

金樱子总黄酮的不同萃取组分高效液相色谱法分析

吴剑峰^{1,2}, 李 峰², 陈传平², 翟金霞¹

[摘要] 目的:探讨金樱子总黄酮的不同萃取组分的黄酮含量。方法:以金樱子为原料,用 60% 乙醇提取金樱子总黄酮,分别用石油醚、三氯甲烷、乙酸乙酯、正丁醇萃取,回收有机溶剂获石油醚、三氯甲烷、乙酸乙酯、正丁醇及水等 5 个萃取相。采用高效液相色谱-紫外检测法测定各相在不同波长下的峰值,并采用高效液相色谱-二极管阵列检测法分析各相中峰是否为黄酮。结果:结果显示小极性黄酮主要分布在三氯甲烷相中,占总黄酮的 47.72%;大极性黄酮主要分布在正丁醇相中,占总黄酮的 44.07%;而水相中有少量黄酮,占总黄酮的 9.17%;石油醚相和乙酸乙酯相黄酮含量极少。结论:金樱子黄酮类成分主要富集于三氯甲烷相和正丁醇相。

[关键词] 金樱子;总黄酮;萃取;高效液相色谱法

[中图分类号] R 284.1

[文献标志码] A

DOI:10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2019.04.022

High performance liquid chromatography analysis of different extraction components of flavonoids from *Lavigate Rosae Fructus*

WU Jian-feng^{1,2}, LI Feng², CHEN Chuan-ping², ZHAI Jin-xia¹

(1. Basic Medical School of Anhui Medical University, Hefei Anhui 230000; 2. Department of Clinical Medicine of West Anhui Healthy Vocational College, Lu'an Anhui 237005, China)

[Abstract] **Objective:** To analyze the flavonoids content in different extraction components from *Laevigatae Rosae Fructus*. **Methods:** The crude flavonoid was extracted from *Rosae Laevigatae Fructus* using 60% ethanol (v:v), and extracted using petroleum ether, chloroform, ethyl acetate and *n*-butanol. The five phases of petroleum ether, chloroform, ethyl acetate, *n*-butanol and water were obtained, the peak value of each phase was measured using HPLC-UV, and the peak of each phase was analyzed by HPLC-DAD. **Results:** The low polar flavonoids mainly distributed in the chloroform phase, which accounted for 47.72% of the total flavonoids. The high polar flavonoids mainly distributed in the *n*-butanol phase, which accounted for 44.07% of the total flavonoids. The small amount of flavonoids in water phase was identified, which accounted for 9.17% of the total flavonoids. The very small amount of flavonoids in petroleum ether and ethyl acetate phases was found. **Conclusions:** The flavonoids of *Laevigatae Rosae Fructus* mainly distributes in the phase of trichloromethane and *n*-butanol.

[Key words] *Rosae Laevigatae Fructus*; total flavonoids; extraction; high performance liquid chromatography

金樱子为蔷薇科常绿攀缘植物金樱子 *Rosa laevigata* Michx. 的果实,是安徽省大别山区的主产中药材之一^[1]。金樱子作为一种传统中药,其味酸、甘、涩,平,有利尿、降血脂等作用^[2-3]。现代医学研究表明,金樱子具有收涩、固精、止泻等功效,是一味很有价值的药食两用中药^[4-5]。据文献报道,金樱子中的化学成分主要有甾体、黄酮、三萜、苯丙素、酚酸和多糖等化合物,其中黄酮类化合物具有非常好的抗氧化、清除自由基、抗血小板凝集等作用^[6-8],是其药理作用的重要成分。为了进一步探讨金樱子黄酮类化合物药理活性的物质基础,从中寻找具有药用价值的生物活性成分,揭示金樱子总

黄酮的药理活性机制和对其进行质量评价,本实验采用不同极性溶剂,对金樱子总黄酮进行分离萃取,为金樱子的深入研究与开发利用提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料 金樱子于 2015 年 11 月采自安徽省六安市金寨县,经皖西卫生职业学院药理学徐茂红副教授鉴定为金樱子 *Rosa laevigata* Michx. 的果实。金樱子去籽后 103 °C 干燥 4 h,粉碎后过 40 目筛,用 60% 乙醇提取、AB-8 型大孔吸附树脂纯化得精制金樱子总黄酮^[9],冷冻干燥备用。

