

图 1 对照品(A)与样品(B) HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC Chromatograms of reference substance (A) and sample (B)

3.2 检测波长的选择: 通过对紫丁香苷、长梗冬青苷对照品溶液进行紫外波长扫描, 结果表明, 两者在 210 nm 波长处均有较强的吸收, 因此选择 210 nm 紫外检测波长。

3.3 实验中比较了不同提取溶剂 (甲醇、乙醇、水、20% 甲醇、50% 甲醇和 80% 甲醇) 以及不同提取方法 (超声提取、加热回流提取和索氏回流提取) 对紫丁香苷和长梗冬青苷的提取效果, 结果显示, 50% 甲醇超声提取的效果最理想; 另外, 对超声提取时间 (15、30、45、60min) 进行了考察, 结果表明

超声提取 30 min 即可将两个成分提取完全。因此, 最终确定供试品溶液的制备方法为 50% 甲醇超声提取 30 min。

3.4 从样品的测定结果来看, 不同产地救必应药材中紫丁香苷和长梗冬青苷的量差异较大, 这可能与救必应的生长环境、生长时间、药用部位 (枝皮或树干皮) 等因素有关。

致谢: 方法研究中使用的具柄冬青苷对照品由原广州市医药工业研究所刘国樵高级工程师及原广州市药品检验所朱品业主任药师提供, 特此感谢。

参考文献:

- [1] 广东省食品药品监督管理局. 广东省中药材标准 (第一册) [M]. 广州: 广东科技出版社, 2004
- [2] 蒋涛滔, 张榕文, 范庆亚. 救必应研究进展 [J]. 中医药导报, 2007, 13(2): 82-84
- [3] 谢培山, 杨赞熹. 救必应化学成分的研究—止血成分救必应乙素的分离、鉴定 [J]. 药学学报, 1980, 15(5): 303-305
- [4] 李超生. 具柄冬青苷的制备方法及应用 [P]. 中国专利: CN 101099754A, 2008-01-09
- [5] 林 彤, 梁广华. 高效液相色谱法测定救必应及其制剂中丁香苷的含量 [J]. 中国中药杂志, 2000, 25(11): 671-672
- [6] 李超生, 张 婷, 李林国, 等. 高效液相色谱法测定救必应药材中具柄冬青苷的含量 [J]. 特产研究, 2007, 4: 45-47

多种药用裸子植物中双黄酮的定量测定

鲁来凤, 曹 园, 王 强*
(中国药科大学, 江苏 南京 210009)

摘 要: 目的 用 HPLC 法同时测定多种药用裸子植物中穗花杉双黄酮、扁柏双黄酮及银杏双黄酮的量。方法 采用 Hanbon Lichrospher C₁₈ (150 mm × 4.6 mm, 5 μm) 柱, 甲醇 0-100% 甲酸水梯度洗脱, 检测波长 337 nm, 体积流量 1.0 mL/min, 柱温 30 °C。结果 所测样品中双黄酮类成分的量差异大, 其中, 穗花杉双黄酮的量在 0.08~4.61 mg/g; 扁柏双黄酮的量在 0.03~4.68 mg/g; 银杏双黄酮的量在 0.10~3.03 mg/g。穗花杉双黄酮在所测样品中存在比较普遍, 而银杏双黄酮则相对较少。此方法加样回收率和线性范围均符合要求。结论 本方法结果准确、灵敏度高、重现性好, 可作为部分药用裸子植物中双黄酮类成分的质量控制定量方法。

关键词: 药用裸子植物; 穗花杉双黄酮; 扁柏双黄酮; 银杏双黄酮

中图分类号: R284.2 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2010)07-1388-03

裸子植物分布在世界各地, 特别是北半球亚热带高山地区及温带至寒温带地区。药用裸子植物的化学成分主要有黄酮类、生物碱、有机酸及甾酮等。其中, 黄酮类及双黄酮类成分是裸子植物的特征性成分^[1]。双黄酮具有抗肿瘤、抗病毒、消除自由基等药理作用^[2-4], 提示该类化合物在治疗心血管疾病及抗肿瘤方面具有广阔的前景。因此, 合理开发利

