届中学微型实验研讨会”征文



中国化学会将于 2011 年 7 月 19—24 日在武汉市召开“第九届全国微型化学实验研讨会暨第七届中学微型实验研讨会”。会议主题:“绿色、低碳、创新、和谐”。

征文内容:具有推广价值的微型实验方案、新仪器(含无机、有机、高分子、分析、物化和中小学自然科学)的新 ML 的软硬件;微型实验在科学研究与工农业生产中的应用;推广应用 ML 经验总结与问题讨论(如:ML 在生态文明建设中的作用、ML 与创新教育、ML 在研究性学习中的应用、ML 与绿色化学、环境保护与环境污染处理、低碳经济、资源节约型与环境友好型社会建设等);境外微型实验的新进展。

联系方式:武汉市洪山区雄楚大街 693 号武汉工程大学材料科学与工程学院(430074), 鄢国平;电话:027-87196030;网站: <http://news.wit.edu.cn>。