

高效液相色谱法同时测定芹菜籽提取物中芹菜苷和3-甲氧基芹菜苷的含量

黄进丽, 魏鲜娥, 苏昭仑, 叶少文, 杨祖伟, 陈琦梦, 李 珍*

(汤臣倍健股份有限公司, 珠海 519000)

摘要: **目的** 建立高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)同时测定芹菜籽提取物中芹菜苷和3-甲氧基芹菜苷含量的分析方法。**方法** 以1%乙酸溶液:乙腈=85:15(V:V)为流动相, 梯度洗脱, 样品经C₁₈色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)分离, 并于330 nm波长检测。**结果** 芹菜苷在0.00334~0.03340 mg/mL之间呈现良好的线性关系, $r^2=0.9998$, 平均回收率为95.2%~104.5%, 相对标准偏差为2.0%; 3-甲氧基芹菜苷在0.00367~0.0367 mg/mL之间呈现良好的线性关系, $r^2=0.9999$, 平均回收率在96.6%~104.0%之间, 相对标准偏差为1.9%, 均符合标准GB/T 27404-2008实验室质量控制规范食品理化检测中的要求。**结论** 该方法操作简便, 准确, 重现性好, 能同时测定芹菜苷和3-甲氧基芹菜苷的含量, 可在实验室推广使用。

关键词: 芹菜籽; 芹菜苷; 3-甲氧基芹菜苷; 高效液相色谱

Simultaneously determination of apigenin and 3-methoxyapigenin content in celery seed extract by high performance liquid chromatography

HUANG Jin-Li, WEI Xian-E, SU Zhao-Lun, YE Shao-Wen, YANG Zu-Wei,
CHEN Qi-Meng, LI Zhen*

(By-Health Co., Ltd., Zhuhai 519000, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for simultaneous determination of apigenin and 3-methoxyapigenin by high performance liquid chromatography (HPLC). **Methods** With 1% acetic acid solution: acetonitrile=85:15 (V:V) as the mobile phase and performing gradient elution, the samples were separated by C₁₈ column (250 mm×4.6 mm, 5 μm) and detected at the wavelength of 330 nm. **Results** Apigenin had a good linear relationship in range of 0.00334–0.03340 mg/mL ($r^2=0.9998$). The average recoveries were 95.2%–104.5%, with the RSD of 2.0%. 3-methoxyapigenin had a good linear relationship in range of 0.00367–0.0367 mg/mL ($r^2=0.9999$), and average recoveries were 96.6%–104.0%, with the RSD of 1.9%. All the results met the requirements of the standard GB/T 27404-2008. **Conclusion** This method is simple, accurate, and has a good reproducibility, which can be used for the simultaneous determination of apigenin and 3-methoxy apigenin, and can be popularized in the laboratories.

KEY WORDS: celery seed; apigenin; 3-methoxyapigenin; high performance liquid chromatography

*通讯作者: 李珍, 工程师, 主要研究方向为保健食品的质量检测。E-mail: 362178337@qq.com

*Corresponding author: LI Zhen, Engineer, By-Health Co., Ltd., Zhuhai 519040, China. E-mail: 362178337@qq.com

1 引言

旱芹(*apium graveolens*, celery)为伞形科植物, 异名香芹、药芹等^[1]。芹菜籽为旱芹的成熟果实, 其除了含有常见的营养元素外, 还具有大量的生物活性物质, 主要包括挥发油化合物、不饱和脂肪酸、类黄酮物质、丁基苯酞类、氨基酸、膳食纤维、香豆精类成分、黄酮及其甙类成分^[2,3]。目前研究表明芹菜籽具有抗氧化、抗肿瘤、降血脂、降血压等多种药理活性^[4-7]。新疆少数民族医学中以芹菜籽入药^[8,9], 认为其性干热, 具有健脑安神、活血、祛风除湿的功效, 是多种护肝减压的传统药方中的主药。对芹菜根、叶、叶柄的黄酮类化合物成分研究的较多^[10-12], 黄酮类化合物成分主要有 3'-甲氧基木犀草素-7-洋茺萜糖-葡萄糖甙、芹菜素、木犀草素-7-洋茺萜糖-葡萄糖甙^[13,14]等。其中, 芹菜素以芹菜苷的形式存在为主^[15], 芹菜苷是一种天然的二糖黄酮苷, 最早发现于欧芹的种子中, 这类物质经研究发现具有良好的药理活性^[16,17], 常用的检测方法为高效液相色谱法。目前芹菜籽中的芹菜苷和 3-甲氧基芹菜苷的含量各有单一的检测方法, 能同时检测 2 种成分含量或者分离的研究很少。本研究建立了高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)同时测定芹菜籽中芹菜苷和 3-甲氧基芹菜苷的含量, 以期达到简便、快捷、准确, 分离度及重复性均较好的检测效果, 为这 2 种物质的分离和研究提供依据, 同时在常规检测中可以推广使用。

