

雪松松针中总黄酮及4种指标成分的含量测定方法研究[△]

胡鹏斌^{1*}, 韩涛¹, 刘东彦², 石晓峰^{1,2#}, 李师¹, 宁红霞¹(1. 甘肃中医学院, 兰州 730030; 2. 甘肃省医学科学院, 兰州 730050)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)03-0381-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.03.29

摘要 目的:建立测定雪松松针中总黄酮及杨梅素、槲皮素、山柰酚和异鼠李素含量的方法。方法:采用紫外分光光度法,以芦丁为对照品,以硝酸铝[Al(NO₃)₃]显色,在510 nm处测定雪松松针中总黄酮的含量。采用高效液相色谱法同时测定雪松松针中杨梅素、槲皮素、山柰酚和异鼠李素的含量。色谱柱为Agilent TC-C₁₈,流动相为乙腈-0.1%磷酸水溶液(梯度洗脱),流速为1.0 ml/min,检测波长为360 nm,柱温为30 °C,进样量为20 μl。结果:芦丁的含量在45.8~549 μg范围内与吸光度呈良好线性关系($r=0.9993$);平均加样回收率为97.65%,RSD=1.37%(n=6)。杨梅素、槲皮素、异鼠李素的质量浓度在1~10 μg/ml、山柰酚的质量浓度在4~40 μg/ml范围内与各自峰面积积分值呈良好线性关系($r\geq0.9992$),平均加样回收率分别为100.11%、97.63%、100.46%、102.11%,RSD分别为1.35%、1.49%、1.56%、1.51%(n=6)。雪松松针样品中总黄酮、杨梅素、槲皮素、山柰酚和异鼠李素的平均含量分别为81.9、0.229、0.503、0.843、0.297 mg/g。结论:本方法简便、准确、重复性好,可作为雪松松针中黄酮类物质的含量测定方法。

关键词 雪松;松针;总黄酮;杨梅素;槲皮素;山柰酚;异鼠李素;含量测定;紫外分光光度法;高效液相色谱法

Content Determination Method of Total Flavonoids and 4 Maker Compounds in Pine Needles of *Cedrus deodara*

HU Peng-bin¹, HAN Tao¹, LIU Dong-yan², SHI Xiao-feng^{1,2}, LI Shi¹, NING Hong-xia¹(1. Gansu College of TCM, Lanzhou 730030, China; 2. Gansu Academy of Medical Science, Lanzhou 730050, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the method for the content determination of total flavonoids and myricetin, quercetin, campherol and isorhamnetin in pine needles of *Cedrus deodara*. METHODS: Using rutin as control, the content of total flavonoids in pine needles of *C. deodara* was determined by UV spectrometry. The contents of myricetin, quercetin, campherol and isorhamnetin in *C. deodara* were determined by HPLC. The determination was performed on TC-C₁₈ column with mobile phase consisted of acetonitrile-0.1% phosphoric acid solution (gradient elution) at the flow rate of 1.0 ml/min. The detection wavelength was set at 360 nm, and column temperature was 30 °C. The sample size was 20 μl. RESULTS: The linear range was 45.8~549 μg for rutin($r=0.9993$) with an average recovery of 97.65% (RSD=1.37%, n=6). The linear range were 1~10 μg/ml for myricetin, quercetin and isorhamnetin, and 4~40 μg/ml for kaempferol ($r\geq0.9992$). The average recoveries of 4 maker compounds were 100.11% (RSD=1.35%), 97.63% (RSD=1.49%), 100.46% (RSD=1.56%) and 102.11% (RSD=1.51%), respectively (n=6). The total flavonoids and 4 maker compounds in pine needles of *C. deodara* were 81.9 mg/g, 0.229 mg/g, 0.503 mg/g, 0.843 mg/g and 0.297 mg/g, respectively. CONCLUSIONS: The method is simple, accurate and reproducible. It can be used for content determination of flavonoids in the pine needles of *C. deodara*.

