

HPLC-PAD法测定不同品种核桃分心木中没食子酸、柚皮素

买买提·吐尔逊^{1,2}, 阿吉姑·阿布都热西提^{1,2}, 热萨莱提·伊敏^{1,2}, 贾淑平^{1,2}, 麦麦提·艾在孜¹

(1.喀什大学化学与环境科学学院, 新疆喀什 844007;

2.新疆特色药食用植物资源化学重点实验室, 新疆喀什 844007)

摘要:目的:建立采用超声提取,反相高效液相色谱-二极管阵列检测法测定核桃分心木中没食子酸和柚皮素的含量的方法。方法:色谱柱:安捷伦HC-C₁₈柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:甲醇(A)-0.1%磷酸溶液(B),梯度洗脱;检测波长:276 nm;柱温:30 °C;流速:1.0 mL/min。结果:没食子酸和柚皮素分别在2.0~80 μg/mL($r=0.9999$)和1.0~60 μg/mL($r=0.9999$)浓度范围内呈良好的线性关系,平均回收率分别为99.7%(RSD=1.84%, $n=5$)和101.2%(RSD=2.65%, $n=5$)。分心木中含有具有抗炎、抗病毒、抗菌的没食子酸和柚皮素,平均含量分别为268.3 μg/g和102.2 μg/g。结论:HPLC-PAD测定没食子酸和柚皮素的方法简便、快速、有效、灵敏、准确、具有良好的重复性和回收率,可作为分心木中没食子酸和柚皮素的定量分析方法。

关键词:反相高效液相色谱法,分心木,没食子酸,柚皮素

Determination of content of gallic acid, naringenin in *Juglans regia*. by HPLC-PAD

Mamat·TURSON^{1,2}, Ajigul·ABUDUREXIT^{1,2}, Risalat·EMIN^{1,2}, JIA Shu-ping^{1,2}, Mamat·EZIZ¹

(1.College of Chemistry and Environmental Science, Kashgar University, Kashgar 844007, China;

2.Laboratory of Xinjiang Native Medicinal and Edible Plant Resources Chemistry, Kashgar 844007, China)

Abstract: Objective: The content of gallic acid and naringenin in *Juglans regia*. extracted by ultrasonic was determined by RP-HPLC. Method: RP-HPLC with Agilent HC-C₁₈ column (5 μm, 250 mm×4.6 mm) and used CH₃OH(A)-0.1% H₃PO₄(B) as the mobile phase with flow rate of 1.0 mL/min. Column temperature was 30 °C and the detection wavelength was 276 nm. Result: There was a linear correlation between the concentration of gallic acid (2.0~80 μg/mL, $r=0.9999$) and naringenin (1.0~60 μg/mL, $r=0.9999$), respectively. The average recovery of gallic acid and naringenin were 99.7% (RSD=1.84%, $n=5$), 101.2% (RSD=2.65%, $n=5$), respectively. The result showed that the content of gallic acid and naringenin in *Juglans regia*, which had pharmacodynamics as anti-inflammatory, antiviral and antibacterial, were 268.3 μg/g and 102.2 μg/g respectively. Conclusion: this method was simple, rapid, sensitive and accurate, and could be used to identify and evaluate the quantitative determination of gallic acid and naringenin in *Juglans regia*.

Key words: HPLC-PAD; *Juglans regia*; gallic acid; naringenin

中图分类号: TS207.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2016)04-0077-04

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2016.04.006

核桃分心木(*Juglans regia*), 又称核桃隔膜, 也叫胡桃衣(《本草再新》)、胡桃夹(《现代实用中药》), 是胡桃科核桃属植物核桃的果核内木质隔膜^[1]。颜色淡肉色, 味道苦涩, 易折断, 可以长期保存。在维吾尔医学中, 分心木常用来治疗口腔溃疡、咽炎、牙龈出血、泻痢等疾病。具有补肾、驱寒等功能, 是南疆广大农牧民家庭必备的民间良药^[2-3]。分心木是新疆广大农牧民家庭必备的民间良药, 每家每户都会存放分