2 材料与方 法

2.1 仪器与试剂

XP 205 电子天平[梅特勒-托利多国际贸易(上海)有限公司]; Agilent1200 高效液相色谱仪(附紫外检测器或 DAD 检测器, 美国安捷伦科技有限公司); P180H 超声波清洗器(德国 ELMA 公司); TGL-10C 高速台式离心机(上海安亭科学仪器厂)。

乙腈(色谱纯)、甲醇(分析纯)、冰醋酸(分析纯)、一级用水、芹菜苷(批号: 2N1110BA14, 纯度: 99.5%)(上海源叶生物科技有限公司); 3-甲氧基芹菜苷(批号: 25250001, 纯度: 97.8%)(上海安谱实验科技股份有限公司); 芹菜籽提取物(美国纳图瑞克斯公司)。

2.2 实验方法

2.2.1 仪器条件

色谱柱: Phenomenex, Kinetex XB-C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm)或具有同等性能的色谱柱; 柱温: 30 °C; 检测器: 紫外检测器 330 nm; 流动相: 以乙腈:1%乙酸水溶液=15:85(V:V), 梯度洗脱; 流速: 1.0 mL/min; 进样量: 5 μL, 梯度洗脱表见表 1。

表 1 梯度洗脱表
Table 1 Gradient elution

时间/min	乙腈/%	1%乙酸水溶液/mL
0.01	15	85
7.00	15	85
22.00	22	78
22.01	15	85
25.00	15	85

2.2.2 标准系列溶液的配制

(1) 标准储备液的配制

准确称取芹菜苷对照品 10.49 mg, 置于 50 mL 棕色容量瓶中, 加甲醇超声溶解, 定容至刻度混匀, 作为芹菜苷储备液。

准确称取 3-甲氧基芹菜苷对照品 11.73 mg, 置于 50 mL 棕色容量瓶中, 加甲醇超声溶解, 定容至刻度混匀, 作为 3-甲氧基芹菜苷储备液。

(2) 标准溶液的配制

准确吸取芹菜苷储备液和 3-甲氧基芹菜苷储备液各 2.00 mL 于同一 25 mL 容量瓶中, 用甲醇定容至刻度摇匀, 用 0.45 μm 的滤膜过滤, 滤液作为标准溶液。

2.2.3 供试品溶液处理

称取试样 0.2 g 置于 50 mL 离心管中, 加 1.0 mL 水湿润样品后立即用振荡器混匀, 然后加入甲醇超声提取(约 30 min), 取出, 放冷, 转移至 25 mL 容量瓶中, 用甲醇定容, 摇匀, 用 0.45 μm 的滤膜过滤, 滤液即为供试品溶液。

2.2.4 线性范围确认

分别精密吸取标准溶液 1、2、5、8、10 μL 和样品溶液 5 μL 进样。以浓度 C(mg/mL)为横坐标, 峰面积 A 为纵坐标, 绘制标准工作曲线。

2.2.5 样品峰纯度实验

取处理好的供试品溶液, 采用二极管阵列检测器, 按 2.2 仪器条件进样, 采用 DAD 检测器进行全波长扫描, 测定样品中芹菜苷和 3-甲氧基芹菜苷的峰纯度。

2.2.6 精密度实验

称取芹菜籽提取物样品约 0.2 g, 共 6 份, 按 2.2.3 的方法处理样品, 测定样品中芹菜苷和 3-甲氧基芹菜苷的含量, 计算其相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)。

2.2.7 稳定性实验

取同一批供试品溶液分别于 0、1、2、4、8、12 h 进样, 测定其峰面积的相对标准偏差。

2.2.8 加标回收率实验

精密称取约 0.2 g 样品, 共 9 份, 置于 25 mL 容量瓶中, 分成 3 组, 每组 3 份, 于每一组中分别精密加入芹菜苷标准溶液(浓度为 0.2088 mg/mL)0.60、1.20、1.70 mL, 3-甲氧基芹菜苷标准溶液(浓度为 0.2294 mg/mL)1.60、3.20、

