

doi: 10.3969/j.issn.0490-6756.2017.05.025

HPLC 测定香椿中的有机酸和黄酮等 7 种活性成分

高 意, 周光明, 张彩虹, 于 璐, 陈军华, 廖安辉

(西南大学化学化工学院发光与实时分析教育部重点实验室, 重庆 400715)

摘要: 采用 Phenomenex C₁₈ 色谱柱 (150 mm×4.6 mm, 5 μm) 分离 7 种成分; 流动相为甲醇-0.1% 醋酸溶液, 梯度洗脱; 流速: 0.8 mL·min⁻¹, 紫外检测波长: 290 nm, 柱温: 35 °C. 建立超声辅助萃取-高效液相色谱法 (HPLC) 分离香椿中表儿茶素、没食子酸、儿茶素、芦丁、杨梅素、槲皮素和山奈酚 7 种活性成分及其含量测定的方法. 结果发现 7 种成分在 15 min 内均达到基线分离, 线性关系良好 ($r > 0.9991$, $n = 7$), 平均回收率均在 99.23%~104.5% (RSD% < 1.26%, $n = 3$). 本实验采用超声波法提取, 方法简单、快速、经济、可靠, 可用于香椿的质量监控.

关键词: 高效液相色谱; 香椿; 超声萃取; 黄酮; 有机酸; 含量测定

中图分类号: O652.62 文献标识码: A 文章编号: 0490-6756(2017)05-1039-06

Determination of seven active ingredients in *Agrimonia Pilosa Ledeb* by HPLC

GAO Yi, ZHOU Guang-Ming, ZHANG Cai-Hong, YU Lu, CHEN Jun-Hua, LIAO An-Hui

(Key Laboratory on Luminescence and Real-Time Analysis, Ministry of Education,
School of Chemistry and Chemical Engineering, Southwest University, Chongqing 400715, China)

Abstract: The separation of seven active ingredients is performed on Phenomenex C₁₈ column (150 mm×4.6 mm, 5 μm) with step gradient. Mobile phase is methanol-0.1% acetic acid at the flow rate of 0.8 mL·min⁻¹; the UV detection wavelength is 290 nm and the column temperature is set at 35 °C. The HPLC method is established for separation and determination of epicatechin, gallic acid, catechin, rutin, myricetin, quercetin and kaempferol in *Toona sinensis* by ultrasonic extraction. The good separation of epicatechin, gallic acid, catechin, rutin, myricetin, quercetin and kaempferol is achieved within 15 min. Calibration curves of the seven active ingredients show linear relationship ($r > 0.9991$, $n = 7$). The average recoveries are within 99.23%~104.5% (RSD% < 1.26%, $n = 3$). This ultrasonic extraction method is simple, fast, economical and reliable.

Keywords: HPLC; *Toona sinensis*; Ultrasonic extraction; Flavonoids; Organic acid; Content determination

1 引言

香椿 (*Toona sinensis*), 又名红椿、椿芽树、椿花, 根皮、叶、嫩枝及果入药, 嫩叶枝可做菜^[1]. 现

代药理学研究表面, 香椿具有祛风利湿, 止血止痛等功效^[2-3], 根皮可用于痢疾、肠炎、泌尿道感染, 便血, 血崩, 白带, 风湿腰腿痛; 叶及嫩枝可治疗痢疾; 其果实一般用于胃、十二指肠溃疡, 慢性胃炎

收稿日期: 2016-03-23

基金项目: 国家自然科学基金(21277110)

作者简介: 高意(1991-), 女, 硕士, 研究方向为色谱分析. E-mail: raining@swu.edu.cn

通讯作者: 周光明. E-mail: gmzhou@swu.edu.cn

等^[4-6]. 据文献报道, 香椿含有黄酮类、萜类、苯丙素类、酚类和挥发油等多种生物活性成分^[7-10]. 其中已报道成分中含有表儿茶素、没食子酸、儿茶素、芦丁、杨梅素、槲皮素和山奈酚等多种活性成分^[11-15], 此类成分具有抗氧化、抗癌、抗炎、降糖以及降低胆固醇等多种药理作用^[16-20], 因此研究香椿中多种活性成分对香椿的深入研究开发和质量控制具有重要意义.