心木, 在新疆民间的储藏量较大。新疆盛产核桃, 核桃品种繁多, 有纸皮核桃、薄皮核桃、石头核桃等。另外, 新疆的少数民族将分心木与石榴外皮配合用于染发、染布等, 是天然的染料。对新疆丰富的分心木资源进行研究利用, 变废为宝, 能为当地的社会经济发展做出一定贡献。

目前, 对分心木有效成分以及总黄酮含量的测定有研究报道^[4-7], 其中没食子酸和柚皮素是核桃仁

收稿日期: 2015-05-22

作者简介: 买买提吐尔逊(1971-), 男, 硕士, 教授, 主要从事色谱分离分析、天然产物及药物分析方面的研究, E-mail: maimat@126.com。

基金项目: 新疆维吾尔自治区自然科学基金项目(201318101-15)。

膜中的主要活性成分,具有抗炎、抗病毒、抗菌、祛痰、止咳、平喘等作用,但是尚未见用高效液相色谱方法同时测定其含量的相关报道。因此,研究其没食子酸和柚皮素等有效成分具有十分重要的实践意义。而高效液相色谱法以操作简单、准确度高、重复性好等优点被广泛用于多种有效成分的含量测定。本文以五个常见核桃品种分心木作为研究对象,提取其中的没食子酸和柚皮素,建立测定其含量的高效液相色谱-二极管阵列检测方法,为新疆丰富的核桃资源的进一步研究和开发利用提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

没食子酸对照品、柚皮素对照品 中国药品生物制品检定所;甲醇、乙腈 色谱纯,天津市光复精细化工研究所;水 高纯水;其他试剂 均为分析纯;五个品种核桃分心木 2014年和2015年初分批采购于喀什市中亚南亚大市场;纸皮核桃 和田墨玉;薄皮核桃 阿克苏温宿;石头核桃 喀什叶城;晚实核桃 和田墨玉;新早丰核桃 阿克苏温宿。

LC-20AT高效液相色谱仪 配有SPD-M20A二极管阵列检测器,DGU-20A5在线脱气机,LC-solution工作站,日本岛津公司;KQ3200DE型超声波清洗器 昆山市超声仪器有限公司;XA-1型多功能粉碎机 江苏姜堰市分析仪器厂;ZK-82B真空干燥箱 上海市实验仪器总厂;BS224S型电子天平 德国赛多利斯公司;0.22 μm 微孔过滤膜。

1.2 实验方法

1.2.1 检测波长 对没食子酸和柚皮素对照品混合液在200~500 nm之间进行紫外-可见光谱扫描,并从二极管阵列检测器采集的样品三维图谱中提取紫外光谱和不同波长的色谱进行对比,最后确定最适宜检测波长。

1.2.2 色谱条件 色谱柱:安捷伦HC-C₁₈柱(5 μm , 250 mm \times 4.6 mm);流动相:甲醇(A)-0.1%磷酸(B),梯度洗脱;流速:1.0 mL/min;检测波长:276 nm,柱温:30 $^{\circ}\text{C}$;进样量:20 μL 。

1.2.3 标准品溶液的配制 准确称取没食子酸及柚皮素对照品各10.0 mg置于50 mL容量瓶中,用甲醇使其溶解并定容至刻度,摇匀,得200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 没食子酸及柚皮素对照品标准储备溶液,在冰箱里保存(5 $^{\circ}\text{C}$)。使用时根据需要混合并稀释至所需浓度,得到没食子酸及柚皮素浓度分别为0.5、1.0;2.0、5.0;10、10;20、20;40、40;80、60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的6组标准混合溶液。

1.2.4 样品溶液的制备 取不同品种核桃分心木各适量,经重蒸馏水洗净,放入真空干燥箱内在60 $^{\circ}\text{C}$ 下干燥4 h,用多功能粉碎机粉碎,过40目筛。

