

HPLC 测定亚麻荠种子中芦丁及指纹图谱研究

李飞飞^{1,2}, 范毅¹, 魏悦^{1,2}, 李智宁¹, 张丽先¹, 宋梦娇¹, 于立芹¹, 朱杰¹

(1. 河南省纳普生物技术有限公司, 郑州 450002; 2. 河南省科学院天然产物重点实验室, 郑州 450002)

摘要:为更好地评价亚麻荠种子的质量, 采用 HPLC 测定 12 批亚麻荠种子的芦丁含量, 并建立了亚麻荠种子的 HPLC 指纹图谱, 通过 TCMYS 指纹图谱软件对不同产地亚麻荠种子指纹图谱进行相似度分析。结果表明, HPLC 测定芦丁的标准曲线回归方程线性关系良好($r=0.999$), 平均加标回收率为 99.37%, 12 批亚麻荠种子指纹图谱相似度较高, 标定 16 个共有峰。HPLC 指纹图谱方法稳定性及重复性良好, 可为亚麻荠种子的质量评价及质量控制提供依据。

关键词:亚麻荠种子; 芦丁; HPLC; 指纹图谱

中图分类号: TS222+.1; TQ646 文献标识码: A 文章编号: 1003-7969(2021)11-0128-05

Determination of rutin in camelina seed by HPLC and its fingerprint

LI Feifei^{1,2}, FAN Yi¹, WEI Yue^{1,2}, LI Zhining¹, ZHANG Lixian¹,
SONG Mengjiao¹, YU Liqin¹, ZHU Jie¹

(1. Henan Nature Product Biotechnology Co., Ltd., Zhengzhou 450002, China; 2. Key Laboratory of Natural Products, Henan Academy of Sciences, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: In order to better evaluate the quality of camelina seeds, the rutin contents of 12 batches of camelina seeds were determined by HPLC, and its HPLC fingerprints were established. The similarity analysis was performed on fingerprints of camelina seeds from different producing areas by TCMYS fingerprint software. The results showed that the regression equation of the standard curve for the determination of rutin by HPLC had a good linear relationship ($r=0.999$), and the average spiked recovery was 99.37%. The fingerprints of 12 batches of camelina seeds had high similarity, and sixteen common peaks were found. The HPLC fingerprint methods had good stability and reproducibility, which could provide a basis for quality evaluation and quality control of camelina seeds.

Key words: camelina seed; rutin; HPLC; fingerprint

亚麻荠 (*Camelina sativa* L.) 为一年生草本植物, 是一种古老的油料作物, 属木兰纲, 五桠果亚纲, 山柑目, 十字花科, 亚麻荠属 (*Camelina*)^[1-3]。亚麻荠种子中含有丰富的油脂、蛋白质、黄酮、植物甾醇和微量元素^[1-5]。此外, 亚麻荠种子中芦丁含量较高, 药理学研究发现芦丁是一种良好的自由基清除剂, 具有抗脂质过氧化、保护急性缺血性损伤、抗癌和防紫外线等作用^[6-11]。目前, 针对亚麻荠的研究

主要是在种植方面, 而对其种子的质量控制研究较少。为了更好地评价亚麻荠种子的质量, 本文采用 HPLC 对不同地区 12 批的亚麻荠种子中芦丁含量进行分析, 并建立了亚麻荠种子的指纹图谱。

1 材料与方法

1.1 实验材料

12 批亚麻荠种子, 分别采自陕西岐山 (编号 S1~S3)、青海民和 (编号 S4~S6)、甘肃和政 (编号 S7~S9) 和河南汤明 (编号 S10~S12); 甲醇、石油醚、甲酸等均为分析纯; 乙腈为色谱纯; 超纯水; 芦丁标准品 (批号 100080-201811), 中国药品检定所。

ME204 万分之一电子天平, 上海梅特勒-托利多; AUW220D 十万分之一电子天平; LC-20AT 高效液相色谱仪 (配 SPD-M20A 二极管阵列检测

收稿日期: 2020-06-11; 修回日期: 2021-06-18

基金项目: 河南省科学院国内外访学项目 (210813005); 河南省科学院重大聚焦项目 (190113004)