目前对于香椿的研究方法众多, 主要包含气相色谱-质谱连用仪^[21-22]、原子光谱法^[24]、荧光光谱法^[25]和高效液相色谱法^[26-28]等. 刘常金等^[23]利用气相色谱-质谱连用仪对香椿中醛类、醇类、醚类和酯类等挥发性成分进行了研究; 陈从瑾等^[24]则利用电感耦合等离子体原子发射光谱法(ICP-AES法)同时测定不同月份香椿不同部位中的 Fe、Mn、Cu、Zn、Ca、Mg、Na、K、Al、Pb、Cd、和 Ni 12 种元素的含量; 常永芳等^[25]利用荧光光谱法测定了香椿中总黄酮含量, 但目前尚未见文献报道关于利用高效液相色谱法对香椿中有机酸和多种黄酮类成分同时测定的文献. 本文利用超声辅助-高效液相色谱法建立对香椿中多种活性成分同时分离和含量测定的方法, 此方法简单、快速且重复性良好, 为研究香椿提供了新的参考依据.

2 材料与方法

2.1 仪器与设备

日本岛津 LC-20A 高效液相色谱仪(包括 SPD-20A 紫外检测器、CTO-10AS 柱温箱、LC-20AT 泵), KH-3200B 型超声波清洗器(昆山禾创超声仪器有限公司), SZ-2 自动双重纯化水蒸馏器(上海泸西分析仪器), XY 型电热恒温干燥箱(上海精宏实验设备有限公司), FA2004A 型分析天平(上海精天电子仪器有限公司).

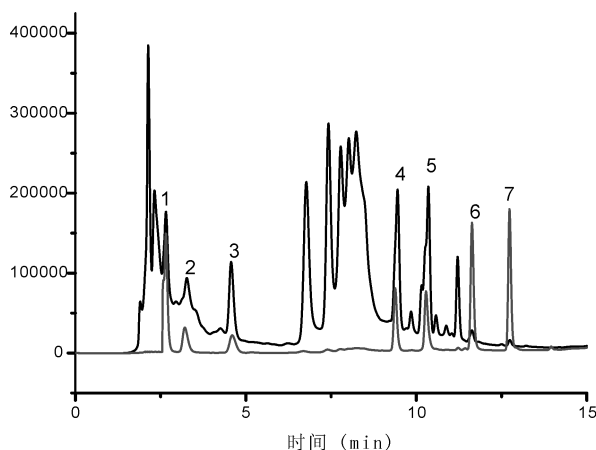
2.2 材料与试剂

表儿茶素、没食子酸、儿茶素、芦丁、杨梅素、槲皮素和山奈酚对照品(纯度均 $\geq 98.5\%$, 上海晶纯实业有限公司); 甲醇(色谱纯, 重庆川东化工有限公司化学试剂厂), 乙酸(分析纯, 重庆川东化工有限公司化学试剂厂), 二次蒸馏水(实验室自制), 香椿购于当地永辉超市.

2.3 方法

2.3.1 色谱条件 色谱柱为 Phenomenex C₁₈(150 mm \times 4.6 mm, 5 μ m); 流动相: 以甲醇为流动相 B, 0.1% 醋酸为流动相 A, 选择梯度洗脱(0~5

min, 35% \rightarrow 65% B; 5~10 min, 65% \rightarrow 95% B; 10~15 min, 95% \rightarrow 55% B; 15~20 min, 55% \rightarrow 35% B); 流速: 0.8 mL \cdot min⁻¹; 进样量: 20 μ L; 检测波长: 290 nm; 柱温: 35 $^{\circ}$ C. 样品和对照品的色谱图见图 1.



1-表儿茶素 2-没食子酸 3-儿茶素 4-芦丁 5-杨梅素 6-槲皮素 7-山奈酚

图 1 混合对照品和样品色谱图

Fig. 1 Chromatograms of the standard mixture and sample

2.3.2 对照品溶液的制备 精确称取表儿茶素、没食子酸、儿茶素、芦丁、杨梅素、槲皮素和山奈酚对照品适量分别置于 10 mL 容量瓶中, 以甲醇溶解稀释、定容, 制得对照品溶液, 浓度分别为 500、420、500、500、500、540、490 μ g \cdot mL⁻¹. 分别准确量取 7 种对照品溶液各 0.1 mL 于 10 mL 容量瓶中, 稀释甲醇至刻度, 得到混合对照品溶液, 置于冰箱(4 $^{\circ}$ C)中避光保存.

