

RP-HPLC法测定罗汉果叶中总黄酮含量*

The Determination of Total Flavonoids in *Momordica grosvenori* Leaf by RP-HPLC

陈全斌,杨建香,程忠泉,义祥辉

Chen Quanbin, Yang Jianxiang, Cheng Zhongquan, Yi Xianghui

(广西师范大学资源与环境科学系,广西桂林 541004)

(Dept. of Natural Reso. & Envi. Sci., Guangxi Normal Univ., Guilin, Guangxi, 541004, China)

摘要: 用反相高效液相色谱法 (HPLC) 测定罗汉果 (*Momordica grosvenori*) 叶中总黄酮的含量, 用保留时间定性, 用外标法定量。结果表明, 罗汉果叶含有黄酮甙元槲皮素和山奈酚, 槲皮素线性回归方程为 $y = 179033.73x + 6958.30, r = 0.9951$; 山奈酚线性回归方程为 $y = 176444.32x + 10827.99, r = 0.9944$ 。罗汉果叶中总黄酮含量为 1.618%。

关键词: 罗汉果叶 总黄酮 HPLC 定量

中图分类号: O625.63 文献标识码: A 文章编号: 1005-9164(2005)01-0043-03

Abstract Quercetin and kaempferol are found from *Momordica grosvenori* leaves by their Retain-time in RP-HPLC. The contents of total flavonoids is measured by external standard method, and the result is 1.618%.

Key words *Momordica grosvenori* leaf, total flavonoid, HPLC, quantitative

葫芦科植物罗汉果 (*Momordica grosvenori*) 是我国特有的经济、药用植物, 为广西桂北地区的传统特产。罗汉果营养价值高, 含有丰富的果糖、蛋白质和多种维生素, 其性凉味甘, 具有抗菌消炎、止咳润肺等功效, 广泛用于医药、饮料和调味品中^[1]。前人已经对罗汉果的果实中甜甙^[2-4]、多糖^[5]、黄酮^[6,7]及块根中淀粉^[8]、药用成分^[9]等进行了较多的研究, 但对罗汉果叶的研究未见报道。

黄酮类化合物广泛分布于植物界中, 近 20 年来黄酮类化合物及其药理日益引起人们的重视, 大多数具有显著生理药理活性, 对一些常见病、多发病有重要的生理作用。国内外已经发现的黄酮类化合物有数千种, 相应地在多种植物中开发出多种产品。因此, 研究和开发罗汉果叶黄酮类化合物, 将填补罗汉果研究领域的空白, 对开发罗汉果系列产品具有重要的意义。

1 实验部分

1.1 材料与试剂

罗汉果叶: 2003年秋季采集于广西临桂县和永福县。

D-101大孔吸附树脂 (天津富邦化工科技有限公司生产)、75%乙醇 (食用)

盐酸 (A. R)、甲醇 (A. R)、磷酸 (A. R); 二次蒸馏水

槲皮素及山奈酚对照品 (中国药品生物制品检定所生产)。

1.2 仪器

RE-52A型旋转蒸发仪 (上海亚生化仪器厂生产)、WS210S型电子天平 (北京塞多利斯仪器系统有限公司生产)、P200II型高压液相色谱仪, 包括 UV 20 II 紫外可变波长检测器; HypersilC18 (5 μ m, 4.6mmX200mm) 色谱柱; Echrom 98 色谱工作站 (大连依利特分析仪器有限公司生产)。

1.3 色谱条件

流动相: $V_{\text{甲醇}} : V_{\text{水}} : V_{\text{磷酸}} = 60 : 40 : 0.3$; 流速: 1.0 ml/min; 检测波长: 360 nm; 灵敏度: 0.08; 柱温: 40 $^{\circ}$ C。

收稿日期: 2004-05-28

作者简介: 陈全斌 (1957-), 男, 高级工程师, 主要从事天然产品开发与研究。

* 广西科学技术厅研究与开发计划 (桂科能 0443001-12) 资助项目。本课题中罗汉果叶黄酮开发与应用, 已申请国家专利 (200310110827.X)。

1.4 标准溶液及样品制备

1.4.1 标准溶液配制

分别配制浓度为 0.2 mg/ml 的槲皮素、山奈酚标准溶液。准确吸取槲皮素标准溶液 0.2 ml, 山奈酚标准溶液 1 ml, 置入 10 ml 容量瓶中, 用甲醇定容, 摇匀, 得混合标准溶液。

1.4.2 样品溶液制备

称取粉碎的罗汉果叶 50 g, 置入圆底烧瓶中, 再加 500 ml 蒸馏水在电炉上煮沸, 沸腾 20 min, 冷却, 过滤, 重复 3 次, 合并滤液。将滤液以 10 ml/min 速度过大孔吸附树脂柱, 吸附完毕后, 用蒸馏水清洗, 除去一些水溶性杂质至流出液无色, 然后用 75% 乙醇洗脱, 收集洗脱液, 并将洗脱液用旋转蒸发仪旋干, 得到粗黄酮 3.75 g, 粗黄酮再经无水乙醇溶解, 过滤后旋干得到精制黄酮 1.4 g。

