

市售川乌各品种中总黄酮的含量比较^Δ

郑玲利*,袁明勇#,朱盛林,赵霞(成都医学院第一附属医院药剂科,成都 610500)

中图分类号 R284.1;R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)31-2942-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.31.22

摘要 目的:测定市售川乌不同品种中总黄酮的含量并比较其差异。方法:利用超声波提取法,在温度55℃、时间40 min、以70%乙醇为提取溶剂、物料比为1:20(m/V)的条件下提取10个样品中的黄酮类化合物;以芦丁为对照品,在510 nm波长处,采用紫外分光光度法测定总黄酮的含量。结果:芦丁的质量浓度在0~0.098 8 mg/ml范围内与其吸光度呈良好的线性关系($r=0.999 8$);精密度、稳定性、重复性试验的RSD均 $<2\%$;平均加样回收率为97.93%,RSD=1.55%($n=6$)。10个市售川乌样品中,总黄酮质量分数最高的是8号,其质量分数极显著高于10、4、6、7、2、1、9、3号,显著高于5号;3号川乌的总黄酮质量分数最低,但与7、2、1、9号川乌比较差异无统计学意义。结论:市售不同品种川乌中总黄酮的质量分数存在明显差异,临床应注意甄别使用。

关键词 川乌;黄酮类化合物;市售品;紫外分光光度法

Comparison of the Flavonoids Content from Marketable *Aconitum carmichaelii* Products

ZHENG Ling-li, YUAN Ming-yong, ZHU Sheng-lin, ZHAO Xia (Dept. of Pharmacy, The First Affiliated Hospital of Chengdu Medical College, Chengdu 610500, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To determine and compare the contents of flavonoids from different types of marketable *Aconitum carmichaelii*. METHODS: Using ultrasonic extraction, the flavonoids compounds were extracted from 10 samples at 55 °C for 40 min with the material ratio of 1:20 (m/V) using 70% ethanol as solvent. The content of flavonoids was determined by UV spectrophotometry at 510 nm, using rutin as substance control. RESULTS: The linear range of rutin were 0-0.098 8 mg/ml ($r=0.999 8$) with an average recovery of 97.93% (RSD=1.55%, $n=6$). RSDs of precision, stability and reproducibility tests were all lower than 2%. Among 10 types of marketable *A. carmichaelii*, the content of flavonoids in No. 8 sample was the highest, which was very significantly higher than in No. 10, No.4, No. 6, No.7, No.2, No.1, No.9 and No.3 samples, and significantly higher than in No.5 samples; the content flavonoids in No. 3 sample was the lowest, which was not significantly different from No. 7, No.2, No. 1 and No.9 samples. CONCLUSIONS: The contents of flavonoids are different significantly in different types of marketable *A. carmichaelii*, which should be used after identified in the clinic.

KEY WORDS *Aconitum carmichaelii*; Flavonoids; Marketable product; UV spectrophotometry

川乌是毛茛科植物乌头 *Aconitum carmichaelii* Debx. 的干燥母根,主产于四川、陕西等地,临床上主要用作散寒止痛,但超过一定用量容易出现中毒现象,使其临床应用受到一定限制^[1]。目前,国内、外学者对川乌的研究主要集中在其生物碱和毒理作用方面,鲜有对其黄酮类化合物的研究及相关报道。近年来, Vitalini S 等^[2-3]从乌头属植物中提取分离得到新的水溶性黄酮类化合物,表现出较强的抗氧化活性。

黄酮类化合物广泛存在于自然界,表现出强心的生理活性^[4-5],契合川乌强心的药理作用。但迄今为止,尚未见川乌中黄酮类化合物的系统研究。因此,笔者采用超声波提取法对流通于成都市荷花池中药材市场的川乌10个品种中总黄酮的含量进行测定,为后续川乌中黄酮类化合物的强心作用研究奠定基础。

1 材料

1.1 仪器

SG2200HPT 型超声波清洗器(上海司乐仪器有限公司);

^Δ 成都医学院立项科研课题(No.CYZ11-021)

* 主管药师,硕士。研究方向:医院药学。电话:028-83016717。

E-mail: zhenglinli326@163.com

通信作者:副教授,硕士。研究方向:医院药学。电话:

028-83016983。E-mail: yuanmingyong226@163.com

UV-3200PS 型紫外-可见分光光度计(日本岛津公司);TG328A 型电光分析天平(上海精密科学仪器有限公司)。

1.2 药材

10个市售川乌样品均购于成都市荷花池中药材市场,经笔者鉴定为真品。

1.3 试剂

芦丁对照品(四川省食品药品检验所,纯度:99%,批号:110910);所用试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 供试品溶液的制备