2.3.3 供试品溶液的制备 精确称取干燥且已过 60 目筛的香椿粉末 1 g, 依次加入 5 mL 甲醇和 5 mL 水, 超声(160 W, 4 kHz)萃取 40 min, 取萃取液上层清液离心(6000 r \cdot min⁻¹)10 min, 取上层清液过滤(0.45 μ m 有机滤膜), 制得供试溶液, 混合对照品和样品的色谱图如图 1.

3 结果与分析

3.1 线性关系考察

精确吸取混合对照品溶液(“2.3.2”项制得), 以甲醇-水配置 8 种浓度不同的混合对照品溶液, 每个浓度一次进样 3 次, 并以“2.3.1”项下色谱条件进行分析. 最后以对照品浓度-平均峰面积进行线性回归. 7 种被测活性成分的线性关系结果见表 1.

表 1 6 种被测成分的线性方程、线性范围和相关系数

Tab. 1 Regression equations, linear range and correlation coefficients of 6 compounds

化合物	线性方程	线性范围($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	相关系数	检出限($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)
表儿茶素	$Y = -1342.74 + 43026.9X$	0.000625~62.5	0.9991	0.00443
没食子酸	$Y = 5475.37 + 28174.01X$	0.0002625~26.25	0.9996	0.000825
儿茶素	$Y = 3026.14 + 18785.75X$	0.0003125~31.25	0.9997	0.000721
芦丁	$Y = 12169.95 + 35802.71X$	0.0003125~31.25	0.9993	0.000066
杨梅素	$Y = 17490.48 + 38748.53X$	0.0003125~31.25	0.9994	0.0000521
槲皮素	$Y = 39205.71 + 68454.27X$	0.0003375~33.75	0.9991	0.0000632
山奈酚	$Y = 71205.68 + 93899.80X$	0.00030625~30.625	0.9991	0.0000612

3.2 精密度试验

取混合对照品溶液重复进样,测定各个对照品的峰面积,结果表儿茶素、没食子酸、儿茶素、芦丁、杨梅素、槲皮素和山奈酚平均峰面积的 RSD % 分别为 1.77 %, 1.89 %, 1.25 %, 1.38 %, 1.93 %, 1.99 %, 1.69 %, 表明仪器精确度良好。

3.3 稳定性试验

吸取同一供试溶液 4d 内每隔 3 h 进样测定分析,结果表明表儿茶素、没食子酸、儿茶素、芦丁、杨梅素、槲皮素和山奈酚峰面积 RSD % 分别为 1.83 %, 1.97 %, 1.98 %, 1.87 %, 1.78 %, 0.97 %, 由此表明该方法具有良好的稳定性。

3.4 重复性试验

称取同一批样品制备供试品溶液(制备方法同

“2.3.3”),分别进样分析,结果显示表儿茶素、没食子酸、儿茶素、芦丁、杨梅素、槲皮素和山奈酚的峰面积 RSD % ($n=7$) 分别为 1.92 %, 1.90 %, 1.87 %, 1.47 %, 1.50 %, 0.98 %, 证明仪器重复性良好。

3.5 样品的含量测定及回收率试验

取香椿粉末制备供试品溶液 3 份(以“2.3.3”项中的方法),每份样品进样 2 次测定分析,根据表 1 中得到的线性方程计算出样品中各个成分的含量,见表 2。称取 9 份同一批次香椿粉末各 1 g,每 3 个为一组,每组按照低、中、高分别加入对应含量的对照品溶液,再按照“2.3.3”项制备供试品,得到 3 组 9 个样品溶液,依次进样测定分析,计算平均回收率,见表 2。

表 2 样品含量测定及加标回收率试验 ($n=3$)Tab. 2 Determination results of real samples and spiked recovery ($n=3$)

