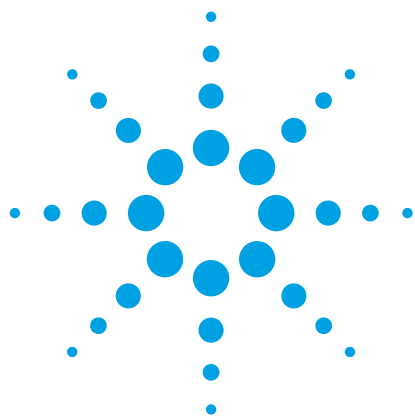




采用 Bond Elut Plexa 固相萃取吸附剂 净化银杏样品并对其黄酮类成分进行 HPLC-DAD 定量分析

应用报告

膳食补充剂

作者

Kedimetse Mothibedi, Janes Mokgadi
与 Nelson Torto
Department of Chemistry
Rhodes University
P.O. Box 94
Grahamstown 6140
南非

摘要

采用 Agilent Bond Elut Plexa 固相萃取吸附剂实现了银杏片中槲皮素、山奈酚和异鼠李素的样品净化。使用配备了二极管阵列检测器的 Agilent 1200 系列高效液相色谱仪 (HPLC-DAD) 进行分析。采用 Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 色谱柱 (4.6 × 75 mm, 3.5 μm) 和 0.5% 磷酸-甲醇 (40:60) 流动相, 实现了良好的峰分离。在柱温为 35°C 时, 4 min 内即可完成这些化合物的分离。校准曲线的最高浓度为 120 μg/mL, 槲皮素、山奈酚和异鼠李素校准曲线的线性相关系数分别为 0.9989、0.9992 和 0.9992。槲皮素、山奈酚和异鼠李素的回收率范围分别为 106-107%、103-109% 和 73-88%, 相对标准偏差均不超过 5%。



Agilent Technologies

引言

银杏是一种古老的中国植物药，用于治疗多种疾病如循环系统失调和痴呆症等 [1]。银杏提取物的主要有效成分属黄酮类，尤其是槲皮素、山奈酚和异鼠李素这些苷元的衍生物（结构见图 1）。黄酮类成分是大多数植物中存在的一类多酚类化合物，在种子、果皮、树皮和花中含量较高。它们主要靠清除自由基的抗氧化作用 [1] 展现其扩张血管、抗血栓、抗肿瘤、抗病毒、抗突变、抗过敏、抗炎和抗菌活性 [2]。因此，黄酮类成分被广泛用做膳食补充剂。

为了对市场上膳食补充剂的品质进行定性和定量监测，采用能够处理复杂基质样品的萃取方法非常必要。显然传统的液-液萃取或索氏提取无法满足当前大多数样品的制备要求，因此，它们在分析实验室中已被如固相萃取 (SPE) 等基于吸附剂技术的样品制备方法所取代 [3]。目前人们对于 SPE 材料的分析物回收率、吸附能力和选择性等相关要求在不断提高。此外，人们对分析的简化、自动化和提高通量等方面的需求也推动了不同形式和配置的 SPE 的发展 [4]。

本文采用 Agilent Bond Elut Plexa 固相萃取吸附剂对银杏样品进行净化，并对样品中的黄酮类成分进行预富集。该方法操作简便，能提供更高的分析性能和易用性 [5]。

实验部分

材料与化学品

槲皮素、山奈酚和异鼠李素标准品均购于 Sigma-Aldrich 公司（圣路易斯，MO，美国）。甲醇（HPLC 级）购于 Merck KGaA 公司（达姆施塔特，德国）。磷酸、盐酸和氢氧化钾颗粒购于 Merck Chemicals 公司（约翰内斯堡，南非），氨水 (25%) 购于 Saarchem Analytic 公司（克鲁格斯多普，南非）。Solgar 银杏胶囊和银杏叶购于当地草药店（格雷厄姆斯敦，南非）。水为 Milli-Q 系统纯化水（Millipore，贝德福德，MA，美国），使用 Jenway 3510 pH 计（Bibby Scientific Ltd., Dunmow, Essex, 英国），Agilent Bond Elut Plexa 固相萃取柱（1 mL/30 mg，部件号 12109301）。在配备有 Agilent 1200 系列二极管阵列检测器的 Agilent 1200 系列高效液相色谱系统上进行分析。分析柱为 Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 色谱柱（4.6 × 75 mm，3.5 μm，部件号 959933-902）。

