

HPLC 测定木薯叶片中黄酮醇含量

LC-407

摘要： 本文参照 GB/T 42114-2022 建立了 HPLC 测定木薯叶片中黄酮醇含量的方法，并对方法的线性、精密度及加标回收率进行了考察。结果显示，杨梅苷、芦丁、烟花碱和水仙碱等 4 种化合物在线性范围内线性关系良好；重复性考察中目标物保留时间相对标准偏差不大于 0.05%，峰面积的相对标准偏差在 0.1%~0.2% 之间，重复性好；低中高三水平的加标实验中，目标物的加标回收率在 72.3%~102.1% 之间。所建方法的线性、重复性及加标回收率符合标准要求，可为木薯叶片中黄酮醇含量测定提供参考。

关键词： 高效液相色谱仪 木薯叶片 黄酮醇

技术特点：

- ❖ 优化梯度洗脱程序，提高各目标物的分离度，使 HPLC 洗脱方法适用性更强；
- ❖ 本方法灵敏度、重复性均超出标准要求，可为医药行业相关检测人员提供参考。

木薯叶片中含有丰富的黄酮类化合物，该物质是自然界药用植物中主要的抗氧化活性成分之一，多以苷类形式存在。目前为止，在木薯叶片中发现了 8 种黄酮类化合物，分别是芦丁、烟花苷、槲皮素、山奈酚、三羟基黄酮醇、金丝桃苷、刺槐苷、水仙苷。其中，芦丁和烟花苷两种黄酮醇是木薯叶片中的主要黄酮类物质，但不同的木薯品种、不同的生育期和种植环境，导致木薯叶片中黄酮醇类物质组成和

含量差异较大，获得高含量稳定的黄酮类物质是木薯叶片提高利用价值的关键因素。因此，建立木薯叶中黄酮醇类物质的检测方法，可为木薯叶的利用及质量评价提供参考，对提高木薯的附加值具有重要的意义。

本文采用高效液相色谱法测定木薯叶片中黄酮醇含量，操作性和实用性强，可供相关检测参考。

实验部分

1.1 仪器

本文使用岛津 LC-16 液相色谱仪，配置信息如下：

系统控制器：	CBM-20Alite	自动进样器：	SIL-16
柱温箱：	CTO-16L	输液泵：	LC-16
脱气机：	DGU-20A	检测器：	SPD-16

1.2 分析条件

色谱柱：	Shim-pack GIST (250 mm x 4.6 mm I.D., 5 μm) 岛津(上海)实验器材有限公司, P/N: 227-30017-08		
流动相：	A 相 -0.2% 磷酸溶液; B 相 - 甲醇	柱温：	40°C
流速：	0.8 mL/min	运行时间：	35 min
进样体积：	10 μL	检测波长：	360 nm
洗脱方式：	B 相初始浓度为 25%，时间程序见表 1。		

表 1 梯度洗脱时间程序

Time (min)	Module	Command	Pump B Conc
15	Pumps	Pump B Conc.	45
20	Pumps	Pump B Conc.	50
25	Pumps	Pump B Conc.	100
27	Pumps	Pump B Conc.	25
35	Controller	Stop	