KEYWORDS *Cedrus deodara*; Pine needles; Total flavonoids; Myricetin; Quercetin; Campherol; Isorhamnetin; Content determination; UV spectrometry; HPLC

雪松 *Cedrus deodara* (Roxb.) 是松科雪松属 *C. Trew* 树种的泛称, 包括雪松 *C. deodara* Loud、黎巴嫩雪松 *C. libani* Loud、短叶雪松 *C. brevifolia* Manetti 和北非雪松 *C. atlantica* Henry, 其针叶药用历史悠久, 具有抗肿瘤、抗氧化、改善记忆、抗菌等多种功效, 其含有的主要化学成分为黄酮类、苯丙素类、有机酸类、三萜类、甾体类、多糖及针叶胶等^[1]。其中, 黄酮类化合物主要为杨梅素、槲皮素、山柰酚、异鼠李素及其苷类^[2~5]。本研究采用紫外分光光度(UV)法和高效液相色谱(HPLC)法, 建立了雪松松针中总黄酮及4种指标性成分(梅素、槲皮素、山

柰酚和异鼠李素)含量测定的方法, 以为开发利用雪松松针提供参考。

1 材料

1.1 仪器

1100型HPLC仪, 配备四元梯度泵、可变波长扫描紫外检测器、1100型化学工作站和标准手动进样器(美国安捷伦公司); UV-240型UV计(日本岛津公司); SK3310LHC型超声波清洗器(上海科导超声仪器有限公司); AE260万分之一分析天平(瑞士梅特勒-托利多公司); KCW-1型远红外快速干燥箱(江苏省南通县金余电器配件厂)。

1.2 试剂

芦丁对照品(批号:100080-200306, 纯度:91.7%)、槲皮素对照品(批号:100081-200907, 纯度:96.5%)、山柰酚对照品(批号:110861-200808, 纯度:95.9%)和异鼠李素对照品(批

* 基金项目: 甘肃省科技支撑计划项目(No.1204FKCA152)

* 硕士。研究方向: 中药及复方的临床应用。E-mail: pengbin-hu@163.com

通信作者: 教授。研究方向: 中药化学成分分离分析。电话: 0931-2302644。E-mail: shixiaofeng2005@sina.com

号:110860-200608)均购自中国食品药品检定研究院;杨梅素对照品(批号:100504,纯度>98%)购自上海融禾医药科技有限公司;甲醇、乙腈为色谱纯,水为重蒸水,其余试剂均为分析纯。

1.3 药材

雪松松针于2012年6月采自甘肃省兰州市,原植物标本经甘肃省医学科学研究院何福江研究员鉴定为雪松属植物雪松 *C. deodara*(Roxb.)的针叶。

2 方法与结果

2.1 总黄酮的含量测定

2.1.1 对照品溶液的制备 精密称取芦丁对照品10.02 mg,加40%乙醇溶解并定容至50 ml量瓶中,摇匀,制成每1 ml含0.184 mg的芦丁对照品溶液。

2.1.2 供试品溶液的制备 取雪松松针适量,粉碎,精密称取松针粉末(过60目筛)1.00 g,置圆底烧瓶中,加40%乙醇40 ml,于90 °C水浴回流提取2次(第1次2 h,第2次1 h);合并2次提取液,滤过,用40%乙醇定容至100 ml,摇匀,即得。溶液于4 °C冷藏备用。

2.1.3 线性关系考察 分别精密量取上述芦丁对照品溶液0、0.25、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 ml,分别置于10 ml具塞比色管中,依次加入40%乙醇溶液至5 ml,摇匀,加5%亚硝酸钠(NaNO_2)溶液0.3 ml,摇匀,静置6 min;再加入10%硝酸铝[$\text{Al}(\text{NO}_3)_3$]溶液0.3 ml,摇匀,静置6 min;最后加4%氢氧化钠(NaOH)溶液4 ml,用40%乙醇定容至刻度,摇匀,静置15 min。以40%乙醇为空白,在510 nm波长处测定吸光度(A)。以芦丁含量($x, \mu\text{g}$)为横坐标、吸光度(y, A)为纵坐标,绘制标准曲线,得芦丁的回归方程为 $y=0.0012x+0.0048$ ($r=0.9993$)。结果表明,芦丁含量在45.8~549 μg 范围内与 A 呈良好线性关系。

2.1.4 精密度试验 精密吸取“2.1.1”项下对照品溶液适量,共6份,每份1.0 ml,按“2.1.3”项下方法测定。结果,芦丁对照品溶液吸光度的RSD为0.42%,表明仪器精密度良好。