贮备液和工作标准液的制备

用甲醇制备槲皮素、山奈酚和异鼠李素贮备液，浓度均为 1000 μg/mL，于 4°C 下保存。所有标准液取适量贮备液按要求浓度制备。

参数的优化

色谱峰分离

取 5 μL 50 μg/mL 槲皮素和山奈酚与 100 μg/mL 异鼠李素的标准混合溶液进样进行 HPLC 分析，并对色谱条件进行优化。HPLC 条件列于表 1（见图 3）。

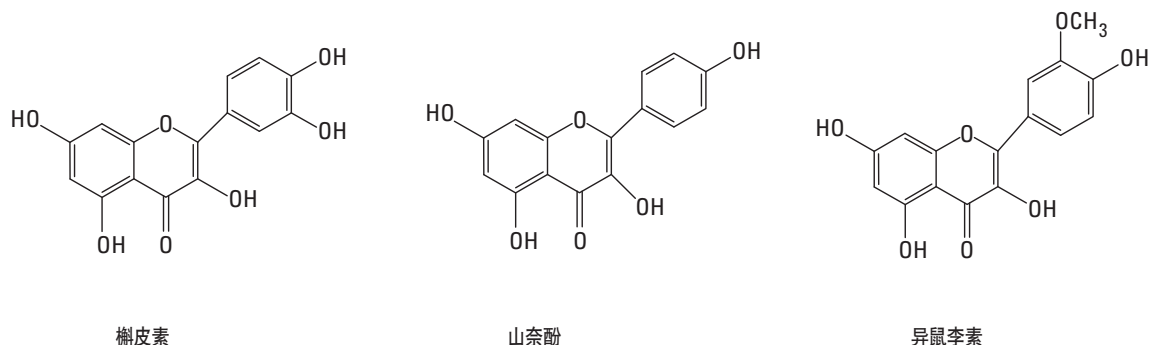


图 1. 槲皮素、山奈酚和异鼠李素的化学结构

表 1. HPLC 条件

参数	色谱条件
色谱柱	Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18, 4.6mm × 75 mm, 3.5 μm (部件号 959933-902)
流速	1 mL/min
进样体积	5 μL
柱温	35 °C
流动相	A: 0.5% 磷酸溶液 B: 甲醇
运行时间	4 min
等度	40% A:60% B
检测	UV, 370 nm

样品制备

首先将银杏胶囊内容物混匀。取 2 g 混匀的胶囊内容物用 40 mL 甲醇和 40 mL 5.5% HCl 溶液 (V/V) 回流提取 1 h, 并不断搅拌。将提取液冷却至室温, 再用 Whatman 滤纸 (直径 125 mm) 过滤。过滤液用三倍体积的 2% 氨溶液稀释。用 1 M KOH 溶液调节 pH 值至约 7。取上述溶液 1 mL 用 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 并对其进行 HPLC-DAD 分析 (见图 4)。将银杏叶粉碎并用研钵研匀。称取 1 g 并按与银杏胶囊相同的提取过程进行操作。

