

胶束萃取 - 高效液相色谱法同时测定葛根粉中 5 种异黄酮

姜兰芳, 周光明*, 李艳艳

(发光与实时分析教育部重点实验室, 西南大学化学化工学院, 重庆 400715)

摘 要: 目的: 基于表面活性剂作为萃取剂, 应用胶束萃取 - 反相高效液相色谱法测定葛根粉中葛根素、大豆苷、染料木苷、大豆苷元和染料木素 5 种异黄酮的含量。方法: 以非离子表面活性剂 Triton X-114 为萃取剂, 采用 Phenomenex C₁₈ 色谱柱, 甲醇 - 体积分数 0.25% 冰醋酸溶液为流动相, 梯度洗脱, 利用紫外检测器在 250nm 波长处进行检测。考察色谱测定条件, 优化胶束萃取和浊点预富集参数。结果: 采用 3g/100mL Triton X-114 表面活性剂, 液固比为 100:1(mL/g), 40℃ 超声萃取 30min, 所得的萃取率最大。在表面活性剂提取液中, 加入一定量的氯化钠进行浊点预富集, 可以提高萃取率和预富集因子。该方法的定性检测限范围是 0.016~0.079 μg/mL($R_{SN}=3$), 平均回收率为 93.7%~98.86%, 预富集因子平均值可达到 12.5。结论: 该方法简便快速、灵敏可靠、绿色环保, 适用于葛根粉中葛根素等 5 种异黄酮成分含量的测定和产品质量控制。

关键词: 胶束萃取; 浊点萃取; Triton X-114 表面活性剂; 异黄酮; 高效液相色谱

Simultaneous Determination of Isoflavonoids in Kudzu Powder by High Performance Liquid Chromatography Coupled with Micelle-mediated Extraction

JIANG Lan-fang, ZHOU Guang-ming*, LI Yan-yan

(Key Laboratory on Luminescence and Real-time Analysis, Ministry of Education, School of Chemistry and Chemical Engineering, Southwest University, Chongqing 400715, China)

Abstract: Objective: A reverse-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) coupled with micelle-mediated extraction method was developed for the simultaneous determination of five isoflavonoids such as puerarin, daidzin, daidzein, genistin and genistein from kudzu powder. Methods: The non-ionic surfactant Triton X-114 was used as the extraction solvent. The chromatographic separation of samples was performed on a Phenomenex C₁₈ column using methanol-0.25% glacial acetic acid as the mobile phase by means of gradient elution and a UV detector set at 250 nm was used for detection. The chromatographic conditions were explored to optimize the micelle-mediated extraction and enrichment of cloud points. Results: The highest extraction rate of isoflavonoids was achieved using 3 g/100 mL Triton X-114 as the surfactant for ultrasonic-assisted extraction at 40 °C for 30 min with a material/liquid ratio of 1: 100 (g/mL). Sodium chloride was added to the extract to improve extraction rate and cloud point enrichment. The limit of detection (LOD) of this developed method was in the range of 0.016—0.079 μg/mL ($R_{SN}=3$) with average recovery rates ranging between 93.7% and 98.86%. The enrichment factor was approximately 12.5. Conclusion: This developed method is characteristics of simple operation, low cost, high extraction efficiency and less pollution to environment, which is suitable for the quality control of five isoflavonoids in kudzu powder.

Key words: micelle-mediated extraction; cloud point extraction (CPE); Triton X-114 surfactant; isoflavonoids; high performance liquid chromatography (HPLC)

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)06-0186-05

收稿日期: 2010-05-25

基金项目: 科技部重大专项(2008ZX07315); 重庆市自然科学基金项目(CSTC2007BB5370)

