

# 山核桃树皮中槲皮苷的提取工艺优选及含量测定

陈金印,张坤,徐敏,沈勇,刘楠楠,蒋福升,丁志山\*  
(浙江中医药大学,杭州 310053)

**[摘要]** **目的:** 优选山核桃树皮中槲皮苷的提取工艺,并建立其含量测定方法。**方法:** 采用乙醇回流法提取山核桃树皮,经聚酰胺吸附去杂、多次析晶得槲皮苷,采用核磁共振波谱法(NMR)确证其结构,HPLC测定其含量。通过正交试验考察乙醇体积分数、提取时间和提取次数对槲皮苷得率的影响。**结果:** 经 NMR 确证产物为槲皮苷,HPLC 表明其在 4.8 ~ 91.2 mg·L<sup>-1</sup> 呈良好线性关系,山核桃树皮中槲皮苷含量高达 8.37%。最佳提取工艺为 10 倍量 60% 乙醇回流提取 2 次,每次 1 h,提取率 >90%。**结论:** 建立的山核桃中槲皮苷含量测定方法简单精确,优选的提取工艺稳定可行。

**[关键词]** 山核桃; 槲皮苷; 高效液相色谱法; 含量; 提取工艺

**[中图分类号]** R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)22-0042-04

## Optimization of Extraction Technology for Quercitrin from Bark of *Carya cathayensis* and Determination of Its Content

CHEN Jin-yin, ZHANG Kun, XU Min, SHEN Yong, LIU Nan-nan, JIANG Fu-sheng, DING Zhi-shan\*  
(Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China)

**[Abstract]** **Objective:** To optimize extraction technology of quercitrin from bark of *Carya cathayensis*, and establish its content determination method. **Method:** Ethanol reflux extraction method was conducted, extraction solution was absorbed by polyamide to remove dopant, then condensed, crystallized and recrystallized to obtain pure product. After identification by NMR, the content of quercitrin was determined by HPLC. Orthogonal test was used to investigate influence of the concentration of ethanol, extraction time and extraction times on yield of quercitrin. **Result:** NMR verified product as quercitrin, HPLC showed that quercitrin had a good linear relationship in the range of 4.8-91.2 mg·L<sup>-1</sup>, the content of quercitrin from bark of *C. cathayensis* was up to 8.37%. Optimum extraction technology was: reflux extracted 2 times with 10 times the amount of 60% ethanol, 1 h per time, extraction rate of quercitrin 90%. **Conclusion:** Established content determination method of quercitrin from *C. cathayensis* was accurate and simple, optimized extraction technology was stable and feasible.

**[Key words]** *Carya cathayensis*; quercitrin; HPLC; content; extraction technology

山核桃树皮具有抗菌消炎、清热解毒、抗氧化、抗肿瘤等药理作用<sup>[1-2]</sup>,其所含成分槲皮苷属黄酮醇苷类化合物,具有抗病毒、抗炎、增强心肌收缩及利尿等作用,常用作抗炎、利尿剂及纺织染料。同时,槲皮苷已成为评价某些中草药质量优劣<sup>[3]</sup>及药物制剂药效成分含量标准之一<sup>[4-5]</sup>。但槲皮苷在各植物中含量有限,难以得到大量纯品进行系统实验

研究。本课题组对山核桃化学成分及药理活性做了大量工作<sup>[6-9]</sup>,在前期试验中发现,山核桃树皮中槲皮苷含量占树皮干重的 8% 以上,为大量获得槲皮苷纯品提供了保证。尚未发现有关山核桃树皮中槲皮苷含量测定及其提取工艺考察的报道,故本试验对该化合物的分离、鉴定、提取工艺优化及其含量测定进行了初步探讨。