准确称取上述精致黄酮 60 mg, 置于圆底烧瓶, 加入甲醇 30 ml 及盐酸 (1:1) 10 ml, 水浴加热回流水解 1 h, 然后用甲醇定容至 50 ml 得样品待测溶液。

1.5 总黄酮含量计算

总黄酮含量计算按银杏提取物总黄酮甙含量计算方法^[10]计算。总黄酮甙含量 = (槲皮素含量 + 山奈酚含量) × 2.51

2 实验结果

2.1 色谱分离效果

混合标准溶液和样品待测溶液的色谱图见图 1 和图 2。

图 1 和图 2 显示, 在本试验的色谱条件下标准溶液和样品待测溶液中各目标峰得到充分洗脱和分离。标准溶液中槲皮素和山奈酚的保留时间分别为 8.57 min, 15.8 min; 样品待测液中槲皮素和山奈酚的保留时间分别为 8.56 min, 15.7 min。两种溶液中槲皮素和山奈酚的保留时间一致。

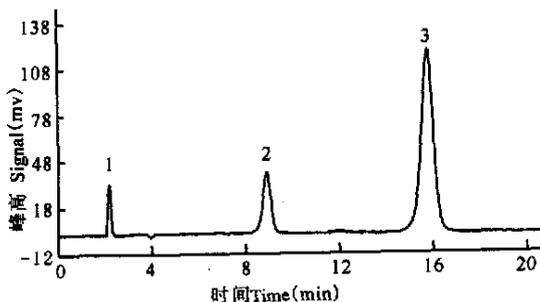


图 1 标准混合溶液色谱图

Fig. 1 Standard sample spectrum

1. 甲醇峰; 2. 槲皮素; 3. 山奈酚

1. Methanol, 2. Quercetin, 3. Kaempferol

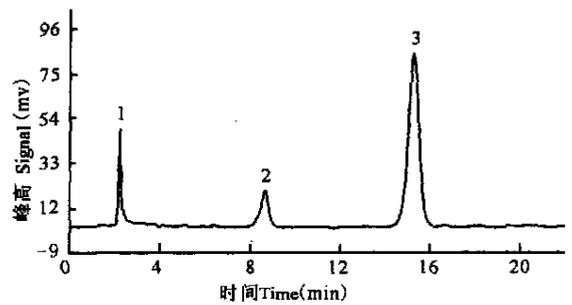


图 2 样品色谱图

Fig. 2 Sample spectrum

1. 甲醇; 2. 槲皮素; 3. 山奈酚

1. Methanol, 2. Quercetin, 3. Kaempferol

2.2 标准曲线绘制

分别取混合标准溶液 5 μl, 10 μl, 15 μl, 20 μl, 25 μl 进样, 测定质量 (μg) 和峰面积 (mv·min) 之间关系, 得槲皮素线性回归方程为: $Y = 6958.30 + 179033.73X$, $r = 0.9951$; 山奈酚线性回归方程为: $Y = 10827.99 + 176444.32X$, $r = 0.9944$

2.3 精密度试验

精确吸取样品溶液 20 μl, 重复进样 5 次, 根据山奈酚峰面积积分值, 得 RSD 为 3.75%。

2.4 回收率试验

采用加样回收法, 称取槲皮素标准品 1 mg, 山奈酚标准品 2 mg, 加入已准确称量好的普通叶子精致黄酮样品中, 重复水解制样过程, 定容 50 ml, 得测试液。进样 20 μl 进行分析, 计算槲皮素、山奈酚的回收率分别为 97.28%, 101.36%。

2.5 样品测试

准确吸取样品待测溶液 20 μl, 进样, 测定槲皮素、山奈酚色谱峰面积积分值, 以外标法计算其含量。结果在罗汉果叶黄酮粗品中, 槲皮素含量为 0.827%, 山奈酚含量为 9.87%。罗汉果叶黄酮精品中槲皮素含量为 1.53%, 山奈酚含量为 21.50%。根据 1.4.2 试验得率, 推算罗汉果叶中槲皮素含量为 0.04284%, 山奈酚含量为 0.602%。

2.6 总黄酮的含量

黄酮粗品中黄酮甙含量为 26.8%, 黄酮精品中黄酮甙含量为 57.8%, 罗汉果叶中黄酮甙含量为 1.618%。

3 结束语

试验结果表明罗汉果叶中存在黄酮化合物, 其甙元是槲皮素和山奈酚, 这与罗汉果果实中黄酮甙元^[7]一致。罗汉果叶总黄酮甙含量为 1.618%。通过本法对罗汉果叶总黄酮含量的测定, 为罗汉果叶在药用领域的应用提供了理论依据。

