

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2021.20.016

高效液相色谱法同时测定分心木中芦丁、槲皮素、金丝桃苷含量*

李 静, 贾文江, 曹望弟[△], 苏阳阳

(陕西省商洛市药品检验所, 陕西 商洛 726000)

摘要:目的 建立同时测定分心木中芦丁、槲皮素、金丝桃苷含量的高效液相色谱法。方法 色谱柱为 Kromasil 100-5 C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-0.4% 磷酸水溶液(梯度洗脱), 流速为 1.0 mL/min, 检测波长为 360 nm, 柱温为 25 ℃, 进样量为 10 μL。结果 芦丁、槲皮素、金丝桃苷线性范围分别为 36.60~366.00 μg/mL、48.10~481.00 μg/mL、4.80~48.00 μg/mL ($r=0.999$, $n=5$); 平均加样回收率分别为 100.10%, 99.72%, 100.02%, RSD 分别为 0.71%, 0.18%, 0.26% ($n=9$); 精密性、稳定性、重复性试验的 RSD 均小于 2%。结论 该方法简便快捷, 结果准确可靠, 重复性和稳定性均较好, 可用于同时测定分心木中芦丁、槲皮素、金丝桃苷的含量。

关键词: 高效液相色谱法; 分心木; 芦丁; 槲皮素; 金丝桃苷; 含量测定

中图分类号: R932; R284.1; R286.0

文献标志码: A

文章编号: 1006-4931(2021)20-0061-03

Content Determination of Rutin, Quercetin and Hypericin in Diaphragma Juglandis Fructus by HPLC

LI Jing, JIA Wenjiang, CAO Wangdi, SU Yangyang

(Shangluo Pharmaceutical Inspection Institute, Shangluo, Shaanxi, China 726000)

Abstract: Objective To establish a high-performance liquid chromatography(HPLC) method for the simultaneous determination of rutin, quercetin and hyperoside in Diaphragma Juglandis Fructus. **Methods** The chromatographic column was Kromasil 100-5 C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was acetonitrile-0.4% phosphoric acid aqueous solution (gradient elution), the flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelength was 360 nm, the column temperature was 25 ℃, and the injection volume was 10 μL. **Results** The linear ranges of rutin, quercetin and hyperoside were 36.60-366.00 μg/mL, 48.10-481.00 μg/mL, 4.80-48.00 μg/mL ($r=0.999$, $n=5$), respectively. The average recoveries of rutin, quercetin and hyperoside were 100.10%, 99.72% and 100.02% with RSDs of 0.71%, 0.18% and 0.26% ($n=9$), respectively. The RSDs of precision, repeatability and stability tests were lower than 2%. **Conclusion** The method is simple, rapid, accurate, reliable, reproducible and stable, which can be used for the simultaneous determination of rutin, quercetin and hyperoside in Diaphragma Juglandis Fructus.

Key words: HPLC; Diaphragma Juglandis Fructus; rutin; quercetin; hyperoside; content determination

分心木为胡桃科植物胡桃 *Juglans regia* L. 果核的干燥木质隔膜, 性平, 味苦、涩, 入脾、肾经, 具有补肾涩精功效, 用于治疗肾虚遗精、滑精、遗尿、尿血、带下、泻痢, 收载于《陕西省中药饮片标准(第三册)》^[1]。关于分心木含量测定报道较少, 仅见该药材活性鞣质^[2]、浸出物含量^[3]、氨基酸含量测定及综合评价^[4], 文献[5]采用紫外-分光光度法测定了不同产地分心木中总黄酮含量, 文献[6]从核桃分心木的乙酸乙酯萃取部分分离纯化得到金丝桃苷、槲皮素等 10 个化合物。现行标准仅见性状鉴别, 本研究中建立了同时测定分心木中芦丁、槲皮素、金丝桃苷含量的高效液相色谱法, 为全面控制该药材的质量奠定了基础。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Agilent 1260 II 型高效液相色谱仪(美国安捷伦科

技有限公司), 配有紫外检测器; SQP 型电子分析天平(北京赛多利斯科学仪器有限公司, 精度为 0.1 mg); AS30600BDT 型超声波清洗仪(天津奥特赛恩斯仪器有限公司, 功率为 250 W, 频率为 40 kHz); Hitech 型纯水机(上海和泰仪器公司); FW-200D 型高速万能粉碎机(天津鑫博得仪器有限公司)。

