

# HPLC 法测定拟南芥中总黄酮含量的研究

张海军<sup>1,2</sup>, 郭 丽<sup>1</sup>, 王明泽<sup>1</sup>, 车 野<sup>1</sup>, 侯 丽<sup>1</sup>, 李泽宇<sup>1</sup>, 王殿奎<sup>1</sup>

(1. 黑龙江省农业科学院 大庆分院, 黑龙江 大庆 163316; 2. 吉林省种子管理总站, 吉林 长春 130062)

**摘要:**为更好地开发和利用拟南芥中总黄酮及相关副产品,研究了检测拟南芥中总黄酮含量的方法。结果表明:以芦丁为标准品,建立了检测拟南芥中总黄酮含量的 HPLC 法。HPLC 法色谱条件: $C_{18}$  色谱柱、35℃ 柱温、256 nm 检测波长、35% 甲醇:65% 水(含 0.4% 磷酸)流动相、10  $\mu$ L 进样量及 10 mL $\cdot$ min<sup>-1</sup> 流速。标准品芦丁在该色谱条件下,峰型良好,在 0.05~1.60 mg $\cdot$ mL<sup>-1</sup> 时峰面积与质量浓度间呈良好线性关系, $R^2=0.9997$ ,平均加样回收率为 99.90%,RSD 小于 3%( $n=6$ ),该方法适用于拟南芥中总黄酮的检测。

**关键词:**拟南芥;总黄酮含量;芦丁;高效液相色谱

中图分类号:R284.2

文献标识码:A

文章编号:1002-2767(2014)04-0097-04

黄酮类化合物是植物中常见苯丙氨酸代谢途径产生的重要生理活性物质,在预防和治疗骨质疏松症、癌症和更年期综合症等方面功效显著,亦可降低心血管疾病和冠心病的发生<sup>[1-3]</sup>,作为一种雌性激素保健品,目前成为科学研究和药品开发的热点。高效的检测方法是黄酮类物质研发的基础,目前,关于总黄酮的定量检测方法主要是紫外分光光度法和 HPLC 法<sup>[4-5]</sup>等,主要集中于大豆<sup>[6]</sup>等大田作物和银杏叶<sup>[7]</sup>、桑叶<sup>[8]</sup>、苦荞麦<sup>[9]</sup>、苦丁茶<sup>[10]</sup>、落叶松<sup>[11]</sup>、百蕊草<sup>[12]</sup>、花椒<sup>[13]</sup>和罗汉果<sup>[14]</sup>等药用植物。目前,利用根瘤农杆菌将 DNA 转化到模式植物拟南芥和烟草等基因组已是分子生物学常规试验操作,组织培养和植株再生体系研究也日趋成熟<sup>[15]</sup>,但关于拟南芥中总黄酮含量检测方法相关的研究较少。该研究以芦丁为标准品,建立了检测拟南芥中总黄酮含量的 HPLC 法,旨在为深入研究转基因拟南芥中总黄酮及相关副产品开发及综合利用提供技术参考和理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

仪器:日本岛津高效液相色谱仪(LC-20A 型)、数控超声波清洗器(KQ-3200DE 型)、电热恒温水浴锅(HWS-24 型)及分析天平(FA-2004A 型)等。试剂:色谱级甲醇、色谱级磷酸,分析纯甲醇,分析纯乙醇。Sigma 公司产总黄酮标准品:芦丁(Rutin)纯度 $\geq 98\%$ 。

### 1.2 方法

1.2.1 标准品母液配制 精密称取 2.5 mg 标准品,用色谱级甲醇定容至 25 mL,分别取 0.05、0.10、0.20、0.40、0.80 及 1.60 mL 母液定容到 10.00 mL,摇匀备用。

1.2.2 色谱条件的选择及优化 选用  $C_{18}$  色谱柱,35℃ 柱温,256 nm 检测波长,35% 甲醇:65% 水(含 0.4% 磷酸)流动相,10  $\mu$ L 进样量,10 mL $\cdot$ min<sup>-1</sup> 的流速,每份样品检测 30 min。3 次重复测定,保留时间定性,峰面积定量。根据标准曲线方程计算样品中异黄酮总量。

1.2.3 样品的制备 迅速精确称取 0.5 g 拟南芥新鲜叶片,按每 100 mg 鲜重 400  $\mu$ L 甲醇(80% 分析纯)比例提取,研磨至匀浆,超声处理 60 min,滤渣甲醇洗涤 2 次,置于室温条件下静置 2.5 h 后混匀转入 2.0 mL 离心管中,80℃ 水浴 14 h,12 000 g 离心 15 min,抽取上清液,0.45  $\mu$ m 滤膜过滤定容至 50 mL,待测备用。

