

核桃仁的定性定量鉴别方法

张雪, 徐佳佳, 潘英妮, 齐文, 庞俊竹, 刘晓秋*

(沈阳药科大学中药学院, 沈阳 110016)

[摘要] 目的: 建立核桃仁 TLC 鉴别和 HPLC 含量测定方法。方法: 采用 TLC 法对核桃仁中 glansreginin A 进行定性鉴别并采用 HPLC 法对其进行含量测定。Diamonsil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 200 mm, 5 μm), 流速 0.8 mL·min⁻¹, 检测波长 265 nm, 流动相乙腈-1% 冰醋酸, 梯度洗脱。结果: 在 TLC 鉴别中, glansreginin A 斑点清晰、分离效果好; 在 HPLC 测定中, glansreginin A 在 24.26 ~ 242.6 mg·L⁻¹ 线性关系良好, 平均回收率为 96.4% (RSD 2.7%)。结论: 所建立的 TLC 和 HPLC 法操作简便、专属性强且重复性好, 可作为核桃仁定性、定量的质量控制方法。

[关键词] 核桃仁; 薄层色谱; 高效液相色谱; glansreginin A

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)04-0062-03

[doi] 10.11653/syfyj2014040062

Identification of TLC and Determination of HPLC on Juglandis Semen

ZHANG Xue, XU Jia-jia, PAN Ying-ni, QI Wen, PANG Jun-zhu, LIU Xiao-qiu*

(School of Traditional Chinese Materia Medica, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

[Abstract] **Objective:** To establish the methods of identification of TLC and determination of HPLC in the Juglandis Semen. **Method:** Glansreginin A in Juglandis Semen was identified by TLC method and the content was determined by HPLC method. The chromatographic column was Diamonsil C₁₈ (4.6 mm × 200 mm, 5 μm). The flow rate was 0.8 mL·min⁻¹, the detection wavelength was set at 265 nm. A gradient elution of acetonitrile-water containing 1% acetic acid was used. **Result:** The TLC method had high sensitivity and showed clear spots of glansreginin A; the glansreginin A showed a good linearity within the range of 24.26-242.6 mg·L⁻¹, and the average recovery rate was 96.4% (RSD 2.7%). **Conclusion:** The methods are simple, reliable and repeatable. They can be used for the quality control of Juglandis Semen.

[Key words] Juglandis Semen; TLC; HPLC; glansreginin A

核桃仁为胡桃科植物胡桃的成熟种子, 又名胡桃肉。其性温味甘, 归肾、肺、大肠经, 具有补肾、温肺、润肠的功效^[1]。核桃仁中主要含有油脂、蛋白质、酚酸、黄酮、鞣质、有机酸等成分, 药理研究表明具有抗氧化、抗癌、降低胆固醇、预防心脏疾病发生等作用^[2-10]。《中国药典》2010年版(一部)中收载

了核桃仁的性状、显微鉴别及检查水分、酸败度、羰基值和过氧化值等项, 目前尚无对核桃仁进行质量控制的指标和方法, 关于核桃仁质量控制的文献也未见报道。本课题组在对核桃仁中的化学成分进行研究时, 分离得到核桃仁中的主要指标性成分 glansreginin A; 并以 glansreginin A 为对照品, 建立了核桃仁的 TLC 鉴别方法, 采用 HPLC 对其含量进行测定。

1 材料

LC-20AB 型高效液相色谱仪(日本岛津公司, SPD-20A UV-VIS 检测器, LC-Solution 色谱工作站)、ZF-1 型三用紫外分析仪(上海精科实业有限公司)、SG3200H 型超声波清洗器(上海冠特超声仪器有限公司)、TB-25 型分析天平(北京丹佛仪器有限公司)

[收稿日期] 20130416(004)

[基金项目] 国家药典委员会质量标准研究项目(YD-106)

[第一作者] 张雪, 在读硕士, 从事中药质量标准研究, Tel: 024-23986469, E-mail: vrs999777@sina.com

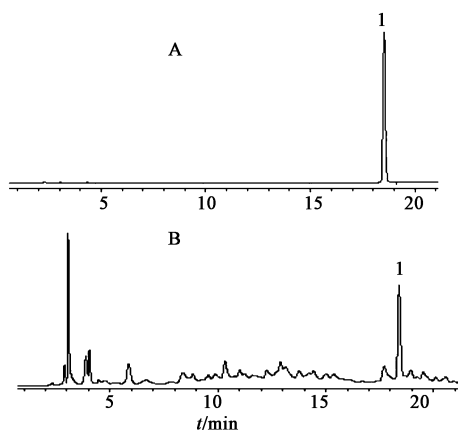
[通讯作者] * 刘晓秋, 博士, 教授, 从事中药药效物质基础及中药新药的研究与开发, Tel: 024-23986469, E-mail: liuxiaoqiu3388@126.com