作者简介: 李飞飞 (1986), 女, 助理研究员, 博士, 研究方向为分析化学、粮食与油脂分析 (E-mail) 752680480@qq.com。

器),日本岛津;FW-80高速万能粉碎机;KQ-500E超声波提取仪。

1.2 实验方法

1.2.1 标准储备液的配制

精确称取芦丁标准品适量,加甲醇溶解,摇匀,配制质量浓度为1415.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准储备液,于4 $^{\circ}\text{C}$ 避光储存备用。

1.2.2 样品中芦丁含量测定

1.2.2.1 试样的制备

将烘干(60 $^{\circ}\text{C}$)后的亚麻荠种子用粉碎机粉碎过3号筛,得到亚麻荠粉。称取10g亚麻荠粉于索氏提取器中,加入200mL石油醚,回流提取8h,将去除油脂的粉末挥干,得到亚麻荠粕。精密称取1.0g亚麻荠粕,加入50mL80%甲醇,称重,超声提取1h,冷却,再称重,用80%甲醇补足失重,摇匀,过滤取滤液,过0.45 μm 滤膜待HPLC分析。

1.2.2.2 HPLC分析条件

Agilent Eclipse XDB C18色谱柱(250mm \times 4.6mm \times 5 μm);二极管阵列检测器(DAD);柱温35 $^{\circ}\text{C}$;波长280nm;流动相为乙腈(B)-0.1%甲酸(A);梯度洗脱程序为0~20min 10%B \rightarrow 17%B,30~50min 17%B \rightarrow 29%B;流速1.0mL/min;进样量10 μL 。

1.2.2.3 标准曲线的绘制

精密量取0.2、0.4、0.5、0.8、1.3mL标准储备液,置于10mL容量瓶中,用甲醇定容,配制系列不同质量浓度的标准工作溶液。将系列不同质量浓度的标准工作溶液注入高效液相色谱仪进行分析,以芦丁的质量浓度(C)为横坐标、峰面积(A)为纵坐标,绘制标准曲线,计算回归方程。

1.2.2.4 试样溶液的测定

将待测液进高效液相色谱仪分析,得到芦丁色谱峰面积。根据标准曲线回归方程得到试样溶液中芦丁的质量浓度,再计算样品中芦丁含量。

2 结果与讨论

2.1 方法建立

2.1.1 分析时间的考察

取陕西岐山亚麻荠种子S1供试品溶液10 μL ,注入高效液相色谱仪,通过梯度洗脱进行色谱峰分离,运行75min,记录色谱图。结果发现,在50min后无色谱峰出现,所以分析时间定为50min。

2.1.2 色谱柱的考察

选用3种不同型号的色谱柱进行分析,色谱柱分别为Agilent Zorbax SB C18柱(4.6mm \times 250mm,5 μm)、Agilent Eclipse XDB C18柱(4.6mm \times 250mm,5 μm)和NUCLEODUR C18 Pyramid column

(4.6mm \times 250mm,5 μm)。结果发现,亚麻荠种子中16个共有峰成分在使用Agilent Eclipse XDB C18色谱柱时分离效果更好。因此,采用Agilent Eclipse XDB C18色谱柱进行分析。

2.1.3 提取方法考察

取陕西岐山亚麻荠种子,按1.2.2.1方法得到亚麻荠粕。取亚麻荠粕,分别采用80%甲醇超声提取和回流提取各1h,测得芦丁含量分别为0.46%和0.45%,两种提取方法测定结果相当。考虑回流提取比较烦琐,故选用超声进行提取。

2.1.4 空白实验

取80%甲醇10 μL 注入高效液相色谱仪,按照1.2.2.2色谱条件记录色谱图,结果表明溶剂峰集中在3min之前,对检测无干扰,故选用80%甲醇作为溶剂进行试样的制备。

2.2 方法学考察

2.2.1 线性关系

按1.2.2.3方法绘制标准曲线,计算得到回归方程为 $A = 8042.7C - 1295.7$,在28.31~183.99 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内线性相关系数大于0.999,说明回归方程线性关系较好。

2.2.2 重复性

取陕西岐山亚麻荠种子S1样品,按1.2.2.1的方法平行制备样品溶液6份,按照1.2.2.2条件进行测定,测得芦丁平均含量为0.46%,相对标准偏差(RSD)为0.46%。16个色谱峰相对保留时间(以芦丁峰为参比)的RSD为0.50%,相对峰面积(以芦丁峰为参比)的RSD均小于3.0%,说明该方法重复性良好,符合指纹图谱要求。