取干燥的川乌样品,用高速粉碎机粉碎,过60目筛,取粉末约2g,精密称定,置具塞锥形瓶中,加70%乙醇作为提取溶剂,物料比为1:20(m/V),于55℃下超声(功率:300W,频率:40kHz)提取40min,滤过,收集滤液,用70%乙醇定容至100ml量瓶中,即得供试品溶液。

2.2 对照品溶液的制备

精密称取芦丁对照品10.30mg,置于25ml量瓶中,先加入少量70%乙醇超声(功率:300W,频率:40kHz)溶解,再用70%乙醇稀释至刻度,摇匀,制备成质量浓度为0.412mg/ml的对照品溶液。

2.3 显色方法^[6]

取供试品溶液 10 ml 或对照品溶液适量, 置 25 ml 量瓶中, 依次加入 5% NaNO₂ 溶液 1 ml, 放置 6 min 后加入 10% Al(NO₃)₃ 溶液 1 ml, 放置 6 min, 再加入 4% NaOH 溶液 10 ml, 放置 15 min, 最后加 70% 乙醇定容, 待测。另以显色剂为空白对照。

2.4 检测波长的选择

精密吸取对照品溶液 3 ml 和供试品溶液、空白对照溶液各 10 ml, 分别按“2.3”项下方法处理, 于 190~600 nm 波长范围内进行扫描。从图 1 结果可见, 芦丁对照品溶液与供试品溶液的吸收光谱基本一致, 有 3 个较大吸收峰, 而最大吸收波长在 510 nm 处; 空白对照溶液无干扰。因此, 选用 510 nm 作为检测波长。

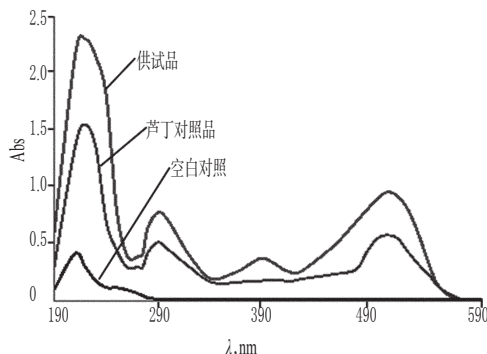


图 1 紫外-可见吸收光谱图

Fig 1 UV visible absorption spectrum

2.5 方法学考察

2.5.1 标准曲线的制备 精密吸取质量浓度为 0.412 mg/ml 的芦丁对照品溶液 0、1、2、3、4、5、6 ml, 分别置于 25 ml 量瓶中, 依次按“2.3”项下方法处理, 于 510 nm 波长处测定吸光度。以吸光度(x)为横坐标, 对照品质量浓度(y)为纵坐标, 进行线性回归, 得回归方程为 $y=0.0844x+0.0005$ ($r=0.9998, n=7$)。结果表明, 芦丁对照品质量浓度在 0~0.0988 mg/ml 范围内与其吸光度呈良好的线性关系。

2.5.2 精密性试验 精密吸取芦丁对照品溶液 3.0 ml, 按“2.3”项下方法操作, 于 510 nm 波长处测定吸光度, 连续测定 6 次。结果, $RSD=0.64\%$ ($n=6$), 表明仪器精密性良好。

2.5.3 重复性试验 精密称取同一批(样品编号: 4)川乌粉末适量, 共 6 份, 分别按“2.1”项下方法制备供试品溶液, 再按“2.3”项下方法操作, 于 510 nm 波长处测定吸光度。结果, $RSD=1.02\%$ ($n=6$), 表明本方法重复性良好。

2.5.4 稳定性试验 取同一(样品编号: 4)供试品溶液 10 ml, 按“2.3”项下方法操作, 分别于 0、20、40、60、80、100、120 min 在 510 nm 波长处测定吸光度。结果, $RSD=1.68\%$ ($n=7$), 表明供试品溶液在 120 min 内稳定性良好。

2.5.5 加样回收率试验 精密称定已知含量的同一批(样品编号: 4)样品粉末 6 份, 各约 1 g, 分别精密加入芦丁对照品适量, 按“2.1”项下方法制备供试品溶液, 再按“2.3”项下方法操作, 于 510 nm 波长处测定吸光度, 计算加样回收率, 结果见表 1。

2.6 川乌中总黄酮的含量测定

精密称取各川乌样品 2.000 g, 每个样品 3 份, 分别按“2.1”项下方法制备供试品溶液, 再按“2.3”项下方法操作, 于 510 nm 波长处测定各个样品中总黄酮的吸光度, 根据标准曲线计算总黄酮的质量浓度。再利用下列公式计算每个川乌样品中总

