

李青, 谭红, 袁鑫, 等. 高效液相色谱法测定核桃青皮中胡桃醌的含量[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(1): 259-261.

# 高效液相色谱法测定核桃青皮中胡桃醌的含量

李青<sup>1,2</sup>, 谭红<sup>2</sup>, 袁鑫<sup>1,2</sup>, 何锦林<sup>2</sup>, 魏赫楠<sup>1,2</sup>, 李占彬<sup>2</sup>

(1. 贵州大学, 贵州贵阳 550002; 2. 贵州省分析测试研究院, 贵州贵阳 550002)

**摘要:**应用高效液相色谱原理建立核桃青皮中胡桃醌活性成分的分析测定方法, 该方法的线性回归方程为  $y = 598\ 860x - 49\ 983$  ( $r^2 = 0.999\ 1$ ), 线性范围为  $10 \sim 150\ \mu\text{g/mL}$ , 该方法的精密度、稳定性、重复性良好, 回收率为  $93.90\% \sim 95.14\%$ , 相对标准偏差小于  $2\%$ 。

**关键词:**高效液相色谱; 胡桃醌; 核桃; 青皮

**中图分类号:** O657.7<sup>+</sup>2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)01-0259-02

胡桃醌是核桃青皮中的有效成分, 具有抗肿瘤、抑菌及抗病毒、抗氧化等活性, 目前已被应用于医药方面的研究<sup>[1]</sup>。高效液相色谱的分离原理与其他色谱法相同, 都是利用混合物中各组分在固定相和流动相之间的分配系数不同而被分别分离的原理<sup>[2]</sup>。现在使用的微处理机控制的高效液相色谱仪, 其自动化程度非常高, 不仅能控制仪器的相关操作参数(如溶剂的梯度洗脱、流动相流量与流速、柱温、自动进样、洗脱液收集、检测器功能等), 而且还能对获得的色谱图进行收缩、放大、叠加, 并对保留时间和峰高、峰面积进行综合处理, 使色谱分析工作者能高效率、高质量、高标准地完成分析工作<sup>[3]</sup>, 因此它在天然产物中活性物质的研究及植物药的发展中起着非常重要的作用。天然产物中活性物质不像化学药品那样简单、规范、物质单一, 它们不仅有着非常复杂的成分, 而且各种成分之间可能会相互影响和相互作用。因此, 根据不同的分析对象、目的以及要求, 可以利用高效液相色谱技术对天然产物某一成分化合物建立高效、灵敏、准确的分析方法或定量方法。本试验就是利用高效液相色谱技术, 建立了一种对胡桃醌含量的高效、快速的 HPLC 检测方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

核桃主要由贵州省赫章县提供。

97% 胡桃醌标准品(Sigma 公司)、磷酸、磷酸氢二钠、无水乙醇、氯仿、氢氧化钠均为分析纯, 甲醇为色谱纯。

Agilent1100 高效液相色谱仪, PHS-3C 型精密 pH 计(上海精密科学仪器有限公司), XS-20B 粉碎机(上海兆申电子科技有限公司), ALC-110.4 电子天平(北京赛多利科学仪器有限公司), RE-52A 旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂), H-1850R 型高速冷冻离心机(长沙湘仪离心机仪器有限公司), 101-2AB 型电热鼓风干燥箱(天津泰斯特仪器有限公司), SC-316 冰箱(山东省青岛海尔股份有限公司), 78-1

型磁力搅拌器(江苏省常州澳华仪器有限公司), KQ-50 型超声波清洗器(江苏省昆山市超声波仪器有限公司)。

### 1.2 方法

1.2.1 色谱条件 色谱柱选用  $\text{C}_{18}$  柱( $4.6\ \text{mm} \times 150\ \text{mm}$ ,  $5\ \mu\text{m}$ ), 流动相采用甲醇-水(体积比  $1:1$ ), 水相先用磷酸调节 pH 值约为 4, 流速为  $0.8\ \text{mL/min}$ , 紫外检测波长为  $250\ \text{nm}$ , 柱温为  $30\ ^\circ\text{C}$ 。

1.2.2 胡桃醌标准溶液的制备 精确称取胡桃醌标准品  $5.0\ \text{mg}$ , 置于  $25\ \text{mL}$  容量瓶中, 加入甲醇溶解(在超声波清洗器上振荡  $5\ \text{min}$  后)在室温下冷却后再用甲醇定容, 摇匀, 即得  $200\ \mu\text{g/mL}$  胡桃醌标准溶液。