2.2.3 稳定性

精密吸取陕西岐山亚麻荠种子S1样品溶液10 μL ,分别于0、2、4、6、8、12、24h注入高效液相色谱仪按1.2.2.2条件进行测定,测得芦丁平均含量为0.46%,RSD为0.85%,16个色谱峰的相对保留时间和相对峰面积的RSD均小于3.0%,说明供试品溶液在24h内稳定,符合指纹图谱要求。

2.2.4 精密度

取陕西岐山亚麻荠种子S1样品溶液,连续进样6次,测得芦丁平均含量为0.46%,RSD为0.80%,16个色谱峰的相对保留时间和相对峰面积的RSD均小于3.0%,说明供试品溶液制备方法可操作性强,精密度良好。

2.2.5 回收率实验

取已知芦丁含量的同一批次的陕西岐山亚麻荠种子S1样品共6份,称取0.50g,精密加入2.83mg

续表 3

峰号	不同样品编号的相对峰面积												平均相对峰面积	RSD/%
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12		
11	0.024	0.036	0.020	0.040	0.040	0.041	0.041	0.042	0.044	0.046	0.045	0.049	0.039	22.19
12	0.139	0.142	0.142	0.306	0.309	0.311	0.146	0.147	0.151	0.145	0.147	0.151	0.186	39.64
13	0.058	0.060	0.056	0.026	0.028	0.028	0.050	0.052	0.052	0.044	0.044	0.045	0.045	26.47
14	0.089	0.090	0.089	0.092	0.092	0.090	0.145	0.145	0.144	0.142	0.144	0.143	0.117	23.89
15	0.180	0.184	0.181	0.271	0.272	0.271	0.268	0.264	0.264	0.276	0.273	0.274	0.248	16.23
16	0.051	0.052	0.050	0.069	0.074	0.074	0.084	0.083	0.077	0.080	0.077	0.078	0.071	17.77

表 4 不同地区亚麻荠种子 HPLC 指纹图谱共有峰相对保留时间

峰号	不同样品编号的相对保留时间												平均相对保留时间	RSD/%
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12		
1	0.101	0.101	0.102	0.102	0.100	0.102	0.101	0.101	0.101	0.100	0.101	0.102	0.101	0.71
2	0.221	0.222	0.221	0.222	0.220	0.221	0.221	0.221	0.222	0.221	0.220	0.222	0.221	0.33
3	0.270	0.271	0.270	0.271	0.271	0.270	0.271	0.270	0.271	0.270	0.271	0.270	0.271	0.19
4	0.308	0.308	0.309	0.307	0.308	0.308	0.309	0.307	0.309	0.308	0.307	0.308	0.308	0.24
5	0.346	0.345	0.346	0.347	0.346	0.346	0.346	0.345	0.346	0.346	0.345	0.347	0.346	0.19
6	0.407	0.407	0.408	0.407	0.408	0.406	0.407	0.407	0.407	0.406	0.406	0.407	0.407	0.16
7	0.729	0.729	0.730	0.729	0.729	0.728	0.730	0.729	0.729	0.728	0.729	0.729	0.729	0.08
8	0.746	0.745	0.747	0.747	0.746	0.746	0.745	0.746	0.746	0.745	0.747	0.747	0.746	0.11
9	0.832	0.832	0.833	0.832	0.831	0.833	0.832	0.832	0.831	0.833	0.832	0.832	0.832	0.08
10	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.00
11	1.033	1.034	1.033	1.033	1.033	1.032	1.033	1.034	1.033	1.033	1.032	1.033	1.033	0.06
12	1.067	1.067	1.066	1.068	1.066	1.068	1.066	1.067	1.067	1.068	1.067	1.066	1.067	0.07
13	1.239	1.238	1.239	1.240	1.238	1.238	1.239	1.240	1.240	1.238	1.239	1.238	1.239	0.07
14	1.286	1.286	1.287	1.287	1.285	1.285	1.287	1.287	1.286	1.286	1.286	1.285	1.286	0.06
15	1.377	1.377	1.377	1.378	1.376	1.377	1.378	1.376	1.377	1.377	1.377	1.376	1.377	0.05
16	1.404	1.403	1.405	1.404	1.404	1.404	1.403	1.405	1.404	1.404	1.403	1.404	1.404	0.05

