

高效液相色谱法测定南瓜粉中葫芦巴碱的含量

张英春¹, 杨鑫^{1,*}, 张华¹, 王静², 徐德昌¹

(1. 哈尔滨工业大学食品科学与工程学院, 黑龙江 哈尔滨 150090

2. 中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所, 北京 100081)

摘 要: 目的: 建立高效液相色谱法测定南瓜粉中葫芦巴碱的方法。方法: 甲醇超声波提取样品中的葫芦巴碱, 色谱柱为 Zorbax-NH₂ (4.6 × 150mm, 5 μm), 流动相为乙腈-水 (80:20, V:V), 流速为 1ml/min, 检测波长为 265nm。结果: 葫芦巴碱浓度在 5.01~101.4 μg/ml 内呈现良好的线性关系, 相关系数 $r=0.9999$ ($n=5$); 精密实验 RSD=0.31% ($n=5$); 平均回收率为 85.28%, RSD=4.4% ($n=6$); 测定三个品系的 30 个样品中南瓜粉中葫芦巴碱的含量为 0.1219~0.4836mg/g。结论: 首次建立了高效液相色谱法测定南瓜中葫芦巴碱含量的方法, 为南瓜功能性成分开发和遗传育种提供了理论依据。

关键词: 南瓜粉; 葫芦巴碱; 高效液相色谱法

HPLC Determination of Trigonelline in Pumpkin Powder

ZHANG Ying-chun¹, YANG Xin^{1,*}, ZHANG Hua¹, WANG Jing², XU De-chang¹

(1. College of Food Science and Engineering, Harbin Institute of Technology, Harbin 150086, China; 2. Institute of Quality Standards and Testing Technology for Agri-Products, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract: objective: To set up a method for determination trigonelline in pumpkin powder by HPLC. Method: Pumpkin powder sample was extracted with methanol ultrasonic, Zorbax-NH₂ (4.6×150 mm, 5 μm) column was used with mobile phase as acetonitrile-water (80:20,V:V). The flow rate was 1ml/min and detection wavelength was set at UV 265 nm. Result: The calibration curve is linear in the range of 5.01~101.4 μg/ml, with the correlation coefficient 0.9999 ($n=5$); the RSD 0.31 ($n=5$) in the precision test, the average recovery rate 85.26% and RSD 4.4% ($n=6$). The contents of trigonelline in the three kinds of thirty samples are 0.1219~0.4836 mg/g. Conclusion: The method can provide scientific indexes for developing the functional component and selecting breed of pumpkin.

Key words: pumpkin powder; trigonelline; HPLC

中图分类号: TS231.5642.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2008)01-0280-03

南瓜是葫芦科南瓜属草本植物, 富含果胶、戊聚糖、甘露醇、多种氨基酸(瓜氨酸、天门氨酸等)、维生素(VC、VE、VB等)、矿物质(Fe、P、Se等), 此外南瓜中还含有生物碱、南瓜子碱、葫芦巴碱等多种生物活性物质和营养成分。葫芦巴碱具有抗癌作用, 在 12.5mg/kg 水平上能使白血病 P388 小鼠生命延长 31%^[1]。同时可治疗某些皮肤病, 如牛皮癣等。目前, 有关南瓜中葫芦巴碱的含量测定, 国内外未见报道。本实验采用高效液相色谱法分别探索了氨基键合正相色谱柱和 C₁₈ 反相色谱柱测定南瓜中葫芦巴碱的色谱条件, 将其中葫芦巴碱成分进行分离及定性定量分析, 首次建立了高效液相色谱氨基键合正相色谱法测定南瓜中葫芦巴碱

含量的方法, 为南瓜中的功能性成分开发和遗传育种提供了理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

南瓜粉 东北农业大学南瓜育种室; 乙腈和甲醇 (分别为色谱纯和分析纯) 山东禹王实业有限公司; 去离子水由 millipore purification system 超纯水系统制备。

葫芦巴碱标准品 Sigma 公司 (T-5509); 葫芦巴碱标准品储备溶液: 精密称取 25mg 葫芦巴碱标准样品于 25ml 容量瓶中, 用甲醇定容, 浓度为 1mg/ml, 作为标准品储备液; 葫芦巴碱标准使用溶液: 取 1mg/ml 的标准品