2.1.5 稳定性试验 精密吸取“2.2.2”项下供试品溶液0.4 ml,分别于0、10、20、30、40、50、60 min时按“2.1.3”项下方法测定。结果,芦丁对照品溶液吸光度的RSD为0.25%,表明供试品溶液在60 min内稳定性良好。

2.1.6 重复性试验 精密吸取同一批雪松松针粉末,按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液0.2 ml,共6份,按“2.1.3”项下方法测定,计算芦丁含量。结果,芦丁的平均含量为82 mg/g,芦丁对照品溶液吸光度的RSD为1.4%,表明本方法重复性良好。

2.1.7 加样回收率试验 精密称取已知含量(82 mg/g)的雪松松针样品1.0 g,共6份,按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液;再分别精密加入芦丁对照品适量,按“2.1.3”项下方法测定,计算加样回收率,结果见表1。

2.1.8 样品含量测定 精密称取雪松松针样品1.00 g,共3份,分别按照“2.1.2”项下方法制备供试品液,再按“2.1.3”项下方法测定,计算总黄酮的含量。结果,3批样品中总黄酮的含量分别为81.3、82.6、81.8 mg/g,平均含量为 (81.9 ± 0.7) mg/g。

2.2 雪松松针中4种指标性成分的含量测定

2.2.1 对照品溶液的制备 精密称取杨梅素、槲皮素、山柰酚、异鼠李素对照品各1.02、1.03、4.20、1.00 mg,分别置于10 ml

表1 总黄酮的加样回收率试验结果($n=6$)

Tab 1 Results of recovery tests of total flavonoids($n=6$)

已知含量, mg	加入量, mg	测得量, mg	加样回收率, %	平均加样回收率, %	RSD, %
0.164	0.170	0.329	97.06		
0.164	0.170	0.330	97.65		
0.164	0.170	0.332	98.82	97.65	1.37
0.164	0.170	0.331	98.24		
0.164	0.170	0.332	98.82		
0.164	0.170	0.326	95.29		

量瓶中,加40%乙醇溶解并定容,制成杨梅素、槲皮素和异鼠李素质量浓度均为0.1 mg/ml、山柰酚质量浓度为0.4 mg/ml的对照品贮备液。取上述对照品贮备液各1 ml,置于同一5 ml量瓶中,加40%乙醇定容,制成杨梅素、槲皮素和异鼠李素质量浓度均为20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、山柰酚质量浓度为80 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备 精密称取雪松松针粉末(过60目筛)1.0 g,置于100 ml圆底烧瓶中,加40%乙醇40 ml,于90 °C水浴回流提取2次(第1次2 h,第2次1 h);合并2次提取液,用40%乙醇定容至100 ml,摇匀,滤过,取续滤液30 ml,置圆底烧瓶中,加10%盐酸10 ml,沸水浴回流1 h,放冷,转移至50 ml量瓶中,加40%乙醇定容至刻度,摇匀,经0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液作为供试品溶液。

2.2.3 色谱条件 色谱柱:Agilent TC-C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈(A)-0.1%磷酸水溶液(B),梯度洗脱(0~15 min, 22% A; 15~30 min, 25% A; 30~45 min, 33% A);流速:1.0 ml/min;检测波长:360 nm;柱温:30 °C;进样量:20 μl 。

2.2.4 系统适用性试验 分别精密吸取上述混合对照品溶液和供试品溶液各20 μl ,按“2.2.3”项下色谱条件进样测定,记录色谱图,色谱见图1。结果,供试品溶液中杨梅素、槲皮素、山柰酚和异鼠李素色谱峰的保留时间分别为14.6、27.2、38.3、39.6 min,与对照品溶液一致;理论板数以杨梅素峰计不低于6 000;分离度均>1.5。