1.2 试剂

芦丁对照品(批号为 100080-201408, 含量为 92.8%), 槲皮素对照品(批号为 100081-201610, 含量为 99.1%), 金丝桃苷对照品(批号为 111521-201809, 含量为 94.9%), 均购自中国食品药品检定研究院; 乙腈为色谱纯, 磷酸为分析纯, 水为超纯水。分心木药材(批号分别为 2020001, 2020002, 2020003, 2020004), 经陕西省商洛市药品检验所曹望弟主任药师鉴定为正品。

*基金项目: 2018 年中医药公共卫生服务补助资金第四次全国中药资源普查项目[财社[2018]43 号]。

第一作者: 李静, 女, 大学本科, 主管药师, 研究方向为中药质量标准, (电话)0914-2396707(电子信箱)809646479@qq.com。

[△]通信作者: 曹望弟, 男, 大学本科, 主任药师, 研究方向为药品检验, (电话)0914-2313380(电子信箱)wangdi357@163.com。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Kromasil 100-5 C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈(A)-0.4%磷酸水溶液(B),梯度洗脱(0~10 min时 20% A, 10~26 min时 39.5% A, 26~30 min时 20% A);流速:1.0 mL/min;检测波长:360 nm;柱温:25℃;进样量:10 μL。

2.2 溶液制备

混合对照品溶液:取芦丁、槲皮素、金丝桃苷对照品各适量,精密称定,加甲醇溶解并定容,制成含芦丁、槲皮素、金丝桃苷质量浓度分别为0.366,0.481,0.048 mg/mL的混合对照品溶液。分别吸取2,5,10,15,20 mL,置20 mL容量瓶中,加甲醇定容,摇匀,即得系列混合对照品溶液。

供试品溶液:取样品粉末(过4号筛)5 g,精密称定,置索氏提取器中,加70%乙醇50 mL,加热回流提取6 h,提取液减压干燥至近干,用甲醇定容至25 mL,即得。

2.3 方法学考察

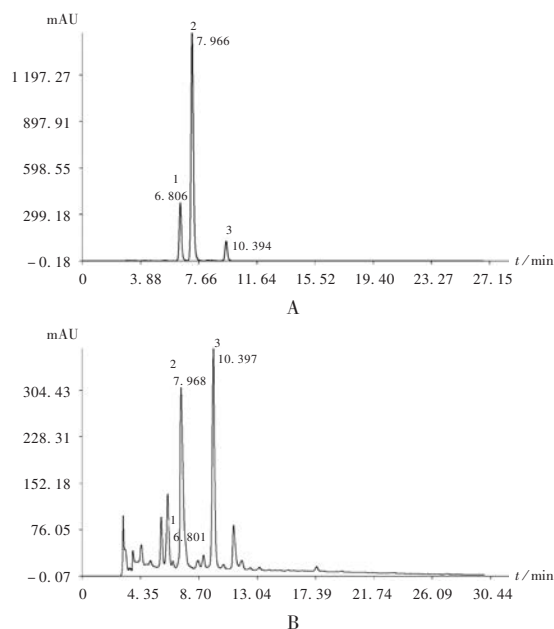
系统适用性试验:取2.2项下混合对照品溶液和供试品溶液各适量,按2.1项下色谱条件进样测定,记录色谱图,详见图1。结果各相邻成分间分离度较好($R>1.5$),理论板数以芦丁、槲皮素、金丝桃苷峰计均大于3 000。

线性关系考察与检测限和定量限确定:取2.2项下系列混合对照品溶液各10 μL,分别依次注入高效液相色谱仪,记录峰面积。以待测成分对照品质量浓度(X , μg/mL)为横坐标、峰面积积分值(Y)为纵坐标进行线性回归。取2.2项下混合对照品溶液,用甲醇倍比稀释,按各组分色谱峰信噪比(S/N)为3:1和10:1时分别测定其检测限(LOD)和定量限(LOQ)。结果见表1。