收稿日期: 2006-11-30

作者简介: 张英春(1975-), 女, 讲师, 硕士, 研究方向为食品化学和食品安全。E-mail: zyc229@163.com

* 通讯作者: 杨鑫(1977-), 男, 讲师, 博士, 研究方向为食品化学和食品安全。E-mail: yangxin940@163.com

备液 0.125、0.25、0.5、1.0、1.25、2.0、2.5ml 于 25ml 容量瓶中, 用色谱甲醇稀释并定容, 摇匀, 微孔滤膜 (0.45 μm) 滤过, 得胡芦巴碱标准使用溶液的浓度分别为 0.005、0.010、0.020、0.040、0.050、0.080、0.100mg/ml, 待上机用。

1.2 仪器

1100 型高效液相色谱仪 [配备四元梯度泵 (G1311A)、在线真空脱气机、100 位自动进样器 (G1313A)、二极管阵列检测器 (G1315B DAD), 柱温箱 (G1316A)、ZORBAX-NH₂ 柱 (4.6 \times 150mm, 5 μm) 和 Zorbax Eclipse XDB-C₁₈ 柱 (4.6 \times 150mm, 5 μm) 和化学工作站 (HP Chemstation system)] Agilent 公司; 超声波清洗器。

1.3 色谱条件

色谱柱为 ZORBAX-NH₂ (4.6 \times 150mm, 5 μm); 流动相为乙腈-水 (80:20, V:V); 流速 1ml/min; 检测波长 265nm; 柱温 25 $^{\circ}\text{C}$; 进样 10 μl 。胡芦巴碱标准品的保留时间为 8.36min。标准品和样品的液相色谱图见图 3。

1.4 方法

1.4.1 样品处理

精密称取 0.6~0.8g 的南瓜粉, 置具塞比色管中, 加 10ml 甲醇, 浸泡 30min, 然后超声 20min, 过滤, 滤渣再加 3ml 甲醇, 超声 10min, 再过滤, 滤渣再加 3ml 甲醇, 再超声 10min。合并滤液置 25ml 容量瓶中, 甲醇定容, 微孔滤膜 (0.45 μm) 滤过, 弃去初滤液, 取续滤液, 即得供试品溶液。

1.4.2 标准曲线绘制

分别取胡芦巴碱含量为 0.005、0.010、0.020、0.040、0.050、0.080、0.100mg/ml 的标准品溶液, 进行液相色谱分析, 进样量为 10 μl , 以标准品浓度为横坐标 (X), 标准品峰面积为纵坐标 (Y), 绘制工作曲线。

1.4.3 样品测定

将处理后的样品溶液进行液相色谱分析, 进样量为 10 μl , 采用外标法定量, 测定不同品系的南瓜粉中胡芦巴碱的含量。

2 结果与分析

2.1 提取方法的考察

胡芦巴碱是一种两性化合物, 以内盐形式存在, 其结构如图 1。它易溶于水、乙醇、甲醇, 不溶于乙醚, 氯仿。对于胡芦巴碱提取方法, 作者分别用甲醇对样品进行浸泡然后对超声提取和热水浴 (100 $^{\circ}\text{C}$) 提取的方法进行了考察, 结果表明超声提取效率较高, 且操作简便, 超声 40min 即可提取完全。

2.2 色谱条件的选择

国外报道的咖啡中胡芦巴碱测定的方法有极谱法

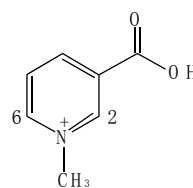
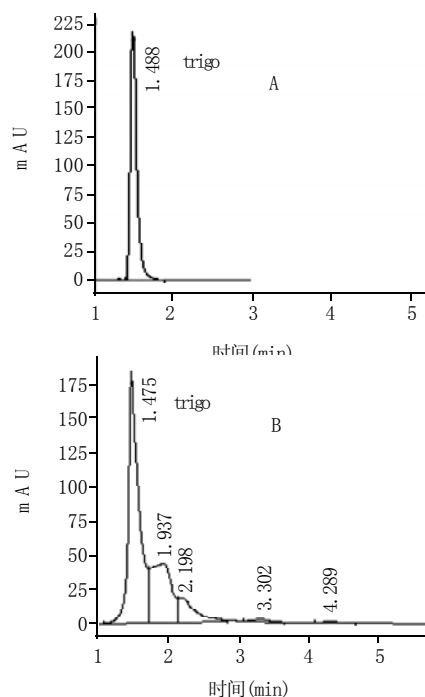