司)。核桃仁样品(取核桃果实剥去外壳,并于阴凉处通风阴干,取核桃仁粉碎过 20 目筛,装入封口袋,保存于 4 ℃,备用),13 批样品经沈阳药科大学刘晓秋教授鉴定为 *Juglans regia* L. 的成熟种子; glansreginins A 对照品(本课题组自制,通过 3 个 TLC 不同溶剂系统展开均为一个斑点, HPLC 鉴定其纯度 > 98%)。硅胶 GF₂₅₄(本课题组自制,青岛海洋化工厂),乙腈(色谱纯,天津康科德科技有限公司),娃哈哈纯净水(杭州娃哈哈集团有限公司),二氯甲烷、甲醇(分析纯,天津市博迪化工股份有限公司),甲酸(分析纯,天津市大茂化学试剂厂)。

2 方法与结果

2.1 HPLC 测定 glansreginins A 的含量

2.1.1 色谱条件 Diamonsil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 200 mm, 5 μm),流动相乙腈(A)-1.0%冰醋酸溶液(B),梯度洗脱(0~5 min, 90%~78% B; 5~10 min, 78%~77% B; 10~20 min, 77%~40% B),流速 0.8 mL·min⁻¹,检测波长 265 nm,进样量 20 μL。色谱图见图 1。



A. 对照品; B. 样品; 1. glansreginins A

图 1 核桃仁样品的 HPLC

2.1.2 对照品溶液的制备 精密称取 glansreginins A 对照品 24.26 mg, 置 10 mL 量瓶中, 加 60% 甲醇使溶解至刻度, 摇匀, 制成 2.426 g·L⁻¹ 的对照品溶液, 即得。

2.1.3 供试品溶液的制备 取核桃仁样品(No. 9) 2.0 g, 加石油醚 50 mL, 加热回流提取 1 h, 滤过, 弃去石油醚液, 药渣挥干, 加 60% 甲醇 50 mL, 密塞, 称定质量。超声处理 45 min, 放冷, 再称定质量, 用 60% 甲醇补足减失的质量, 以 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

2.1.4 线性关系考察 分别精密吸取对照品溶液 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mL 至 10 mL 量瓶中, 加

60% 甲醇至刻度, 制成系列对照品溶液。分别吸取 20 μL, 注入高效液相色谱仪, 以测得的峰面积(Y)为纵坐标, 以对照品质量浓度(mg·L⁻¹)为横坐标(X), 绘制标准曲线, glansreginins A 的回归方程为 $Y = 2.051 \times 10^4 X + 8.756 \times 10^3$ ($r = 0.9997$), 表明 glansreginins A 在 24.26~242.6 mg·L⁻¹ 线性关系良好。

2.1.5 精密度试验 取 2.1.4 项下对照品溶液(glansreginins A 97.04 mg·L⁻¹), 按照 2.1.1 项下色谱条件连续进样 6 次, 计算 glansreginins A 峰面积的 RSD 0.9%, 表明精密度良好。

2.1.6 重复性试验 取核桃仁样品(No. 9) 6 份, 按照 2.1.3 项下方法制备供试品溶液, 并按 2.1.1 项下色谱条件进行测定, 记录色谱图并计算含量, glansreginins A 含量的 RSD 1.9%。表明方法重复性良好。

2.1.7 稳定性试验 精密吸取同一供试品溶液(No. 9), 按 2.1.1 项下色谱条件, 分别在制备后 0, 2, 4, 6, 8 h 进行测定, 记录色谱图, 按峰面积计算 glansreginins A 峰面积的 RSD 2.1%。表明供试液制备后 8 h 内, 稳定性良好。

2.1.8 加样回收率试验 精密称取核桃仁样品(No. 9) 6 份, 每份 1.0 g, 分别精密加对照品溶液 1.1 mL, 按 2.1.3 项下方法制备供试品溶液, 按 2.1.1 项下色谱条件, 依法测定, 计算回收率, 结果见表 1。

表 1 核桃仁样品中 glansreginins A 加样回收率试验

样品中含量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
2.705	5.192	93.2		
2.705	5.227	94.5		
2.707	5.269	96.0		
2.704	5.365	99.7	96.4	2.7
2.703	5.351	99.2		
2.707	5.264	95.8		

注: 加入量均为 2.669 mg。

2.1.9 样品测定 取核桃仁样品, 按 2.1.3 项下方法制备供试品溶液, 在 2.1.1 色谱条件下测定, 计算各样品中 glansreginins A 的含量, 结果表明 13 批样品中, 不同产地核桃仁中 glansreginins A 含量有一定差异但相差不大, 新疆阿克苏温宿县的 glansreginins A 含量最高为 0.48%, 云南彝良县的 glansreginins A 含量最低为 0.21%, glansreginins A 的平均含量为 0.31%。结果见表 2。