精密度试验:精密量取2.2项下混合对照品溶液适量,按2.1项下色谱条件连续进样测定6次。结果见表1,表明仪器精密度良好。

稳定性试验:取2.2项下供试品溶液适量,分别于室温下放置0,2,4,8,12,18,24 h时进样测定。结果见表1,表明供试品溶液在室温下24 h内基本稳定。

重复性试验:取同一批样品粉末(过4号筛)6份,依法制备供试品溶液,按2.1项下色谱条件进样测定,



1. 芦丁 2. 金丝桃苷 3. 槲皮素
A. 混合对照品溶液 B. 供试品溶液

图1 高效液相色谱图

1. rutin 2. hyperoside 3. quercetin
A. Mixed reference solution B. Test solution

Fig. 1 HPLC chromatograms

并计算含量。结果见表1,表明方法重复性良好。

加样回收试验:取已知含量的同一批样品粉末(过4号筛)5.0 g,精密称定,平行6份,依法制备供试品溶液,分别加入芦丁、槲皮素、金丝桃苷质量浓度为59.67,192.5,28.88 μg/mL的混合对照品溶液0.8,1.0,1.2 mL,按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算回收率。结果见表2。

2.4 样品含量测定

取4批样品(批号分别为2020001,2020002,2020003,2020004),按2.2项下方法制备供试品溶液,并按2.1项下色谱条件进样测定3次,并计算含量。结果见表3。

3 讨论

3.1 流动相选择

参考文献[7-15],考察了乙腈-磷酸、乙腈-甲酸、乙腈-醋酸、甲醇-磷酸等流动相系统,综合比较峰

表1 分心木中3种成分含量测定方法学考察结果

Tab. 1 Results of methodological investigation on content determination of three components in Diaphragma Juglandis Fructus

成分	回归方程	r	线性范围(μg/mL)	LOQ(ng)	LOD(ng)	RSD(%)		
						精密度试验	稳定性试验	重复性试验
A	$Y_1 = 0.989 X_1 + 6.1023$	0.999	36.60~366.00	0.042	0.014	0.27	0.14	0.58
B	$Y_2 = 9.334 X_2 + 20.5236$	0.999	48.10~480.00	0.066	0.022	0.42	0.19	0.96
C	$Y_3 = 1.041 X_3 - 1.9112$	0.999	4.80~48.00	0.035	0.010	0.37	0.27	0.76

注:A为芦丁,B为槲皮素,C为金丝桃苷。表2同。

Note:A is rutin,B is quercetin,C is hyperoside, as well as Tab. 2.

表2 加样回收试验结果($n=9$)
Tab. 2 Results of the recovery test($n=9$)

样品含量(mg)			加入量(mg)			测得量(mg)			回收率(%)			$\bar{X}$ (%)			RSD(%)		
A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
59.745	193.454	28.787	47.740	153.800	23.100	107.481	346.285	51.862	99.99	99.37	99.89						
59.316	192.867	28.358	47.740	153.800	23.100	107.259	346.130	51.415	100.43	99.65	99.81						
59.162	192.785	28.357	47.740	153.800	23.100	107.369	346.047	51.561	100.98	99.65	100.45						
59.123	193.031	29.383	59.670	192.250	28.880	119.628	385.281	58.359	101.40	100.00	100.33						
59.549	192.545	28.205	59.670	192.250	28.880	119.253	384.438	57.028	100.06	99.81	99.80	100.10	99.72	100.02	0.71	0.18	0.26
59.874	192.456	28.854	59.670	192.250	28.880	119.250	384.437	57.676	99.51	99.86	99.80						
59.447	193.074	28.738	71.600	230.710	34.656	130.842	422.816	63.369	99.71	99.58	99.93						
59.547	192.867	28.357	71.600	230.710	34.656	130.721	423.040	62.970	99.41	99.77	99.88						
59.787	192.785	28.358	71.600	230.710	34.656	130.967	422.957	63.119	99.41	99.77	100.30						

表3 分心木中芦丁、槲皮素、金丝桃苷含量测定结果($n=3$)
Tab. 3 Results of content determination of rutin, quercetin and hyperoside in Diaphragma Juglandis Fructus($n=3$)

