

HPLC同时测定藏族药圆柏和刺柏中3种黄酮类成分的含量

徐旭坤¹, 武雪¹, 宋平顺², 赵建邦²

(1. 兰州大学药学院, 兰州 730000;

2. 甘肃省药品检验研究院, 甘肃省中药品质与安全评价工程技术研究中心, 兰州 730070)

[摘要] 目的:建立 HPLC 测定藏族药圆柏和刺柏中 3 种主要黄酮类成分的方法。方法:采用 HPLC,样品经 70% 甲醇超声,采用 CAPCELL PAK C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相 0.2% 磷酸乙腈-0.2% 磷酸水梯度洗脱,流速 1.0 mL·min⁻¹,检测波长 360 nm,柱温 40 °C。结果:芦丁在 0.004 9 ~ 0.146 4 μg ($r=0.999 9$);槲皮苷在 0.009 4 ~ 0.281 4 μg ($r=0.999 8$);山柰酚在 0.005 4 ~ 0.162 0 μg ($r=0.999 8$)进样量与峰面积均成良好的线性关系;芦丁、槲皮苷和山柰酚的加样回收率分别为 100.12% (RSD 2.6%), 96.35% (RSD 0.7%), 96.13% (RSD 0.5%)。结论:3 种黄酮在 40 min 内达到基线分离。该方法分析时间短、稳定性和准确度良好,对圆柏和刺柏药材的质量控制具有一定的参考价值。

[关键词] 藏药; 圆柏; 刺柏; 黄酮; 芦丁; 槲皮苷; 山柰酚

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)13-0074-03

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015130074

Simultaneous Determination of Three Main Flavonoids in *Sabina chinensis* and *Juniperus formosana* by HPLC XU Xu-kun¹, WU Xue¹, SONG Ping-shun², ZHAO Jian-bang² (1. College of Pharmacy, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China; 2. Gansu Institute for Drug Control, Gansu Traditional Chinese Medicine Quality and Safety Evaluation Engineering Research Center, Lanzhou 730070, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a HPLC method for the simultaneous determination of three main flavonoids in *Sabina chinensis* and *Juniperus formosana*. **Method:** Samples were extracted by 70% methanol with ultrasonic process. The HPLC was performed on an CAPCELL PAK C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) with 0.2% H₃PO₄ acetonitrile-0.2% H₃PO₄ water as mobile phase. The flow rate was 1.0 mL·min⁻¹ and the column temperature was kept at 40 °C. The detection wavelength was at 360 nm. **Result:** The linear range of rutin was 0.004 9-0.146 4 μg ($r=0.999 9$); the linear range of quercetin-3-rhamnoside was 0.009 4-0.281 4 μg ($r=0.999 8$) and the linear range of kaempferol was 0.005 4-0.162 0 μg ($r=0.999 8$). The average recoveries of rutin, quercitrin; and kaempferol were 100.12% (RSD 2.6%), 96.35% (RSD 0.7%), 96.13% (RSD 0.5%), respectively. **Conclusion:** Three flavonoids reached baseline separation within 40 min. This method has advantages of less analytic time, good stability and accuracy of operation, and has certain reference value for quality control of *Juniperus formosana* and *Sabina chinensis* herb.

[Key words] *Sabina chinensis*; *Juniperus formosana*; HPLC; flavonoid; rutin; quercitrin; kaempferol

圆柏常绿, 树形优美, 历来就是风景园林的重要植物^[1]。在我国, 除东北及西北北部外, 其余各省均有分布或栽培。四川盆地及盆地边缘山区广泛分布。尤其川西北高原地区多成片生长, 资源蕴藏丰富^[2-3]。刺柏为我国特有的树种, 主要分布在四川

西部、西藏及云南地区。其根、树干、种子、叶不仅含有芳香油, 被用于提取柏脑, 加工制成次级产品乙酸柏木酯, 作为保香剂、日用香精的修饰剂等; 其芳香性成分也被用于生产杜松子酒、化妆品和增强饮料的口感与香味^[4]; 而且含有黄酮类化合物, 具清肾

[收稿日期] 20140914(004)