作者简介: 姜兰芳(1983—), 女, 硕士研究生, 研究方向为色谱分析。E-mail: jianglf@swu.edu.cn

* 通信作者: 周光明(1964—), 男, 教授, 博士后, 研究方向为色谱及其联用技术。E-mail: gmzhou@swu.edu.cn

葛根为豆科植物野葛的干燥根^[1],是常用中药材,现代研究证实,葛根中的主要有效成分为葛根素等异黄酮类化合物,该类化合物具有抗氧化性,改善心、脑血液循环、扩张冠状动脉、降血压、降血糖之功效^[2-3]。葛根又属于药食同源,也广泛地被应用于保健食品和食品中。有关葛根中葛根素等异黄酮的含量测定研究已有不少报道^[4-8],但对市售的葛根粉中葛根素含量测定报道不多,本实验针对葛根粉中葛根素等异黄酮的提取、预富集条件以及测试条件等进行优化,并采用高效液相色谱法对葛根粉样品进行定量分析。

测定中草药葛根样品中的异黄酮含量通常采用高效液相色谱法^[4-8]、高效薄层色谱法^[9]和红外光谱法^[10]等,其样品前处理常采用液-液萃取法、索氏萃取法和固相萃取法,这些方法都使用大量的有机溶剂,费时耗力而且在蒸发浓缩过程中有部分被测物丢失。胶束萃取(micelle-mediated extraction, MME)和浊点萃取(cloud point extraction, CPE)预富集方法是近年来发展起来的一种特殊液液萃取分离技术,它是利用表面活性剂胶束水溶液的增溶性和浊点现象,改变实验参数引发相分离,可以使表面活性剂结合的疏水性物质与亲水性物质达到理想的分离效果,从而可以提高回收率和预富集因子。与上述传统前处理方法比较,该方法只需要一定浓度的表面活性剂,具有试剂用量小、环境友好、萃取效率高、操作简便等优点,已广泛应用于环境样品^[11-15]、医药样品^[16-17]和固体样品^[18-22]的前处理中。

本实验拟以非离子表面活性剂 Triton X-114 为萃取剂,利用胶束萃取技术来提取、分离葛根粉中的葛根素等异黄酮类物质,应用反相高效液相色谱法(RP-HPLC)分析测定其含量,以期评价葛根粉这一药食资源的质量提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

葛根粉 重庆市场。

葛根素、大豆苷、染料木苷、大豆苷元和染料木素对照品 天津中新药业中药现代化技术工程中心; 甲醇(分析纯) 成都市科龙化工试剂厂; 冰乙酸(分析纯) 重庆东方试剂厂; 氯化钠、硫酸钠、碳酸钠(均为分析纯) 重庆北碚化学试剂厂; 二次蒸馏水为实验室自制; Triton X-114 深圳美荷生物有限公司。

1.2 仪器与设备

LC-20AT 液相色谱输液泵、SPD-20A 紫外检测器、CTO-10AS 柱温箱、LC-8000 色谱数据处理系统 日本 Shimadzu 公司; 色谱柱为 Phenomenex C₁₈(150mm × 4.6mm, 5 μm) 广州菲罗门科学仪器有限公司; 0.45 μm 针头微孔滤膜过滤器 重庆钛新仪器有限公司; KH-3200B 型超声波清洗器 昆山禾创超声仪器有限公司;

TGL-16G 高速离心机 上海安亭科学仪器厂; SZ-2 自动双重纯化水蒸馏器 上海沪西分析仪器; LIDA pH 计 上海理达仪器厂; FA2004A 型分析天平 上海精天电子仪器有限公司。

1.3 溶液的配制

对照品储备液: 分别精密称取对照品葛根素、大豆苷、大豆苷元、染料木苷和染料木素适量,加甲醇配制成葛根素 273 μg/mL、大豆苷 100 μg/mL、大豆苷元 500 μg/mL、染料木苷 100 μg/mL、染料木素 160 μg/mL 的溶液,作为储备溶液,待用。

对照品混合溶液: 精密吸取 5 种异黄酮储备液适量,用 3g/100mL Triton X-114 表面活性剂溶液配制一系列浓度不同的对照品混合溶液,冰箱(4℃)内保存备用。