标准溶液须放在冰箱中保存, 防止甲醇挥发和长时间放置在阳光下使标准溶液物质分解, 给试验带来误差。

1.2.3 最大吸收波长的测定和选择 对胡桃醌标准溶液在  $220 \sim 400\ \text{nm}$  的范围内进行紫外光谱扫描, 选定检测波长。

1.2.4 流动相组成的确定 以甲醇-水体系作为流动相, 进行等度洗脱。固定流动相的流速为  $0.8\ \text{mL/min}$ 。为了选择最佳的流动相比, 改变流动相中甲醇的比例, 使其体积分数分别为  $20\%$ 、 $30\%$ 、 $40\%$ 、 $50\%$ 、 $60\%$ 、 $70\%$ 、 $80\%$ 、 $90\%$ , 测定胡桃醌标准溶液的保留时间和峰面积。

1.2.5 pH 值的确定 常用来调节流动相 pH 值的化合物有磷酸、醋酸、磷酸盐缓冲溶液和醋酸盐缓冲溶液。本试验采用磷酸来调节 pH 值而不采用醋酸的主要原因是磷酸的紫外吸收较小且属于中等强酸, 等量的  $0.1\%$  磷酸溶液和  $1\%$  醋酸溶液的 pH 值相等, 除此之外, 磷酸还不损坏色谱仪器的接口。

用磷酸调节水相的 pH 值分别为  $2$ 、 $3$ 、 $4$ 、 $5$ 、 $6$ 、 $7$ , 加入流动相中的有机相和水相的体积比为  $1:1$ , 测定不同 pH 值下胡桃醌标准溶液的保留时间和峰面积。

1.2.6 柱温的选择 本试验考察了温度对色谱分离的影响, 在选定的上述条件下, 分别在柱温为  $18$ 、 $22$ 、 $26$ 、 $30$ 、 $34$ 、 $38$ 、 $42\ ^\circ\text{C}$  时测定胡桃醌标准溶液的保留时间和峰面积。

1.2.7 标准曲线的建立 用甲醇稀释  $200\ \mu\text{g/mL}$  胡桃醌标准溶液, 制备质量浓度为  $10$ 、 $20$ 、 $50$ 、 $100$ 、 $120$ 、 $150\ \mu\text{g/mL}$  系列标准品工作溶液, 按照上述确定的色谱条件测定标准品系列工作溶液的峰面积, 以质量浓度为横坐标、峰面积为纵坐标作工作曲线, 求得标准曲线方程。

1.2.8 精密度试验 取质量浓度分别  $10$ 、 $50$ 、 $100\ \mu\text{g/mL}$  标

收稿日期: 2013-06-05

基金项目: 贵州省林业科研技术基金(编号: 黔林科合 J 字[2012]18 号); 国家国际科技合作专项(编号: 2011DFB41640)。

作者简介: 李青(1987—), 男, 湖南益阳人, 硕士, 主要从事仪器分析方法的研究。E-mail: 287476045@qq.com。

准溶液,按照已经确定的色谱条件,各进样 3 次,分别测定峰面积并计算胡桃醌浓度、相对标准偏差(RSD)。

1.2.9 稳定性试验 将 20 μg/mL 标准溶液放置在室温条件下,不做任何避光保护,每隔 2 h 进样测定 1 次,共进行 5 次,分别测定其峰面积并计算胡桃醌浓度、相对标准偏差。

1.2.10 重复性试验 取 20 μg/mL 标准溶液 5 份,按上述色谱条件连续进样,分别测定峰面积并计算胡桃醌浓度、相对标准偏差。

1.2.11 加标回收率试验 分别取 3 份 5 mL 50 μg/mL 的标准溶液,分别加入 0.5、0.8、1.0 mL 200 μg/mL 胡桃醌标准溶液,按照上述进样方法操作,测定其峰面积,重复测定 3 次,计算平均回收率、相对标准偏差。

2 结果与分析

2.1 最大吸收波长的测定和选择

由图 1 可知,胡桃醌的最大吸收波长出现在 250 nm 左右,此时受干扰较少。因此选择 250 nm 为测定波长。

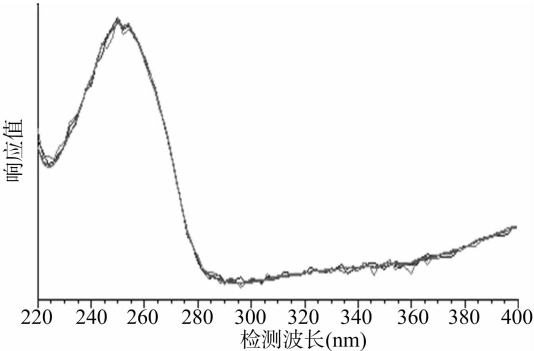


图1 胡桃醌的检测波长

2.2 流动相组成的影响试验

从图 2 可以看出,随着水的比例增加,流动相的极性增大,保留时间也延长。当甲醇的体积分数小于 50% 时,分析时间过长,峰形开始逐渐变差。综合以上情况,选用甲醇的体积分数为 50% (即甲醇与水体积比为 1 : 1)。