1.2 试剂与仪器 芦丁对照品(纯度 98%,上海生化试剂一厂);数显恒温水浴锅(金坛市正基仪器有限公司),TU-1901 双光束紫外可见分光光度计(上海第三分析仪器厂),精密电子天平(Precisa 公司),旋转蒸发器 RE-52(上海青浦沪西仪器厂),冷冻干燥机 FD-1(北京博医康公司),高效液相色谱仪

[收稿日期] 2018-01-22 [修回日期] 2018-08-27

[作者单位] 1. 安徽医科大学基础医学院,安徽合肥 233000; 2. 皖西卫生职业学院临床医学系,安徽六安 237005

[作者简介] 吴剑峰(1984-),男,讲师。

1525(美国 WATERS 公司)。

1.3 方法

1.3.1 金樱子总黄酮的分段萃取 准确称取金樱子总黄酮 1.0 g,溶于 500 mL 60% 乙醇中,减压回收乙醇,得 190 mL 金樱子总黄酮溶液。

分段萃取:以等体积石油醚萃取数次至上液澄清透明无色,得石油醚萃取相;下液继续用等体积三氯甲烷萃取至下液澄清透明无色,得浅黄色三氯甲烷相;上液继续用等体积乙酸乙酯萃取,得乙酸乙酯相;下液继续用等体积正丁醇萃取,得正丁醇相;剩下的即为水相。各相分别减压浓缩,冷冻干燥,称量计重。

1.3.2 各萃取组分高效液相色谱-紫外检测法(HPLC-UV)测定 参照文献[10],确定 HPLC-UV 测定条件为:色谱柱为 Hypersil ODS2 柱(4.6 mm × 250 mm, 10 μm),检测波长 365 nm,流速 1 mL/min,柱温 20 °C,进样量 10 μL,分析时间 26 min,流动相梯度洗脱条件见表 1。用 HPLC-UV 法测定各组分在此波长下的峰值^[11]。

表 1 流动相梯度洗脱条件

时间/min	甲醇/%	水/%	冰乙酸/%
0	40	59.6	0.4
2.5	40	59.4	0.6
3.5	50	49.4	0.6
5.0	55	44.5	0.5
5.5	55	44.5	0.5
10.0	65	34.6	0.4
13.0	65	34.6	0.4
13.5	85	14.8	0.2
16.0	85	14.8	0.2
18.0	100	0	0
25.0	100	0	0

1.3.3 各萃取组分高效液相色谱-二极管阵列检测法(HPLC-DAD)测定 采用 1.3.2 的色谱条件,改用二极管阵列检测器(DAD)检测,根据张东方等^[12]研究结果,采用 HPLC-DAD 法绘制色谱流出曲线,然后描绘每个色谱峰的峰面积-波长曲线,拟合紫外图谱,识别黄酮有效部位,进而进行含量测定,通过各峰的形状确定各相中是否含有黄酮类成分。

2 结果

2.1 金樱子总黄酮分段萃取结果 金樱子总黄酮各相萃取结果中,三氯甲烷相和正丁醇相总黄酮含

量较高,分别为 28.95% 和 32.19%,乙酸乙酯相最低,为 5.23%(见表 2)。

表 2 金樱子总黄酮分段萃取结果

萃取相	质量/g	占总组分比例/%
石油醚	0.164 3	16.43
三氯甲烷	0.289 5	28.95
乙酸乙酯	0.052 3	5.23
正丁醇	0.321 9	32.19
水	0.063 2	6.32

2.2 金樱子总黄酮各组分 HPLC-UV 的测定结果

按照建立的色谱条件,依次进样石油醚相、三氯甲烷相、乙酸乙酯相、正丁醇相和水相,得金樱子总黄酮不同萃取组分色谱图(见图 1)。由图 1 可知,五相中共有 3 个共有峰,分别是 a、b、c,且为大极性成分;而石油醚相和三氯甲烷相有 3 个特征峰,分别为 d、e、f,为小极性成分。五种萃取部位组分中含有 3 个共有峰,分别是 a、b、c;含有 3 个特征峰分别是 d、e、f。石油醚相中含有化学成分多,以小极性的成分为主;三氯甲烷相中含有成分较多,小极性成分所占比例较大;乙酸乙酯相中含有组分最少,多为大极性成分;正丁醇相中含有物质比较多,多为大极性成分;水相中含有较少,多为大极性成分。萃取物中的成分种类随着有机溶剂的极性增加而减少,且小极性成分都集中在石油醚相和三氯甲烷相,大极性成分都集中在乙酸乙酯相和正丁醇相中,实现了对金樱子总黄酮的初步分离。