[基金项目] 国家基本药物所需中药原料资料和监测项目(财社 2011 第 76 号); 中医药行业专项: 我国代表性区域特色中药资源保护作用(201207002)

[第一作者] 徐旭坤, 从事药理学研究, Tel: 18793179155, E-mail: 116552802@qq.com

热、利尿、燥“协日乌素”、愈伤止血等功效，主要用于治疗尿血、尿道疼痛、炭疽、风湿、肾“达日干”、“协日乌素”等病^[5]。关于圆柏和刺柏的化学成分，因其具有广泛的生理活性而受到国内外学者的关注，其成分有挥发油、黄酮类化合物、单萜烃、倍半萜烃和酚类化合物等^[6]；但目前对刺柏和圆柏中黄酮类化合物的研究却很少。现代医学研究表明黄酮类物质具有降血糖、降血脂、抗心律失常等 40 多种生理活性^[7-8]。此外，黄酮类物质作为抗氧化剂还广泛应用于食品中。为提高圆柏和刺柏质量标准，在原有研究的基础上^[9]对其主要活性成分的黄酮类物质采用高效液相色谱法进行了含量测定研究，可作为控制圆柏和刺柏药材内在质量的有效方法。

1 材料

1.1 仪器 1260Infinity 型高效液相色谱仪(包括 G1312 型 C 二元泵, G1314F 型紫外检测器, G1316A 型柱温箱, 美国 Agilent), KH-250DE 型数控超声波清洗器(昆山禾创超声仪器有限公司), AL204 型电子天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司]。

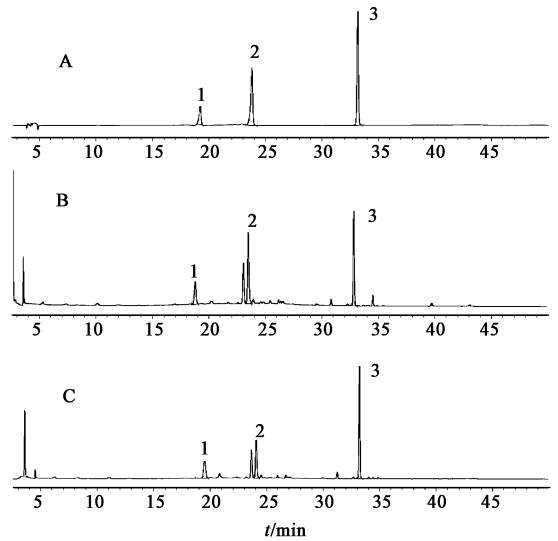
1.2 试药 芦丁、槲皮苷、山柰酚对照品(中国食品药品检定研究院, 批号 100080-200707, 111538-200301, 110861-200808), 乙腈为色谱纯, 水为高纯水, 其他试剂均为分析纯。

1.3 样品 收集了国内藏药不同产地的圆柏 *Sabina chinensis*, 大果圆柏 *S. tibetica*, 密枝圆柏 *S. convallium*, 香柏 *S. pingii* var. *wilsonii*, 刺柏 *Juniperus formosana* 等 11 批药材样品, 经甘肃省食品药品检验所宋平顺主任药师鉴定。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 CAPCELL PAK C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相 0.2% 磷酸水(A)-0.2% 磷酸乙腈(B)溶液, 梯度洗脱(0~9 min, 85% A; 9~20 min, 85%~75% A; 20~30 min, 75%~55% A; 30~40 min, 55%~40% A), 柱温 40 ℃, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 360 nm, 进样量 20 μL。按照上述色谱条件进行测定, 3 种黄酮与其他共存峰得到很好的分离, 各成分理论塔板数 ≥ 5 000, 见图 1。

2.2 对照品溶液的制备 分别精密称取干燥至恒重的芦丁、槲皮苷、山柰酚适量, 置 50 mL 量瓶中, 加甲醇溶解制成含芦丁、槲皮苷、山柰酚 0.048 8, 0.093 8, 0.108 0 g·L⁻¹ 的对照品贮备液。分别精密量取芦丁、槲皮苷、山柰酚对照品溶液 1.0, 1.0, 0.5



