

# HPLC法测定香椿叶中山柰酚-3-O-鼠李糖苷的含量<sup>Δ</sup>

姜祖祥<sup>1\*</sup>,任深圳<sup>2</sup>,王旭波<sup>3</sup>,郭秀美<sup>2</sup>,杨欢<sup>2#a</sup>,贾晓斌<sup>2,4#b</sup>(1.如皋市人民医院药剂科,江苏如皋 226500;2.江苏大学药学院,江苏镇江 212013;3.常州工程职业技术学院制药与生物工程技术系,江苏常州 213164;4.江苏省中医药研究院国家中医药管理局中药释药系统重点实验室,南京 210028)

中图分类号 R284.1;R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)47-4467-03  
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.47.17

**摘要** 目的:建立测定香椿叶中山柰酚-3-O-鼠李糖苷含量的方法,为其质量控制提供参考。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为Thermo Hypersil ODS(150 mm×4.6 mm,5 μm),流动相为甲醇-水(55:45,V/V),流速为1.0 ml/min,检测波长为254 nm,柱温为35℃。结果:山柰酚-3-O-鼠李糖苷的质量浓度在5.14~51.40 μg/ml范围内与其峰面积积分值呈良好的线性关系( $r=0.9997$ );精密性、重复性、稳定性试验的RSD<2%;平均加样回收率为96.77%~103.02%,RSD为3.75%~4.64%( $n=3$ )。结论:该方法准确、重复性和稳定性好,可用于香椿叶中山柰酚-3-O-鼠李糖苷的含量测定。

**关键词** 香椿叶;山柰酚-3-O-鼠李糖苷;高效液相色谱法;含量测定

## Content Determination of Kaempferol-3-O-rhamnoside in *Toona sinensis* by HPLC

JIANG Zu-xiang<sup>1</sup>, REN Shen-zhen<sup>2</sup>, WANG Xu-bo<sup>3</sup>, GUO Xiu-mei<sup>2</sup>, YANG Huan<sup>2</sup>, JIA Xiao-bin<sup>2,4</sup> (1. Dept. of Pharmacy, Rugao People's Hospital, Jiangsu Rugao 226500, China; 2. School of Pharmacy, Jiangsu University, Jiangsu Zhenjiang 212013, China; 3. Dept. of Pharmaceutical Technology and Biological Engineering, Changzhou College of Engineering Technology, Jiangsu Changzhou 213164, China; 4. Key Lab of New Drug Deliver System of Chinese Medicine, State Administration of TCM, Jiangsu Provincial Institute of TCM, Nanjing 210028, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To establish a method for the content determination of kaempferol-3-O-rhamnoside in *Toona sinensis*, and to provide reference for quality control of it. METHODS: HPLC method was adopted. The determination was performed on Thermo Hypersil ODS (150 mm×4.6 mm, 5 μm) column with mobile phase composed of methanol-water (55:45, V/V) at the flow rate of 1.0 ml/min. The detection wavelength was set at 254 nm and column temperature was 35 °C. RESULTS: The linear range of kaempferol-3-O-rhamnoside were 5.14-51.40 μg/ml ( $r=0.9997$ ). RSDs of precision, reproducibility and stability tests were all lower than 2%, and average recoveries were from 96.77% to 103.02% ( $n=3$ ). RSDs were 3.75%-4.64% ( $n=3$ ). CONCLUSIONS: The method is accurate, reproducible and stable. It can be used for the content determination of kaempferol-3-O-rhamnoside in *T. sinensis*.

**KEY WORDS** *Toona sinensis*; Kaempferol-3-O-rhamnoside; HPLC; Content determination

香椿叶为楝科植物香椿 *Toona sinensis* (A. Juss.) Roem. 的干燥树叶<sup>[1-2]</sup>, 味苦, 性温, 无毒, 具有清热收敛、消炎解毒、去燥除湿等功效, 临床上常用于治疗肠炎、痢疾等疾病<sup>[3]</sup>。近几年来, 对该中药的抗氧化活性和化学成分的研究较为深入<sup>[4-10]</sup>。活性筛选试验发现, 从香椿叶分离得到的化合物之中, 山柰酚-3-O-鼠李糖苷具有较强的抗氧化作用<sup>[11-12]</sup>, 是香椿叶中的重要活性物质之一。

虽然目前有报道用液相色谱-质谱(LC-MS)等技术鉴别香

椿叶中的没食子酸及其衍生物等化学成分<sup>[2,13]</sup>, 但对于山柰酚-3-O-鼠李糖苷这一香椿叶中的重要活性物质, 其定量分析方法以及不同产地药材中该化合物的含量比较至今尚未见任何报道。因此, 本试验建立了香椿叶中山柰酚-3-O-鼠李糖苷的高效液相色谱(HPLC)分析方法, 并用于测定江苏三个地区产香椿叶中该化合物的含量, 从而为其质量评价提供参考。