1.4 样品处理

胶束萃取: 准确称量 0.1g 葛根粉样品,置 15mL 离心管中,加入 10mL 3g/100mL Triton X-114 水溶液摇匀后放入 40℃ 超声水浴中超声萃取 30min,萃取完成后 3000r/min 离心 10min,将萃取上清液经 0.45 μm 有机滤膜过滤后待用。

CPE 富集: 将上述萃取上清液转入 10mL 的离心管中,加入 1.76g NaCl 旋涡振荡 1min 后,置入 55℃ 恒温水浴中平衡 40min,3000r/min 离心 5min 使两相分离,弃去上层水相,分取下层表面活性剂富集相,用甲醇定容到 1.0mL 来降低表面活性剂的黏度,经 0.45 μm 有机滤膜过滤后供高效液相色谱分析。

1.5 色谱条件

Phenomenex C₁₈ 色谱柱(150mm × 4.6mm, 5 μm),流动相由体积分数 0.25% 冰乙酸和甲醇组成(A 为体积分数 0.25% 冰乙酸, B 为甲醇),采用梯度洗脱,洗脱程序为: 0~15min, 15%~80% B; 15~20min, 80% B; 20~22min, 80%~15% B; 体积流量: 0.8mL/min; 进样量: 25 μL; 检测波长: 250nm; 柱温: 20℃。

2 结果与分析

2.1 不同提取溶剂的比较

为考察 Triton X-114 表面活性剂的提取效果,在相同的条件下,分别研究甲醇、50% 甲醇、乙醇、环己烷、丙酮和正己烷 6 种常用萃取剂与 3g/100mL Triton X-114 非离子表面活性剂对 0.1g 葛根粉中 5 种异黄酮提取含量的影响。结果表明采用 3g/100mL Triton X-114 为提取溶剂,获得的葛根异黄酮类物质的提取量均为最大。

2.2 胶束萃取参数的选择和优化

2.2.1 表面活性剂质量浓度的选择

分别考察质量浓度为 1.5、3、4、6、12g/100mL

的 Triton X-114 表面活性剂对葛根粉中异黄酮类物质的提取效果。结果表明 3g/100mL Triton X-114 表面活性剂提取效果最好, 结果见图 1。

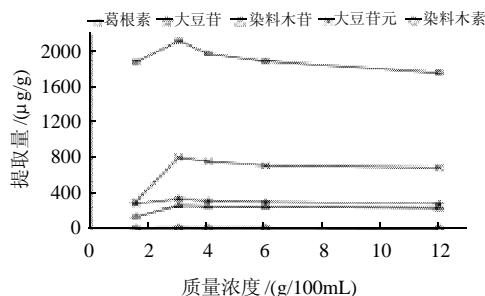


图1 Triton X-114 表面活性剂质量浓度对异黄酮提取效率的影响
Fig.1 Chromatograms of standard isoflavonoids, surfactant and samples

2.2.2 液固比的选择

考察液固比为 33.3:1、40:1、66.7:1、100:1、200:1 (mL/g) 的样品和表面活性剂混合液。结果表明液固比为 100:1(mL/g) 的葛根粉表面活性剂溶液提取效果较好。实验结果见图 2。

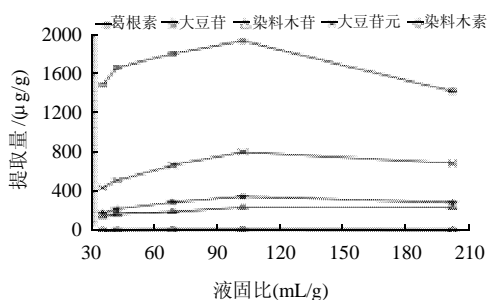


图2 液固比对异黄酮提取效率的影响
Fig.2 Effect of Triton X-114 surfactant concentration on extraction rate of isoflavonoids