样品净化

SPE 条件

通过对 SPE 的活化、上样、淋洗和洗脱程序进行系统研究, 获得了如图 2 所示的最佳 SPE 条件。

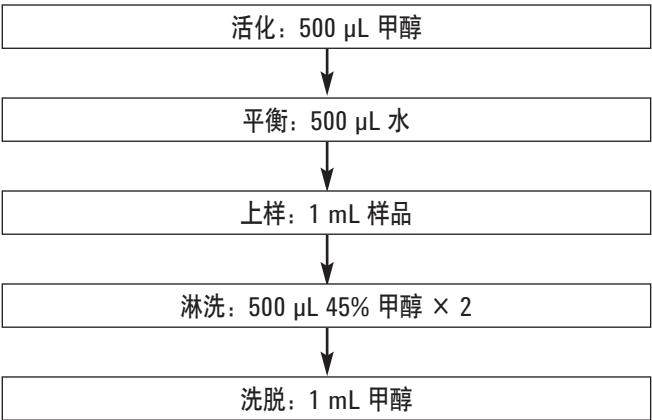


图 2. 采用 Agilent Bond Elut Plexa 吸附剂净化黄酮类成分的 SPE 过程

结果与讨论

分离

采用表 1 所列条件对槲皮素、山奈酚和异鼠李素的混合标准品进行 HPLC 分析, 各峰分离度良好 (见图 3)。

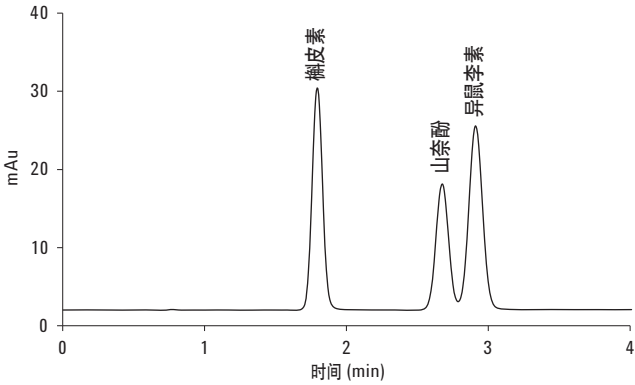


图 3. 槲皮素、山奈酚和异鼠李素混合标准品的色谱图

样品净化

在 SPE 净化处理前后, 分别将银杏胶囊提取液采用直径 25 mm, 孔径 0.45 μm 的 PVDF 膜针筒过滤器过滤, 滤液进样进行 HPLC 分析。两种提取物的叠加色谱图见图 4。由图可见, 未进行 SPE 处理的提取液色谱图有一些干扰峰, 但经过 SPE 处理后, 这些峰就基本消失了, 这表明采用 Bond Elut Plexa SPE 吸附剂对样品的净化非常成功。

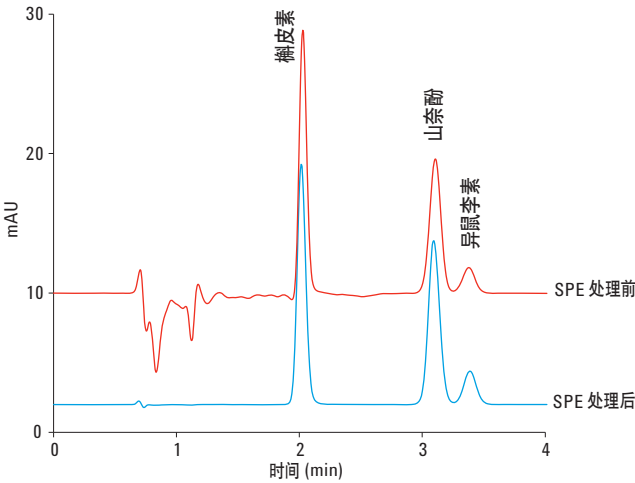


图 4. 银杏样品 SPE 处理前后的色谱图

回收率和重现性

平行取六份银杏胶囊提取物，每个分析物的标准品均以三种不同的浓度水平加入。加标样品按照上述 SPE 过程进行净化。实际测得的加标浓度通过其加标样品总浓度减去原样品中相应分析物的浓度获得。百分回收率通过计算测得加标浓度和其原加标浓度之比获得。计算所有加标水平的相对标准偏差 (RSD)。回收率及其 RSD 结果列于表 2。

表 2. 加标样品中槲皮素、山奈酚和异鼠李素的回收率和重现性数据

分析物	加标水平 ($\mu\text{g/mL}$) n=6	% 回收率	% RSD
槲皮素	10	107	4.35
	20	106	3.35
山奈酚	10	109	2.53
	20	103	1.14
	40	108	4.39
异鼠李素	10	88	4.11
	20	73	4.50
	40	79	1.73

校准曲线

校准曲线的数据由测定不同浓度水平三种化合物的标准混合溶液获得，其浓度范围最高至 120 $\mu\text{g/mL}$ 。每个浓度水平的样品平行测定三次，所得校准曲线表明三种分析物在测定浓度范围内线性关系良好，槲皮素、山奈酚和异鼠李素的线性相关系数分别为 0.9989、0.9992 和 0.9992（见图 5）。

SPE 方法的线性

Bond Elut Plexa SPE 吸附剂的线性范围通过向银杏胶囊中加入浓度渐高的标准品混合溶液，再进行 SPE 净化后来分析考察。当槲皮素和山奈酚的浓度高于 400 $\mu\text{g/mL}$ 时，其线性消失，因为此时对于该分析物而言，吸附剂已经超载了。因此，它们在上样和淋洗过程中会出现损失。然而，异鼠李素的线性浓度仍可以达到 500 $\mu\text{g/mL}$ （见图 6）。