收稿日期:2013-12-27

基金项目:教育部新教师基金资助项目(3M2101936604);国家麻类产业技术体系资助项目(NYCYTX-19-S13);黑龙江省农业科技创新工程重点(青年基金)资助项目

第一作者简介:张海军(1986-),男,山东省济宁市人,硕士,研究实习生,从事植物分子育种和技术推广工作。E-mail:zhanghaijun\_234@163.com。

通讯作者:王殿奎(1963-),男,黑龙江省双城市人,研究员,从事亚麻、大麻、菊芋等经济、能源作物的新品种选育、产业开发和技术推广工作。E-mail:359351633@qq.com。

## 2 结果与分析

### 2.1 色谱条件的优化

2.1.1 检测波长的选择 将标准液和待测液进行紫外光连续波长扫描,结果表明,256和360 nm下具最大吸收峰且峰形良好,通过参考其它文献<sup>[7,9]</sup>,选用256 nm波长。

2.1.2 流动相的选择 流动相分别选取甲醇:0.4%磷酸水为85:25、75:25、65:35、55:45、

45:55、35:65、25:75和15:85,结果表明,35:65条件下峰形最好,灵敏度较高,分离效果好,故选择35%甲醇:65%水(含0.4%磷酸)作为流动相。

2.1.3 总黄酮标准品和样品 HPLC 色谱图 在1.2.2色谱条件下,标准品芦丁和待测拟南芥样品的 HPLC 色谱图结果见图1,保留时间为11.9 min,样品分离及峰形情况良好。