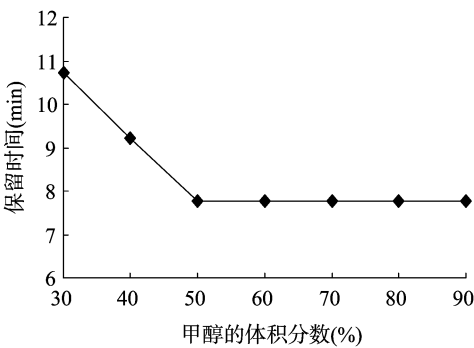


图2 甲醇的体积分数对保留时间的影响

2.3 pH 值的影响试验

流动相中水相的 pH 值在 2 ~ 7 范围对胡桃醌的保留时间(图 3)和峰面积都没有太大的影响,但当 pH 值为 4 时,峰型较好,因此本试验中选取水相的 pH 值为 4。

2.4 柱温的选择试验

试验结果(图 4)表明:随着温度升高,各物质之间的分离效果有所提高,当温度高于 30 ℃,分离效果随着温度升高变

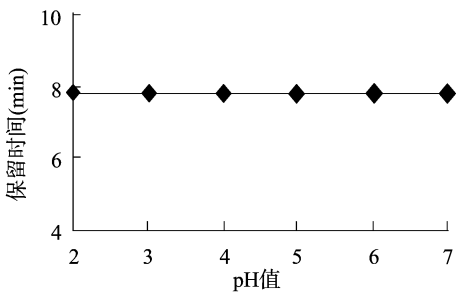


图3 pH值对保留时间的影响

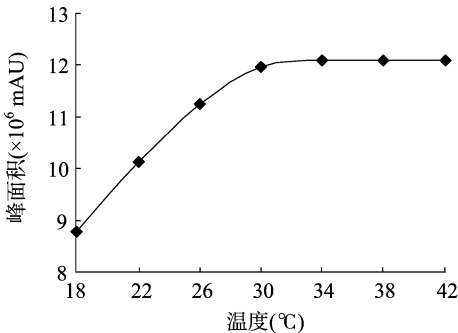


图4 柱温对峰面积的影响

化不再明显,考虑到色谱柱使用温度条件,选择柱温 30 ℃。

2.5 标准曲线的建立

以质量浓度为横坐标、峰面积为纵坐标作工作曲线,得到图 5,对曲线进行线性拟合,得到胡桃醌含量的标准曲线方程为  $y = 598\ 860x - 49\ 983$  ( $r^2 = 0.999\ 1$ ),表明胡桃醌在 10 ~ 150 μg/mL 范围内线性关系良好。

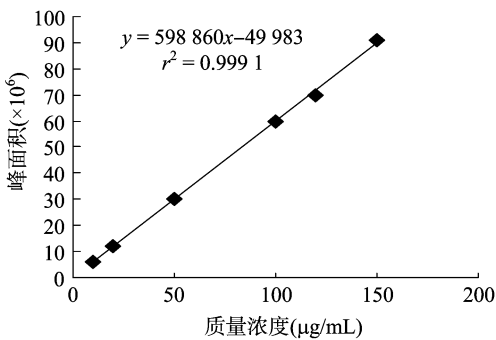


图5 胡桃醌标准溶液工作曲线

2.6 精密度试验

由表 1 可知,高、中、低 3 个不同水平的标准品溶液 RSD 值均小于 2%,表明仪器及进样的精密度良好。

表 1 精密度试验结果

样品浓度 (μg/mL)	测定浓度(μg/mL)						RSD (%)
	1	2	3	4	5	平均	
10	9.73	9.82	9.79	10.21	9.87	9.88	1.29
50	49.81	50.33	49.83	48.97	49.82	49.75	0.63
100	99.82	98.76	100.09	99.33	98.67	99.33	0.49

2.7 稳定性试验

由表 2 可知,所测得浓度的 RSD 为 2.5%,表明该方法在 10 h 之内稳定性较好,即样品溶液可以在 10 h 之内测定,基本上可以满足试验要求。

高 渊,朱 君,吕 飞,等. 江苏口岸截获入境皮蠹疫情分析[J]. 江苏农业科学,2014,42(1):261-262.