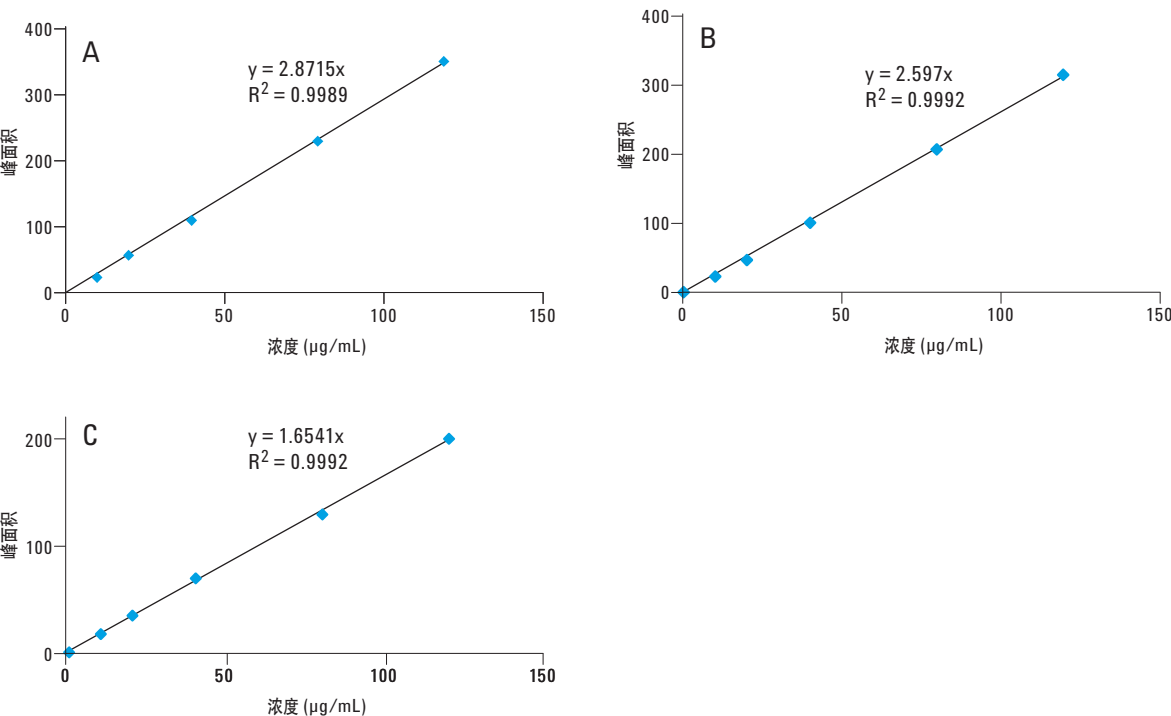


图 5. [A] 槲皮素、[B] 山奈酚和 [C] 异鼠李素的校准曲线

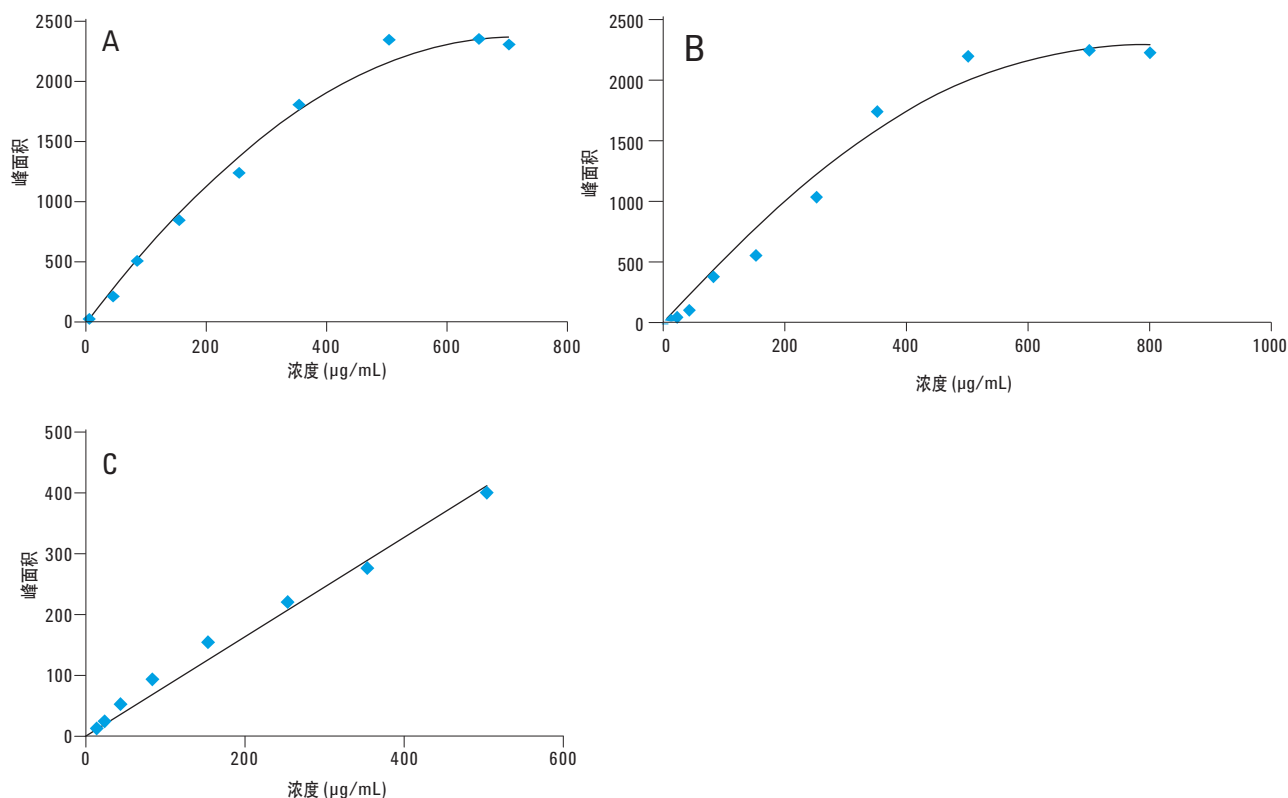


图 6. Bond Elut Plexa SPE 吸附剂的 [A] 槲皮素、[B] 山奈酚和 [C] 异鼠李素线性范围

检测限和定量限

采用公式 1 和 2，通过截距 y_B ，以及回归曲线标准差 S_B 的三倍数据计算得到检测限 (LOD)。

$$y_{LOD} = y_B + 3S_B \quad \text{公式 1}$$

$$LOD = (y_{LOD} - y_B)/m, \quad m = \text{斜率} \quad \text{公式 2}$$

定量限 (LOQ) 的计算与采用公式 1 和 2 的方法相同，但改用 10 倍回归曲线的标准差数据 (公式 3 和 4)。

$$y_{LOQ} = y_B + 10S_B \quad \text{公式 3}$$

$$LOQ = (y_{LOQ} - y_B)/m \quad \text{公式 4}$$

槲皮素、山奈酚和异鼠李素的 LOD 和 LOQ 数据总结于表 3。

表 3. 槲皮素、山奈酚和异鼠李素的 LOD 和 LOQ 数据

	LOD (µg/mL)	LOQ (µg/mL)
槲皮素	1.47	4.67
山奈酚	0.80	2.65
异鼠李素	3.25	10.8

实际样品测定

采用上述方法对银杏片进行分析，测得槲皮素、山奈酚和异鼠李素的浓度分别为 14.54 µg/mL、20.20 µg/mL 和 3.09 µg/mL。银杏叶的黄酮类成分浓度低于 LOQ，因此无法准确测定。

结论

Agilent Bond Elut Plexa 固相萃取吸附剂可高效净化银杏中的黄酮类成分。本文采用该吸附剂建立了一个快速、准确和重现性好的分析方法。槲皮素、山奈酚和异鼠李素的回收率范围分别为 106-107%、103-109% 和 73-88%，结果较理想，其相对标准偏差均不超过 5%。槲皮素、山奈酚和异鼠李素的 LOD 分别为 1.47 µg/mL、0.80 µg/mL 和 3.25 µg/mL，其 LOQ 分别为 4.67 µg/mL、2.65 µg/mL 和 10.8 µg/mL。银杏片含槲皮素、山奈酚和异鼠李素的浓度分别为 14.54 µg/mL、20.20 µg/mL 和 3.09 µg/mL。银杏叶的黄酮类成分浓度水平在 LOQ 以下，不能准确定量。

