

高效液相色谱法测定水杉种子中芦丁的含量

牟新利¹, 付川¹, 吴汉夔², 文畅¹, 徐超¹, 欧容¹, 范深厚³ (1. 重庆三峡学院化学与环境工程学院, 重庆 404000; 2. 南京大学医药生物技术国家重点实验室, 江苏南京 210093; 3. 湖北省利川市水杉母树管理站, 湖北利川 445400)

摘要 以芦丁为标准物, 采用高效液相色谱法(HPLC)测定水杉种子中芦丁的含量。结果表明, 芦丁的线性检测范围为0.000 4~0.040 0 mg/ml, 加样回收率为99.6%, RSD为0.96%。

关键词 高效液相色谱; 水杉; 芦丁

中图分类号 O651.7² **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2009)24-11341-02

Determination on Rutin Content in Seed of *Metasequoia glyptostroboides* with High Performance Liquid Chromatography

MOU Xin-li et al (Chemistry and Environment Engineering Institute of Chongqing Three Gorges College, Wanzhou, Chongqing 404000)

Abstract With rutin as the standard substance, rutin content in seed of *Metasequoia glyptostroboides* was determined by high performance liquid chromatography (HPLC) method. The results showed that the linear detection range of rutin was 0.000 4-0.040 0 mg/ml, and its recovery was 99.6% with RSD of 0.96%.

Key words High performance liquid chromatography; *Metasequoia glyptostroboides*; Rutin

水杉(*Metasequoia glyptostroboides* Hu et Cheng)为我国特有的孑遗物种, 20世纪40年代, 作为“活化石”被发现于湖北利川^[1]。研究表明, 水杉叶片中含有丰富的黄酮和挥发油成分^[2-3], 其中水杉叶黄酮治疗在心血管疾病方面具有较好的疗效^[4-5]。据《中国中药资源志要》记载, 水杉叶、果实具有清热解毒、消炎止痛等功效^[6]。而关于水杉种子的研究较少, 笔者前期研究发现, 水杉种子中含有挥发油成分^[7]和丰富的黄酮, 为进一步研究开发利用水杉种子, 笔者以芦丁为标准物, 采用HPLC法对水杉种子中的芦丁含量进行了测定。

1 材料与方 法

1.1 材料与仪器 Shimadzu LC-20AT(日本岛津); SPD-20AUV-VIS型紫外-可见检测器(日本岛津); SUS混合器(日本岛津); DGU-20A3在线脱气机(日本岛津); LCsolution色谱工作站(日本岛津); JA1203N型电子天平(上海精密科学仪器有限公司); KQ-5200E型超声波清洗仪(巩义市英峪予华仪器厂)。芦丁对照品(美国Sigma公司, 批号113K0667); 甲醇(色谱纯, 天津市四有生物医学技术有限公司); 磷酸(分析纯); 三乙胺(分析纯); 水为超纯水。

1.2 方 法

1.2.1 色谱条件。 色谱柱为Shimpack VP-ODS-C₁₈(4.6 mm × 15 cm); 流动相为甲醇-0.5%磷酸(50:50, 用三乙胺调pH值至3.2); 检测波长为360 nm; 流速为1.0 ml/min; 柱温为室温。

1.2.2 线性关系考查。 准确称取芦丁对照品10 mg置于100 ml容量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 配成浓度为0.1 mg/ml的母液。取上述母液0.1、0.5、1、2.5、5、10 ml分别置于25 ml容量瓶中, 均用甲醇稀释至刻度。稀释后溶液的浓度分别为0.000 4、0.002 0、0.004 0、0.010 0、0.020 0、0.040 0 mg/ml。分别吸取以上6种不同浓度的芦丁对照品溶液进行分析, 进样量20 μl。以芦丁浓度(mg/ml)为横坐标x, 峰面