化合物	样品中含量(μg)	加入量(μg)	测得量(μg)	回收率(%)	平均回收率(%)	RSD(%)
表儿茶素	35.01	17.50	51.95	96.77%	101.1%	0.72%
		35.00	69.71	99.15%		
		52.50	95.51	107.3%		
没食子酸	76.83	38.40	115.99	102.0%	102.4%	0.73%
		76.80	156.67	104.0%		
		115.20	193.60	101.3%		
儿茶素	57.74	28.90	85.73	96.84%	99.23%	1.04%
		57.70	116.2	101.4%		
		86.60	143.9	99.48%		
芦丁	38.93	20.00	59.88	104.7%	104.5%	1.26%
		40.00	80.36	103.6%		
		60.00	102.2	105.4%		
杨梅素	35.06	17.50	53.41	104.9%	104.1%	1.03%
		35.00	70.98	102.6%		
		42.50	79.58	104.7%		
槲皮素	2.62	1.30	3.95	103.5%	102.2%	1.04%
		2.60	7.76	99.16%		
		3.90	9.35	103.9%		
山奈酚	1.13	0.50	1.62	97.64%	102.5%	0.88%
		1.00	2.18	105.2%		
		7.50	2.70	104.6%		

3.6 分析条件优化

3.6.1 流动相的选择 本实验分别比较了乙醇-水、甲醇-水、乙腈-水作为流动相的分离效果,结果表明,用乙醇-水为流动相时,芦丁和杨梅素分离效果差;以乙腈-水作为流动相分离时,无法完全分离槲皮素和山柰酚;以甲醇-水作为流动相分离时,能实现 7 种成分基线的分离,但各组分峰形存在不同程度的拖尾现象. 为实验各组分的良好分离,本次研究进一步试验醋酸水溶液-甲醇为流动相,结果表明,流动相为甲醇-0.1%醋酸溶液时,各组分分离效果好,且峰形良好. 同时,本实验测试梯度选择,并不断改变甲醇比例,最后得到最佳梯度为:0~5 min,35%→65%B;5~10 min,65%→95%B;10~15 min,95%→65%B;15~20 min,65%→35%B.

3.6.2 提取溶剂的选择 本实验比较了甲醇、乙醇和环己烷 3 种提取溶剂的提取效果,结果发现,单独以甲醇、乙醇和环己烷提取剂时,提取到的没食子酸较少,继而研究在三种提取剂加入水,实验发现以甲醇-水为提取剂时提取率最高. 同时本实验进一步比较了甲醇和水不同比例时 7 种活性成分的提取率,发现在浓度为 60% 时提取的 7 种活性成分的总量最高,故选择 60% 甲醇-水作为最终的提取剂,萃取溶剂对 7 种活性成分总量的影响见图 2.

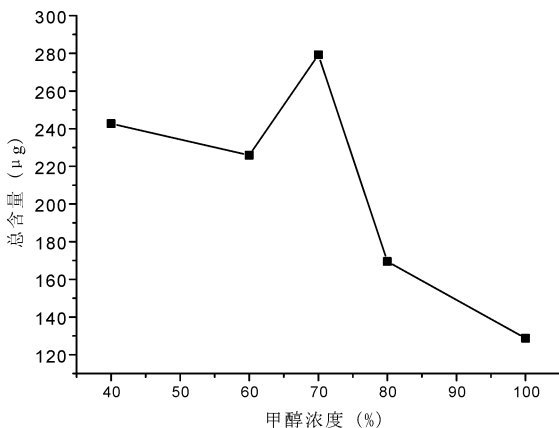


图 2 萃取溶剂对 7 种成分总量的影响

Fig. 2 Effect of extraction solvent on determination of 7 components

3.6.3 萃取时间和功率的影响 本实验比较了甲醇超声时间分别为 10、20、30、40 和 50 min 时所测组分总量,结果表明样品超声 50 min 得到的所测组分的总含量最高,故选择 50 min 为萃取时间,萃取时间对 7 种活性成分的总量的影响见图 3. 同时

进一步比较了 40%、60%、70%、80%、100% 功率下所测组分浸出率,结果表明在最大功率的 80% (160 W) 时提取出的 7 种活性成分的总量最高,故选择最大功率的 80% (160 W) 为萃取功率,萃取功率对 7 种活性成分的总量的影响见图 4.