2.3 金樱子总黄酮各组分 HPLC-DAD 的测定 金樱子总黄酮的 3D 峰图见图 2,各峰放大结果见图 3。黄酮类化合物在 200 ~ 400 nm 有连续双峰^[11],通过图 3 的各峰情况可以判断峰#1、#2、#3、#4、#5 和#6 是黄酮,峰#7 和#8 不是黄酮。同时计算黄酮峰总面积占总峰面积的 73.25%。在进样量和响应值都相同的情况下,峰面积比与含量比等值,即黄酮含量为 73.25%。

通过对各萃取相 HPLC-DAD 的测定分析,发现石油醚相、乙酸乙酯相几乎不含黄酮;而三氯甲烷相、正丁醇相含黄酮较多,水相也含少量黄酮(见图 4)。

三氯甲烷相各峰放大结果见图 5,峰#3、#5 是黄酮,峰#1、#2 和#4 不是黄酮,同时计算黄酮峰总面积占总峰面积的 47.72%,即黄酮含量为 47.72%。

正丁醇相各峰放大结果见图 6,峰#3、#5 和#6

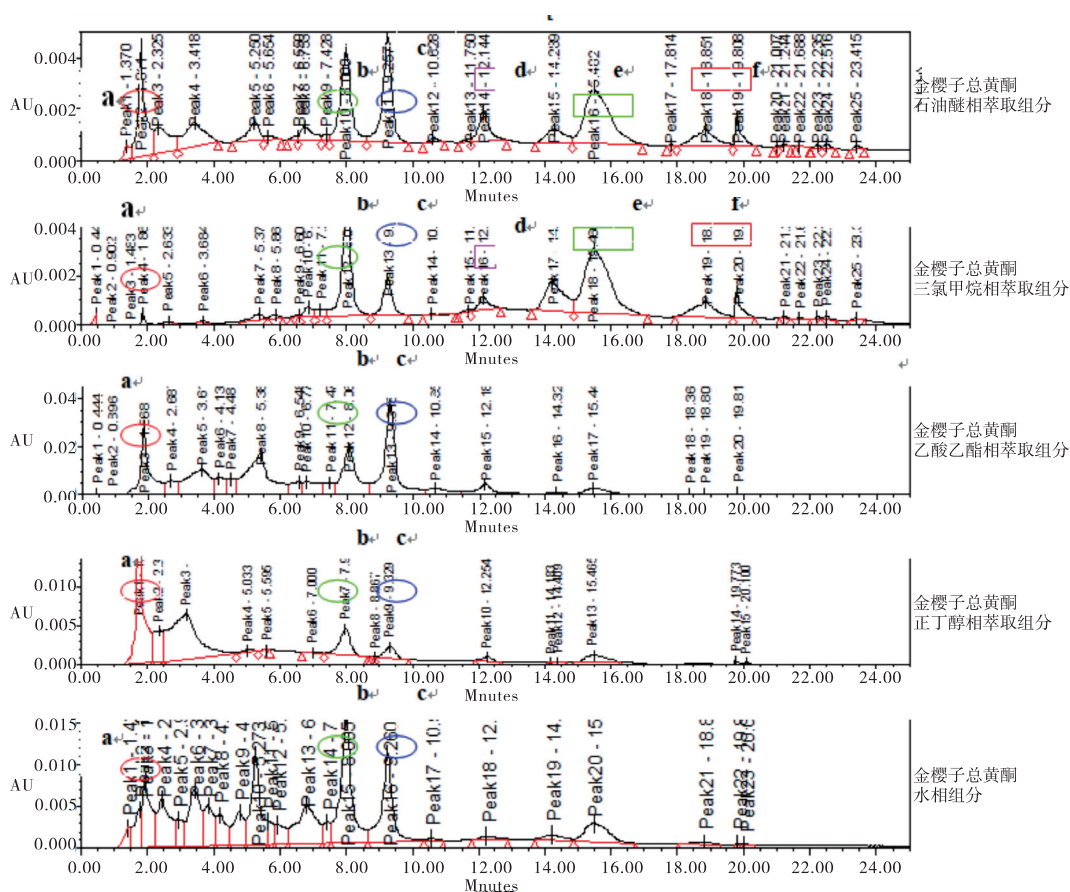


图1 HPLC-UV检测结果

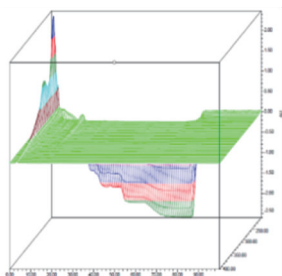


图2 金樱子总黄酮的3D峰图

是黄酮多糖苷,峰#1、#2、#3、#4、和#7不是黄酮,同时计算黄酮峰总面积占总峰面积的44.07%,即黄酮含量为44.07%。