没食子酸和柚皮素分析样品的制备:准确称取已粉碎过筛的不同品种核桃分心木1.0 g,用50 mL 50%甲醇浸泡2 h后,超声提取20 min,使其完全溶解,再次超声10 min,过滤,并用纯甲醇冲洗滤纸,减压蒸馏至近干,用甲醇定容至25 mL,摇匀,用0.22 μm 微孔滤膜过滤,滤液置于冰箱备用。

2 结果与讨论

2.1 检测波长的确定

没食子酸和柚皮素标准品紫外-可见光谱图及从二极管阵列检测器采集的样品三维图谱中提取紫外光谱和不同波长的色谱进行对比结果,当检测波长为276 nm时没食子酸和柚皮素都有较强吸收。因此,结合相关文献[8-9]确定276 nm作为检测波长,没食子酸和柚皮素的紫外吸收曲线见图1。

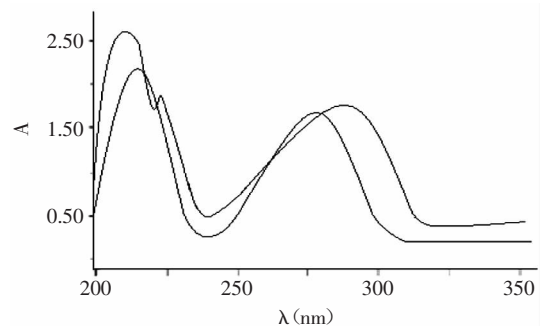


图1 没食子酸和柚皮素的紫外吸收曲线

Fig.1 Absorption spectrum of gallic acid and naringenin

2.2 流动相的选择

根据文献,并结合样品实际成分分别采用不同流动相^[10-11],对样品的分离情况进行考察,当甲醇(A)/0.1%磷酸(B)作流动相,按时间:0~10~20~45 min,甲醇(A)浓度:20%~40%~55%~20%洗脱程序进行梯

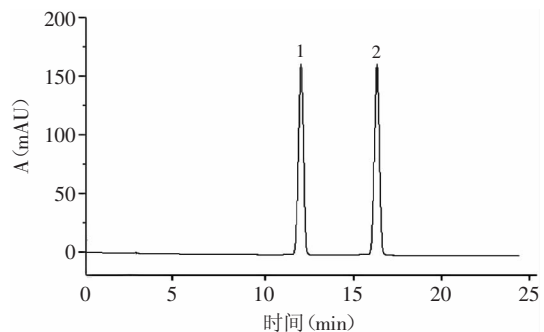


图2 没食子酸和柚皮素标准色谱图

Fig.2 Chromatograms of mixed reference substances

注:1为没食子酸,2为柚皮素;图3同。

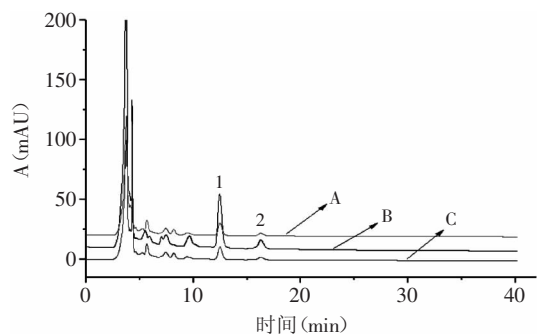


图3 不同提取法提取的分心木样品溶液色谱图

Fig.3 Chromatograms of Juglandis fructus samples by different extraction methods

注:A.浸泡,B.浸泡+超声,C.索氏提取。

度洗脱时,没食子酸和柚皮素与其他杂质峰得到了良好的分离。混合标准品和样品色谱图见图2和图3。从图2和图3可以看出,样品中目标物的出峰时间和标准品的出峰时间一致,没食子酸和柚皮素的峰形对称,都能实现基线分离,适合做定量分析。