用裸子植物中双黄酮类成分资源具有重要的意义。虽然裸子植物的分析研究已有报道, 但药用裸子植物中双黄酮的定量测定未见系统报道, 因此本实验采用 HPLC-DAD 方法考察了多种不同药用裸子植物中双黄酮类成分量差异, 为今后利用药用裸子植物中双黄酮类成分提供科学依据。

1 仪器与试剂

* 收稿日期: 2009-12-07

作者简介: 鲁来凤 (1981-), 女, 湖南常德人, 硕士研究生, 从事中药及其制剂分析。Tel: 15850686892 E-mail: lulaileng520@126.com

* 通讯作者 王 强 Tel: (025) 83271390 E-mail: qwang49@sohu.com

1.1 仪器: Agilent 1100 Series 高效液相色谱仪, DAD 检测器; Sartorius BP211D 型电子分析天平; KH3200E 型超声波清洗器(昆山禾创超声仪器有限公司)。

1.2 试药: 甲醇为色谱纯, 购于江苏汉邦科技有限公司; 水为乐百氏纯净水; 其他试剂均为分析纯。穗花杉双黄酮、扁柏双黄酮及银杏双黄酮对照品为实验室自制, 经光谱确定结构, HPLC 峰面积归一化法计算质量分数均大于 98%。各批次药材经中国药科大学中药分析教研室王强教授鉴定。药材种类及来源见表 1。

2 方法与结果

2.1 色谱条件: 色谱柱为 Hanbon Lichrospher C₁₈ (150 mm × 4.6 mm, 5 μm); 检测波长 337 nm; 柱温 30 °C; 流动相为 A 和 B 两相梯度洗脱, A: 0.1% 甲酸水, B: 甲醇; 洗脱程序: 0~15 min, B 为 60%~70%; 15~25 min, B 为 70%~72%; 25~35 min, B 为 72%~75%; 35~40 min, B 为 75%~80%。体积流量 1 mL/min; 进样量 15 μL, 理论塔板数以穗花杉双黄酮峰计大于 5 000。

2.2 对照品溶液的制备: 分别精密称取穗花杉双黄酮、扁柏双黄酮、银杏双黄酮对照品适量, 置量瓶中, 以甲醇溶解并定容, 即得混合对照品溶液的浓度分别为: 0.2026 mg/mL; 0.0117 mg/mL; 0.0990 mg/mL。

2.3 供试品溶液的制备: 称取样品细粉约 0.5 g(过 40 目筛), 精密称定, 置锥形瓶中, 加甲醇 50 mL, 超声提取 30 min 后滤过。滤渣再用甲醇重复提取两次, 合并 3 次滤液。减压回收溶剂, 残渣用甲醇溶解并定容至 10 mL 量瓶中, 摇匀。进样前用微孔滤膜(0.45 μm) 滤过, 取续滤液, 即得供试品溶液。

2.4 线性关系的考察: 精密吸取上述对照品溶液适量, 稀释成不同质量浓度的混合对照品溶液。取各溶液 15 μL, 按上述色谱条件重复进样两次, 以进样质量浓度(X , μg/mL) 为横坐标, 测得的峰面积平均值(Y) 为纵坐标绘制标准曲线, 并计算回归方程, 结果穗花杉双黄酮在 2.70~334.33 μg/mL 线性良好, 回归方程为 $Y = 52.237 X - 187.72$, $r = 0.9997$; 扁柏双黄酮在 3.90~312.00 μg/mL 线性良好, 回归方程为 $Y = 20.488 X + 58.01$, $r = 0.9997$; 银杏双黄酮在 3.30~198.00 μg/mL 线性良好, 回归方程为 $Y = 51.819 X - 212.75$, $r = 0.9997$ 。