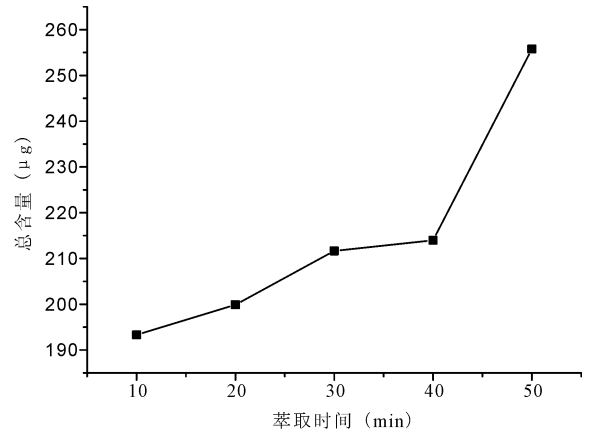


图 3 萃取时间对 7 种成分总量的影响

Fig. 3 Effect of extraction time on determination of 7 components

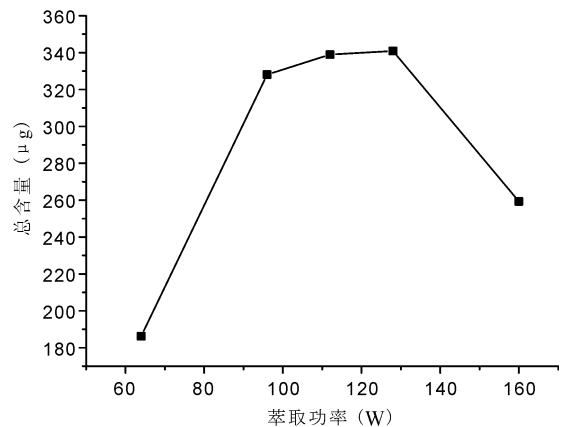


图 4 萃取功率对 7 种成分总量的影响

Fig. 4 Effect of extraction power on determination of 7 components

3.6.4 波长和固液比的选择 经查证大部分黄酮类成分在 300~360 nm 波长范围内均有较强的紫外吸收,有机酸的紫外吸收低于黄酮类成分. 鉴于此,本实验比较了 270、280、290、300、310、330、340、360 nm 作为波长时对样品的检测,结果表明,当波长小于 290 nm 时,溶剂峰较强,对成分成峰造成很大影响,当波长大于 300 nm 后,有机酸紫外吸收弱,由此选择 290 nm 作为检测波长. 同时本实验还比较了固液比分别为 20:1、40:1、60:1、80:1 和 100:1 ($\text{mL} \cdot \text{g}^{-1}$) 的提取效果,结果表明当固液比为 80:1 时,所测组分总量最高,故选择固液比为 80:1 作为最终的提取固液比.

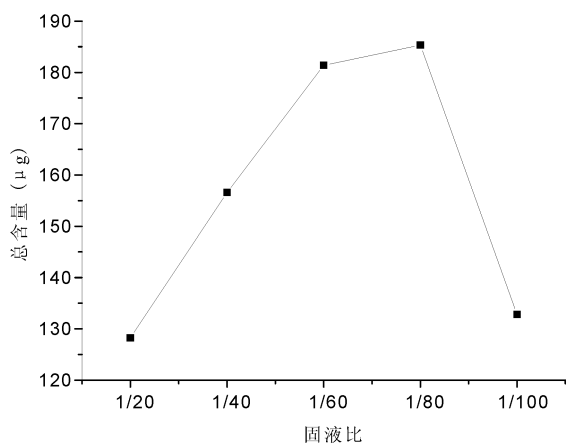


图4 固液比对7种成分总量的影响

Fig. 4 Effect of solid-to-liquid ratio on determination of 7 components

4 结论

4.1 本文讨论了萃取时间和萃取功率对7种活性成分总量的影响,实验发现,萃取率与萃取时间成正比关系,在50 min以后随着萃取时间的增长,萃取率增加值小,综合经济、环保等多方面考虑,最终选择50 min为萃取最佳时间。查阅已报道的关于高效液相测试自然产物成分的文献,在优化分析条件主要是针对萃取溶剂和流动相的优化,本文针对萃取功率进行优化,发现在最大功率时并不能到达最大提取率,而在最大功率的80%时7种活性成分总量最高,故以此作为最佳萃取功率。