来源	产地	批号	贮存时间	含量(mg/g)		
				芦丁	槲皮素	金丝桃苷
核桃分心木	陕西商洛	2020001	1个月	59.741	193.074	28.738
核桃分心木	陕西商洛	2020002	2年	62.670	224.277	30.511
核桃分心木	新疆	2020003	1个月	105.127	450.944	31.997
红皮核桃分心木	陕西商洛	2020004	1个月	32.910	172.277	27.588

形、分离度、出峰时间等参数,选择以乙腈-0.4%磷酸水溶液为流动相进行梯度洗脱,结果3个指标色谱峰分离度和峰形均较好,理论板数最高,重复性最好。取芦丁、槲皮素、金丝桃苷对照品溶液,于250~450 nm波长范围内进行紫外扫描,结果芦丁、槲皮素、金丝桃苷对照品均在360 nm波长处有最大吸收。故选择检测波长为360 nm。

3.2 提取方法选择

考察了盐酸乙醇水解法、乙醇超声法、连续回流提取法等不同提取方法的效果,结果70%乙醇连续回流提取法效果较好,样品提取含量最高。

3.3 不同产地和来源样品含量测定结果

比较样品测定数据,发现新疆核桃分心木中芦丁和槲皮素含量较高;陕西商洛红皮核桃分心木芦丁含量略低,商洛同一产地不同贮存时间分心木3种成分含量无显著差异。

3.4 方法评价

该方法简便快捷,结果准确可靠,重复性和稳定性均较好,可用于同时测定分心木中芦丁、槲皮素、金丝桃苷的含量。

参考文献

[1] 陕西省食品药品监督管理局. 陕西省中药饮片标准(第三册)[M]. 西安:陕西科学技术出版社,2011:33.

- [2] 付文煊,孙黎敏,朱婷,等. 分心木的质量标准研究[J]. 中草药,2006,37(3):385-387.
- [3] 令狐晨,朱青梅,王正红,等. 维药核桃分心木质量标准的初步研究[J]. 安徽农业科学,2015,43(4):119-120.
- [4] 贺娜,耿树香,宁德鲁,等. 云南核桃分心木氨基酸含量及综合评价[J]. 西南林业大学学报(自然科学),2018,38(4):200-205.
- [5] 高捷,王鹏飞,王小平,等. 不同产地分心木中总黄酮及水溶性浸出物的含量比较研究[J]. 陕西农业科学,2018,64(11):52-54.
- [6] 王丹,董红敬,郝翠,等. 核桃分心木化学成分及抗炎活性研究[J]. 天然产物研究与开发,2018,30(9):1548-1553.
- [7] 丁姗姗,吕凌,张毅,等. HPLC法同时测定宣木瓜中绿原酸、芦丁、金丝桃苷、槲皮素的含量[J]. 安徽医药,2012,16(4):450-452.
- [8] 王珍,李秀霞,李娇,等. 高效液相色谱法测定山楂中芦丁、金丝桃苷和槲皮素的含量[J]. 食品工业科技,2013,34(9):302-305.
- [9] 郭炬亮,李新霞,支玲. HPLC测定糙枝金丝桃中绿原酸、芦丁、金丝桃苷、槲皮素和山柰酚[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(11):75-78.
- [10] 陈健. 高效液相色谱法测定金钱草片中槲皮素和山柰素含量[J]. 中国药业,2016,25(6):62-63.
- [11] 冯素香,高宁宁,赵迪,等. HPLC法同时测定不同产地金花葵中6个成分的含量[J]. 沈阳药科大学学报,2019,36(2):118-122.
- [12] 卢婉妃,顾超群,马佳丽,等. 补肾祛瘀颗粒的质量标准研究[J]. 中国药房,2019,30(9):1230-1235.
- [13] 郝晓倩,王进东,卫昱,等. 黄刺玫果提取物中几种化合物的含量测定[J]. 山西医科大学学报,2019,50(5):621-625.
- [14] 董洪强,赵跃丽,张兰胜. 截叶铁扫帚中芦丁、槲皮素与山柰酚含量测定研究[J]. 中国野生植物资源,2020,39(7):18-21.
- [15] 孙悦,李洁,高长久,等. 长柱金丝桃中金丝桃苷和槲皮素的含量测定[J]. 中国中医药现代远程教育,2020,18(12):113-115.

(收稿日期:2020-12-25;修回日期:2021-04-03)