2.2.3 萃取温度和时间选择

为了在尽可能低的萃取温度和最短的时间内达到尽可能大的萃取率, 按照实验方法研究不同温度和时间对提取含量的影响。超声提取温度 40℃ 时, 超声时间 30min 以上提取含量均为最大, 实验中选择在 40℃ 时超声提取 30min。

2.3 CPE 富集参数的选择和优化

葛根异黄酮通过胶束萃取后利用表面活性剂的浊点现象进行预富集来提高预富集因子和回收率。通常促使 CPE 预富集的方法有两种: 一种是升高温度, 使样品溶液的温度高于表面活性剂的浊点温度; 另一种是通过加入电解质来促使两相的分离, 电解质的加入增加了萃取环境的离子强度, 可使水相密度增大, 降低极性物质在水中的溶解性, 更易于进入富集相, 另一方面也会

使表面活性剂的疏水性增强, 促使两相分离^[23]。为改善分析物在胶束萃取后的预富集效果, 考察电解质种类和浓度、平衡温度和时间对 CPE5 种异黄酮回收率的影响。

2.3.1 电解质种类和浓度的影响

考察 NaCl、Na₂CO₃ 和 Na₂SO₄ 3 种电解质对上述表面活性剂萃取液的预富集效果。结果表明加入 NaCl 可以使表面活性剂富集相的体积更小, 回收率最大。因此实验选择 NaCl 电解质作为修饰剂来增强离子强度。加入不同浓度的 NaCl, 考察离子强度对萃取率的影响。当 NaCl 浓度为 0.3mol/L 时, 萃取率达到最大。

2.3.2 平衡温度的影响

当表面活性剂浓度一定时, 温度达到浊点温度后, 随着温度的升高萃取率逐渐增大, 表面活性剂富集相体积减小。在保证萃取完全的前提下, 应该采用尽可能低的平衡温度。不同平衡温度对 5 种异黄酮萃取率的影响见图 3(NaCl 浓度为 0.3mol/L 和平衡时间为 20min), 结果表明, 在 55℃ 平衡温度下, 萃取率达到最大值, 因此实验选择在 55℃ 作为 CPE 预富集的平衡温度。

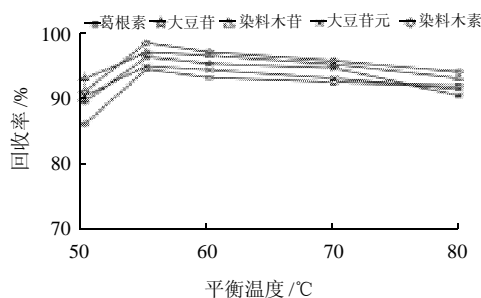


图3 平衡温度对异黄酮类物质回收率的影响
Fig.3 Effect of material/liquid ratio on extraction rate of isoflavonoids

2.3.3 平衡时间的影响

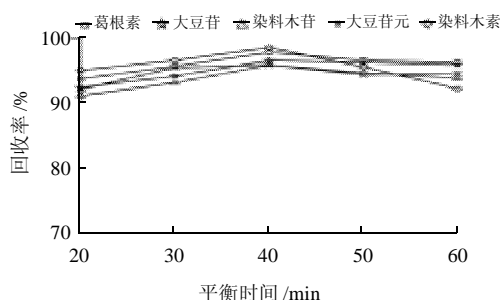


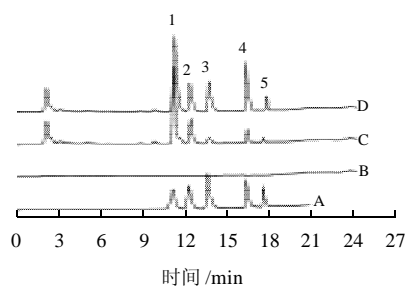
图4 平衡时间对异黄酮类物质回收率的影响
Fig.4 Effect of equilibrium temperature on recovery rate of isoflavonoids