## 1 材料

### 1.1 仪器

KQ-600DB型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司, 功率:600 W, 频率:40 kHz); AE240型电子分析天平(瑞士Mettler Toledo公司,  $d=0.01$  mg); HPLC系统, 含DGU-20A5型脱气机、LC-20AT型高压泵、CTO-10AS型柱温箱、FCV-10AL型混合器、SPD-20A型UV-Vis检测器(日本Shimadzu公司); N2000型工作站(浙江大学智达信息有限公司)。

### 1.2 试剂

Δ 基金项目:“国家中医药管理局中药口服制剂释药系统重点实验室”开放基金资助项目(No. 2011NDDCM01002)

\* 中药师。研究方向: 中药学。电话: 0513-87512315。E-mail: 343044630@qq.com

#a 通信作者: 副教授, 博士。研究方向: 中药化学。E-mail: yanghuan1980@ujs.edu.cn

#b 通信作者: 教授, 博士。研究方向: 中药物质基础。电话: 025-85608672。E-mail: jxiaobin2005@hotmail.com

甲醇(色谱纯,美国 Honeywell 公司);纯净水(杭州娃哈哈集团有限公司);山柰酚-3-*O*-鼠李糖苷对照品为江苏大学药学院生药学研究室自行分离得到,经液相色谱-电喷雾电离-质谱(LC-ESI-MS)法测定,纯度为97.6%。

### 1.3 药材

三批香椿叶于2013年7月分别采收自江苏省南京市、如皋市和镇江市,经江苏大学生药研究所陈钧教授鉴定为 *T. sinensis* 的叶;将鲜叶冷冻干燥,粉碎后过40目筛,收集细粉,置于相对湿度(RH)<40%的电子干燥器内,室温下贮藏。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

色谱柱: Thermo Hypersil ODS(150 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-水(55:45, V/V); 流速: 1.0 ml/min; 检测波长: 254 nm; 柱温: 35 °C; 进样量: 20 μl。色谱见图1。

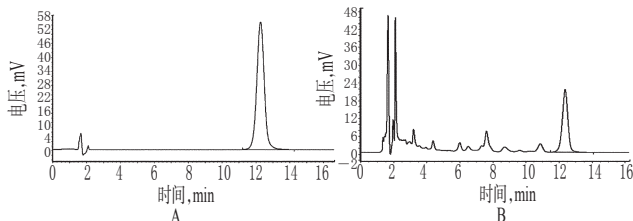


图1 高效液相色谱图

A. 山柰酚-3-*O*-鼠李糖苷对照品; B. 香椿叶(江苏镇江)

Fig 1 HPLC chromatograms

A. kaempferol-3-*O*-rhamnoside control; B. *T. sinensis* Folium (Jiangsu Zhenjiang)

### 2.2 对照品贮备液的制备

精密称取山柰酚-3-*O*-鼠李糖苷对照品 10.28 mg, 加60%甲醇溶解并定容至100 ml, 配制质量浓度为102.80 μg/ml的对照品贮备液, 于室温下避光贮藏。

### 2.3 供试品溶液的制备

取香椿叶细粉0.10 g, 精密称定, 置50 ml离心管中, 精密加入60%甲醇25 ml, 超声15 min, 取上清液, 以0.22 μm微孔滤膜滤过, 于室温下避光贮藏。

### 2.4 线性关系考察

分别精密吸取5.0、4.0、3.0、2.0、1.0、0.5 ml对照品贮备液, 加入60%甲醇稀释至10 ml, 摇匀, 得质量浓度分别为51.40、41.12、30.84、20.56、10.28、5.14 μg/ml的对照品溶液。取以上6份溶液各适量, 分别按“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积。以峰面积积分值(*y*)为纵坐标, 对照品质量浓度(*x*, μg/ml)为横坐标, 进行线性回归, 计算得回归方程为  $y = 79\,057x + 39\,902$  ( $r = 0.999\,7, n = 6$ )。结果表明, 山柰酚-3-*O*-鼠李糖苷的质量浓度在5.14~51.40 μg/ml范围内与峰面积积分值呈良好的线性关系。

### 2.5 精密度试验

吸取同一份供试品溶液(江苏镇江)适量, 按“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积, 重复6次。结果显示, RSD=1.37% ( $n = 6$ ), 表明本方法精密度良好。

分别吸取高、中、低质量浓度(51.40、20.56、5.14 μg/ml)的对照品溶液适量, 按“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积, 各重复3次。结果显示, RSD分别为1.46%、1.39%、1.30% ( $n = 3$ ), 表明仪器精密度良好。

### 2.6 稳定性试验

吸取同一份供试品溶液(江苏镇江)适量, 分别于0、2、4、6、8、12、24、36、48 h, 按“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积。结果显示, RSD=1.87% ( $n = 9$ ), 表明供试品溶液在48 h内的性质稳定。