参考文献

1. M.-J. Dubber, V. Sewram, N. Mshicileli, G. S. Shephard, and I. Kanfer, *J of Pharm and Biomed Ana.* 37 (2005) 723-731.
2. P. Chan, Q. Xia and P. P. Fu, *J of Environmental Science and Health Part C*, 25 (2007) 211-244.
3. J. Mokgadi, L. C. Mmualefe and N. Torto, "Agilent Bond Elut OPT solid phase extraction sorbent in the cleanup of Flavonoids in ginkgo biloba by HPLC-DAD," Agilent Technologies. Santa Clara, CA, United States of America, Publication No. 5990-4799EN, October 21, 2009.
4. <http://www.chem.agilent.com/Library/brochures/5989-9334EN.pdf>
5. <http://www.chem.agilent.com/enUS/Products/columns-supplies/samplepreparation/spe/bondelutplexa/pages/default.aspx>

更多信息

这些数据代表了典型的结果。如需了解更多有关我们产品和服务的信息，请访问我们的网站 www.agilent.com/chem/cn

www.agilent.com/chem/cn

安捷伦对本资料可能存在的错误或由于提供、展示或使用本资料所造成的间接损失不承担任何责任。

本文中的信息、说明及技术规格等如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2011

2011 年 12 月 16 日，中国印刷

5990-9547CHCN



Agilent Technologies