2.4.2 相似度评价

采用“中药指纹图谱相似度评价系统(TCMYS, 2012版)”对亚麻荠种子指纹图谱进行评价,以陕西岐山亚麻荠种子 S1 样品色谱图作为参照图谱,利用中位数法进行多点校正,并生成对照指纹图谱,结果见图 2。12 批亚麻荠种子指纹图谱与对照指纹图谱的相似度见表 5。由表 5 可见,12 批亚麻荠种子指纹图谱与对照指纹图谱的相似度均大于 0.97,说明不同产地亚麻荠种子质量相对稳定。

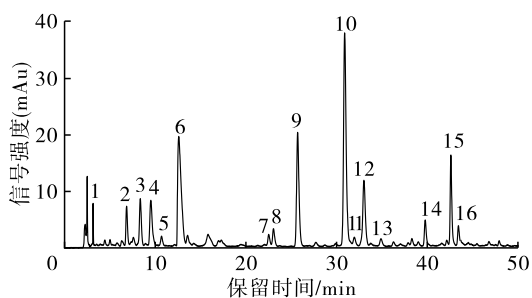


图 2 亚麻荠种子的对照指纹图谱

表 5 12 批亚麻荠种子指纹图谱与对照指纹图谱的相似度

编号	相似度	编号	相似度
S1	1.000	S7	1.000
S2	0.999	S8	0.980
S3	1.000	S9	0.981
S4	0.978	S10	0.987
S5	0.978	S11	0.986
S6	0.978	S12	0.986

3 结论

本研究在不同的色谱柱和不同的提取条件下,考察了色谱峰的分离效果和含量,结果表明,采用 80% 甲醇为提取溶剂对亚麻荠种子中的芦丁进行超声提取,采用 Agilent Eclipse XDB C18 色谱柱,乙腈-0.1% 甲酸梯度洗脱,出峰较多,芦丁和其他杂质峰可达到较好分离,峰形较好、保留时间较适宜,且指纹图谱的峰数较多,基线较平稳,同时方法具有良好重现性。

(下转第 138 页)

- on human milk gangliosides [J/OL]. *Npj Sci Food*, 2018, 2(1): 5 [2020 - 12 - 01]. <https://doi.org/10.1038/541538-018-0013-9>.
- [28] SISU E, FLANGEA C, SERB A, et al. High - performance separation techniques hyphenated to mass spectrometry for ganglioside analysis [J]. *Electrophoresis*, 2011, 32(13): 1591 - 1609.
- [29] FONG B, NORRIS C, MCJARROW P. Liquid chromatography-high - resolution electrostatic ion - trap mass spectrometric analysis of GD3 ganglioside in dairy products [J]. *Int Dairy J*, 2011, 21(1): 42 - 47.
- [30] GIUFFRIDA F, ELMELEGY I M, THAKKAR S K, et al. Longitudinal evolution of the concentration of gangliosides GM3 and GD3 in human milk [J]. *Lipids*, 2014, 49(10): 997 - 1004.
- [31] MCJARROW P, RADWAN H, LIN M, et al. Human milk oligosaccharide, phospholipid, and ganglioside concentrations in breast milk from United Arab Emirates mothers: results from the MISC cohort [J/OL]. *Nutrients*, 2019, 11(10): 2400 [2020 - 12 - 01]. <https://doi.org/10.3390/nu11/02400>.
- [32] MOLONEY C, O'CONNOR D, O'REGAN J. Polar lipid, ganglioside and cholesterol contents of infant formulae and growing up milks produced with an *alpha* lactalbumin - enriched whey protein concentrate [J/OL]. *Int Dairy J*, 2020, 107: 104716 [2020 - 12 - 01]. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2020.104716>.
- [33] MA L, ALASTAIR K H M, HAMID J B J M. Determination of ganglioside concentrations in breast milk and serum from Malaysian mothers using a high performance liquid chromatography - mass spectrometry - multiple reaction monitoring method [J]. *Int Dairy J*, 2015, 49: 62 - 71.
- [34] FRANCESCA G, CRISTINA C H, EMMANUELLE B, et al. Temporal changes of human breast milk lipids of Chinese mothers [J/OL]. *Nutrients*, 2016, 8(11): 715 [2020 - 12 - 01]. <https://doi.org/10.3390/nu8110715>.
- [35] XIAO L P, IZUMI T. Chronological changes in the ganglioside composition of human milk during lactation [J]. *Early Human Develop*, 1999, 55(1): 1 - 8.
- [36] XIAO L P, IZUMI T. Variation of the ganglioside compositions of human milk, cow's milk and infant formulas [J]. *Early Human Develop*, 2000, 57(1): 25 - 31.
- [37] MA L, LIU X. Lactational changes in concentration and distribution of ganglioside molecular species in human breast milk from Chinese mothers [J]. *Lipids*, 2015, 50(11): 1145 - 1154.