### 2.7 重复性试验

取香椿叶细粉(江苏镇江)适量, 共6份, 分别按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 再按“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积。结果显示, RSD=1.53% ( $n = 6$ ), 表明本方法重复性良好。

### 2.8 加样回收率试验

称取香椿叶细粉(江苏镇江)约50.0 mg, 共9份, 每3份为一组, 分别加入一定量的对照品溶液, 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 再按“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积, 计算加样回收率, 结果见表1。

表1 加样回收率试验结果( $n = 3$ )

Tab 1 Results of recovery tests ( $n = 3$ )

样品含量, μg	加入量, μg	测得量, μg	回收率, %	$\bar{x}$ , %	RSD, %
51.21	25.60	75.31	94.14		
50.58	25.60	76.68	101.95	96.77	4.64
51.27	25.60	75.39	94.22		
51.17	51.00	100.47	96.67		
51.53	51.00	100.11	95.25	98.37	4.30
50.91	51.00	103.53	103.18		
51.29	76.80	133.42	106.94		
50.67	76.80	126.86	99.21	103.02	3.75
50.88	76.80	129.93	102.93		

### 2.9 样品含量测定

取三个产地药材细粉各适量, 分别按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 再按“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积, 代入回归方程, 计算样品含量。结果显示, 香椿叶中山柰酚-3-*O*-鼠李糖苷的质量分数分别为(0.102 ± 0.003)% (江苏镇江)、(0.132 ± 0.003)% (江苏南京)和(0.085 ± 0.002)% (江苏如皋)。

## 3 讨论

在样品提取方法的考察中, 笔者分别对不同提取溶剂(20%、40%、60%、80%甲醇和无水甲醇)以及不同超声时间(15、30、45、60 min)的提取效果进行了比较, 发现以60%甲醇超声提取香椿叶细粉15 min, 山柰酚-3-*O*-鼠李糖苷的色谱峰面积最大, 故选该方法作为样品提取方法。

由本试验结果可知, 江苏省三个产地的香椿叶中, 南京产样品中山柰酚-3-*O*-鼠李糖苷的质量分数明显高于镇江和如皋产样品。

综上, 本方法简便、准确、重复性好, 制备的供试品溶液稳定, 可用于香椿叶中山柰酚-3-*O*-鼠李糖苷的含量测定。

## 参考文献

- [1] Hseu YC, Chang WH, Chen CS, *et al.* Antioxidant activities of *Toona sinensis* leaves extracts using different antioxidant models [J]. *Food Chem Toxicol*, 2008, 46(1): 105.
- [2] Yang Y, Wang J, Xing ZE, *et al.* Identification of phenolics in Chinese toon and analysis of their content changes during storage[J]. *Food Chem*, 2011, 128(4): 831.
- [3] 张仲平, 牛超, 孙英, 等. 香椿叶黄酮类成分的分离与鉴定[J]. *中药材*, 2001, 24(10): 725.

# 不同采收期连翘挥发油中 $\alpha$ -蒎烯和 $\beta$ -蒎烯含量的比较<sup>△</sup>

张淑蓉\*, 裴晓丽, 王华阳(山西中医学院中药学院, 太原 030024)

中图分类号 R284.1; R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)47-4469-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.47.18

**摘要** 目的: 建立测定连翘挥发油中 $\alpha$ -蒎烯和 $\beta$ -蒎烯含量的方法, 并比较不同采收期连翘中 $\alpha$ -蒎烯和 $\beta$ -蒎烯含量的差异。方法: 采用水蒸气蒸馏法提取连翘挥发油, 以毛细管气相色谱法测定挥发油中 $\alpha$ -蒎烯和 $\beta$ -蒎烯的含量。色谱柱为HP-5弹性石英毛细管柱(30 m×0.25 mm×0.25  $\mu$ m), 载气为氮气, 程序升温, 进样口温度为230  $^{\circ}$ C, 检测器(FID)温度为250  $^{\circ}$ C。以环己酮为内标物, 用内标法定量。结果:  $\alpha$ -蒎烯、 $\beta$ -蒎烯的质量浓度分别在0.164 0~0.820 0、0.502 0~2.510 0 mg/ml范围内与各自峰面积积分值呈良好的线性关系( $r$ 分别为0.999 6、0.999 4); 二者精密度、稳定性、重复性试验的RSD<3%; 平均加样回收率分别为100.99%、96.61%, RSD分别为2.19%、2.07% ( $n$ 均为9)。结论: 该方法简便、快速、准确, 可用于连翘挥发油中 $\alpha$ -蒎烯和 $\beta$ -蒎烯含量的测定。各采收期连翘挥发油出油率及 $\alpha$ -蒎烯和 $\beta$ -蒎烯含量以7月中下旬为最高。