4.80 mL, 按 2.2.3 的方法处理样品, 按 2.2.1 仪器条件进样, 测定样品中芹菜苷和 3-甲氧基芹菜苷的加标量。

3 结果与分析

3.1 线性实验

芹菜苷和 3-甲氧基芹菜苷的线性范围和线性方程如表 2。相关系数 r^2 分别为 0.99986 和 0.99999, 即用该方法测定芹菜苷和 3-甲氧基芹菜苷的含量, 芹菜苷在浓度 0.00334~0.03340 mg/mL 之间呈现良好的线性, 3-甲氧基芹菜苷在浓度 0.00367~0.03670 mg/mL 之间呈现良好的线性, 符合 GB/T 27404-2008《实验室质量控制规范》的要求 (GB/T 27404-2008 要求相关系数 $r^2 \geq 0.99$)。

表 2 线性范围
Table 2 Linear range

标准 序号	芹菜苷 浓度 (mg/mL)	芹菜苷 峰面积(A)	3-甲氧基芹 菜苷浓度 (mg/mL)	3-甲氧基芹菜苷 峰面积(A)
STD1	0.00334	29.50935	0.00367	26.27716
STD2	0.00668	60.47020	0.00734	52.62709
STD3	0.01670	151.07603	0.01835	131.21915
STD4	0.02672	239.60638	0.02936	209.00803
STD5	0.03340	293.89401	0.03670	259.98193
线性 方程	$Y=8853.97513X+0.946131$		$Y=7091.23402X+0.411301$	
相关 系数(r^2)	0.99986		0.99999	

3.2 新方法主峰纯度确认

本研究方法以乙腈:1%乙酸水溶液=(15:85, V:V)梯度洗脱(见表 1), DAD 检测器检测, 样品中的芹菜苷和 3-甲氧

基芹菜苷在 25 min 时分离出来(见图 1), 芹菜苷的峰纯度为: 999.75, 3-甲氧基芹菜苷的峰纯度为: 999.90, 结果显示本研究方法测定芹菜苷和 3-甲氧基芹菜苷的含量, 分离效果很好, 不受杂质峰的影响。

3.3 检出限

分析方法的检出限(limit of detection limit, LOD)和定量限(limit of quantitation limit, LOQ)由信噪比(S/N)计算。LOD 定义为 $S/N=3$ 时对应的待分析浓度, LOQ 定义为 $S/N=10$ 时对应的分析浓度。

结果显示, 芹菜苷和 3-甲氧基芹菜苷的检出限分别为 8.4 mg/100 g、9.2 mg/100 g, 定量限分别为 25.1 mg/100 g、27.5 mg/100 g。

3.4 精密度试验

精密度结果见表 3。结果显示, 芹菜苷和 3-甲氧基芹菜苷的相对标准偏差分别为 2.0%、1.9%, 具有较好的精密度, 符合 GB/T 27404-2008《实验室质量控制规范》的要求 [GB/T 27404-2008 要求 $RSD(\%) \leq 2.7\%$]。

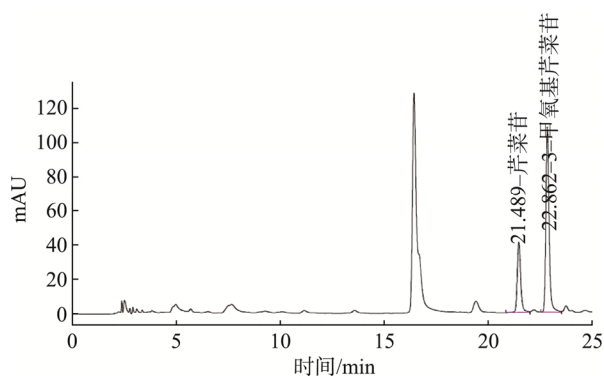


图 1 样品色谱图

Fig.1 Chromatogram of the sample

表 3 精密度实验结果(n=6)
Table 3 Results of repeatability experiment (n=6)

	序号	称样量/g	稀释体积/mL	浓度/(mg/mL)	含量/(mg/100 g)	平均含量/(mg/100 g)	RSD/%	标准要求/%
芹菜苷	1	0.2025	25	0.00951591	117.48	119.0	2.0	2.7
	2	0.2243	25	0.01091080	121.60			
	3	0.2001	25	0.00949435	118.62			
	4	0.2217	25	0.01081650	121.97			
	5	0.2049	25	0.00966787	117.95			
	6	0.2085	25	0.00968798	116.16			
3-甲氧基 芹菜苷	1	0.2025	25	0.0294399	363.45	367.3	1.9	2.7
	2	0.2243	25	0.0335749	374.21			
	3	0.2001	25	0.0291667	364.40			
	4	0.2217	25	0.0334642	377.35			
	5	0.2049	25	0.0298357	364.02			
	6	0.2085	25	0.0300501	360.31			