4.2 相关香椿中活性成分含量测定的文献报道很多,如张明华等^[26]采用硅胶层析色谱法和高效液相色谱法分离与测定香椿叶中没食子酸和没食子酸甲酯;夏国华等^[27]建立了一种反相高效液相色谱测定香椿叶中芸香苷含量的方法;亦有顾芹英等^[28]利用RP-HPLC法测定香椿叶中槲皮素-3-O- α -L-鼠李糖苷,但尚未见有关于香椿中有机酸和黄酮类多种活性成分同时测定的报道。本实验利用甲醇辅助超声萃取下高效液相色谱法测定香椿中表儿茶素、没食子酸、儿茶素、芦丁、杨梅素、槲皮素和山奈酚7种活性成分的含量,15 min所有组分完全出峰,7种活性成分含量测定结果分别为35.01、76.83、57.74、38.93、35.06、2.62和1.13 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 。实验结果满意且重复性良好,实验操作简单快捷,可以用于药用香椿中黄酮的测定。

4.3 香椿嫩芽是一种中国传统的时令蔬菜,同时其叶、根、果实具有较高的药用价值。在已报道的文献中,尚无同时对香椿中多种活性成分含量进行

研究。本文建立的以甲醇辅助超声萃取下利用高效液相测定香椿中的7种活性成分的含量,方法简单、快捷,为香椿的深入开发和研究提供新的参考^[29-34]。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[S]. 北京:化学工业出版社,2005.
- [2] 梁宁,王昌禄,罗成,等. 香椿提取物对痛风抑制作用的初步研究[J]. 农产品加工·学刊,2011,2011:12.
- [3] Chen L, Hung L, Tsai K, *et al.* Wogonin, a bioactive flavonoid in herbal tea, inhibits inflammatory cyclooxygenase-2 gene expression in human lung epithelial cancer cells [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2008, 52: 1349.
- [4] 黄小燕,李松林,党翠芝,等. 香椿果抗氧化活性成分研究[J]. 种子,2011,30:79.
- [5] 李红月,陈超. 香椿子总多酚预处理对大鼠心肌缺血再灌注损伤的干预作用观察[J]. 解放军医学杂志,2011,36:58.
- [6] Chang S J. 7 proteomics analysis of male reproductive physiology by toona sinensis roem [J]. *Reprod Biomed Online*, 2010, 20: S3.
- [7] 陈铁山,罗忠萍. 香椿化学成分的初步研究[J]. 陕西林业科技,2000,2000:1.
- [8] 毕丽君. 香椿嫩叶中黄酮类化合物的提取[J]. 浙江农林大学学报,2000,17:146.
- [9] 李熙灿,谢莉莉. 香椿叶的研究概况[J]. 辽宁中医药大学学报,2005,7:280.
- [10] 侯丽,郝小江,赵庆,等. 香椿子的化学成分研究[C]//第十届全国药用植物及植物药学术研讨会论文摘要集. 昆明:s. n.,2011:21.
- [11] 李秀信,张军华,黄以超,等. 响应面优化表面活性剂-微波提取香椿黄酮工艺[J]. 化学工程,2011,39:11.
- [12] 李秀信,王建华,刘莉莉,等. 微波辅助提取香椿叶黄酮工艺的研究[J]. 中国食品学报,2012,12:46.
- [13] 李万忠,丁嘉信,张晓平,等. 香椿属植物化学成分、提取方法及生物活性研究进展[J]. 齐鲁药事,2012,31:37.
- [14] Hsueh L C, Hseng K H, Jinn H S, *et al.* The fractionated Toona sinensis leaf extract induces apoptosis of human ovarian cancer cells and inhibits tumor growth in a murine xenograft model [J]. *Gyneco Oncol*, 2006, 102: 309.
- [15] 杨慧,王赵改,史冠莹,等. 基于HS-SPME的超声