2.5 精密度试验: 吸取混合对照品溶液, 按上述色谱条件连续测定 6 次, 进样量 15 μL, 测得各对照品

峰面积, 结果显示穗花杉双黄酮峰面积的 RSD 为 0.94%, 扁柏双黄酮的 RSD 为 1.79%, 银杏双黄酮的 RSD 为 1.24%, 表明仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验: 精密吸取供试品溶液, 分别于 0、2、4、6、8 h 测定, 进样量 15 μL, 测得峰面积并计算, 结果显示穗花杉双黄酮峰面积的 RSD 为 0.89%, 扁柏双黄酮的 RSD 为 0.73%, 银杏双黄酮的 RSD 为 1.18%, 表明供试品溶液在 8 h 内稳定。

2.7 重现性试验: 取同一样品 6 份, 按 2.3 项下方法平行制备, 依上述色谱条件进样 15 μL, 测定并计算, 穗花杉双黄酮、扁柏双黄酮及银杏双黄酮质量分数的 RSD 值分别为 0.56%、0.69%、0.46%。

2.8 加样回收率试验: 同一样品, 称取 6 份, 每份约 0.25 g, 精密称定, 分别加入相当于样品量 100% 的对照品, 穗花杉双黄酮 0.43 mg、扁柏双黄酮 0.90 mg、银杏双黄酮 0.50 mg, 按 2.3 项下方法制备供试品溶液, 依上述色谱条件测定, 并计算回收率, 结果平均回收率分别为穗花杉双黄酮 103.06%, RSD 2.98%; 扁柏双黄酮 101.40%, RSD 0.82%; 银杏双黄酮 99.60%, RSD 2.97%。

2.9 样品测定: 取所收集的样品, 按 2.3 项下方法制备供试品溶液, 以 15 μL 的进样量注入色谱仪($n=3$), 测定结果见表 1, 色谱图见图 1。另外, 在草麻黄 *Ephedra sinica* Stapf、湿地松 *Pinus elliotii* Engelm、黑松 *Pinus thunbergii* Parl、金钱松 *Pseudolarix amabilis* (Nelson) rehd 及雪松 *Cedrus deodora* (Roxb.) G Don 中未检测到以上 3 种双黄酮成分。

3 讨论

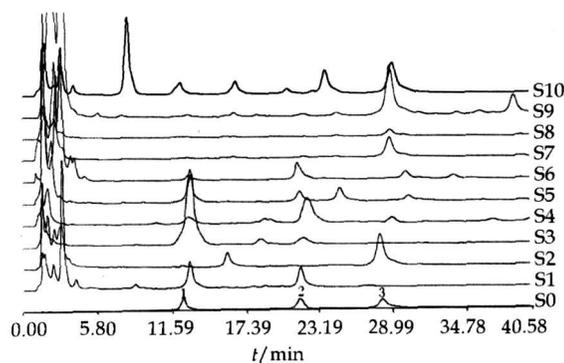
3.1 本实验首次对裸子植物中不同科属的药用植物进行了测定, 其中同科同属植物有: 云南红豆杉和南方红豆杉属于红豆杉科红豆杉属; 黑松和湿地松属于松科松属。同科不同属植物有: 侧柏和柏木分别属于柏科侧柏属和柏木属; 墨西哥落羽杉和北美红杉分别属于杉科落羽杉属和北美红杉属; 金钱松属和雪松分别属于松科金钱松和雪松属。其他科属的植物有: 香榧属于红豆杉科榧树属; 苏铁属于苏铁科苏铁属; 银杏属于银杏科银杏属; 罗汉松属于罗汉松科罗汉松属; 草麻黄属于麻黄科麻黄属^[5]。实验结果进一步证明亲缘关系近的植物具有相同或者相似的成分, 这在植物分类学上也有一定的意义。