图 1 胡芦巴碱结构图

Fig.1 Structure of trigonelline

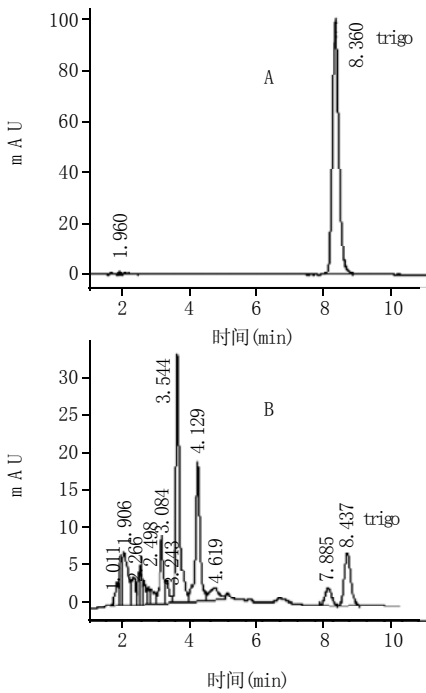
[2]、反相高效液相色谱法等 [3-4]。国内仅见赵怀清 [5-6] 曲燕 [7] 等报道采用正相高效液相色谱法测定胡芦巴中和雀巢咖啡中的胡芦巴碱含量。本实验分别采用反相 C₁₈ 柱和正相氨基键合相色谱柱以甲醇-水、甲醇-磷酸盐缓冲溶液、乙腈-水等不同比例的流动相测定了胡芦巴碱标准品和南瓜粉中的胡芦巴碱含量。反相色谱条件为 Zorbax Eclipse XDB-C₁₈ (4.6mm \times 150mm, 5 μm)、流动相甲醇-水 (40:60, V:V)、流速 1ml/min、检测波长 265nm、柱温 25 $^{\circ}\text{C}$ 的色谱图见图 2。结果表明 C₁₈ 柱的分离效果较差, 而且出峰时间较早, 可能由于胡芦巴碱以内盐形式存在, 极性较大, 不易进入固定相, 尤其是样品中胡芦巴碱与其他成分不易分开, 影响了南瓜粉中胡芦巴碱的定性和定量。而用 ZORBAX-NH₂ 柱, 以乙腈-水 (80:20, V:V) 为流动相, 分离效果较好, 出峰时间在 8min 以后, 胡芦巴碱与相邻峰的分离度 $R=1.64$, 以胡芦巴碱计算, 理论塔板数可达 10089, 色谱图见图 3。

2.3 线性范围考察



A. 标准品色谱图; B. 样品色谱图; trigo. 胡芦巴碱。

图 2 C₁₈ 柱胡芦巴碱标准品及样品中的色谱图
Fig.2 Chromatogram of trigonelline in pumpkin powder with Zorbax Eclipse XDB-C₁₈ column



A. 标准品色谱图; B. 样品色谱图; trigo. 葫芦巴碱。

图3 氨基键合相色谱柱葫芦巴碱色谱图

Fig.3 Chromatogram of trigonelline in pumpkin powder with Zorbax-NH₂ column

分别取葫芦巴碱含量为5、10、20、40、50、80、100 μg/ml 的标准品溶液, 进行液相色谱分析, 进样量为10 μl。以标准品浓度为横坐标(X), 标准品峰面积为纵坐标(Y), 绘制工作曲线。其回归方程为 $Y=13263X-3.8792$, 标准品溶液在5.01~101.4 μg/ml 内呈现良好的线性关系, 相关系数 $r=0.9999(n=5)$ 。

2.4 精密度实验

取同一供试样品A 南瓜粉, 按照样品处理方法1.4.1 进行处理, 重复进样五次, 记录峰面积分别为142.4829、143.1359、142.8186、142.5047、141.9294, 平均值为142.5743, RSD=0.3145%(n=5)。