2.3 提取溶剂及提取方法的选择

分别用纯乙醇或甲醇超声、纯乙醇或甲醇索氏提取、75%乙醇热回流索氏提取法、50%甲醇超声波提取法提取没食子酸和柚皮素。从图3可以看出,用50%甲醇浸泡2 h后,超声提取20 min,放置10 min,再次超声10 min,对没食子酸和柚皮素的提取率最高,而且操作简便,提取对比结果见图3。通过浸泡加超声能够使溶剂充分渗透到样品内部,将其所含的没食子酸等有效成分尽可能完全地溶于溶剂之中,从而得到多成分混合提取液。故选择浸泡2 h,超声20 min,放置10 min,再次超声10 min作为提取方法。

2.4 线性关系和精密度实验

分别精密吸取6组混合标准系列溶液20 μL ,从低浓度到高浓度按1.2.2色谱条件测定其峰面积,每一组重复3次,以对照品浓度 c ($\mu\text{g}/\text{mL}$)为横坐标,峰

表1 线性回归方程、相关系数、线性范围

Table 1 Linearity between peak area and concentration

被测组分	回归方程	相关系数	线性范围 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
没食子酸	$A=352681.8c+25491.1$	0.9999	2.0~80
柚皮素	$A=105763.2c+15064.5$	0.9999	1.0~60

表2 方法的回收率和精密度 ($n=5$)

Table 2 Recovery of the method ($n=5$)

组分	样品(g)	本底值(μg)	加入量(μg)	测得量(μg)	回收率(%)	平均回收率(%)	RSD(%)
没食子酸	1.0002	256.2	200	452.1	97.9	99.7	1.84
	1.0001	256.2	150	403.8	98.4		
	1.0002	256.2	150	404.7	99.0		
	1.0003	256.3	100	356.8	101.5		
	1.0003	256.3	100	358.2	101.9		
柚皮素	1.0002	89.5	100	187.6	98.1	101.2	2.65
	1.0001	89.5	100	188.6	99.1		
	1.0002	89.5	50	141.8	104.6		
	1.0003	89.5	50	140.4	101.8		
	1.0003	89.5	30	120.3	102.7		

表3 样品中没食子酸、柚皮素的测定结果 ($n=3$)

Table 3 Determination results of samples ($n=3$)

序号	核桃样品	产地	不同品种核桃分心木中没食子酸及柚皮素含量			
			没食子酸($\mu\text{g}/\text{g}$)	RSD(%)	柚皮素($\mu\text{g}/\text{g}$)	RSD(%)
1	纸皮核桃	和田墨玉	256.2	1.02	89.5	1.30
2	薄皮核桃	阿克苏温宿	284.6	0.85	102.7	1.52
3	石头核桃	喀什叶城	258.1	0.94	106.5	0.96
4	晚实核桃	和田墨玉	295.6	1.10	115.7	1.08
5	新早丰核桃	阿克苏温宿	246.8	0.97	96.6	1.25
	平均含量		268.3	0.98	102.2	1.22

面积 A 为纵坐标,进行线性回归,得到的线性回归方程、相关系数、线性范围见表1。从表1的相关数据可以看出,没食子酸和柚皮素的浓度与峰面积的线性关系良好。每一组标准溶液连续进样3次,测定没食子酸和柚皮素的峰面积,计算RSD分别为0.65%和0.82%,表明该检测方法的精密度良好。

2.5 稳定性及重现性实验

稳定性实验:取样品溶液,在12 h内每隔2 h进样一次,进样量20 μL ,测定没食子酸和柚皮素峰面积,相对标准偏差分别为1.21%、1.86%。结果表明:供试品溶液在12 h内基本稳定。

重现性实验:精密称取纸皮核桃样品5份,每份约1.0 g,按1.2.4配制样品溶液,按1.2.2色谱条件进行测定,所得到的样品中没食子酸和柚皮素峰面积的RSD分别0.96%和1.14%,实验结果表明重现性良好。