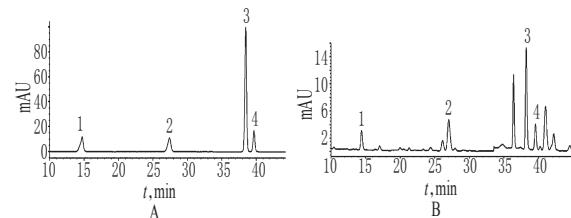


图1 高效液相色谱图

A.供试品;B.对照品;1.杨梅素;2.槲皮素;3.山柰酚;4.异鼠李素

Fig 1 HPLC chromatograms

A. test sample; B. substance control; 1. myricetin; 2. quercetin; 3. kaempferol; 4. isorhamnetin

2.2.5 线性关系考察 依次精密量取“2.2.1”项下混合对照品溶液0.05、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 ml,分别置于1 ml量瓶中,用40%乙醇定容,摇匀,制成杨梅素、槲皮素、山柰酚和异鼠李素系列对照品溶液,按“2.2.3”项下色谱条件分别进样测定,记录峰面积。以峰面积(y)为纵坐标、对照品溶液的质量浓度($x, \mu\text{g}/\text{ml}$)为横坐标,绘制标准曲线,得杨梅素、槲皮素、山柰酚和异鼠李素的回归方程和线性范围,详见表2。结果,杨梅素、槲皮素和异鼠李素的质量浓度在1~10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、山柰酚的质量浓度在4~40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 范围内与各自峰面积积分值呈良好线性关系。

表2 回归方程与线性范围

Tab 2 Regression equation and linear range

待测成分	回归方程	r	线性范围, $\mu\text{g/ml}$
杨梅素	$y=47.087x-11.842$	0.9993	1~10
槲皮素	$y=46.326x-11.270$	0.9993	1~10
山柰酚	$y=58.578x-51.830$	0.9993	4~40
异鼠李素	$y=41.387x-9.354$	0.9992	1~10

2.2.6 精密度试验 精密吸取“2.2.1”项下混合对照品溶液20 μl , 按“2.2.3”项下色谱条件连续进样6次, 记录峰面积。结果, 杨梅素、槲皮素、山柰酚和异鼠李素峰面积的RSD分别为0.82%、1.05%、1.21%和1.24%, 表明仪器精密度良好。

2.2.7 稳定性试验 取同一供试品溶液适量, 分别于制备0、2.4、6、8、12 h时按“2.2.3”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积。结果, 杨梅素、槲皮素、山柰酚和异鼠李素峰面积的RSD分别为1.26%、1.39%、1.75%和0.98%, 表明供试品溶液在12 h内稳定性良好。

2.2.8 重复性试验 精密称取同一批雪松松针的干燥粉末(过60目筛)各适量, 共6份, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 再按“2.2.3”项下色谱条件分别测定, 记录峰面积, 计算样品含量。结果, 杨梅素、槲皮素、山柰酚和异鼠李素的平均含量分别为0.227、0.508、0.818、0.296 mg/g , 峰面积的RSD分别为2.02%、1.85%、2.61%和3.00%, 表明本方法重复性良好。

2.2.9 加样回收率试验 精密称取已知含量的雪松松针干燥粉末(过60目筛)0.5 g, 共6份, 分别置于100 ml圆底烧瓶中, 精密加入杨梅素、槲皮素、山柰酚和异鼠李素的对照品溶液各适量, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 再按“2.2.3”项下色谱条件进样测定, 并计算加样回收率, 结果见表3。

2.2.10 样品中4种指标成分的含量测定结果 精密称取雪松松针粉末各适量, 共3份, 分别按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 再按“2.2.3”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积, 并以外标法计算样品含量。结果, 杨梅素、槲皮素、山柰酚和异鼠李素的平均含量分别为0.229、0.503、0.843、0.297 mg/g 。

3 讨论

3.1 提取方法的选择

采用UV法测定雪松松针中总黄酮的含量时, 笔者考察了不同浓度的甲醇、乙醇等溶剂的提取效率, 同时比较了不同的提取方法(超声、回流)、提取时间、提取次数及提取溶剂的用量, 结果发现样品加入40%乙醇40 ml于90 $^{\circ}\text{C}$ 水浴回流提取2次(第1次2 h, 第2次1 h)的提取效果最好。

3.2 流动相的选择

采用HPLC法测定雪松松针中黄酮苷元的含量时, 考虑到杨梅素、槲皮素、山柰酚和异鼠李素是具有相似结构的4个黄酮苷元, 其化学结构中均含有酚羟基, 呈弱酸性, 参考本课题组前期试验结果^[6]和文献方法^[7~9], 对乙腈-水和甲醇-水流动相系统进行了考察, 最终确定乙腈-0.1%磷酸水溶液为流动相进行梯度洗脱, 可保证主成分峰的峰形良好、分离效果较佳。