积为纵坐标y, 建立线性回归方程。

1.2.3 精密度试验。 吸取同一浓度芦丁对照品溶液, 重复进样5次(进样量20 μl), 测芦丁的峰面积, 计算RSD值。

1.2.4 样品测定。 将水杉种子烘干、粉碎后过80目筛, 准确称取3份各0.1 g水杉种子粉末移入锥形瓶中, 精确加入100 ml甲醇并超声提取30 min。然后用0.45 μm的微孔过滤器过滤入100 ml容量瓶中, 再用甲醇稀释至刻度, 得样品溶液。取20 μl样品注入高效液相色谱仪, 测定样品的峰面积, 计算水杉种子中芦丁的含量。

1.2.5 稳定性试验。 将样品按照“1.2.4”的方法制成样品溶液, 在室温下分别放置0、4、8、12、24 h, 进样量20 μl测峰面积, 计算RSD。

1.2.6 重复性试验。 称取5份水杉种子各0.1 g, 按照“1.2.4”的方法测定样品液的峰面积, 进样量20 μl, 计算RSD。

1.2.7 回收率试验。 称取6份已知芦丁含量为0.577 mg/g的水杉种子, 分别加入芦丁对照品母液0.6 ml(即0.06 mg芦丁), 按照“1.2.4”的步骤分析样品, 计算平均加样回收率。

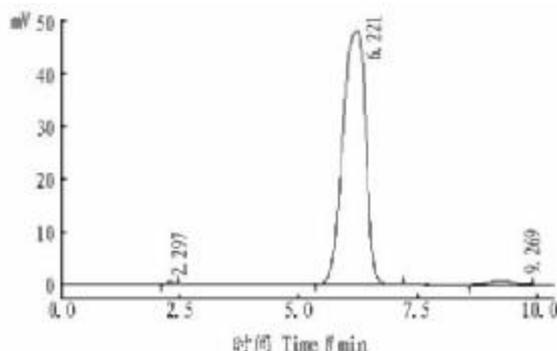


图1 芦丁的高效液相色谱

Fig.1 HPLC chromatograms of rutin

2 结果与分析

2.1 色谱图分析 图1为芦丁浓度为0.04 mg/ml时的高效液相色谱图, 6.221 min出现的峰为芦丁。图2为水杉种子的高效液相色谱图, 6.198 min出现的峰为芦丁。

2.2 线性关系分析 芦丁浓度与其峰面积的线性回归方程为: $y = 415\ 643\ 13x - 6\ 024$ ($R = 0.999\ 8$), 线性范围为0.000 4~0.040 0 mg/ml。

基金项目 重庆三峡学院青年基金项目(2007-sxxyqn-01)。

作者简介 牟新利(1979-), 男, 土家族, 湖北利川人, 硕士, 讲师, 从事制药工艺及过程控制研究。

收稿日期 2009-04-22

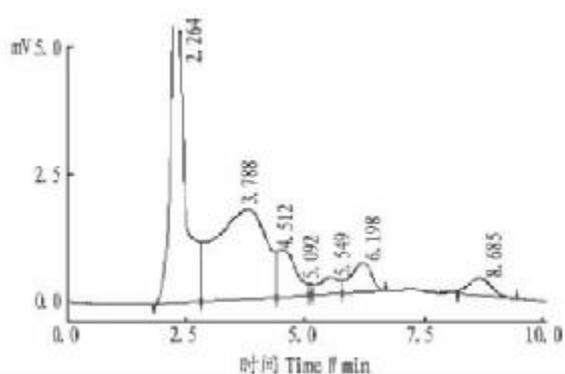


图2 水杉种子的高效液相色谱

Fig. 2 HPLC chromatograms of *Metasequoia glyptostroboides* seeds

2.3 精密度试验结果 5次测定样品峰面积的RSD为1.23%，说明仪器的精密度良好。

2.4 样品测定结果 由表1可知，水杉种子中芦丁的平均

含量为0.583 mg/g，3次测定结果的RSD为1.03%。

2.5 稳定性试验结果 样品在室温下分别放置0、4、8、12、24 h后测得其峰面积的RSD为0.97%，说明方法的稳定性较好。

2.6 重复性试验结果 多次测定样品峰面积的RSD为1.36%，说明试验结果具有可重复性。

表1 水杉种子中芦丁的含量

Table 1 Rutin content in *Metasequoia glyptostroboides* seeds

| 编号 | 芦丁含量//mg/g | 芦丁平均含量//mg/g | RSD//% |
|-----|---------------|------------------------|--------|
| No. | Rutin content | Average value of rutin | RSD//% |
| 1 | 0.577 | 0.583 | 1.03 |
| 2 | 0.589 | | |
| 3 | 0.584 | | |