(上接第 131 页)

以芦丁作为质控指标,对不同地区的亚麻荠种子进行测定,发现相同地区的亚麻荠种子芦丁成分含量接近,不同地区的芦丁含量有差异,其中甘肃和政的亚麻荠种子芦丁含量明显高于其他 3 个地区,这可能与各地的生长环境不同有关。同时,对 12 批亚麻荠种子指纹图谱进行研究,确定了指纹图谱的检测方法,采用“中药指纹图谱相似度评价系统(2012 年版)”进行相似度评价,得到 16 种共有成分,不同批次 16 个共有成分的相对峰面积的 RSD 大于 15% 的成分有 12 个,各样品的共有成分在含量上存在一定差异,可能与亚麻荠种子的产地及采集时间有很大关系。12 批亚麻荠种子的指纹图谱相似度均在 0.97 以上,从指纹图谱的峰差异及整体性评价可以看出,不同来源亚麻荠种子样品之间既有较好的相关性,又有区别。本文首次将 HPLC - DAD 方法应用于亚麻荠种子的指纹图谱研究,方法学各项考察结果均符合指纹图谱研究的技术要求,结合指纹图谱方法控制亚麻荠种子的质量,可为亚麻荠种子全面质量评价和有效性研究提供依据。

参考文献:

- [1] 邓曙东,张青文. 亚麻荠种植和利用的研究现状 [J]. *植物学通报*, 2004, 21(3): 376 - 382.
- [2] 邓乾春,黄凤洪,黄庆德,等. 一种高利用价值油料作物亚麻荠的研究进展 [J]. *中国油料作物学报*, 2009, 31(4): 551 - 559.
- [3] 李飞飞,于立芹,魏悦,等. 亚麻荠种子的营养成分分析 [J]. *中国油脂*, 2019, 44(2): 90 - 93.
- [4] 苑丽霞,郝敬云,周广航,等. 新型能源作物亚麻荠及种子油脂合成调控研究进展 [J]. *山西农业科学*, 2015, 43(5): 634 - 638, 642.
- [5] 谢光辉,秦烁,薛帅,等. 亚麻荠作为生物柴油原料树种的研究现状与前景分析 [J]. *中国农业大学学报*, 2012, 17(6): 239 - 246.
- [6] 韩英华,秦元璋. 芦丁研究现状 [J]. *山东中医杂志*, 2003, 22(10): 635 - 637.
- [7] 占今舜,钟小军,杨群,等. 芦丁的生物活性功能及其在反刍动物生产中的应用 [J]. *动物营养学报*, 2019, 31(7): 2952 - 2957.
- [8] OLIVEIRA V M, CARRARO E, AULER M E, et al. Quercetin and rutin as potential agents antifungal against *Cryptococcus* spp. [J]. *Braz J Biol*, 2016, 76(4): 1029 - 1034.
- [9] 王丽,张丽,康文艺,等. 芦丁清除 DPPH 自由基分光光度法与微量法抗氧化活性研究 [J]. *中成药*, 2009, 31(11): 1785 - 1787.
- [10] 丁冶春,夏侯国论,王家智,等. 稀土芦丁配合物的合成表征及抗肿瘤活性研究 [J]. *光谱实验室*, 2011, 28(2): 614 - 617.
- [11] GANESH PURKAR A, SALUJA A K. Protective effect of rutin on humoral and cell mediated immunity in rat model [J]. *Chem Biol Interact*, 2017, 273: 154 - 159.