水相各峰放大结果见图7,峰#1是黄酮,峰#2不是黄酮,同时计算黄酮峰总面积占总峰面积的9.17%,即黄酮含量为9.17%。

3 讨论

由于黄酮类化合物具有降血压、降血脂、镇痛、抑制血小板聚集、抗骨质疏松、抗心律失常、抗过敏及抗缺氧等多种药理作用,而且黄酮类化合物在人体不能直接合成,只能从食品中获得,所以近年来科

学家都积极关注从植物中提取纯度高、活性强的天然黄酮成分^[13]。因此,对黄酮类化合物的提取以及测定方法研究具有广泛的前景。有机溶剂是黄酮类化合物最常用的提取分离工艺。通常根据溶剂与被提取物极性之间“相似相溶”的内在关系的原理来选择,萃取剂的极性与被提取物的结构相关,萃取剂的极性(介电常数)与被提取物的越相近,则被提取物的萃取率愈大。本实验用不同极性的溶剂(石油醚、三氯甲烷、乙酸乙酯、正丁醇及水),能有效萃取分离金樱子总黄酮,通过对各萃取段的 HPLC-UV 和 HPLC-DAD 分析,可知小极性成分主要分布在石油醚相和三氯甲烷中相,其中三氯甲烷相中成分占总黄酮的47.72%;大极性成分主要分布在正丁醇相中,占总黄酮的44.07%;水相中有少量大极性黄酮,占总黄酮的9.17%;其他相中黄酮含量极少。有研究^[14]表明,不同极性黄酮的生物活性不同,金樱子总黄酮各萃取段活性还需进一步研究,找出活性相对较强,且萃取得率高的成分,从而更加有效收集相应组分。