2.6 加标回收率实验

准确称取已知没食子酸和柚皮素含量的纸皮核桃分心木样品5份,每份1 g左右,分别添加不同量的没食子酸和柚皮素标准溶液,测定结果见表2。其平均回收率为没食子酸99.7%,柚皮素101.2%。

2.7 样品含量测定结果

没食子酸和柚皮素含量的测定:精密吸取不同批次不同品种核桃分心木样品溶液20 μL 进样,按外标法计算样品中没食子酸和柚皮素的含量。测定结果见表3。从测定数据可以看出,产地为和田的晚实核桃分心木中没食子酸和柚皮素的含量略高于其他品种核桃,分别为295.6 $\mu\text{g}/\text{g}$ 和115.7 $\mu\text{g}/\text{g}$ 。

(下转第86页)

数据量化分析了浙江绍兴、杭州、宁波、温州四地的名菜辣味的大体情况。未考虑辣椒制品与其他调味料之间的相互作用及其对菜肴辣度产生的整体影响。因此,针对地域性菜肴风味特征的研究有待进一步深化和完善。

参考文献

- [1] 徐永平,王黎,金礼吉,等. 辣椒素的研究和应用[J]. 大连教育学院学报,2009,25(2):66-69.
- [2] 蒋英志. 中国八大菜系及第九菜系[J]. 文史精华,2013,5(276):64-68.
- [3] 韩晓岚,胡云峰,赵学志,等. 辣椒中辣椒素、二氢辣椒素的超声波提取及其含量测定[J]. 食品科技,2009,34(10):129-183.
- [4] 王立升,张阳,庞丽,等. HPLC法测定广西指天椒中三种辣椒碱类物质的含量[J]. 广西大学学报,2009,34(3):332-335.
- [5] 高艳,欧阳建勋,谢定,等. 辣椒素的提取及其应用研究进展[J]. 食品与机械,2011,27(1):162-165.
- [6] 王旭,王富华,钟红舰,等. 高效液相色谱法测定食品中的辣椒素、二氢辣椒素[J]. 食品科学,2008,29(7):378-381.
- [7] Kurian A L. HPLC Analysis of Capsaicinoids Extracted from Whole Orange Habanero Chili Peppers[J]. Journal of Food Science, 2002,67(3):956-962.
- [8] 刘欣. 辣味鸡油中辣椒素的分离及鸡油精炼研究[D]. 广州:华南理工大学,2012.
- [9] 吴丽威,孙颖,孙秀敏,等. 无溶剂微波预处理-NaOH溶液搅拌法提取干红辣椒中的辣椒素[J]. 分析化学,2010,24(11):1661-1664.

- [10] 胥秀英,郑一敏,傅善权,等. 不同产地辣椒中辣椒素含量测定研究[J]. 食品工业科技,2007,28(11):229-233.
- [11] 张晶,孙长波,石磊岭,等. RP-HPLC法测定辣椒中辣椒素、二氢辣椒素和降二氢辣椒素含量[J]. 药物分析杂志,2011,31(2):245-246.
- [12] 周卫东,陆相龙,邵涛,等. HPLC法测定辣椒秸秆中辣椒素和二氢辣椒素含量[J]. 药物分析杂志,2012,32(6):1017-1021.
- [13] GB/T 21266-2007. Determination of total capsaicinoid content and representation of pungency degree in capsicum and its products[S]. Quality and Technical Supervision Bureau of China,2007.
- [14] 熊科,夏延斌,王燕,等. 辣椒及其制品辣度分级方法研究[J]. 食品科学,2007,28(5):37-40.
- [15] 孙盛,孙波,赵晓. 干辣椒及其制品中辣椒碱含量分析与辣度分级[J]. 中国调味品,2014,39(12):110-112.
- [16] 贾洪锋,彭德川,梁爱华,等. 高效液相色谱法测定豆瓣辣椒素类物质含量[J]. 中国调味品,2012,37(2):104-108.
- [17] 王燕. 辣椒素类物质分析及其感官特性研究[D]. 长沙:湖南大学,2007.
- [18] Bindu T, Natasa S B, Akihito T. High-Performance Liquid Chromatography Analysis of Capsaicin Content in 16 Capsicum Fruits from Nepal[J]. Journal of Medicinal Food, 2009,12(4):908-913.
- [19] 罗金凤,张迪,丁晓雯,等. 辣椒中辣椒素类物质的检测方法及其稳定性研究[J]. 食品工业科技,2012,33(11):334-337.
- [20] 贾洪锋,邓红,梁爱华,等. 川菜菜品的辣味物质分析与辣度分级[J]. 食品科学,2015,36(4):152-157.