**[收稿日期]** 20120703(006)

**[基金项目]** 浙江省“新苗”人才计划项目(2010R410002)

**[第一作者]** 陈金印,硕士,从事中药抗肿瘤研究,Tel:0571-86613666, E-mail:chenjinyin2010@163.com

**[通讯作者]** \* 丁志山,博士,教授,从事中药学研究,Tel:0571-86613666, E-mail: zjtcmdzs@163.com

## 1 材料

500 MHz 型核磁共振仪 (Bruker 公司), UltiMate 3000 型高效液相色谱仪 (美国戴安), WRS-2A 型数字熔点仪 (上海申光仪器仪表有限公司), AR2130 型 1/万电子天平 (美国 Ohaus 公司)。

山核桃树皮于 2011 年 10 月采自浙江临安, 经浙江中医药大学丁志山教授鉴定为山核桃 *Carya cathayensis* Sarg. 的树皮; 槲皮苷对照品 (实验室自制, 经 NMR 鉴定其结构, HPLC 峰面积归一法检测含量 99.8%), 甲醇、乙腈为色谱级, 聚酰胺 (100 ~ 200 目, 杭州禾德化工有限公司), 水为双蒸水。

## 2 方法与结果

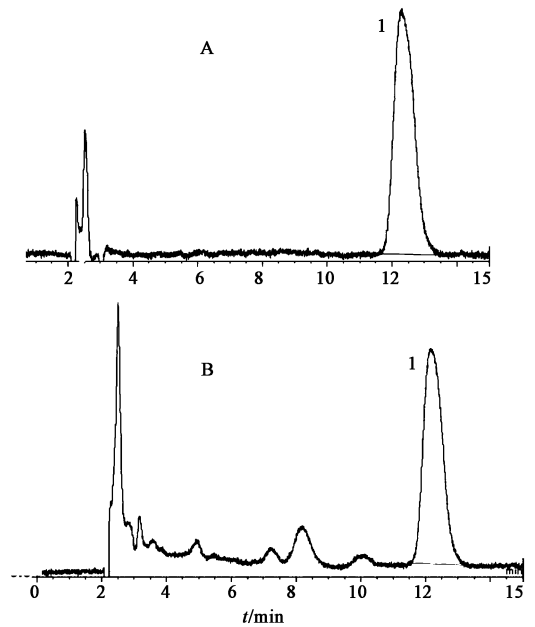
**2.1 槲皮苷分离与鉴定** 山核桃树皮晒干, 打粉, 过 40 目筛, 用 60% 乙醇加热回流提取 2 次, 过滤, 减压浓缩至乙醇体积分数为 40%, 加入聚酰胺适量, 室温摇床吸附过夜, 过滤, 浓缩至无醇味, 室温放置析晶, 12 h 后转入 4 °C 继续析晶, 过滤收集晶体, 加甲醇溶解, 重结晶 1 次, 得黄色粉末状晶体。

熔点测定结果表明, 该黄色粉末晶体熔点为 172.5 ~ 174.0 °C。<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) 0.83 (3H, d, *J* = 6.00 Hz, CH<sub>3</sub>), 3.17-4.00 (4H, glc-H), 5.28 (1H, s, H-1''), 6.23 (1H, d, *J* = 2.00 Hz, H-6), 6.41 (1H, d, *J* = 2 Hz, H-8), 6.88 (1H, d, *J* = 8.50 Hz, H-5'), 7.27 (1H, dd, *J* = 2.25 Hz 和 *J* = 8.25 Hz, H-6'), 7.32 (1H, d, *J* = 2.00 Hz, H-2');<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) 17.538 (C-6''), 70.098 (C-5''), 70.400 (C-3''), 70.630 (C-2''), 71.225 (C-4''), 93.671 (C-8), 98.732 (C-6), 101.865 (C-1''), 104.135 (C-10), 115.507 (C-2'), 115.705 (C-5'), 120.787 (C-1'), 121.164 (C-6'), 134.260 (C-3), 145.242 (C-3'), 148.472 (C-4'), 157.350 (C-2), 156.491 (C-9), 161.343 (C-5), 164.225 (C-7), 177.793 (C-4); 上述数据和文献[4]报道基本一致, 故该化合物确定为槲皮素-3-*O*- $\alpha$ -鼠李糖苷。