A. 对照品; B. 刺柏; C. 圆柏; 1. 芦丁; 2. 槲皮苷; 3. 山柰酚
图 1 刺柏、圆柏的 HPLC

Fig. 1 HPLC of *Sabina chinensis* and *Juniperus formosana*

mL, 置 10 mL 量瓶中, 得到混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备 分别称取各产地圆柏和刺柏粉末(过 2 号筛)约 0.1 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 70% 甲醇 25 mL, 称重, 超声处理 30 min, 放凉, 再称重, 用 70% 甲醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.4 线性关系考察 精密吸取 2.2 项下混合对照品溶液, 按 2.1 项下的色谱条件, 分别进样 1, 2, 5, 10, 15, 20, 30 μL, 以峰面积为纵坐标(Y), 进样量(μg)为横坐标(X), 绘制标准曲线, 得到芦丁、槲皮苷、山柰酚的回归方程分别为 $Y = 1\,511.5X + 0.476\,2$ ($r = 0.999\,9$), $Y = 1\,771.7X + 5.136\,9$ ($r = 0.999\,8$), $Y = 4\,087.4X - 2.667\,2$ ($r = 0.999\,8$), 线性范围分别在 0.004 9~0.146 4, 0.009 4~0.281 4, 0.005 4~0.162 0 μg 呈良好的线性关系。

2.5 精密度试验 取 2.2 项下混合对照品溶液, 按 2.1 项下的色谱条件, 重复进样 6 次, 进样量 20 μL, 测定。结果芦丁、槲皮苷、山柰酚峰面积 RSD 分别为 0.4%, 0.6%, 0.2%, 各化合物 RSD 均 < 3%, 符合要求。表明仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验 取 2.2 项下的混合对照品溶液, 按照 2.1 项下的色谱条件在 24 h 内每隔一定时间测 1 次, 一共测 6 次。结果芦丁、槲皮苷、山柰酚峰面积 RSD 分别为 1.4%, 0.2%, 0.6%, 表明 3 个成分在 24 h 内稳定。

2.7 重复性试验 取同一批圆柏样品粉末 0.1 g 精密称定, 共 5 份, 按 2.3 项下的方法制备, 按 2.1

项下的色谱条件进行测定。结果芦丁、槲皮苷、山柰酚的平均含量分别为 0.041 4%, 0.180 2%, 0.131 2%, RSD 分别为 0.7%, 0.9%, 1.6%, 表明方法重复性良好。

2.8 加样回收试验 取已知含量的圆柏粉末约 0.05 g, 精密称定, 共称取 6 份, 置具塞锥形瓶中, 精密加入芦丁、槲皮苷和山柰酚对照品适量(芦丁 0.048 8 g · L⁻¹, 槲皮苷 0.093 8 g · L⁻¹, 山柰酚 0.108 0 g · L⁻¹), 按 2.3 项下的方法制备, 计算各对照品的平均加样回收率和 RSD, 见表 1。

表 1 圆柏中 3 种成分的加样回收率试验

Table 1 Recovery test of 3 compounds of *Juniperus formosana*

化合物	样品中量 /μg	加入量 /μg	测得量 /μg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
芦丁	20.72	24.40	45.36	100.99	100.12	2.6
	21.22	24.40	46.38	103.11		
	22.01	24.40	46.08	98.66		
	20.59	24.40	44.80	99.22		
	21.56	24.40	46.56	102.45		
	22.80	24.40	46.30	96.31		
槲皮苷	91.08	93.80	180.95	95.81	96.35	0.7
	92.20	93.80	182.51	96.28		
	91.76	93.80	182.63	96.88		
	90.95	93.80	182.39	97.48		
	91.82	93.80	181.70	95.82		
	91.95	93.80	181.82	95.81		
山柰酚	65.95	64.80	128.16	96.01	96.13	0.5
	66.73	64.80	128.79	95.77		
	67.12	64.80	129.47	96.22		
	67.25	64.80	130.11	97.00		
	66.47	64.80	128.48	95.70		
	65.17	64.80	127.44	96.09		

2.9 样品测定 分别取不同产地的圆柏和刺柏粉末约 0.1 g, 精密称定, 按 2.3 项下的方法制备, 按 2.1 项下色谱条件, 精密吸取供试品溶液 20 μL, 注入高效液相色谱仪进行测定, 结果见表 2。