# 江苏口岸截获入境皮蠹疫情分析

高 渊<sup>1</sup>, 朱 君<sup>2</sup>, 吕 飞<sup>3</sup>, 梁小松<sup>4</sup>, 周明华<sup>5</sup>

(1. 苏州出入境检验检疫局, 江苏苏州 215126; 2. 张家港出入境检验检疫局, 江苏张家港 215633;

3. 太仓出入境检验检疫局, 江苏太仓 215400; 4. 常州出入境检验检疫局, 江苏常州 213000;

5. 江苏出入境检验检疫局, 江苏南京 210001)

**摘要:**对 2003—2012 年江苏口岸入境检疫截获的皮蠹科昆虫根据截获地口岸类型、检疫类别进行统计分析, 截获且鉴定到种或属的共 1 326 批次, 分属皮蠹科的 10 个属。

**关键词:**江苏口岸; 截获; 皮蠹; 疫情

**中图分类号:** S41 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)01-0261-02

皮蠹科昆虫中部分类群生活于仓储物内, 取食干燥的水产品、皮张、药材、毛、羽毛、谷物及其制品, 是一类十分重要的储藏物害虫<sup>[1]</sup>。该类害虫检疫意义十分突出, 分析口岸截获皮蠹的种类, 明确其主要传播途径, 对加强口岸疫情防控能力具有十分重要的意义。

## 1 方法

收集整理江苏各口岸截获皮蠹的疫情数据, 对筛选鉴定到种或属的进行统计, 按皮蠹种类、截获批次、截获地、检疫类

别、来源地等要素进行归类分析。

## 2 结果

### 2.1 种类及频次

2003—2012 年江苏各口岸进境检疫截获并鉴定到种或属的皮蠹科昆虫共 1 326 批次(表 1), 分属皮蠹科的 10 个属, 其中墨西哥斑皮蠹、谷斑皮蠹、肾斑皮蠹、筒斑皮蠹及其他斑皮蠹属(非中国种)为检疫性有害生物。共截获检疫性有害生物 49 批次, 占总截获皮蠹批次数的 3.7%。

### 2.2 按截获地口岸类型统计

按截获地口岸类型区分, 口岸分支机构(指含港口的分支机构)共截获皮蠹 1 198 批次, 占总批次的 90.3%; 特殊监管区分支机构(指不含港口的分支机构)共截获皮蠹 128 批次, 占总批次的 9.7%。

收稿日期: 2013-06-24

基金项目: 江苏出入境检验检疫局科研计划项目(编号: 2012KJ55、2013KJ55)。

作者简介: 高 渊(1975—), 男, 农艺师, 主要从事植物检疫研究。

E-mail: gao@jsci.gov.cn.

表 2 稳定性试验结果

样品浓度 (μg/mL)	测定浓度(μg/mL)						RSD (%)
	1	2	3	4	5	平均	
20	19.56	18.96	18.57	19.01	17.82	18.78	2.5

### 2.8 重复性试验

由表 3 可知, 所测得浓度的 RSD 为 0.31%, 表明该方法的重复性良好。

表 3 重复性试验结果

样品浓度 (μg/mL)	测定浓度(μg/mL)						RSD (%)
	1	2	3	4	5	平均	
20	19.91	19.92	20.02	20.05	19.89	19.96	0.31

### 2.9 加标回收率试验

由表 4 可知, 胡桃醌加标回收率试验的回收率分别为 93.90%、94.63%、95.14%, RSD 分别为 1.06%、1.14%、1.46%, 表明该测定方法对胡桃醌含量测定的准确度较高, 结果值得信赖。

## 3 结论

本试验建立了核桃青皮中胡桃醌活性成分的高效液相色谱测定方法, 该方法的线性方程为  $y = 598\ 860x - 49\ 983$  ( $r^2 =$

表 4 加标回收率试验结果

样品编号 (μg/mL)	计算浓度(μg/mL)			回收率 (%)	RSD (%)
	重复 1	重复 2	重复 3		
1	59.63	60.71	58.94	93.90 ± 1.00	1.06
2	68.04	66.89	65.76	94.63 ± 1.08	1.14
3	71.09	72.92	70.05	95.14 ± 1.39	1.46

0.999 1), 线性范围为 10~150 μg/mL, 为核桃青皮中胡桃醌提供了可行的定量分析方法。通过方法学考查, 证明了该方法的精密度、稳定性、重复性良好, 且加标回收率试验结果表明该方法回收率为 93.90%~95.14%, 相对标准偏差小于 2%。该方法不仅简单实用, 而且操作简便迅速, 不需要梯度洗脱, 准确度、精密度和重现性均较为理想, 可以成为核桃青皮中胡桃醌含量测定的可靠参考。

## 参考文献:

- [1] 许绍惠, 许 弘. 胡桃属植物毒性成分及其应用[J]. 沈阳农业大学学报, 1990, 21(2): 167-170.
- [2] 朱明华, 胡 坪. 仪器分析[M]. 北京: 高等教育出版社, 2008: 66-67.
- [3] 孟 霞. 高效液相色谱法在几种药用植物分析中的应用研究[D]. 重庆: 西南大学, 2009.