### 2.2 槲皮苷含量测定

**2.2.1 系统适应性考察** Kromasil C<sub>18</sub> 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相甲醇-5% 乙腈的 0.04% 磷酸水溶液 (40:60), 流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 检测波长 256 nm, 柱温 35 °C, 进样量 10 μL。在此色谱条件下, 槲皮苷与相邻色谱峰分离度 > 3, 理论塔板数 > 3 000, 达到基线分离 (图 1)。

**2.2.3 线性关系考察** 精密称取槲皮苷对照品 1.2 mg, 置于 5 mL 量瓶中, 用甲醇溶解定容, 制成 0.24 g·L<sup>-1</sup> 的对照品储备液。精密量取储备液适



A. 对照品; B. 样品; 1. 槲皮苷

图 1 山核桃树皮提取物 HPLC

量, 用甲醇稀释成含槲皮苷 4.8, 19.2, 33.6, 48.0, 62.4, 76.8, 91.2 mg·L<sup>-1</sup> 的工作液, 分别进样 10 μL。以峰面积 *Y* 对质量浓度 *X* 绘制标准曲线, 得槲皮苷线性回归方程为  $Y = 34.652X - 0.4997$  ( $R^2 = 0.9999$ ), 槲皮苷在 4.8 ~ 91.2 g·L<sup>-1</sup> 呈良好线性关系。

**2.2.4 精密度试验** 精密吸取同一对照品溶液, 按 2.2.1 项下色谱条件, 连续进样 6 次, 每次 10 μL, 测定峰面积, 结果 RSD 0.21%。

**2.2.5 稳定性试验** 山核桃树皮晒干, 打粉, 过 40 目筛, 准确称取粉末 0.5 g, 用 100 mL 60% 乙醇回流提取 1 h, 过滤, 定容至 50 mL, 精密吸取 100 μL, 甲醇定容至 2 mL 作为供试品溶液, 分别于 0, 1, 3, 6, 9, 12 h 各进样 10 μL, 结果 RSD 0.85%, 说明供试品溶液在 12 h 内稳定。

**2.2.6 重复性试验** 精密称取同一批山核桃树皮粉末 6 份, 按 2.2.5 项下方法制备供试品溶液, 按 2.2.1 项下色谱条件测定山核桃树皮中槲皮苷质量分数为 8.37%, RSD 1.14%, 表明该方法重复性良好。

**2.2.7 加样回收率试验** 精密称取已知槲皮苷含量的山核桃树皮粉末 9 份, 每份 250 mg, 分成 3 组, 分别向 3 组中精密加入槲皮苷对照品 12.0, 24.0, 36.0 mg, 按 2.2.5 项下方法提取、定容、稀释和进样。结果平均加样回收率 97.64%, RSD 1.31%, 说明该方法准确度高。

表 1 槲皮苷加样回收率试验

No.	样品中 含量/mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均回收 率/%	RSD /%
1	20.93	12.00	31.75	96.43		
2	20.93	12.00	31.95	97.05		
3	20.93	12.00	32.53	98.79		
4	20.93	24.00	43.68	97.23		
5	20.93	24.00	44.59	99.24	97.64	1.31
6	20.93	24.00	43.89	97.69		
7	20.93	36.00	55.69	97.82		
8	20.93	36.00	54.25	95.31		
9	20.93	36.00	56.45	99.17		

2.3 槲皮苷提取工艺优化 称取山核桃树皮粉末 500 g,按正交试验安排加入适量乙醇,回流提取若干次,过滤,合并滤液并定容,加甲醇稀释并定容,进样 10  $\mu$ L,测定槲皮苷得率。正交试验安排及结果见表 2,方差分析见表 3。

表 2 山核桃树皮中槲皮苷的提取工艺优选正交试验安排

No.	A 乙醇体积 分数/%	B 料液比	C 提取 时间/h	D 提取 数/次	槲皮苷 得率/%
1	40	1:8	1	1	80.33
2	40	1:10	1.5	2	85.65
3	40	1:12	2	3	86.12
4	60	1:8	1	3	89.52
5	60	1:10	2	1	88.12
6	60	1:12	1	2	92.69
7	80	1:8	2	2	88.17
8	80	1:10	1	3	92.28
9	80	1:12	1.5	1	88.56
$K_1$	84.03	86.01	88.43	85.67	
$K_2$	90.11	88.68	87.91	88.84	
$K_3$	89.67	89.12	87.47	89.31	
R	6.08	3.17	0.96	3.64	

