

芸香苷纯度标准物质研究

杨昆¹, 杨健¹, 王宏洁², 边宝林^{2*}

(1. 天津医科大学, 天津 300070; 2. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700)

[摘要] 目的: 研制传统中药中活性成分芸香苷的纯度标准物质, 并建立有效的定值方法。方法: 依据国家计量技术规范和其它相关技术规范, 制备芸香苷纯度标准物质, 采用高效液相色谱(HPLC)法进行均匀性检验与稳定性考察; 采用面积归一化法确定芸香苷的纯度。结果: 研制的芸香苷纯度标准物质符合国家有证标准物质要求, 标准值与不确定度评估值为(99.79 ± 0.3)% (k=2), 并获得国家二级标准物质证书。结论: 为芸香苷的分析检测提供了可靠的量值溯源保证, 应用前景非常广泛。

[关键词] 芸香苷; 纯度标准物质; 高效液相色谱法

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2011)21-0127-03

中药化学标准物质的研制是中药标准化、现代化、国际化规范建立的关键, 是制定中药材、中药提取物、中药饮片、中药配方颗粒、中成药质量标准必不可少的物质基础, 是发挥中药药效作用的是中药中存在的有效物质基础。芦丁(rutin)又叫芸香苷、维生素 P、紫槲皮苷, 为黄酮类化合物, 是槲皮素(quercetin)的 3-O-芸香糖苷。芦丁及其衍生物具有广泛的药理活性, 临床用于防治脑溢血、高血压等心脑血管疾病及视网膜出血。在医药上一直作为治疗心脑血管系统等疾病的辅助药物和营养增补剂。由于它对人体没有毒性, 因此在食品工业上还可作为抗氧化剂和天然食用黄色素使用。

芦丁主要存在于芸香科植物芸香 *Ruta graveolens* L 全草挥发油, 豆科植物槐 *Sophora japonica* L 的花蕾(槐米)和果实(槐角), 金丝桃科植物红呈莲 *Hypericum ascyron* L 全草及蓼科植物荞麦 *Fagopyrum esculentum* Moench 籽苗中。但在我国及国际上还没有关于芸香苷的纯度标准物质。本文研制的芸香苷纯度标准物质获得了国家二级标准物质证书, 填补了国内外相关标准物质的空白。

1 材料

甲醇为 Fisher HPLC Grade, 纯水为娃哈哈纯净

水, 液相色谱仪为安捷伦 HP-1100。药材为豆科植物槐 *Sophora japonica* L 的花蕾(市售槐米)。乙醇为卫生酒精。冰醋酸为分析纯。

2 实验部分

2.1 芸香苷的制备方法 青槐米粉碎, 加入 12 倍量的 50% 乙醇加热回流 1 h, 滤过, 残渣加 8 倍量 50% 乙醇, 加热回流 1 h。滤过, 残渣弃, 合并滤液, 浓缩至无醇味, 冷藏放置 24 h, 抽滤, 沉淀部分干燥, 得芸香苷粗品。芸香苷粗品经多次酸性甲醇重结晶后, 得芸香苷纯品(含量 97% ~ 98%), 上 ODS 柱(75 ~ 100 目)纯化。3 g 芸香苷纯品, 加甲醇加热溶解(溶解度 3 g 芸香苷粗品/10 mL 甲醇)。然后加入 30% 的水。上 300 g 的 ODS 柱。用 30% 的甲醇洗脱, 收集洗脱液, 每份 50 mL, HPLC 检查, 合并洗脱液, 减压浓缩、干燥, 得芸香苷标准物质候选物。

2.2 芸香苷的结构确证 分子式: C₂₇H₃₀O₁₆, 分子量: 610.51, 浅黄色粉末, 熔点: 176 ~ 178℃, UV: λ_{max}^{CH₃OH} nm: 258, 361。IR: ν_{max}^{KBr}: 3 385 (OH), 1 656 (C=O), 1 607, 1 507, 1 449 (C₆H₅-)。MS: m/z: 611.51 [M⁺], NMR: (缺)¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD), δ(ppm): 7.20 ~ 7.35 (5H, m, 芳环质子), 4.97 (1H, d, J = 3.6, H-3), 3.40 (1H, m, H-2), 2.61 (3H, s, N-CH₃), 0.98 (3H, d, J = 6.6, H-1), ¹³C-NMR (400 MHz, CD₃OD), δ(ppm): 12.36 (C-1), 62.54 (C-2), 74.13 (C-3), 140.98 (C-1'), 128.72 (C-2', 6'), 131.44 (C-3', 5'), 131.09 (C-4'), 33.31 (N-CH₃)。结构式见图 1。

2.3 芸香苷的纯度检查 纯度检查采用 HPLC-

[收稿日期] 2011-09-14

[基金项目] 国家科技基础平台项目(2004DEA1016)