3.5 稳定性试验

取同一批供试品溶液分别于 0、1、2、4、8、12 h 进样, 其峰面积的 RSD 分别为 1.0%、1.2%(见表 4), 说明供试品溶液的芹菜苷和 3-甲氧基芹菜苷在 12 h 内较稳定。

3.6 加标回收率试验

在不同添加水平下, 芹菜苷和 3-甲氧基芹菜苷的回收率分别为 95.2%~104.5%、96.6%~104.0%(见表 5), 相对标准偏差分别为 3.0%、2.5%, 本研究方法对芹菜苷和 3-甲氧基芹菜苷的含量测定满足要求。

表 4 稳定性试验($n=6$)
Table 4 Stability test ($n=6$)

稳定性(峰面积)	0 h	1 h	2 h	4 h	8 h	12 h	平均值	RSD/%
芹菜苷(mAU)	90.504	92.071	92.797	91.144	91.454	92.661	91.772	1.0
3-甲氧基芹菜苷(mAU)	221.732	224.508	226.077	228.347	228.076	228.305	226.174	1.2

表 5 加标回收率实验结果($n=3$)
Table 5 Spiked recovery rate experiment results ($n=3$)

项目名称	加标量	称样量 M/g	加标样测得量 /mg	测得标准品 加入量/mg	理论标准品 加入量/mg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%	
芹菜苷	50%加标		0.2056	0.3670	0.1223	0.1253	97.60	99.4	3.0
			0.1995	0.3567	0.1193	0.1253	95.21		
			0.2032	0.3639	0.1221	0.1253	97.44		
			0.2261	0.5186	0.2495	0.2506	99.56		
			0.2159	0.5011	0.2442	0.2506	97.44		
			0.2252	0.5144	0.2464	0.2506	98.32		
	150%加标		0.2126	0.6135	0.3605	0.3550	101.54		
			0.2205	0.6335	0.3711	0.3550	104.53		
			0.2138	0.6184	0.3640	0.3550	102.53		
			0.2056	1.1331	0.3779	0.3670	102.97		
			0.1995	1.1119	0.3791	0.3670	103.29		
			0.2032	1.1281	0.3817	0.3670	104.01		
3-甲氧基芹菜苷	100%加标		0.2261	1.5649	0.7344	0.7341	100.04	101.5	2.5
			0.2159	1.5021	0.7091	0.7341	96.59		
			0.2252	1.5546	0.7274	0.7341	99.08		
	150%加标		0.2126	1.9010	1.1201	1.1011	101.72		
			0.2205	1.9531	1.1432	1.1011	103.82		
			0.2138	1.9070	1.1217	1.1011	101.87		

4 结论

本研究建立的 HPLC 法同时测定芹菜籽提取物中芹菜苷和 3-甲氧基芹菜苷的含量, 用流动相乙腈:1%乙酸水溶液=15:85($V:V$), 梯度洗脱, 流速: 1.0 mL/min, 可以获得很好的分离效果。该方法操作简便, 准确度高, 专属性强, 精密度好, 可作为芹菜籽提取物中芹菜苷和 3-甲氧基芹菜苷质量控制的分析方法。

参考文献

- 刘咏松. 芹菜的本草研究及功用[J]. 四川中医, 2004, 22(7): 25-26.
Liu YS. Study and function of Chinese celery [J]. Sichuan Tradit Chin Med, 2004, 22(7): 25-26.
- 王文宝, 马华夏, 宋春梅. 芹菜籽化学成分及药理作用的研究进展[J]. 吉林医药学院学报, 2012, 33(1): 49-51.
Wang WB, Ma HX, Song CM. Research progress on chemical constituents and pharmacological effects of celery seeds [J]. J Jilin Med