1.3 样品前处理

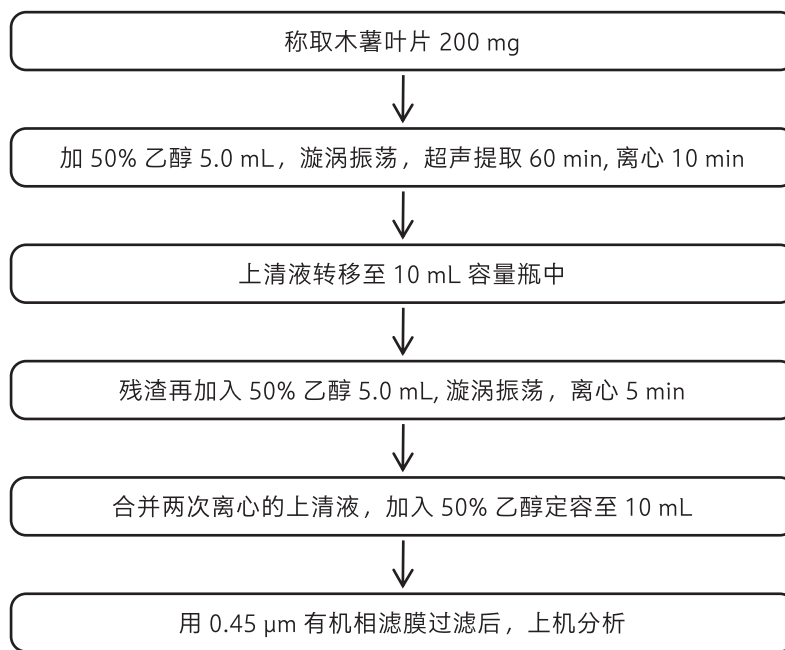


图 1 样品前处理流程图

■ 结果与讨论

2.1 标准溶液色谱图

各化合物的标准色谱图如图 2 所示，相关化合物信息见表 2。

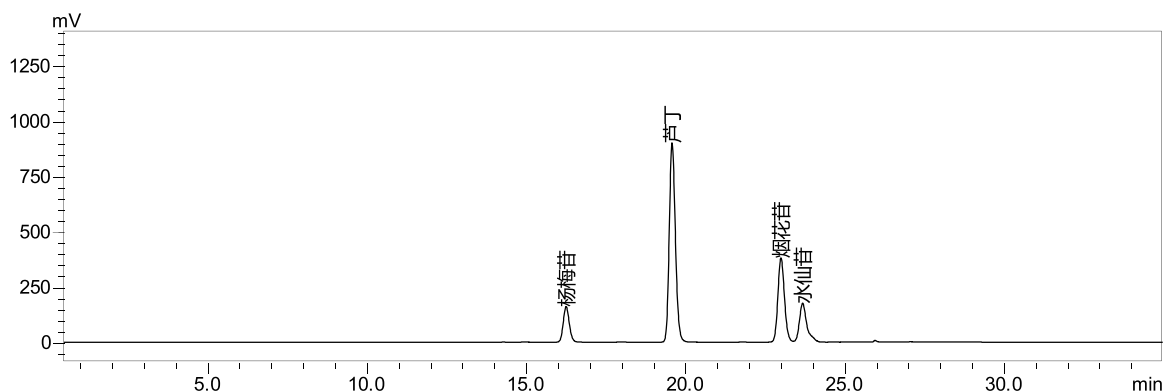


图 2 杨梅苷 (100 μg/mL)、芦丁 (600 μg/mL)、烟花碱 (300 μg/mL)、水仙碱 (100 μg/mL) 的标准色谱图

表 2 标准溶液中各化合物信息

No.	化合物	英文名称	CAS 号	保留时间 (min)
1	杨梅苷	myricetin-3-o-Rutinoside	41093-68-9	16.274
2	芦丁	quercetin-3-o-Rutinoside	153-18-4	19.599
3	烟花碱	kaempferol-3-o-Rutinoside	17650-84-9	23.018
4	水仙碱	isorhamnetin-3-o-Rutinoside	604-80-8	23.697

2.2 校准曲线和检出限

以 50% 乙醇为溶剂，配制各化合物标准溶液，标准系列溶液浓度如表 3 所示。

表 3 各化合物标准溶液浓度 ($\mu\text{g/mL}$)

No.	杨梅苷	芦丁	烟花碱	水仙碱
1	0.25	1.50	0.75	0.25
2	0.50	3.00	1.50	0.50
3	2.50	15.0	7.50	2.50
4	5.00	30.0	15.0	5.00
5	25.0	150	75.0	25.0
6	50.0	300	150	50.0
7	100	600	300	100

按“1.2 分析条件”进行测定，使用外标法定量。以峰面积为纵坐标，对应的标准系列溶液浓度为横坐标，绘制校准曲线。校准曲线线性关系良好，相关系数大于 0.9999。采用 $0.25 \mu\text{g/mL}$ 杨梅苷标准溶液、 $1.50 \mu\text{g/mL}$ 芦丁标准溶液、 $0.75 \mu\text{g/mL}$ 烟花碱标准溶液、 $0.25 \mu\text{g/mL}$ 水仙碱标准溶液作为上机分析溶液，进行仪器灵敏度的考察，并且通过软件计算方法检出限和测定下限。具体结果如表 4 所示。