表 1 加样回收率试验结果 ($n=6$)

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

序号	称样量, g	样品含量, mg	加入量, mg	测得量, mg	回收率, %	\bar{x} , %	RSD, %
1	0.993	5.886	6.021	11.877	99.50		
2	1.002	5.939	6.042	11.839	97.64		
3	0.997	5.910	6.124	12.038	100.02	97.93	1.55
4	0.998	5.916	6.031	11.788	97.36		
5	1.034	6.129	6.061	11.969	96.35		
6	0.996	5.904	6.115	11.814	96.65		

黄酮的质量分数: 总黄酮质量分数 (%) = $ncV/m \times 10^{-3} \times 100\%$ 。式中, n 为提取液的稀释倍数; c 为提取液中总黄酮的质量浓度 (mg/ml); V 为提取液的体积 (ml); m 为川乌的质量 (g)。

2.6.1 总黄酮含量测定结果 每个样品各测定 3 次, 取平均值。10 个市售川乌品种的总黄酮质量分数见表 2。表 2 结果表明, 随机购买的 10 个市售川乌品种中总黄酮的质量分数存在较大差异, 质量分数范围在 1.68%~13.31% 之间, 平均值为 5.66%。

表 2 10 个市售川乌品种的总黄酮质量分数 (%) ($n=3$)

Tab 2 The content of total flavonoids in 10 marketable *A. Carmichaelii* (% ($n=3$))

样品编号	总黄酮质量分数	样品编号	总黄酮质量分数
1	2.10	6	5.37
2	2.97	7	3.12
3	1.68	8	13.31
4	5.93	9	1.95
5	11.30	10	8.99

2.6.2 F 检验 采用方差分析对试验结果进行 F 检验, 得到表 3。由于 $F > F_{0.01}(9, 20)$, 即 $P < 0.01$, 故由表 3 可以看出 10 个市售川乌品种中总黄酮质量分数的平均值之间存在显著性差异。

表 3 10 个市售川乌品种中总黄酮质量分数的方差分析结果

Tab 3 Analysis of variance of flavonoids content in 10 marketable *A. Carmichaelii*

变异来源	SS	df	MS	F
品种间	474.876	9	52.764	66.403
误差	15.892	20	0.795	
总变异	490.768	29		

注: $F_{0.05}(9, 20)=2.40$; $F_{0.01}(9, 20)=3.45$

note: $F_{0.05}(9, 20)=2.40$; $F_{0.01}(9, 20)=3.45$

2.6.3 多重比较 查表得到 SSR 值, 通过标准误差的值得出相应的 LSR 值, 利用 SSR 法对 10 个市售川乌品种中的总黄酮质量分数进行多重比较, 结果见表 4。多重比较结果表明, 8 号川乌的总黄酮质量分数极显著高于 10、4、6、7、2、1、9、3 号样品, 显著高于 5 号样品; 5 号川乌的总黄酮质量分数极显著高于 10、4、6、7、2、1、9、3 号样品; 10 号川乌的总黄酮质量分数极显著高于 4、6、7、2、1、9、3 号样品; 4 号川乌的总黄酮质量分数极显著高于 7、2、1、9、3 号样品, 与 6 号样品的差异无统计学意义; 7、2、1、9、3 号川乌的总黄酮质量分数差异无统计学意义。

3 讨论

化学成分对中药药效起决定作用, 川乌具有的强心药理作用可能与其所含的黄酮类化合物有关^[7]。本试验发现, 在温度 55℃、超声波提取时间 40 min、70% 乙醇为提取溶剂、物料比为 1:20 (m/V) 的条件下, 所选 10 个市售川乌品种的总黄酮质量分数存在较大的差异, 质量分数范围在 1.68%~13.31%

HPLC法测定熊果苷乳膏中熊果苷的含量

孟小斌^{1*}, 曲彩虹²(1.梅州市人民医院, 广东 梅州 514031; 2.中山大学附属第三医院 广州 510630)

中图分类号 R283.621; R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)31-2944-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.31.23

摘要 目的:建立测定熊果苷乳膏中熊果苷含量的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为WELCHROM C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为甲醇-水(70:30, V/V),柱温为28℃,流速为0.8 ml/min,检测波长为280 nm。结果:熊果苷的质量浓度在0.010 1~0.201 6 mg/ml范围内与其峰面积积分值呈良好的线性关系($r=0.999\ 9$);精密性、重复性、稳定性试验的RSD均<2%;平均加样回收率为99.53%,RSD=0.88%($n=9$)。结论:该方法简便、准确、精密度高、重复性好,可用于熊果苷乳膏的质量控制。
关键词 熊果苷乳膏;熊果苷;含量测定;高效液相色谱法