- Univ, 2012, 33(1): 49–51.
- [3] 吕金良, 热比古丽. 斯拉木, 阿吉艾克拜耳 艾萨. 芹菜籽黄酮类化学成分研究[J]. 中成药, 2007, 29(3): 406–408.
Lv JL, Rebigul S, Ajaikebaier AS. Flavonoids from celery seed [J]. Chin Trad Pat Med, 2007, 29(3): 406–408.
- [4] 严建刚, 张名位, 杨公明, 等. 芹菜提取物的降血脂与抗氧化作用的研究[J]. 中国食品学报, 2005, 5(3): 1–4.
Yan JG, Zhang MW, Yang GM, *et al.* Study on lipid lowering and antioxidant effects of celery extract [J]. Chin Food, 2005, 5(3): 1–4.
- [5] 严建刚, 张名位, 杨公明, 等. 芹菜黄酮的提取条件及其抗氧化活性研究[J]. 西北农林科技大学, 2005, 33(1): 131–135.
Yan JG, Zhang MW, Yang GM, *et al.* Extraction conditions of celery flavone and its antioxidative activity [J]. Northwest Agric Forestry Univ, 2005, 33(5): 131–135.
- [6] 张铭, 徐嵩, 肖帆, 等. 芹菜籽提取物对高尿酸血症模型大鼠的血尿酸以及抗氧化能力的影响[J]. 医学信息, 2018, 13: 84–87.
Zhang M, Xu Q, Xiao F, *et al.* Effects of celery seed extract on serum uric acid and antioxidant capacity of hyperuricemia rats [J]. Med Inform, 2018, 13: 84–87.
- [7] 吴韶梅, 哈婧, 刘小争, 等. 芹菜叶提取物抗氧化作用研究[J]. 食品科学, 2010, 31(9): 103–105.
Wu SM, Ha J, Liu XZ, *et al.* Antioxidant effects of celery leaf extract [J]. Food Sci, 2010, 31(9): 103–105.
- [8] 吕金良, 牟新利, 王武宝, 等. 维药芹菜籽化学成分研究[J]. 时珍国医国药, 2006, 17(1): 6–7.
Lv JL, Mou XL, Wang WB, *et al.* Study on chemical constituents of celery seeds in uygur medicine [J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2006, 17(1): 6–7.
- [9] 陈研, 乌利亚. 沙伊提, 等. 维药芹菜根化学成份的研究[J]. 新疆中医药, 2008, 26(1): 33–34.
Chen Y, Wu RY, Sha YT, *et al.* Study on chemical constituents of celery root in uygur medicine [J]. Xinjiang Trad Chin Med, 2008, 26(1): 33–34.
- [10] 韩丽. 新疆维药芹菜根抗血脂血症活性部位的制备和体外药效学研究[D]. 乌鲁木齐: 新疆医科大学, 2017.
Han L. Preparation and in vitro pharmacodynamics of the active parts of Xinjiang Uygur medicine celery root against hyperlipidemia [D]. Urumchi: Xinjiang Medical University, 2017.
- [11] 张晓霞. HPLC同时测定新疆维药芹菜根提取物中3种黄酮类成分的含量[J]. 时珍国医国药, 2016, (12): 2825–2827.
Zhang XX. Simultaneous determination of 3 flavonoids in celery root extract of Xinjiang Uygur medicine by HPLC [J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2016, (12): 2825–2827.
- [12] 杨立红. 芹菜叶柄与叶片中总黄酮含量的研究[J]. 山东师大学报, 1998, 13(4): 434–436.
Yang LH. A study of the flavonoid amount in the leaves and petioles of celery [J]. J Shandong Nor Univ, 1998, 13(4): 434–436.
- [13] 王克勤, 严智慧, 罗军武, 等. 聚酰胺树脂分离纯化芹菜黄酮的工艺研究[J]. 食品与机械, 2009, 25(3): 46–50.
Wang KQ, Yan ZH, Luo JW, *et al.* Separation and purification of celery flavone by polyamide resin [J]. Food Mach, 2009, 25(3): 46–50.
- [14] 易建华, 朱振宝. 响应面优化酶法提取芹菜黄酮工艺研究[J]. 食品科学, 2009, 30(10): 92–96.
Yi JH, Zhu ZB. Study on enzymatic extraction of flavonoids from celery by response surface optimization [J]. Food Sci, 2009, 30(10): 92–96.
- [15] 赵琨, 王丽, 李磊, 等. 芹菜素对自由基致 DNA 损伤的保护作用及机制[J]. 食品科学, 2011, 32(13): 1–2.
Zhao J, Wang L, Li L, *et al.* Protective effect and mechanism of apigenin on DNA damage induced by free radicals [J]. Food Sci, 2011, 32(13): 1–2.
- [16] 贾佳, 谢静莉, 许学书. 芹菜苷体外活性的研究[J]. 食品科学, 2008, 29(12): 99–101.
Jia J, Xie JL, Xu XS. Study on the activity of apigenin *in vitro* [J]. Food Sci, 2008, 29(12): 99–101.
- [17] 宋立芳, 程冬萍. 芹菜苷类化合物的合成策略[J]. 浙江化工, 2015, (7): 18–22.
Song LF, Cheng DP. Synthesis strategies of apigenin compounds [J]. Zhejiang Chem Ind, 2015, (7): 18–22.

(责任编辑: 王 欣)

作者简介



黄进丽, 主要研究方向为保健食品的质量检测。
E-mail: 415752743@qq.com



李 珍, 工程师, 执业药师, 主要研究方向为食品的质量检测。
E-mail: 362178337@qq.com