表 4 标准系列溶液的准确度、线性相关系数及方法检出限和测定下限

No.	化合物	线性范围 ($\mu\text{g/mL}$)	相关系数 (r)	准确度 (%)	方法检出限 ($\mu\text{g/g}$)	测定下限 ($\mu\text{g/g}$)
1	杨梅苷	0.25 ~ 100	0.9999	87.7-109.5	0.65	2.18
2	芦丁	1.5 ~ 600	0.9999	89.6-107.2	0.70	2.34
3	烟花碱	0.75 ~ 300	0.9999	88.3-108.5	0.84	2.80
4	水仙碱	0.25 ~ 100	0.9999	87.9-108.8	0.62	2.06

2.3 精密度

采用目标物的标准品溶液连续测定 6 次，考察仪器的精密度。结果显示，目标物保留时间相对标准偏差在 0.026~0.03%；峰面积的相对标准偏差在 0.132%~0.150% 之间，仪器精密度良好。具体结果如表 5 所示。

表 5 精密度检测结果 (n=6)

No.	目标物名称	标准溶液浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	保留时间 (RSD%)	峰面积 (RSD%)
1	杨梅苷	100	0.030	0.132
2	芦丁	600	0.034	0.134
3	烟花碱	300	0.027	0.135
4	水仙碱	100	0.026	0.150

2.4 加标回收率

采用 1.2 项下分析方法测定市售木薯叶片，样品色谱图见图 3。在该样品中分别进行 4 种化合物的低、中、高三水平加标实验，每组加标平行三份；各化合物的回收率范围在 72.3%~102.1% 之间；具体加标浓度与结果如表 6 所示。

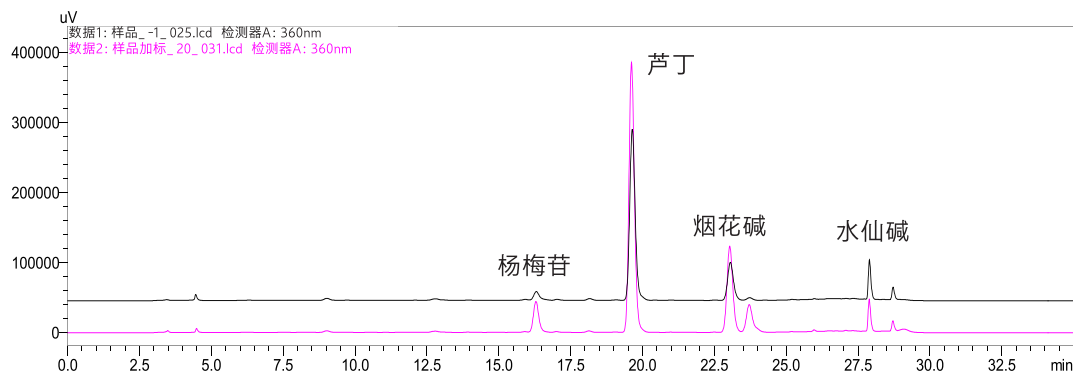


图3 样品与样品加标色谱图

表6 各化合物加标回收率结果

No.	目标物	样品含量 ($\mu\text{g/g}$)	加标 (1)		加标 (2)		加标 (3)	
			加标量 ($\mu\text{g/g}$)	回收率 (%)	加标量 ($\mu\text{g/g}$)	回收率 (%)	加标量 ($\mu\text{g/g}$)	回收率 (%)
1	杨梅苷	412.60	250	92.4	500	93.9	1000	95.4
2	芦丁	7981.35	1500	72.3	3000	74.7	6000	77.4
3	烟花碱	2091.95	750	85.9	1500	87.8	3000	89.8
4	水仙碱	78.15	250	100.5	500	101.4	1000	102.1

结论

本文参照 GB/T 42114-2022 建立了使用 LC-16 测定木薯叶片中黄酮醇含量的高效液相色谱分析方法，分析结果表明，各化合物在各浓度范围内，线性良好，重复性佳，设定条件下加标回收率为 72.3%~102.1%。该方法灵敏度高、重复性好，可用于木薯叶片中黄酮醇含量的检测。

岛津应用云