综上所述, 本研究采用UV法测定雪松松针中总黄酮的含量, 并采用HPLC法同时测定了杨梅素、槲皮素、山柰素、异鼠李素的含量。该方法简便、快捷、重复性好, 可作为雪松松针中黄酮类物质的含量测定方法。

参考文献

表3 4种指标成分的加样回收率试验结果($n=6$)Tab 3 Results of recovery tests of 4 kinds of marker compounds($n=6$)

待测成分	称样量, g	已知含量, mg	加入量, mg	测得量, mg	加样回收率, %	平均加样回收率, %	RSD, %
杨梅素	0.500 6	0.114	0.12	0.235	100.83	100.11	1.35
	0.500 7	0.114	0.12	0.237	102.50		
	0.500 4	0.114	0.12	0.237	102.50		
	0.500 2	0.114	0.12	0.234	100.00		
	0.500 1	0.114	0.12	0.232	98.33		
	0.500 0	0.114	0.12	0.230	96.67		
	0.500 6	0.254	0.26	0.509	98.08		
	0.500 7	0.254	0.26	0.506	96.92		
	0.500 4	0.254	0.26	0.504	96.15		
	0.500 2	0.254	0.26	0.513	99.62		
槲皮素	0.500 1	0.254	0.26	0.504	96.15	97.63	1.49
	0.500 0	0.254	0.26	0.511	98.85		
	0.500 6	0.409	0.41	0.832	103.17		
	0.500 7	0.410	0.41	0.833	103.17		
	0.500 4	0.409	0.41	0.815	99.02		
	0.500 2	0.409	0.41	0.799	96.12		
	0.500 1	0.409	0.41	0.825	101.46		
	0.500 0	0.409	0.41	0.818	99.76		
	0.500 6	0.148	0.15	0.302	102.67	102.11	1.51
	0.500 7	0.148	0.15	0.303	103.33		
山柰酚	0.500 4	0.148	0.15	0.299	100.67		
	0.500 2	0.148	0.15	0.301	102.00		
	0.500 1	0.148	0.15	0.298	100.00		
	0.500 0	0.148	0.15	0.304	104.00		

- [1] 白朝辉, 石晓峰, 刘东彦, 等. 雪松松针的化学成分及药理作用研究进展[J]. 中国药师, 2012, 15(12): 1 791.
- [2] Liu DY, Shi XF, Wang DD, et al. A new flavonid in pine of Cedrus deodara[J]. Chin Herb Med, 2011, 3(1): 5.
- [3] Liu DY, Shi XF, Wang DD, et al. Two new myricetin glycosides from pine needles of Cedrus deodara[J]. Chem Nat Compd, 2011, 47(5): 704.
- [4] 刘东彦, 石晓峰, 李冲, 等. 雪松松针黄酮类化学成分的研究[J]. 中草药, 2011, 42(4): 631.
- [5] 刘东彦, 石晓峰, 李冲, 等. 雪松松针乙酸乙酯部位化学成分的研究[J]. 中草药, 2011, 42(10): 1 921.
- [6] 石晓峰, 刘东彦, 李爽, 等. RP-HPLC法同时测定雪松松针中杨梅素、槲皮素和山柰酚的含量[J]. 药物分析杂志, 2012, 32(9): 1 550.
- [7] 樊鑫梅, 申雪丽, 闫丽丽, 等. 高效液相色谱法同时测定沙棘果中槲皮素、山柰酚和异鼠李素的含量[J]. 中国医院药学杂志, 2012, 32(17): 1 343.
- [8] 游璐茜, 吴振, 赵玉芬. 檫木中槲皮素、山柰酚和杨梅素含量的高效液相色谱法测定[J]. 化学通报, 2009, 72(10): 896.
- [9] 梁泰刚, 孟旭鹏, 赵承孝, 等. HPLC法同时测定不同产地满山红中4种黄酮成分的含量[J]. 药物分析杂志, 2010, 30(2): 279.

(收稿日期: 2014-07-16 修回日期: 2014-11-11)

(编辑: 孙冰)