表2 核桃仁样品中 glansreginin A 的含量 %

No. 来源	glansreginin A	No. 来源	glansreginin A
1 云南彝良县	0.21	8 黑龙江哈尔滨市	0.29
2 云南大关县	0.27	9 新疆喀什地区	0.27
3 云南临沧市	0.31	10 新疆阿克苏温宿县	0.48
4 云南盐津县	0.30	11 新疆阿克苏地区	0.30
5 天津市	0.23	12 辽宁沈阳市	0.25
6 山东沾化县	0.45	13 浙江临安市	0.31
7 山西左权县	0.30	平均值	0.31

2.2 薄层色谱鉴别

2.2.1 对照品溶液和供试品溶液的制备 取 glansreginin A 对照品适量,精密称定,加甲醇制成每 1 mL 含 1.0 mg 的对照品溶液。取 2.1.2 项下供试品溶液 25 mL,蒸干,残渣加甲醇 2 mL 使溶解,作为供试品溶液。

2.2.2 色谱条件及鉴定 吸取 glansreginin A 对照品溶液和供试品溶液各 2 μL,分别点于同一硅胶 GF₂₅₄ 薄层板,以二氯甲烷-甲醇-甲酸(5:1:0.1)为展开剂,展开,取出,晾干,置于紫外灯(254 nm)下观察。供试品色谱中,在与对照品色谱的相应位置上显相同颜色的暗斑。

3 讨论

Anita Solar 等采用光二极管矩阵检测器-高效液相色谱法对核桃果实(包括外果皮)中成分进行了分析,表明含有类黄酮(包括儿茶素和杨梅树皮素)、酚酸(包括香草酸、丁香酸、鞣花酸、绿原酸)和苯醌(包括胡桃醌和 1,4-萘醌)^[5]。本课题组在对核桃仁中的成分进行 HPLC-DAD 检测时发现,核桃仁中主要的色谱峰未能指认,经分离鉴定,确定该成分为 glansreginin A^[11],在对不同产地核桃仁进行检测时发现,glansreginin A 是核桃仁中特有成分,含量高且稳定,专属性强,故选择 glansreginin A 作为指标性成分对核桃仁进行鉴别和含量测定。

HPLC 测定全国不同产地的核桃仁中 glansreginin A 的含量,结果表明 glansreginin A 在核桃仁中的含量较均衡、稳定,建议《中国药典》标

准中规定核桃仁中 glansreginin A 的含量。

本文考察了不同浓度的甲醇和乙醇对 glansreginin A 的溶解程度,结果显示,用 60% 甲醇提取时,提取效率高且杂质少,故选择 60% 甲醇作为提取溶剂。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社, 2010:262.

[2] 郑敏燕,魏永生,耿薇. 利用气相色谱/质谱联合技术研究核桃仁油脂脂肪酸组成[J]. 沈阳师范学院学报, 2006, 21(4):26.

[3] Anderson K J, Teuber S S, Gobeille A, et al. Walnut polyphenolics inhibit *in vitro* human plasma and LDL oxidation [J]. Nutr, 2001, 131(11):2837.

[4] Toshiyuki F, Hideyuki I, Takashi Y. Antioxidative polyphenols from walnuts (*Juglans regia* L.) [J]. Phytochem, 2003, 63(7):795.

[5] Hudina M, Štampar F, Solar A, et al. Phenolic content of walnut fruit as affected by cultivar and developmental stage [C]. V International Walnut Symposium 705, 2004:231.

[6] 孟洁,杭瑚. 核桃仁活性成分的提取及体外抗氧化活性研究[J]. 食品科学, 2001, 22(12):44.

[7] 胡博路,杭瑚. 核桃清除活性氧自由基的研究[J]. 中草药, 2002, 33(3):227.

[8] 邱金东,汤昆. DPPH 和 ABTS 法测定核桃仁的体外抗氧化活性[J]. 中成药, 2008, 30(8):1215.

[9] 司高. 核桃仁醇提物抑制癌细胞生长的实验研究[J]. 中医研究, 2011, 24(1):19.

[10] Reiter R J, Manchester L C, Tan D. Melatonin in walnuts: influence on levels of melatonin and total antioxidant capacity of blood [J]. Nutr, 2005, 21(9):920.

[11] Ito H, Okuda T, Fukuda T, et al. Two novel dicarboxylic acid derivatives and a new dimeric hydrolyzable tannin from walnuts [J]. J Agric Food Chem, 2007, 55(3):672.

[责任编辑 顾雪竹]