3.2 分析条件的选择: 本实验对药用裸子植物中的穗花杉双黄酮、扁柏双黄酮和银杏双黄酮的最佳提取方法和检测波长进行了优选。从实验结果来看,

表 1 样品的定量测定结果

Table 1 Quantitative determination of samples tested

编号	名称	来源	质量分数/(mg·g ⁻¹)		
			穗花杉双黄酮	扁柏双黄酮	银杏双黄酮
S1	侧柏 <i>Platycladus orientalis</i>	南京	0.98	2.26	—
	侧柏 <i>P. orientalis</i>	昆明	1.18	2.29	—
	侧柏 <i>P. orientalis</i>	南京同仁堂	1.61	3.56	—
S2	银杏 <i>Ginkgo biloba</i>	昆明	0.22	—	1.04
	银杏 <i>G. biloba</i>	南京	—	—	1.90
S3	苏铁 <i>Cycas revoluta</i>	昆明	4.58	1.10	—
	苏铁 <i>C. revoluta</i>	南京	4.61	1.55	—
S4	罗汉松 <i>Podocarpus macrophyllus</i>	昆明	0.46	4.68	0.56
	罗汉松 <i>P. macrophyllus</i>	南京	0.20	4.10	1.21
S5	北美红杉 <i>Sequoiadendron sempervirens</i>	南京	1.33	0.98	—
S6	墨西哥落羽杉 <i>Taxodium mucronatum</i>	昆明	0.26	2.03	—
	墨西哥落羽杉 <i>T. mucronatum</i>	南京	0.11	0.25	—
S7	云南红豆杉 <i>Taxus yunnanensis</i>	昆明	0.09	0.03	0.10
S8	南方红豆杉 <i>Taxus chinensis</i>	南京	0.08	—	0.34
S9	香榧 <i>Torreya grandis</i>	南京	0.13	0.27	3.03
S10	柏木 <i>Cupressus funebris</i>	南京	0.64	—	2.13



1 穗花杉双黄酮 2 扁柏双黄酮 3 银杏双黄酮 S0 对照品
1 amentoflavone 2 hinokiflavone
3 ginkgetin S0 reference substances

图 1 对照品和样品对照图谱

Fig 1 HPLC Chromatograms of reference substances and samples

在 337 nm 处各成分吸收较好;用甲醇超声振荡提取 3 次,提取的比较完全且简便易行,重现性好。

3.3 实验结果表明所测得的多种药用裸子植物中都含有双黄酮类化合物(除松科),但其量差异较大,其中,穗花杉双黄酮在苏铁中的量最高为 4.61 mg/g;扁柏双黄酮在罗汉松中的量最高为 4.68 mg/g;银杏双黄酮在香榧中的量最高为 3.03 mg/g,这可为将来该类成分的开发利用提供一定的理论依据。

同种药用植物由于批次不同,成分的量差异较大,这可能与采收季节及产地有关。文献报道^[6]麻黄中含有穗花杉双黄酮,但本实验中并未检测到,可能是其量太低,也可能是与产地及采收季节有关。在本实验所测定的几种松科植物中未检测到双黄酮类化合物,证实了双黄酮类化合物在松科中少见^[7]。

3.4 本实验首次用 HPLC-DAD 法同时对药用裸子植物中 3 种双黄酮成分进行了定量测定,方法简便、准确、重现性好,为今后开发利用此类药用植物提供依据,也为药用裸子植物的质量控制奠定基础。

参考文献:

- [1] 袁昌齐. 中国裸子药用植物概论[J]. 中药通报, 1988, 13(1): 3-6.
- [2] 徐智, 束俭辉, 谭桂山. 双黄酮类化合物研究进展[J]. 中国现代医学杂志, 2004, 14(7): 88-91.
- [3] 张玉梅, 谭宁华, 黄火强, 等. 墨西哥落羽杉中三个活性双黄酮研究[J]. 云南植物研究, 2005, 27(1): 107-110.
- [4] 郑晓珂, 赵献敏, 冯卫生, 等. 卷柏调血脂活性部位化学成分研究[J]. 中草药, 2009, 40(11): 1712-1715.
- [5] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志[M]. 第 7 卷. 北京: 科学出版社, 2006.
- [6] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1996.
- [7] 周荣汉, 段金廛. 植物化学分类学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2005.