表 2 各产地圆柏和刺柏中 3 种化合物的含量 (n=3)

Table 2 Three compounds of different localities of *Sabina chinensis* and *Juniperus formosana* (n=3) %

品种来源	来源	药用部位	芦丁	槲皮苷	山柰酚
圆柏	甘肃天祝	枝、叶	0.026 6	0.054 4	0.024 3
圆柏	西藏	果实	0.049 9	0.059 8	0.060 9
圆柏	青海	枝、鳞叶	0.029 3	0.177 2	0.097 3
圆柏	青海	枝、刺叶	0.024 1	0.085 1	0.110 3
圆柏	安徽亳州	枝、鳞叶	0.041 4	0.180 2	0.131 2
圆柏属	奇正藏药	刺叶	0.047 4	0.182 1	0.153 9
大果圆柏	西藏	枝、鳞叶、刺叶	0.136 0	0.175 6	0.167 2
密枝圆柏	西藏	枝、鳞叶、刺叶	0.053 1	0.133 2	0.137 6
刺柏	甘肃甘南	枝、刺叶	0.049 2	0.179 2	0.022 1

3 讨论

3.1 取溶剂的选择 参照 2005 年版《中国药典》侧柏叶含量测定方法, 曾使用甲醇、50% 甲醇、70% 甲醇、乙醇作溶剂进行提取, 结果均可检出黄酮类成分, 而用 70% 甲醇作为提取溶剂, 干扰成分少, 成分含量高, 本实验选择 70% 甲醇为提取溶剂。

3.2 提取效率考察 分别考察超声 20, 30, 45, 60, 90, 120 min 6 个不同提取时间点对含量的影响, 结果显示超声提取时间 30 min 时含量达到最大值, 故本实验选择超声提取时间为 30 min。

3.3 流动相的选择 分别考察流动相为甲醇-乙腈-0.2% 磷酸、甲醇-0.2% 磷酸、乙腈-0.4% 磷酸、0.2% 磷酸乙腈-0.2% 磷酸水 4 个不同流动相梯度洗脱对含量结果的影响, 结果显示用 0.2% 磷酸乙腈-0.2% 磷酸水作为流动相后, 混合对照品和样品中 3 种黄酮类成分均达到了基线分离。

3.4 质量标准拟定 测定样品中涉及了 5 种不同的植物来源, 药用部位有一定的差异, 这是目前藏药应用的实际情况, 根据测定结果, 芦丁、槲皮苷和山柰酚的含量均相对较高, 建议用其三者的总含量作为控制藏药刺柏和圆柏的质量标准。

[参考文献]

- [1] 蒋永明. 园林绿化树种手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2002: 23-24.
- [2] 中国科学院植物志编辑委员会. 中国植物志. 第七卷[M]. 北京: 科学出版社, 1978: 362-636.
- [3] 四川植物志编辑委员会. 四川植物志. 第二卷[M]. 成都: 四川人民出版社, 1981: 190.
- [4] Xie J L, Dai Z Q, Yu D X, et al. The chemical constituents of essential oil from leaves of *Juniperus formosana* Hayata [J]. J Yunnan Univ, 1994, 16(2): 44-48.
- [5] 国家药典委员会. 国家药品标准. 蒙药卷[M]. 北京: 化学工业出版社, 1998: 23.
- [6] 马燕燕, 伏劲松, 单晓庆, 等. 香柏的化学成分研究[J]. 医学教育探索, 2010, 41(1): 32-33.
- [7] 张英华, 关雪. 刺五加叶中黄酮类提取物的抗氧化性及抑菌作用研究[J]. 东北农业大学学报, 2012, 43(3): 85-90.
- [8] 杨公明, 严建刚. 芹菜黄酮的提取及其抗氧化与降血脂作用研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2004: 39-41.
- [9] 崔鸿江, 巴德玛, 林燕. 蒙药材刺柏叶中槲皮苷的含量测定[J]. 天然产物研究与开发, 2013, 25(2): 221-223.

[责任编辑 顾雪竹]