Content Determination of Arbutin in Arbutin Cream by HPLC

MENG Xiao-bin¹, QU Cai-hong²(1.Meizhou Municipal People's Hospital, Guangdong Meizhou 514031, China; 2.The Third Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510630, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the content determination of arbutin in Arbutin cream. METHODS: HPLC method was used. The determination was performed on WELCHROM C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm) column with methanol-water(70:30, V/V) as mobile phase at the flow rate of 0.8 ml/min. The detection wavelength was set at 280 nm, and column temperature was 28℃. RESULTS: The linear range of arbutin was 0.010 1-0.201 6 mg/ml($r=0.999\ 9$) with an average recovery of 99.53% (RSD=0.88%, $n=9$). The RSDs of precision, reproducibility and stability tests were lower than 2%. CONCLUSIONS: The method is simple, accurate, precise and reproducible, which can be used for quality control of Arbutin cream.

KEY WORDS Arbutin cream; Arbutin; Content determination; HPLC

表4 10个市售川乌品种中总黄酮质量分数的多重比较结果(SSR法)

Tab 4 Multiple comparison of flavonoids content in 10 marketable *A. carmichaelii* (SSR)

样品编号	\bar{x}_1	$\bar{x}_2-1.68$	$\bar{x}_3-1.95$	$\bar{x}_4-2.00$	$\bar{x}_5-2.97$	$\bar{x}_6-3.12$	$\bar{x}_7-5.37$	$\bar{x}_8-5.93$	$\bar{x}_9-8.99$	$\bar{x}_{10}-11.30$
8	13.31	11.64**	11.36**	11.31**	10.34**	10.20**	7.94**	7.38**	4.32**	2.01*
5	11.30	9.63**	9.35**	9.30**	8.33**	8.19**	9.33**	5.37**	2.31**	
10	8.99	7.32**	7.04**	6.98**	6.02**	5.88**	3.62**	3.06**		
4	5.93	4.25**	3.98**	3.92**	2.96**	2.81**	0.56			
6	5.37	3.69**	3.42**	3.36**	2.40**	2.25**				
7	3.12	1.44	1.16	1.11	0.14					
2	2.97	1.30	1.02	0.97						
1	2.01	0.33	0.05							
9	1.95	0.28								
3	1.68									

注:“*”表示介于 $LSD_{0.05}$ 与 $LSD_{0.01}$ 之间者,具有显著性;“**”表示大于 $LSD_{0.01}$ 者,具有极显著性

note: When the value is between $LSD_{0.05}$ and $LSD_{0.01}$, which means the significance, the corresponding data is marked with “*”. When the values is greater than $LSD_{0.01}$, which means the most significance, the corresponding data is marked with “**”

之间,平均值为5.66%。其中,总黄酮质量分数最高的是8号川乌,高达13.31%,极显著高于10、4、6、7、2、1、9、3号,显著高于5号;3号川乌的总黄酮质量分数最低,只占1.68%,但与7、

2、1、9号川乌比较差异无统计学意义。造成这种情况的发生可能与市售川乌的基原、产地、采收时间、加工及贮藏方法不同有关。提示目前在中药材市场流通的川乌药材品种较为混乱,水溶性化学成分含量不一,导致其在药用过程中疗效不能得到确切保证,应引起临床重视。

参考文献

- [1] 唐瑜之,李永波.川乌新义[J].中华实用中西医杂志, 2005, 19(18):1 220.
- [2] Vitalini S, Braca A, Passarella D, et al. New flavonol glycosides from *Aconitum burnatii* Gáy- er and *Aconitum variegatum* L. [J]. *Fitoterapia*, 2010, 81(7):940.
- [3] Braca A, Fico G, Morelli I, et al. Antioxidant and free radical scavenging activity of flavones glycosides from different *Aconitum species*[J]. *J Ethnopharmacol*, 2003, 86(63):63.
- [4] 何晓川,周宁娜,林青,等.滇黄芩总黄酮抗心律失常作用的实验研究[J].中国中药杂志, 2010, 35(4):508.
- [5] 程秋月,郭菁,张成义.黄酮类化合物药理作用的研究[J].北华大学学报, 2011, 12(2):180.
- [6] 朱芸,白晓光,李鹏,等.正交试验优选锁阳总黄酮超声提取工艺[J].中国药房, 2011, 22(15):1 376.
- [7] 唐小荷,陈震翼.山楂籽黄酮提取物抗实验性心律失常作用的研究[J].齐鲁药事, 2012, 31(6):321.

(收稿日期:2013-01-16 修回日期:2013-05-16)

* 副主任药师。研究方向:临床药学。电话:0753-2131137。
E-mail:xbmeng@163.com