表 3 方差分析

误差来源	SS	f	F	P
A	68.891	2	49.384	<0.05
B	17.072	2	12.238	>0.05
C(误差)	1.395	2	1.000	
D	23.474	2	16.827	>0.05

注:  $F_{0.05}(2,2) = 19.00$ 。

由表 2,3 结果可知,4 个因素中乙醇体积分数对提取工艺影响最大,其次为提取次数和物料比,提

取时间影响较小。以极值最小的 C 因素为误差项进行方差分析,结果表明 A 因素有显著影响,其他因素均对提取工艺无显著影响,结合生产成本考虑,确定最佳提取工艺为  $A_2B_2C_1D_2$ ,即加 10 倍量 60% 乙醇回流提取 2 次,每次 1 h。

2.4 验证试验 称取山核桃树皮粉末 3 份,平行操作,按优选的提取工艺制备样品溶液,定容,稀释,按 2.2.1 项下色谱条件进行槲皮苷提取率分析。结果槲皮苷得率分别为 92.14%,89.41%,91.14%,说明优选工艺条件合理、稳定。

### 3 讨论

研究表明槲皮苷在抗氧化、抗动脉粥样硬化、抗肿瘤、治疗糖尿病等方面具有较大的应用潜力<sup>[10-14]</sup>。目前已有多个以槲皮苷为主要药效成分的专利,如 CN100406027C,CN1320891C 等;同时以槲皮苷为主要药效成分的产品也走向市场,如田基黄胶囊、田基黄注射液等。检索国内外大量资料发现有关槲皮素和其他黄酮类物质的提取工艺和测定方法的研究较多<sup>[15-18]</sup>,但未见有关槲皮苷纯品制剂专利及药物制剂;综合分析,可能是由于现有药物资源不适合工业化生产槲皮苷纯品,因此,寻找到一种简便、经济、高效并获得高纯度的槲皮苷技术工艺,将有望带来巨大经济效益和社会效益。本研究发现,山核桃树皮中槲皮苷质量分数高达 8.37%,通过系统研究,利用 HPLC 建立了山核桃树皮中槲皮苷的含量测定方法,并初步建立高效提取槲皮苷的体系,为获得廉价、高纯槲皮苷样品奠定了坚实基础。

### [参考文献]

- [1] 司传领,刘忠,惠岚峰,等.核桃楸树皮提取物的化学成分及其抗氧化活性研究[J].林产化学与工业,2008,289(1):29.
- [2] 王金兰,张淑霞,李铁军,等.山核桃树皮化学成分研究[J].中草药,2008,39(4):490.
- [3] 熊丽,陈晓辉,梁健,等.RP-HPLC 同时测定田基黄药材中异槲皮苷、槲皮苷和槲皮素的含量[J].药物分析杂志,2008,28(10):1619.
- [4] 中山大学.一种田基黄提取物及其制备方法和用途,中国;CN1320891C[P].2007-06-13.
- [5] 中国人民解放军第二军医大学.一种用于治疗肝脏疾病的中药组合物及其制备方法,中国;CN1660307A[P].2008-07-30.
- [6] 胡旭姣,赵肖君,周奋,等.山核桃提取物体外抗肿瘤作用研究[J].中华中医药学刊,2007,25(2):369.