2.7 回收率试验结果 由表2可知，芦丁的平均加样回收率为99.6%，RSD为0.96% (n=6)。

表2 芦丁回收率试验结果

Table 2 Recovery test of rutin

| 种子质量 | 样品中芦丁含量//mg | 芦丁加入量//mg | 测得芦丁总量//mg | 回收率//% | 平均回收率//% | RSD//% |
|--------------|------------------|-----------------|-----------------|----------|---------------|--------|
| g | Rutin content in | Adding amount | Measured total | Recovery | Average | |
| Seed quality | samples | amount of rutin | amount of rutin | rate | recovery rate | |
| 0.050 3 | 0.029 0 | 0.060 0 | 0.089 3 | 100.4 | 99.6 | 0.96 |
| 0.050 8 | 0.029 3 | 0.060 0 | 0.089 0 | 99.4 | | |
| 0.101 2 | 0.058 4 | 0.060 0 | 0.119 1 | 101.1 | | |
| 0.100 4 | 0.057 9 | 0.060 0 | 0.117 6 | 99.5 | | |
| 0.200 5 | 0.115 7 | 0.060 0 | 0.175 0 | 98.8 | | |
| 0.201 1 | 0.116 0 | 0.060 0 | 0.175 2 | 98.6 | | |

3 讨论

3.1 由于样品解离会导致色谱峰出现拖尾现象，在流动相中加入三乙胺(用磷酸调节pH值为3.2)能抑制拖尾，从而改善峰形，因此该试验以甲醇-0.5%磷酸(50:50，用三乙胺调pH值至3.2)为流动相。从标准品芦丁的液相色谱图来看，色谱峰对称，各成分分离效果较好。

3.2 芦丁有4个紫外吸收波段^[8]，其中360 nm波长处测得的色谱峰对称，干扰较少。研究表明，槲皮素在360 nm处有最大吸收峰^[9]，而芦丁中含有槲皮素结构。所以在360 nm处可准确检测样品中芦丁的含量。

3.3 该试验方法简便、快速、准确，可用于测定水杉种子中芦丁含量。

参考文献

[1] 王希群, 马履一, 郭保香, 等. 湖北利川水杉原生种群及其生境 1948 ~

2003 年间变化分析[J]. 生态学报, 2005, 25(5): 972-977.

[2] 龚复俊, 王有为, 王晔. 吸附法提取分离水杉总黄酮的研究[J]. 天然产物研究与开发, 2005, 17(4): 478-481.

[3] 宋二颖, 雷荣爱. 水杉叶挥发油成分分析[J]. 中药材, 1997, 20(10): 514-515.

[4] 田伟, 赵永青, 彭海平, 等. 水杉总黄酮对 IGF1 诱导的心肌成纤维细胞增殖和胶原合成的影响[J]. 中国中医基础医学杂志, 2006, 12(4): 286-288.

[5] 敖英, 刘惟亮, 屠治本, 等. 水杉总黄酮对高血脂症大鼠血小板聚集、释放功能及超微结构的影响[J]. 中国医院药学杂志, 2004, 24(11): 657-659.

[6] 中国药材公司. 中国中药资源志要[M]. 北京: 科学出版社, 1994: 149.

[7] MOU X L, FU C, WU H K, et al. Composition of essential oil from seeds of *Metasequoia glyptostroboides* growing in China [J]. Chemistry of Natural Compounds, 2007, 43(3): 334-335.

[8] 北京医学院, 北京中医学院. 中草药成分化学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1980: 276-276.

[9] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典一部[S]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 220-221.

科技论文写作规范——文内标题

文章内标题力求简短，一般不超过30字，标题内尽量不用标点符号。标题顶格书写，文内标题层次不宜过多，一般为3~4级，分别以1; 1.1; 1.1.1; 1.1.1.1方式表示。