沿用银杏提取物总黄酮甙含量计算方法来计算罗汉果叶总黄酮含量不是十分准确的,因为各种黄酮甙中糖基不尽相同,换算系数可能不一样。精确的罗汉果叶总黄酮含量计算方法以及罗汉果黄酮的药理作用有待于进一步研究。

参考文献:

[1] 李典鹏,张厚瑞.广西特产植物罗汉果的研究与应用[J].广西植物,2002,20(3):270-276.
 [2] Tsurtematsu T, Shigenobu A. Study on the constituents from fructs of momordicae grosvenori [J]. J Pharm (Japan), 1983, 103: 1151-1173.
 [3] Eichiro Takeo, Hiroshi Yoshida, Norio Tada, et al. Sweet element of siraitia grosvenori inhibit oxidative modification of low-density Lipoprotein [J]. Journal of Atherosclerosis and Thrombosis, 2001, 9(2): 114-120.
 [4] 刘钟栋.罗汉果甙(V)的精制研究[J].离子交换与吸

附,1999,15(4):364-368.

[5] 陈全斌,陈海燕,李俊,等. PHLC法测定罗汉果多糖的相对分子质量 [J]. 中草药, 2003, 34(12): 1075-1076
 [6] 斯建勇,陈迪华,常琪,等.鲜罗汉果中黄酮甙的分离及结构测定 [J]. 药学学报, 1994, 29(2): 114-120.
 [7] 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.
 [8] 陈全斌,汤桂梅,义祥辉.罗汉果块根淀粉的提取及其性质研究 [J]. 食品科学, 2002, 23(4): 37-41.
 [9] 陈全斌,汤桂梅,徐庆,等.罗汉果块根中药用成份提取及其药理初探 [J]. 化学世界, 2003, 44(1): 21-23.
 [10] 中国国家药典委员会. 中华人民共和国药典 [M]. 2000年版一部. 北京: 化学工业出版社, 2000

(责任编辑: 邓大玉)

(下转第 42页 Continue on page 42)

轨道的电荷占据数有关, 3p轨道的电荷占据数增加, 有利于其氢化物的稳定。

(2)吸氢前后,取代元素 M 的 3d电子的变化是影响 ZrMnM 合金储氢性能的主要原因之一。吸氢后, Co的 3d分波态密度向成键区偏移,加强了与氢原子的成键作用,使得 Co的加入能延长合金的循环寿命。

(3)在 ZrMnM 合金中, Co和 Mn与 H的成键特征很相近, Co的加入利于改善 ZrMnM 合金的氢压平台曲线。

参考文献:

[1] 李全安,陈云贵,王丽华,等.储氢合金的开发与应用 [J].材料开发与应用,1999,14(3):33-36.
 [2] 杨晓光,雷永泉,于进云,等. AB₂型锆基储氢合金 [J]. 上海有色金属,1994,1(15):8-14.
 [3] 李平,王新林,吴建民,等. AB₂型 Laves相储氢电极材料的研究现状 [J]. 金属功能材料,2000,7(2):8-12.
 [4] Sawa H, Wakao S. Electrochemical properties of Zr-V-Ni system hydrogen absorbing alloys of face-centered cubic structure [J]. Materials Translations, 1990, 31(6): 487-492.
 [5] Yang X G, Lei Y Q, Zhang W K. Effect of alloying with Ti, V, Mn on the electrochemical properties of Zr-Cr-Ni base Laves phase metal hydride electrodes [J]. Alloys

and Compounds, 1996, 243: 151-155.

[6] Nakano H, Wakao S. Substitution effect of elements in Zr based alloys with Laves phase for nickel hydride battery [J]. Alloys and Compounds, 1995, 231: 587-593.
 [7] 高学平,宋德英,张允什,等. Laves相储氢合金及其在 Ni/MH 电池中的研究进展 [J]. 化学通报, 1994, 6: 10-16.
 [8] Matsumura T, Yukawa H, Morinaga M. Alloying effect on electronic structure of ZrMn₂ intermetallic hydride [J]. Alloys and Compounds, 1998, 279: 192-200.
 [9] Fujitani S, Yonezu I, Saito T, Furukawa N. Relations between equilibrium hydrogen pressure and lattice parameters in pseudobinary Zr-Mn alloys [J]. Less-Common Metals, 1991, 172-174: 220-231.
 [10] Yonezu I, Fujitani S, Furukawa A, et al. Characteristics of hydrogen-absorbing Zr-Mn alloys for heat utilization [J]. Less-Common Metals, 1991, 168: 201-209.
 [11] Sinha V K, Ewallace W. The hyperstoichiometric ZrMn_{1+x}Fe_{1-y}-H system: hysteresis effect [J]. Less-Common Metals, 1983, 91: 239-249.
 [12] Wagner C. Thermodynamics of Alloys [M]. London: Addison-Wesley, 1952. 65.

(责任编辑: 邓大玉)