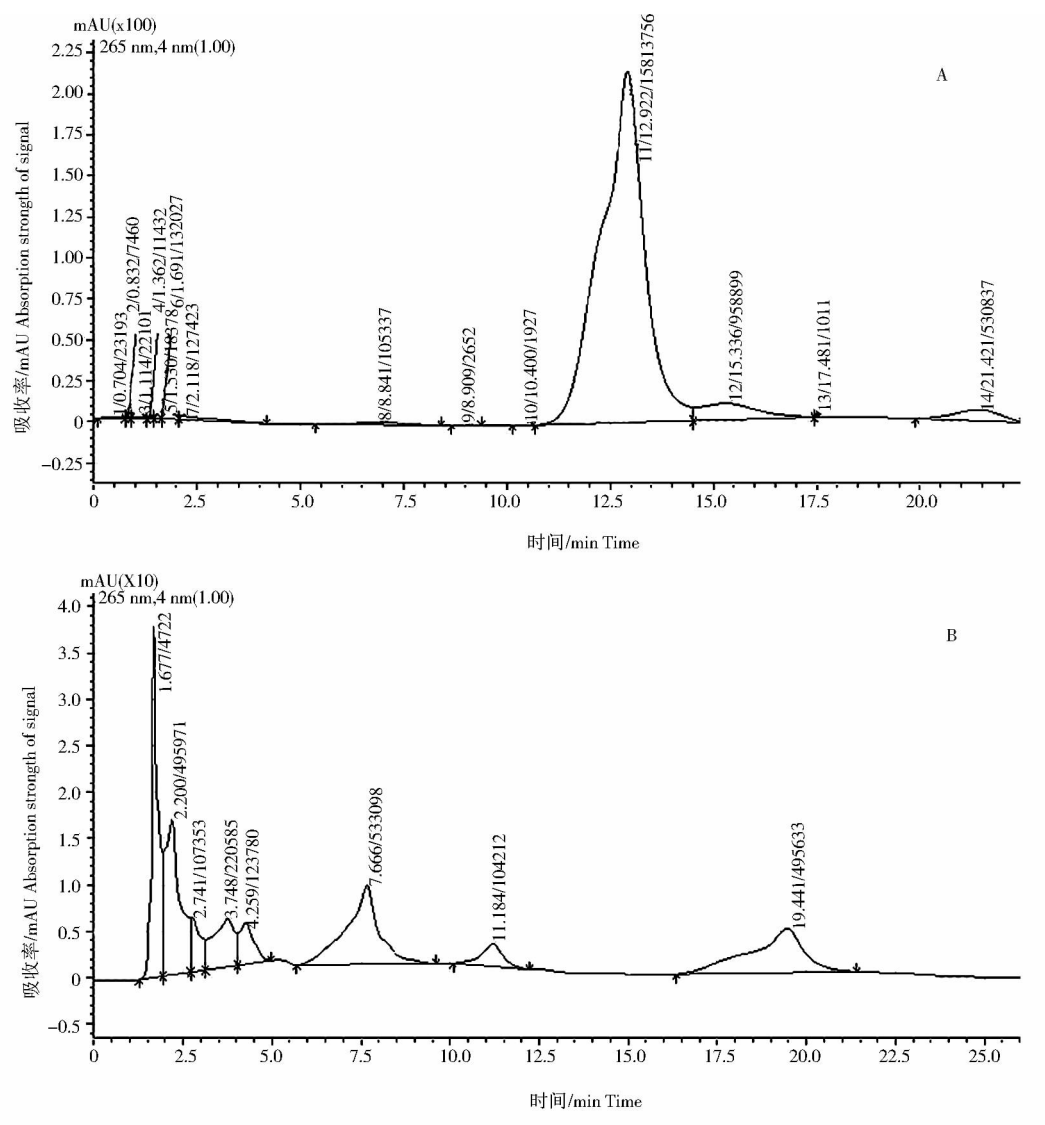


图1 总黄酮标准品(A)和待测样品(B)HPLC 色谱图

Fig.1 HPLC chromatograms of standard rutin(A)and extraction sample(B)

2.1.4 线性关系的考察 HPLC 法测定不同梯度浓度的标准品液,分别以浓度和峰面积为横纵坐标作回归方程,得到标准品的标准曲线: $y =$

$2\ 000\ 000x - 56\ 138$ ,标准品芦丁在  $0.05 \sim 1.60\ \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  浓度范围内  $R^2 = 0.999\ 7$ ,峰面积与质量浓度呈现良好的线性关系(见图2)。

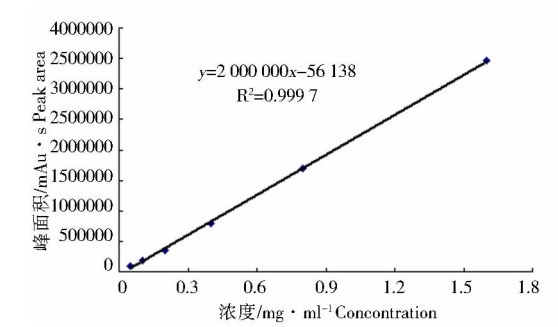


图 2 总黄酮标准品芦丁的标准曲线  
Fig. 2 Standard curve of standard rutin

2.2 测定方法的验证

2.2.1 精密度试验 取同一浓度的标准品液,连续进样 6 次,分别记录峰面积值,经计算,标准品 RSD=0.110%(n=6),结果表明,该试验采用的高效液相色谱仪器具有良好的精密度(见表 1)。

表 1 精密度试验的测定结果

Table 1 The results of the accuracy experiment

编号 No.	保留时间/min Retention time	峰面积/mAu·s Peak area	平均峰面积/mAu·s Aerage of peak area	相对标准偏差(RSD)/% Relative standard deviation
1	12.309	3495294	3357986.167	0.110
2	12.316	3370449		
3	12.299	3445063		
4	12.334	3341162		
5	12.334	3335207		
6	12.314	3160742		

表 2 加样回收率的测定结果

Table 2 Determination results of recovery

编号 No.	样品量/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Sample content	加入量/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Amount content	测得量/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Measure content	回收率/% Recovery	平均回收率/% Average recovery	相对标准偏差/% Relative standard deviation
1	26.52	10.00	36.05	98.23	99.90	2.6691
2	26.52	20.00	46.27	99.06		
3	26.52	30.00	56.82	101.13		
4	26.52	40.00	65.49	96.12		
5	26.52	50.00	76.82	101.13		
6	26.52	60.00	87.51	103.73		

3 结论

该试验采用超声波法辅助提取拟南芥总黄酮,利用 HPLC 法进行总黄酮含量测定,结合了

2.2.2 重现性试验 取同一供试样品,平行处理 6 次,测定峰面积值,标准品 RSD=0.94%(n=6),结果表明,在该条件下数据重现性好,方法可靠。

2.2.3 稳定性试验 取 4℃ 保存条件下某一浓度已经检测的密封样品,每隔 4 h 进样一次,连续进样 72 h,结果表明,标准品日内稳定性 RSD=0.86%(n=6)、日间稳定性 RSD=1.38%(n=3),说明样品在 24 和 72 h 内连续进样稳定可靠。

2.2.4 加样回收率试验 分别取 1、2、3、4、5 和 6 mL 标准品母液,用某一已知浓度的样品定容至 10 mL,每个样品 3 次重复测定,计算加样回收率,公式:加样回收率(%)=(测得浓度-本底浓度)/加标量 $\times$ 100。标准品的平均加样回收率为 99.90%(n=6),RSD=2.6691%(n=6)(见表 2)。

超声波法和 HPLC 法的双重优点,即:超声波法省时、便捷、节能、提取率高等,HPLC 法高效液相色谱仪器精密度高、测定结果准确等优点,适于

拟南芥中总黄酮含量的测定。试验确定的最优 HPLC 法色谱参数:  $C_{18}$  色谱柱、35℃ 柱温、256 nm 检测波长、35% 甲醇:65% 水(含 0.4% 磷酸)流动相、10  $\mu\text{L}$  进样量及 10  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$  流速。精密度试验的 RSD 值为 0.110%, 平均加样回收率为 99.90%, RSD 为 2.669 1%。验证性试验结果表明,建立的 HPLC 法准确可靠、测定灵敏度高、操作便利,适用于拟南芥及其副产品中总黄酮含量的测定,具有推广价值。