**关键词** 连翘; 挥发油;  $\alpha$ -蒎烯;  $\beta$ -蒎烯; 毛细管气相色谱法; 含量测定; 采收期

## Comparison of the Contents of $\alpha$ -pinene and $\beta$ -pinene in Volatile Oil of *Forsythia suspensa* in Different Harvest Periods

ZHANG Shu-rong, PEI Xiao-li, WANG Hua-yang (School of TCM, Shanxi College of TCM, Taiyuan 030024, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To establish a method for the content determination of  $\alpha$ -pinene and  $\beta$ -pinene in volatile oil of *Forsythia suspensa*, and to compare the contents of  $\alpha$ -pinene and  $\beta$ -pinene of *F. suspensa* in different harvest periods. METHODS: Vapour-distillation was employed to extract volatile oil from *F. suspensa*. The contents of  $\alpha$ -pinene and  $\beta$ -pinene of volatile oil in *F. suspensa* were determined by GC. The determination was performed on HP-5 capillary column (30 m×0.25 mm×0.25  $\mu$ m) using nitrogen as carrier gas by temperature programming. The injector temperature was 230  $^{\circ}$ C, and the temperature of FID was 250  $^{\circ}$ C. The test was quantitatively analyzed by internal standard method using cyclohexanone as internal standard. RESULTS: The linear range was 0.164 0-0.820 0 mg/ml for  $\alpha$ -pinene ( $r=0.999 6$ ) and 0.502 0-2.510 0 mg/ml for  $\beta$ -pinene ( $r=0.999 4$ ). RSDs of precision, stability and reproducibility tests were all lower than 3%. Average recoveries were 100.99% (RSD=2.19%,  $n=9$ ) and 96.61% (RSD=2.07%,  $n=9$ ). CONCLUSIONS: The method is simple, rapid, accurate and suitable for the content determination of  $\alpha$ -pinene and  $\beta$ -pinene in volatile oil of *F. suspensa*. The contents of  $\alpha$ -pinene and  $\beta$ -pinene from volatile oil of *F. suspensa* in the middle and late of July are the highest.

**KEY WORDS** *Forsythia suspensa*; Volatile oil;  $\alpha$ -pinene;  $\beta$ -pinene; Capillary GC; Content determination; Harvest period

- [4] Wang KJ, Yang CR, Zhang YJ. Phenolic antioxidants from Chinese toon (fresh young leaves and shoots of *Toona sinensis*) [J]. *Food Chem*, 2007, 101(1):365.
- [5] Poon SL, Leu SF, Hsu HK, et al. Regulatory mechanism of *Toona sinensis* on mouse leydig cell steroidogenesis [J]. *Life Sci*, 2005, 76(13):1 473.
- [6] Hseu YC, Chen SC, Lin WH, et al. *Toona sinensis* (leaf extracts) inhibit vascular endothelial growth factor (VEGF) -induced angiogenesis in vascular endothelial cells [J]. *J Ethnopharmacol*, 2011, 134(1):111.
- [7] Yang HL, Chang WH, Chia YC, et al. *Toona sinensis* extracts induces apoptosis via reactive oxygen species in human premyelocytic leukemia cells [J]. *Food Chem Toxicol*, 2006, 44(12):1 978.
- [8] 沈玉萍, 钟雄雄, 余筱洁, 等. 中药香椿叶的化学成分研究 [J]. *中国药理学杂志*, 2013, 48(1):22.
- [9] Shen Y, Yin H, Chen B, et al. Validated reversed phase-high performance liquid chromatography-diode array detector method for the quantitation of rutin, a natural immunostimulant for improving survival in aquaculture practice, in *Toonea sinensis* folium [J]. *Pharmacogn Mag*, 2012, 8(29):49.
- [10] 李争玲, 王旭波, 冉顶诗, 等. 香玲子的化学成分研究 [J]. *中国药房*, 2013, 24(27):2 540.
- [11] Formica JV, Regelson W. Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids [J]. *Food Chem Toxicol*, 1995, 33(12):1 061.
- [12] Hsieh TJ, Wang JC, Hu CY, et al. Effects of rutin from *Toona sinensis* on the immune and physiological responses of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) under *Vibrio alginolyticus* challenge [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2008, 25(5):581.
- [13] Cheng KW, Yang RY, Tsou SCS, et al. Analysis of antioxidant activity and antioxidant constituents of Chinese toon [J]. *J Funct Foods*, 2009, 1(3):253.

(收稿日期:2013-08-03 修回日期:2013-08-26)

△基金项目:山西省科技攻关项目(No.20120313015-4)

\*教授, 硕士研究生导师。研究方向:中药活性成分分析及药效物质基础。电话:0351-2272269。E-mail:zhangsr62@163.com