## 叶黄素微囊分散片的成型处方优选

耿梦园<sup>1</sup>, 鲁萍<sup>2</sup>, 杨丽丽<sup>1</sup>, 孙疆<sup>1</sup>, 王新春<sup>1,3\*</sup>

(1. 石河子大学药学院, 新疆 石河子 832002; 2. 新疆生产建设兵团医院, 乌鲁木齐 830002;  
3. 石河子大学医学院一附院, 新疆 石河子 832008)

**[摘要]** 目的: 优选叶黄素微囊分散片的成型处方。方法: 以外观、混悬性、崩解时间及溶出度为综合评价指标, 采用单因素试验确定填充剂及润滑剂种类和用量、崩解剂、润湿剂及溶胀性辅料的种类, 通过正交试验优选叶黄素微囊分散片的成型工艺处方。结果: 最佳处方为以 25% 羧甲基淀粉钠(CMS-Na)-交联聚乙烯吡咯烷酮(PVPP)(1:1.5)为崩解剂, 6% 羟丙基纤维素(HPC)为溶胀性辅料, 70% 乙醇溶液为润湿剂, 所制备的分散片在 80 s 内完全崩解, 10 min 溶出度 >90%。结论: 优选的处方辅料种类及比例适宜、片面光洁, 崩解迅速、溶出度高, 具有良好的开发前景。

**[关键词]** 叶黄素微囊; 分散片; 成型工艺; 正交试验

**[中图分类号]** R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)22-0045-04

## Optimization of Shaping Prescription of Lutein Microencapsulation Dispersible Tablet

GENG Meng-yuan<sup>1</sup>, LU Ping<sup>2</sup>, YANG Li-li<sup>1</sup>, SUN Jiang<sup>1</sup>, WANG Xin-chun<sup>1,3\*</sup>

**[收稿日期]** 20120706(009)

**[基金项目]** 石河子大学生研究训练计划项目(SRP2012216); 科技人员服务企业行动项目(SQ2009GJG4102765)

**[第一作者]** 耿梦园, 在读本科, Tel:0993-2855827, E-mail:gengmengyuan@qq.com

**[通讯作者]** \*王新春, 教授, 从事药物新剂型的研究, E-mail:ewjwxc@163.com

- [7] 谢红, 马哲龙, 许志连, 等. 山核桃叶提取物体外对 HepG2 细胞增殖抑制作用研究[J]. 中药学, 2011, 23(11): 222.
- [8] Xu-dong C, Zhishan D, Fu-sheng J, et al. Antitumor constituents from the leaves of *Carya cathayensis* [J]. Nat Prod Res, 2011, 36(2): 1.
- [9] 马哲龙, 蒋福升, 俞婷婷, 等. 山核桃树叶中球素查耳酮的含量测定[J]. 中国医药导报, 2011, 22(8): 69.
- [10] Chou S C, Su C R, Ku Y C, et al. The constituents and their bioactivities of *Houttuynia cordata* [J]. Chem Pharm Bull, 2009, 57(11): 1227.
- [11] Wagner C, Vargas A P, Roos D H, et al. Comparative study of quercetin and its two glycoside derivatives quercitrin and rutin against methylmercury (MeHg)-induced ROS production in rat brain slices [J]. Arch Toxicol, 2010, 84(2): 89.
- [12] Choi J S, Bae J Y, Kim D S, et al. Dietary compound quercitrin dampens VEGF induction and PPAR gamma activation in oxidized LDL-exposed murine macrophages: association with scavenger receptor CD36 [J]. J Agric Food Chem, 2010, 58(2): 1333.
- [13] Ding M, Zhao J, Bowman L, et al. Inhibition of AP-1 and MAPK signaling and activation of Nrf2/ARE pathway by quercitrin [J]. Int J Oncol, 2010, 36(1): 59.
- [14] 尹锋, 胡立宏, 楼凤昌. 罗勒化学成分的研究[J]. 中国天然药物, 2004, 2(1): 20.
- [15] 吕子明, 陈凯, 于向红, 等. 甘草总黄酮的大孔吸附树脂纯化工艺优选[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(11): 24.
- [16] 曹跃, 王丽, 周翎, 等. 火绒草中总黄酮的纯化工业优选[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(10): 38.
- [17] 毛海立, 周德超, 龙成梅, 等. 铁包金中不同部位总黄酮含量比较[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(9): 115.
- [18] 张集盘, 叶国梁, 石晶萍, 等. RP-HPLC 法测定金钱草中槲皮素和山萘素两种黄酮成分的含量[J]. 江苏药学与临床研究, 2005, 13(1): 31.

[责任编辑 全燕]