#### 参考文献:

- [1] Fabjan N, Rode J, Kosir I J, et al. Tartary buckwheat(*Fagopyrum tataricum* Gaertn.)[J]. J Agric Food Chem, 2003, 51(22): 6452-6455.
- [2] Aedin C, Bryn H, Rosa M. Isoflavones, lignans and stilbenes-origins, metabolism and potential importance to human health[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2000, 80: 1044-1047.
- [3] Xiong Q B, Shi D W, Mizuno M. Flavonol glucosides in pericarps of *Zanthoxylum bungeanum* [J]. Phytochemistry, 1995, 39(3): 723-725.
- [4] 周建华, 刘松艳, 巩发永. 两种分光光度法测定苦荞麦中黄酮含量的比较[J]. 江苏农业科学, 2008(5): 247-251.
- [5] 胡敏, 姜发堂, 张声华. 三种测定银杏叶提取物中总黄酮的方法比较[J]. 食品与发酵工业, 1997, 23(4): 40-43.
- [6] 张海军, 苏连泰, 李琳, 等. 高效液相色谱法(HPLC)测定大豆异黄酮含量的研究[J]. 大豆科学, 2011, 30(4): 672-675.
- [7] 方子季, 许自明, 朱秀美, 等. 高效液相色谱内标法测定银杏叶制品中的总黄酮含量[J]. 解放军药科学学报, 2002, 18(1): 51-53.
- [8] 周美环, 赵书楷, 陈森, 等. HPLC 法测定桑叶中芦丁的含量[J]. 辽宁中医药大学学报, 2010, 12(5): 228-229.
- [9] 石生益, 梁晶晶, 杨明. 苦荞麦中芦丁的正交提取工艺及 HPLC 检测研究[J]. 中国酿造, 2010(11): 162-164.
- [10] 尹礼国, 魏琴, 吴同, 等. 苦丁茶中生物类黄酮及芦丁含量的测定[J]. 食品研究与开发, 2009, 30(1): 109-111.
- [11] 王宇, 王遂. 分光光度法测定落叶松中的总黄酮含量[J]. 食品科学, 2009, 30(22): 314-317.
- [12] 周正华, 杜安全, 王先荣. 百蕊草总黄酮的含量测定[J]. 安徽医药, 2002, 6(1): 63-64.
- [13] 吴亮亮, 石雪萍, 张卫明. 反相高效液相色谱法测定不同品种花椒中芦丁和槲皮素的含量[J]. 中国野生植物资源, 2011, 30(1): 54-56.
- [14] 陈全斌, 杨瑞云, 义祥辉, 等. RP-HPLC 法测定罗汉果鲜果及甜甙中总黄酮含量[J]. 食品科学, 2003, 24(5): 133-135.
- [15] 万华方, 梁颖. 拟南芥种皮色素形成机制研究进展[J]. 中国农学通报, 2005, 21(5): 233-236.

## Determination of Total Flavonoids Content in *Arabidopsis thaliana* by High-Performance Liquid Chromatographic

ZHANG Hai-jun<sup>1,2</sup>, GUO Li<sup>1</sup>, WANG Ming-ze<sup>1</sup>, CHE Ye<sup>1</sup>, HOU Li<sup>1</sup>, LI Ze-yu<sup>1</sup>, WANG Dian-kui<sup>1</sup>

(1. Daqing Branch of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Daqing, Heilongjiang 163316; 2. Seed Management Station of Jilin Province, Changchun, Jinlin 130062)

**Abstract:** In order to develop and use the flavonoids and related by-products in *Arabidopsis thaliana*, the determine method was established for total flavonoids content. The results showed that taking rutin as the standard, high-performance liquid chromatographic method was established, mobile phase consisted on methanol(A)/0.4% orthophosphoric acid in distilled water(B) and each solvent was filtered through a 0.45  $\mu\text{m}$  pore size filter and degassed in an ultrasonic bath before. The analysis of rutin was performed at 35℃ (column oven temperature) with 10  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$  flow rate, the injection volume was 10  $\mu\text{L}$ , and solvent A:B of rutin was 35%:65%, the chromatogram was detected at 256 nm. The peak area had a good linearity with concentration when  $R^2=0.9997$ , the recoveries of standard spiling was 99.90% with RSD less than 3%. So the method was suitable for determination of total flavonoids in *Arabidopsis thaliana*.

**Key words:** *Arabidopsis thaliana*; total flavonoids content; rutin; high-performance liquid chromatographic(HPLC)