2.5 重现性实验

精密称取6 份A 样品为0.6829、0.6860、0.6850、0.6860、0.6862g, 按照样品处理方法1.4.1 进行处理, 含量测定结果分别为: 0.4342、0.4112、0.4333、0.3909、0.3898mg/g, 平均值为0.4119mg/g, RSD=5.27%(n=5)。

2.6 回收率实验

精密称取已知含量的南瓜粉样品0.60g(共6 份), 加入葫芦巴碱标准品, 测定结果见表1。

2.7 南瓜粉样品测定

按照1.3 的色谱条件进样分析。测定了A、B、C 三个品系的30 个品种, 外标法定量, 所测南瓜粉中葫芦巴碱的含量在0.1219~0.4836mg/g, 结果见表2。

表1 葫芦巴碱加样回收率测定结果

Table 1 Recovery of trigonelline

序号	样品量 (μg)	加入量 (μg)	测定量 (μg)	回收率 (%)	平均值 (%)	RSD (%)
1	183.2	200	359.7	88.25	85.28	4.4
2	183.2	200	365.0	90.90		
3	182.6	300	436.7	84.70		
4	183.2	300	436.8	84.53		
5	182.3	400	513.5	82.80		
6	183.6	400	505.7	80.52		

表2 南瓜粉中葫芦巴碱的含量

Table 2 Content of trigonelline in pumpkin powder

品系	含量(mg/g)	品系	含量(mg/g)
A ₁	0.3638	B ₇	0.2688
A ₂	0.2782	B ₉	0.2765
A ₄	0.3598	B ₁₀	0.3077
A ₆	0.2723	B ₁₁	0.1953
A ₈	0.2172	B ₁₃	0.4836
A ₉	0.2952	C ₁	0.2350
A ₁₁	0.2069	C ₂	0.2924
A ₁₂	0.2197	C ₄	0.2472
A ₁₄	0.2305	C ₇	0.3212
A ₁₅	0.1219	C ₈	0.3474
B ₁	0.3004	C ₁₀	0.1781
B ₂	0.4268	C ₁₂	0.3078
B ₃	0.1881	C ₁₅	0.2535
B ₄	0.2986	C ₁₇	0.3493
B ₆	0.3260	C ₁₉	0.2111

3 结 论

本测定方法操作简便、结果稳定, 可以快速准确的对南瓜中葫芦巴碱成分进行定性定量分析, 首次建立了高效液相色谱氨基键合正相色谱法测定南瓜中葫芦巴碱含量的方法, 为南瓜中的功能性成分开发和遗传育种提供了理论依据。

参考文献:

[1] AGARWAL J S, RASTOGI R P. Chemical examination of water-soluble fraction of *Mappiafoetidamiens*[J]. Indian J Chem, 1975, 13(7): 758-759.

[2] SMOLA U, SONTAG G. Polarographic determination of trigonelline in coffee[J]. I Lebensm Unters Forsch, 1983, 177(2): 114-116.

[3] NOZAL M J, BERNAL J L, MARINERO P, et al. High-performance liquid-chromatographic determination of organic acid in honeys from different botanical origin[J]. J Liou Chromatographic Relat Technol, 1998, 21(20): 3181-3195.

[4] CASAL S, OLIVEIRA M B, FERREIRA M A. HPLC/diode-anay applied to the thermal degradation of trigonelline, nicotinic acid and caffeine in coffee[J]. Food Chem, 2000, 68(4): 481-485.

[5] 赵怀清, 曲燕, 王雪娅, 等. 高效液相色谱法测定葫芦巴中葫芦巴碱的含量[J]. 中国中药杂志, 2002, 27(3): 194-196.

[6] 赵怀清, 曲燕, 王雪娅, 等. 不同产地葫芦巴种子中葫芦巴碱含量的测定[J]. 中国药学杂志, 2002, 37(8): 617-619.

[7] 曲燕, 赵怀清, 张洪建, 等. HPLC法测定雀巢速溶咖啡中葫芦巴碱的含量[J]. 沈阳药科大学学报, 2001, 18(6): 422-424.