在 0.3mol/L NaCl 和平衡温度为 55℃ 的条件下, 研究平衡时间对葛根粉中葛根素、大豆苷、大豆苷元、染料木苷和染料木素回收率的影响见图 4。结果表明, 平衡时间为 40min 获得的 5 种异黄酮类物质的回收率均为最大。

2.4 分析方法的确认

2.4.1 方法专属性考察

对照品混合液按 2.3 节的方法操作, 进样 20 μL , 记录色谱见图 5A; 取空白 3% Triton X-114 表面活性剂 10mL, 按 2.3 节方法操作, 进样 20 μL , 记录色谱图 5B; 从图 5B 可以看出, 表面活性剂水溶液的紫外吸收很弱, 不干扰 5 种异黄酮的分析测定。从图 5C 和图 5D 比较可以得知表面活性剂通过 CPE 预富集可以使被测物达到较好的预富集效果。



1. 葛根素; 2. 大豆苷; 3. 染料木苷; 4. 大豆苷元; 5. 染料木素。A. 5 种异黄酮标准品; B. 空白表面活性剂; C. CPE 富集前葛根粉样品; D. CPE 富集后葛根粉样品。

图 5 标准品、表面活性剂和样品色谱图

Fig.5 Effect of equilibrium time on recovery rate of isoflavonoids

2.4.2 线性关系

将一系列质量浓度不同的对照品混合溶液按 1.5 节色谱条件注入液相色谱仪, 测定峰面积。以峰面积为纵坐标, 质量浓度为横坐标, 进行线性回归, 回归方程及线性范围见表 1。在 0.078~136 $\mu\text{g/mL}$ 范围内质量浓度和峰面积呈较好的相关性, $r > 0.9996$, 在信噪比 $R_{\text{SN}}=3$ 时, 检出限在 0.016~0.079 $\mu\text{g/mL}$, 在信噪比 $R_{\text{SN}}=10$ 时, 定量限在 0.054~0.260 $\mu\text{g/mL}$ 。

表 1 线性关系实验结果($n=5$)

Table 1 Linear relationship between peak area and the concentration of isoflavonoids ($n=5$)

异黄酮种类	线性方程	线性范围/ ($\mu\text{g/mL}$)	相关系数(r)	检出限/ ($\mu\text{g/mL}$)	定量限/ ($\mu\text{g/mL}$)
葛根素	$Y = -4602.36 + 111730.7X$	0.078~136	1.0000	0.079	0.260
大豆苷	$Y = 9599.52 + 104194.26X$	0.84~50	0.9998	0.016	0.054
染料木苷	$Y = -82427.49 + 100221.59X$	0.46~50	0.9996	0.031	0.100
大豆苷元	$Y = 80492.03 + 69193.56X$	0.29~83.3	0.9999	0.059	0.200
染料木素	$Y = 11032.22 + 137153.32X$	0.58~80	0.9999	0.029	0.097

2.4.3 精密度和重现性

精密吸取对照品混合溶液 20 μL , 按选定的色谱条件连续进样 5 次, 结果葛根素、大豆苷、染料木苷、大豆苷元、染料木素对照品峰面积的 RSD 分别为 0.94%、3.29%、2.69%、1.61%、2.02%、1.38%, 表明仪器

的精密度良好。精密称取同一批葛根粉样品 5 份, 按 1.4 节方法制备样品溶液并进行 HPLC 测定, 葛根素、大豆苷、染料木苷、大豆苷元、染料木素峰面积的 RSD ($n=5$) 分别为 3.34%、2.48%、0.74%、1.83% 和 1.76%, 结果表明该方法重现性良好。

2.4.4 提取回收率和稳定性

精密称取已知含量的同一葛根粉样品 0.1g, 称定 9 份分成 3 组, 每组准确加入不同量对照品混合液, 按 1.4 节方法制备样品溶液, HPLC 测定。葛根素、大豆苷、染料木苷、大豆苷元、染料木素的平均加标回收率为 93.70%~98.86%, 预富集因子平均值可达到 12.5。测定结果见表 2。

表 2 5 种异黄酮的加标回收率和 RSD($n=3$)