- 波辅助提取香椿挥发性成分工艺优化 [J]. 天津农业科学, 2015, 21: 54.
- [16] Chang H C, Hung W C, Huang M S, *et al.* Extract from the leaves of *Toona sinensis* roemor exerts potent antiproliferative effect on human lung cancer cells [J]. *Am J Chin Med*, 2002, 30: 307.
- [17] 黄小燕, 李松林, 党翠芝, 等. 香椿果抗氧化活性成分研究 [J]. 种子, 2011, 30: 79.
- [18] Raghav R, Yadav N, Tyagi G, *et al.* Degradation studies of organic acids in commercially packed fruit juices: a reverse phase high performance liquid chromatographic approach [J]. *Int J Food Eng*, 2012, 8: 295.
- [19] Zheng X K, Wang W W, Zhang L, *et al.* Antihyperlipidaemic and antioxidant effect of the total flavonoids in *Selaginella tamariscina* (Beauv.) Spring in diabetic mice [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2013, 65: 757.
- [20] Azando E. Involvement of tannins and flavonoids in the in vitro effects of *Newbouldia laevis* and *Zanthoxylum zanthoxyloides* extracts on the exsheathment of third-stage infective larvae of gastrointestinal nematodes [J]. *Vet Parasitol*, 2011, 180: 292.
- [21] Wu J G, Peng W, Yi J, *et al.* Chemical composition, antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus* and a pro-apoptotic effect in SGC-7901 of the essential oil from *Toona sinensis* (A. Juss.) Roem. leaves [J]. *J Ethnopharmacol*, 2014, 154: 198.
- [22] 李贵军, 汪帆. 香椿嫩叶挥发油化学成分的 GC-MS 分析 [J]. 安徽化工, 2014, 40: 85.
- [23] 刘常金, 张杰, 周争艳, 等. GC-MS 分析比较 3 个特产香椿品种的挥发性成分 [J]. 食品科学, 2013, 34: 261.
- [24] 陈丛瑾, 覃雯, 莫利书, 等. ICP-AES 法同时测定不同月份香椿不同部位中的微量元素 [J]. 中国食品学报, 2010, 10: 233.
- [25] 常永芳, 冯俊霞, 于宏伟, 等. 荧光光谱法测定香椿叶总黄酮的含量 [J]. 光谱实验室, 2010, 27: 1773.
- [26] 张明华, 徐凤娟, 沈玉萍, 等. HPLC 法分离与测定香椿叶中没食子酸和没食子酸甲酯 [C]//中国中药杂志第十届编委会暨中药新产品创制与产业化发展战略研讨高端论坛. 北京: 中国中药杂志编辑部, 2011.
- [27] 夏国华, 童馨苇, 丁妍, 等. RP-HPLC 测定香椿叶中芸香苷的含量 [J]. 南京中医药大学学报, 2011, 27: 587.
- [28] 顾芹英, 李慧华, 秦冬, 等. RP-HPLC 法测定香椿叶中槲皮素-3-O- α -L-鼠李糖苷 [J]. 中成药, 2014, 36: 577.
- [29] 高意, 周光明, 陈军华, 等. 高效液相色谱法同时测定仙鹤草中 6 种黄酮 [J]. 食品科学, 2015, 36: 93.
- [30] 陈军华, 周光明, 秦红英, 等. 翻白草中 7 种黄酮和有机酸的超声提取及含量测定 [J]. 食品科学, 2015, 36: 95.
- [31] 彭贵龙, 周光明, 秦红英. HPLC 测定药用芦荟中芦荟苷和芦荟大黄素含量 [J]. 中国中医药信息杂志, 2013, 20: 59.
- [32] 彭贵龙, 周光明, 秦红英. HPLC 同时测定药用白菊花中绿原酸、木犀草素、芹菜素和金合欢素 [J]. 天然产物研究与开发, 2014, 26: 1067.
- [33] 秦红英, 周光明, 彭贵龙, 等. HPLC 同时测定虎耳草中的岩白菜素、原儿茶酸和没食子酸的含量 [J]. 四川大学学报: 自然科学版, 2013, 50: 1044.
- [34] 秦红英, 周光明, 彭贵龙, 等. 离子液体超声辅助萃取 HPLC 法测定天山雪莲中的 4 个有效成分 [J]. 药物分析杂志, 2014, 34: 844.