[第一作者] 杨昆, 副研究员, 从事化学, Tel: 022-23542626, E-mail: tijmu@tijmu.edu.cn

[通讯作者] * 边宝林, 研究员, 从事中药化学, Tel: 010-64021008, E-mail: bianbaolin9@yahoo.com.cn

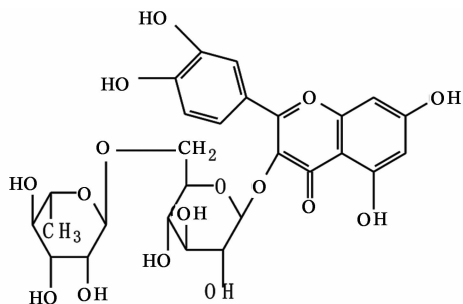


图 1 芸香苷结构图

ELSD 方法,测定条件为色谱柱为 ODS-C₁₈ (4.6 mm × 250 mm),流动相为甲醇-水-冰醋酸 (37:62:1),流速为 1 mL·min⁻¹,柱温为 35 °C。测定结果未见其他杂质峰。见图 2。

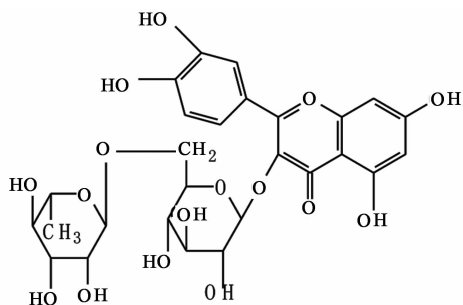


图 2 芸香苷 HPLC

2.4 芸香苷定值方法研究 芸香苷为黄酮类化合物,在 257 nm 波长处有明显的紫外吸收,因此,我们通过高效液相法测定条件的选择、样品的处理、精密密度、重现性以及稳定性试验,最终采用高效液相紫外检测的方法,测定芸香苷的含量。

2.4.1 液相条件 色谱柱为 ODS-C₁₈ 4.6 × 250 mm,流动相为甲醇-水-冰醋酸 (33:66:1),流速为 1 mL·min⁻¹,波长为 257 nm,柱温为 35 °C。

2.4.2 样品的配置与测定 精密称取芸香苷 1 mg,甲醇溶解,定容于 10 mL 量瓶,即为供试品溶液。精密吸取 10 μL,注入高效液相。

2.4.3 精密密度考察 精密称取芸香苷 (样品 LD-1) 1 mg,甲醇溶解,定容于 10 mL 量瓶,即为供试品溶液。精密吸取 10 μL,注入高效液相。结果见表 1。

表 1 芸香苷精密密度测定 %

测定值	均值	标准差	相对标准偏差
99.823			
99.824			
99.782	99.808	0.021	0.021
99.787			
99.823			

2.4.4 重复性考察 分别精密称取芸香苷 1 mg 5 分,甲醇溶解,定容于 10 mL 容量瓶,即为供试品溶液。精密吸取 10 μL,注入高效液相。结果见表 2。

表 2 芸香苷重现性测定

样品编号	测定值(相对百分含量)			均值/%	标准差	相对标准偏差%
	1	2	3			
LD-1	99.816	99.816	99.799			
LD-2	99.808	99.798	99.800			
LD-3	99.811	99.809	99.803	99.924	0.009	0.009
LD-4	99.792	99.839	99.833			
LD-5	99.778	99.786	99.822			

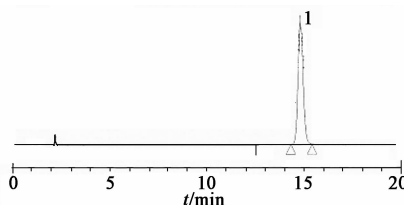


图 3 芸香苷高效液相色谱图

2.4.5 稳定性考察 对分装后的标准物质,在室温、干燥和避光的条件下保存。在放置第 1 个月、第 2 个月和第 3 个月末时,采用高效液相色谱法进行检查。结果见表 3。

表 3 芸香苷稳定性测定

样品号	0 月	1 月	2 月	3 月
1	99.803	99.767	99.813	99.787
2	99.803	99.750	99.807	99.779
3	99.802	99.787	99.733	99.804
平均值	99.803	99.768	99.784	99.790

采用平均值一致性检验法评价标准物质的稳定性,结果表明芸香苷标准物质在 3 个月的时间内纯度值无显著性变化,在 3 个月内稳定。

2.5 芸香苷标准物质均匀性

2.5.1 瓶间均匀性考察 从 400 瓶中随机抽取 15 个样品,称去约 1 mg,置于 10 mL 量瓶中,用流动相溶解,定容。过 0.45 μm 的膜。进样 10 μL。采用方差分析法进行标准物质均匀性统计检验。通过组间方差和组内方差的比较判断各组测量值之间有无系统误差。瓶间均匀性检验见表 4。

2.5.2 瓶内均匀性考察 于同一样品瓶中,分别称去约 1 mg,置于 10 mL 量瓶中,用流动相溶解,定容。过 0.45 μm 的膜。进样 10 μL。瓶内均匀性结果见表 5。瓶内、瓶间均匀性比较见表 6。