黄酮类化合物测定方法目前主要有比色法、薄

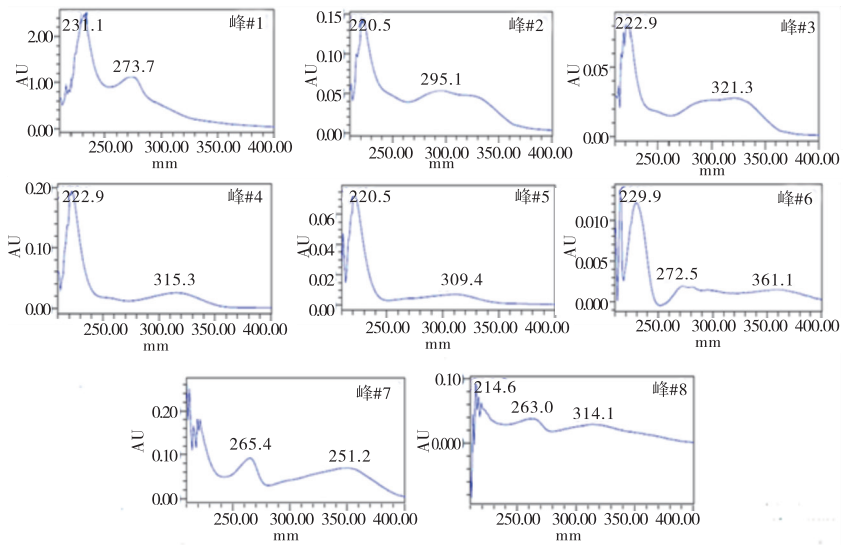


图3 金樱子总黄酮的各峰放大图

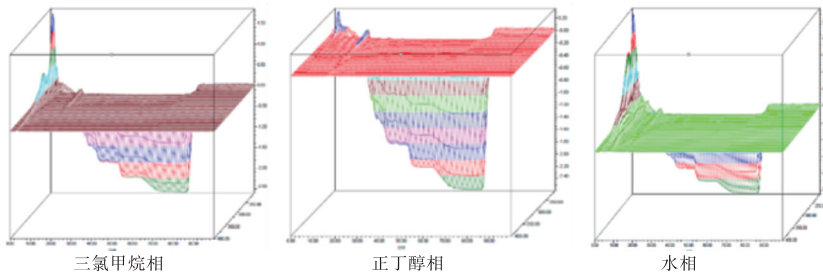


图4 金樱子总黄酮主要萃取相3D峰图

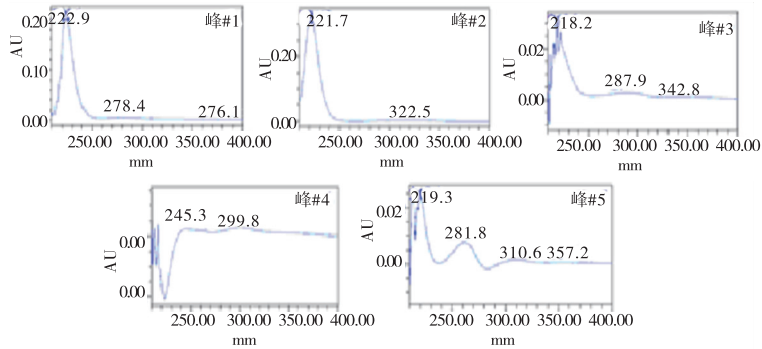


图5 金樱子总黄酮三氯甲烷萃取相各峰放大图

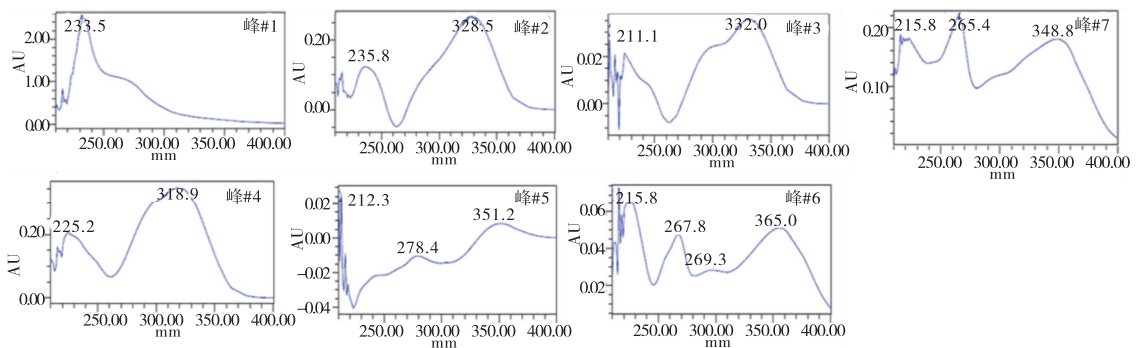


图6 金樱子总黄酮正丁醇萃取相各峰放大图

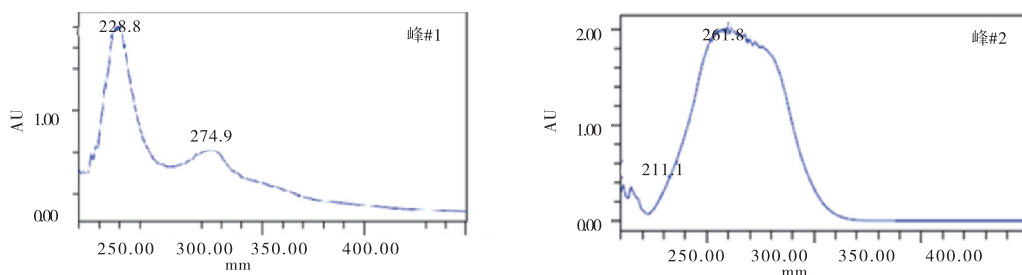


图7 金樱子总黄酮水相各峰放大图

层色谱法、高效液相色谱法、高效液相色谱-质谱联用法以及毛细管电泳法等^[15]。比色法适于测定总黄酮,但不适用于单一成分的测定。高效液相色谱法是测定黄酮类化合物的有效方法,它克服了传统定量方法繁琐、费时、分离度欠佳以及气相色谱法的拖尾现象或制成相应衍生物操作繁琐等缺点,分离效率高,在该类化合物中的应用日趋增多^[16]。当前高效液相色谱仪普遍应用紫外检测器,其特点是速度快、灵敏度高、重复性好,对于测定单一组分的含量测定具有明显优势,但其得到的化学信息较少。用 DAD 检测器可以获取色谱峰的紫外可见光吸收谱图,还可据此提供峰纯度分析功能。在新药开发中,有效部位的含量测定方法选择的科学性对含量准确性至关重要。

本实验通过有机溶剂分段萃取,黄酮类成分可实现有效富集,同时采用高效液相色谱法分析金樱子药材中黄酮类成分,该方法简单、可靠、分析效率高,对于金樱子的质量控制研究具有一定的参考价值。

[参 考 文 献]

[1] 余宏,陈传平. 安徽省大别山山区金樱子资源开发利用现状调查[J]. 安徽农学通报,2012,18(12):124.
 [2] 赵德贵. 固精缩尿要药——金樱子[J]. 中国保健食品,2014(6):82.
 [3] DONG D, QI Y, XU L, *et al.* Total saponins from *Rosa laevigata* Michx fruit attenuates hepatic steatosis induced by high-fat diet in rats[J]. *Food Funct*, 2014, 5(12):3065.