Table 2 Recovery rates and relative standard deviations of 5 isoflavonoids in spiked samples

异黄酮种类	加入量/ μg	富集因子	第 1 天		第 2 天		回收率/%
			测得量/ μg	RSD/%	测得量/ μg	RSD/%	
葛根素	5.46	11.8	5.13	3.12	5.11	3.24	94.10
	10.92	12.5	10.21	3.45	10.24	2.98	93.70
	16.38	13.0	15.46	3.24	15.48	3.01	94.50
大豆苷	5.46	11.9	5.19	2.12	5.21	2.48	95.24
	10.92	12.5	10.51	2.09	10.54	2.97	96.36
	16.38	13.0	15.80	2.73	15.81	3.17	96.48
染料木苷	5.46	11.8	5.23	1.02	5.25	1.32	95.89
	10.92	12.6	10.51	1.35	10.53	1.43	96.73
	16.38	12.9	15.92	0.97	15.93	1.03	97.19
大豆苷元	5.46	11.9	5.14	1.97	5.16	1.76	94.46
	10.92	12.5	10.54	2.03	10.53	2.45	96.49
	16.38	12.9	15.56	2.18	15.61	2.31	95.18
染料木素	5.46	12.0	5.11	3.24	5.13	3.43	95.73
	10.92	12.6	10.70	2.94	10.81	3.01	98.86
	16.38	13.0	15.83	3.72	15.84	2.83	96.73

注: 富集因子 = CPE 前的峰面积 / CPE 后的峰面积; 回收率 = CPE 前的被测物质量 / CPE 后的被测物质量。

2.4.5 样品含量的测定

取 3 批葛根粉样品, 依次按 1.4 节方法处理样品, 按选定的色谱条件进样, 测定含量。结果见表 3。

表 3 样品含量测定结果($n=3$)

Table 3 Contents of isoflavonoids in real samples determined by this method ($n=3$)

异黄酮种类	样品 1	样品 2	样品 3
葛根素	2.512	2.436	2.330
大豆苷	0.883	0.818	0.765
染料木苷	0.256	0.201	0.164
大豆苷元	0.368	0.369	0.287
染料木素	0.018	0.017	0.016

3 结 论

本方法以非离子表面活性剂 Triton X-114 为溶剂对葛根粉中的葛根素等异黄酮类物质进行超声波提取, 提取液利用表面活性剂的浊点现象来预富集浓缩, 用高效液相色谱法进行测定, 采用 UV 作为检测器, 表面活性剂对被测物的紫外吸收无影响, 能准确地对葛根粉中的葛根素等异黄酮类物质进行定性和定量分析, 且检测线性范围较宽, 精密度较好, 具有操作简便、快速、安全、经济、选择性好及检出限低等优点。

参考文献:

- [1] 中国药典委员会. 中国药典: 一部[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 233-234.
- [2] SHINDE A N, MALPATHAK N, FULZELE D P. Determination of isoflavone content and antioxidant activity in *Psoralea corylifolia* L. callus cultures[J]. Food Chem, 2010, 118(1): 128-132.
- [3] ARTI A, NAIR M G, STRASBURG B G. Antioxidant activities of isoflavones and their biological metabolites in a liposomal system[J]. Arch Biochem Biophys, 1998, 356(2): 133-141.
- [4] 梁桂贤, 李勤. 葛根黄酮提取分离方法及制剂研究进展[J]. 山西中医学院学报, 2001, 2 (4): 47-49.
- [5] 宋丽军, 谭晓梅, 罗佳波. RP-HPLC 同时测定葛根异黄酮提取部位中葛根素、大豆苷、染料木苷和大豆苷元的含量[J]. 药物分析杂志, 2009, 29(6): 968-970.
- [6] 金文姗, 谈钰元, 陈有根. 高效液相色谱法测定不同产地葛根中葛根素、大豆苷及大豆苷元的含量[J]. 中国中药杂志, 2003, 28(1): 49-51.
- [7] 张立. RP-HPLC 法测定大豆提取物中大豆苷元、染料木素、大豆苷、染料木苷的含量[J]. 中草药, 2001, 32(2): 118-119.
- [8] 李洪玉, 戴诗文, 寿旦. 葛粉中葛根素的高效液相色谱分析[J]. 中国实用医药, 2009, 4(1): 39-40.
- [9] CHEN Sibao, LIU Heping, TIAN Runtao. High-performance thin-layer chromatographic fingerprints of isoflavonoids for distinguishing between *Radix puerariae* Lobate and *Radix puerariae* Thomsonii[J]. J Chromatogr A, 2006, 1121(1): 114-119.
- [10] LAU C C, CHAN C. Rapid analysis of *Radix puerariae* by near-infrared spectroscopy[J]. J Chromatogr A, 2009, 1216(11): 2130-2135.
- [11] 马岳, 黄骏雄. 浊点萃取在环境化学方面的应用[J]. 上海环境科学, 2000, 19(7): 319-324.
- [12] WANG Ling, CAI Yaqi, HE Bin. Determination of estrogens in water by HPLC-UV using cloud point extraction[J]. Talanta, 2006, 70(1): 47-51.
- [13] YAO Bingjia, YANG Li, HU Qiong. Cloud point extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons in aqueous solution with silicone surfactants [J]. Chin J Chem Eng, 2007, 5(4): 468-473.
- [14] 肖珊美, 陈建荣, 沈玉勤. 双硫脲浊点萃取 - 石墨炉原子吸收光谱法测定环境水样中痕量铅的研究[J]. 光谱学与光谱分析, 2006, 26(5): 955-958.
- [15] APICHA S T, SUPALAX S J. Cloud-point extraction and reversed-phase high-performance liquid chromatography for the determination of carbamate insecticide residues in fruits[J]. Anal Bioanal Chem, 2009, 394(5): 1307-1317.
- [16] 孟庆玉, 黎源倩, 邹晓莉. 浊点萃取 - 高效液相色谱法同时测定人尿中的 4 种抗凝血鼠药[J]. 分析化学, 2008, 36(6): 760-764.
- [17] 石珊, 毕开顺, 唐倩. 浊点萃取结合高效液相色谱法测定大鼠血浆中双氯芬酸钠的浓度[J]. 药物分析杂志, 2009, 29(4): 551-555.
- [18] SUN Chen, XIE Yuchun, LIU Huizhou. Microwave-assisted micellar extraction and determination of glycyrrhizic acid and liquiritin in licorice root by HPLC[J]. Chin J Chem Eng, 2007, 15(4): 474-477.
- [19] SHI Zhihong, ZHU Xiaomin, ZHANG Hongyi. Micelle-mediated extraction and cloud point preconcentration for the analysis of aesculin and aesculetin in Cortex fraxini by HPLC[J]. J Pharm Biomed Anal, 2007, 44(4): 867-873.
- [20] FANG Qun, HIN W Y, HEI W L. Micelle-mediated extraction and preconcentration of ginsenosides from Chinese herbal medicine[J]. J Chromatogr A, 2000, 904(1): 47-55.
- [21] LIU Wei, ZHAO Weijun, CHEN Jianbo. A cloud point extraction approach using Triton X-100 for the separation and preconcentration of Sudan dyes in chilli powder[J]. Anal Chim Acta, 2007, 605(1): 41-45.
- [22] HE Jiantao, ZHAO Ziwei, SHI Zhihong. Analysis of isoflavone daidzein in *puerariae Radix* with micelle-mediated extraction and preconcentration [J]. J Agric Food Chem, 2005, 53(3): 518-523.
- [23] GU T, GALERA-GOMEZ P A. Clouding of Triton X- 114: The effect of added electrolytes on the cloud point of Triton X- 114 in the presence of ionic surfactants[J]. Colloids Surf A, 1995, 104(2/3): 307-312.