表 4 瓶间均匀性检验 %

No.	含量			平均值
	1	2	3	
LDJ-1	99.803	99.799	99.808	99.803
LDJ-2	99.798	99.803	99.809	99.803
LDJ-3	99.800	99.799	99.807	99.802
LDJ-4	99.801	99.918	99.800	99.806
LDJ-5	99.803	99.808	99.804	99.805
LDJ-6	99.806	99.823	99.809	99.813
LDJ-7	99.802	99.803	99.801	99.802
LDJ-8	99.822	99.804	99.803	99.810
LDJ-9	99.804	99.803	99.820	99.809
LDJ-10	99.811	99.815	99.812	99.813
LDJ-11	99.801	99.799	99.804	99.801
LDJ-12	99.812	99.799	99.824	99.812
LDJ-13	99.807	99.803	99.785	99.798
LDJ-14	99.797	99.798	99.807	99.801
LDJ-15	99.806	99.788	99.803	99.799

表 5 瓶内均匀性检验 %

样品号	含量			平均值
	1	2	3	
LDN-1	99.799	99.797	99.792	99.796
LDN-2	99.806	99.799	99.813	99.806
LDN-3	99.795	99.800	99.808	99.801
LDN-4	99.803	99.804	99.799	99.802
LDN-5	99.801	99.817	99.808	99.809
LDN-6	99.802	99.815	99.804	99.807
LDN-7	99.803	99.796	99.804	99.801
LDN-8	99.818	99.799	99.796	99.804
LDN-9	99.816	99.798	99.798	99.804
LDN-10	99.797	99.799	99.789	99.795

表 6 芸香苷瓶间和瓶内均匀性

项目类别	Q1	Q2	F 值	$F_{0.05}$ (查表)	结论
芸香苷瓶间均匀性	0.001 086	0.001 794	1.3	2.04	均匀
芸香苷瓶内均匀性	0.000 555	0.001 046	1.18	2.39	均匀

瓶间: $V_1 = 14$ $V_2 = 30$ $N = 45$

瓶内: $V_1 = 9$ $V_2 = 20$ $N = 30$

2.6 芸香苷定值与不确定度

2.6.1 液相条件 色谱柱为 ODS- C_{18} (4.6 mm × 250 mm), 流动相为甲醇-水-冰醋酸 (33:66:1), 流速为 $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 波长为 257 nm, 柱温为 35 °C。

2.6.2 样品的配置与测定 精密称取芸香苷 1 mg, 甲醇溶解, 定容于 10 mL 量瓶, 即为供试品溶液。精密吸取 10 μl , 注入高效液相。八家实验室定值数据见表 7。

标准物质的不确定度来源于四个部分: 首先是定值分析过程产生的不确定度, 可通过测试数列用

表 7 8 家实验室定值数据

样品号	Lab1	Lab2	Lab3	Lab4	Lab5	Lab6	Lab7	Lab8
1	99.82	99.88	99.80	99.75	99.78	99.78	99.94	99.69
2	99.81	99.85	99.80	99.82	99.74	99.80	99.80	99.64
3	99.84	99.86	99.80	99.81	99.76	99.80	99.92	99.54
4	99.81	99.87	99.81	99.75	99.74	99.81	99.91	99.63
5	99.82	99.86	99.80	99.79	99.75	99.81	99.81	99.69
6	99.84	99.87	99.81	99.82	99.77	99.79	99.69	99.57
平均值	99.82	99.86	99.81	99.79	99.76	99.80	99.85	99.63
RSD	0.014	0.011	0.005	0.033	0.016	0.012	0.096	0.062
总平均值	99.79							
均值方差	6.5×10^{-8}							

贝塞尔法求出标准偏差。其次是标准物质的不均匀产生的不确定度。再有是高效液相色谱定值方法中由于主成分和杂质成分的紫外吸收响应因子不同带来的不确定度。最后是标准物质特性量值的不稳定性所引起的不确定度。

芸香苷标准物质不确定度的分析见表 8。

表 8 芸香苷标准物质不确定度分析

不确定度贡献	不确定度分量
多家测量均值的标准偏差	1.4×10^{-4}
对测量影响因素的标准偏差	7.27×10^{-4}
不均匀性标准偏差	忽略
不稳定性标准偏差	忽略
合成不确定度	0.001 5
扩展不确定度 ($K = 2$)	0.003

3 总结

芸香苷纯度标准物质是国内外首批推出芸香苷纯度标准物质, 填补了国内外相关标准物质的空白。其由多家实验室应用高效液相色谱法对芸香苷标准物质的纯度进行了准确的定值。标准值与不确定度评估值为 $99.79\% \pm 0.3\%$ ($k = 2$), 它的扩展不确定度 ($k = 2$) 为 0.15%, 且均匀性良好。可应用于保健品和药物分析等领域, 为芸香苷的分析检测提供了可靠的量值溯源保证, 应用前景非常广泛。

[参考文献]

- [1] JJG1006-94, 中华人民共和国国家计量技术规范[S].
- [2] 金浩, 韩永志主编. 标准物质及其应用技术[M]. 2 版. 北京: 中国标准出版社, 2003: 45.
- [3] 中国实验室国家认可委员会编. 化学分析中不确定度的评估指南[M]. 北京: 中国计量出版社, 2002: 50.

[责任编辑 蔡仲德]