 [4] 周俊,何湘珍,肖启国,等. 金樱子对大鼠糖尿病性白内障细胞凋亡和氧化应激的影响[J]. 中南医学科学杂志,2014(3):241.

[5] 刘学贵,李佳骆,高品一,等. 药食两用金樱子的研究进展[J]. 食品科学,2013,34(11):392.
 [6] 刘焱,张延鲁,覃克风. 金樱子中总黄酮的超声提取及抗氧化活性分析[J]. 湖北农业科学,2016(5):1256.
 [7] 陈传平,彭成,方士英,等. 不同提取工艺对金樱子黄酮体外抗氧化活性的影响[J]. 中国林副特产,2013(6):5.
 [8] 陈传平,方士英,彭成,等. 金樱子总黄酮对大鼠全血黏度和血小板聚集的影响[J]. 皖西学院学报,2014,30(2):72.
 [9] 周守标,陈乃东,胡金蓉,等. 春花胡枝子黄酮大孔树脂纯化工艺研究及纯化前后抗氧化性变化比较[J]. 中国实验方剂学杂志,2006,12(12):4.
 [10] 陈乃东,陈乃富,陈存武,等. 蕨菜乙醇提取物不同萃取部位抗氧化活性测定及其组分 HPLC 分析[J]. 食品工业科技,2013,34(17):49.
 [11] 李爱红,胡文军. HPLC 法测定复方银杏叶胶囊中总黄酮苷的含量[J]. 中国药房,2008,19(12):927.
 [12] 张东方,周美环,孟荃,等. HPLC-UV 拟合紫外图谱识别黄芩中黄酮有效部位及其含量测定[J]. 辽宁中医学院学报,2005,3(7):266.
 [13] 陈钢,苏同福,赵士举. 萃取剂的极性对银杏叶总黄酮提取率的影响[J]. 河南科学,2014,32(11):2233.
 [14] 王鸿飞,刘飞,徐超,等. 费菜总黄酮及其不同极性提取物抑菌活性研究[J]. 中国食品学报,2013,13(5):124.
 [15] 张岩,曹国杰,张燕,等. 黄酮类化合物的提取以及检测方法的研究进展[J]. 食品研究与开发,2008,29(1):154.
 [16] 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]. 分析化学研究报告,2014,42(3):415.

(本 文 编 辑 赵 素 容)