(上接第79页)

3 结论

本文用高效液相色谱-二极管阵列检测法对不同产地不同品种核桃分心木中没食子酸和柚皮素进行了测定,并建立了测定分心木中没食子酸和柚皮素含量的方法。结果表明,选用的流动相梯度洗脱条件下基线平稳,没有出现漂移,没食子酸和柚皮素基线分离,而且没食子酸和柚皮素的周围没有干扰的杂质峰,分离效果较好。不同产地不同品种核桃分心木中没食子酸和柚皮素含量之间有一定的差异,这可能与生长环境、采摘时间和个体差异有关。

本文所采用的测定方法操作简便、快捷、灵敏度高、稳定性好、测定结果准确可靠,适于测定核桃分心木中没食子酸和柚皮素的含量。报道显示^[12-13],分心木中含有较丰富的没食子酸、柚皮素、香草酸、核桃素D等物质,本实验测定出了柚皮素和没食子酸,与上述研究结果一致。但由于实验条件限制未能对其他成分进行测定,后续实验需进一步完善。

参考文献

- [1] 茹克娅·沙德克. 维吾尔医常用药材学(维吾尔文):下册[M]. 乌鲁木齐:新疆科技卫生出版社,1993:323-324.
- [2] 吐尔洪·吾买尔. 维吾尔医药植物学(维吾尔文)[M]. 乌鲁木齐:新疆人民出版社,2004:122-123.
- [3] 穆塔力甫·艾力,阿吉·艾米提. 维吾尔医常用草药(维吾尔

文)[M]. 乌鲁木齐:新疆人民卫生出版社,2004:695.

- [4] 杨明珠,田新雁,肖朝江,等. 核桃分心木化学成分与生物活性研究[J]. 天然产物研究与开发,2012,24:1707-1711.
- [5] 郑绯,赵庆国,凌海慧. 分心木化学成分及药理作用研究进展[J]. 首都医药,2014,21(16):16-17.
- [6] 张淑兰,王国军,唐辉,等. 高效液相色谱法测定核桃隔膜中黄酮苷的含量[J]. 中国医院药学杂志,2013,33(13):1107-1109.
- [7] 李橙橙,齐洁,杨永建. 分心木中总黄酮的提取工艺考察[J]. 中国药师,2010,13(3):369-370.
- [8] 丁洁,王爱霞,高志莹,等. HPLC测定艾蒿黄酮乳膏中槲皮素和柚皮素的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(16):86-88.
- [9] 金欣,王锋,姚岚,等. HPLC测定野老鹤草中没食子酸和鞣花酸的总量[J]. 中成药,2010,32(7):1172-1176.
- [10] 许良,谭晓杰,李清,等. RP-HPLC法测定蒙药森登-4汤中槲子苷、槲皮素和没食子酸的含量[J]. 沈阳药科大学学报,2007,24(3):151-153.
- [11] 王广娟,赵文. 树脂提纯五倍子中没食子酸的研究[J]. 食品工业科技,2010,31(5):234-237.
- [12] 景援朝,赵焕新,孙永丽,等. 分心木化学成分的研究[J]. 食品与药品,2015,17(2):87-89.
- [13] 毕肯·阿不得克里木,韩艳春,阿依吐伦斯马义. 核桃分心木化学成分的预实验研究[J]. 新疆医科大学学报,2010,33(9):1044-1046.