

核桃楸不同药用部位总黄酮含量测定及变化规律

任晓蕾,曹贵阳,初东君,霍金海,王伟明*
(黑龙江省中医研究院,哈尔滨 150036)

[摘要] 目的:建立核桃楸药用部位总黄酮成分含量测定方法,明确其变化规律。方法:采用 75% 乙醇回流对青龙衣中总黄酮类成分进行提取,以芦丁为对照品,采用硝酸铝-亚硝酸钠比色法,AB-8 大孔树脂除色素,建立含量测定方法。结果:初伏前后 5 个采集时间青龙衣总黄酮含量分别为 3.15,3.49,3.90,3.98,3.96 mg·g⁻¹。结论:初伏前黄酮总含量较低,初伏后总黄酮含量呈逐步增加的趋势,并且有一个快速增长的过程,伏天过后含量略有下降;不同药用部位黄酮含量顺序为叶>皮>茎。

[关键词] 核桃楸;青龙衣;黄酮;含量测定
[中图分类号] R284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2012)24-0104-03

The Determination and Accumulation of Flavone
in Different Medicinal Parts of *Juglans mandshurica*

REN Xiao-lei, CAO Gui-yang, CHU Dong-jun, HUO Jin-hai, WANG Wei-ming*
(Heilongjiang Academy of Traditional Chinese Medicine, Harbin 150036, China)

[Abstract] Objective: To establish the determination method and variation of medicinal parts of *Juglans mandshurica*. Method: Extract the total flavone from Qinglongyi by 75% ethanol, take the aluminum nitrate-nitrite colorimetric, in addition to the pigment by AB-8 macroporous resin and establish the determination method. Result: The content of total flavone in five different acquisition time was 3.25, 3.49, 3.90, 3.98, 3.96 mg·g⁻¹. Conclusion: Before the canicular days, the content of total flavones was gradually increased; after the canicular days, the content of total flavones was significantly growth to flatten, the content of total flavones of medicinal parts of *J. mandshurica* was leaf>bark>stem.

[Key words] *Juglans mandshurica*; Qinglongyi; flavone; determination

核桃楸为胡桃科胡桃属落叶乔木,其青果皮,茎,叶和树皮均可入药,核桃青果皮,即其果实未成熟时核外包裹的青皮,又被称为“青龙衣”。现代研

究表明,核桃楸具有抗菌、消炎、抗癌等作用,其抗肿瘤作用尤为显著,核桃楸各部位的提取物治疗癌症早已有广泛应用^[1-3]。

目前从胡桃科植物中分离出黄酮类化合物有 23 种,主要为黄酮醇和二氢黄酮醇及其苷。其中 Min 等从核桃楸根和茎中分离得到的 4 种黄酮,即 toxifolin, afzelin, quercitrin, myrieitrin。目前已证实,胡桃科植物中所含的黄酮类化合物具有抑酶、抗氧化和抗肿瘤等作用^[4-7]。

1 材料

1.1 药材 核桃楸青果皮、皮、叶、茎于 2009 年 7 月采自哈尔滨市宾县铜矿山区,经黑龙江省中医研究院初东君主任药师鉴定为 *Juglans mandshurica* Maxim。

[收稿日期] 20120113(003)
[基金项目] “重大新药创制”国家科技重大专项课题(2009ZX09102-138);黑龙江省科技攻关项目(GB09C301);哈尔滨市科技攻关项目(2009AA3BS084);哈尔滨市青年科技创新人才专项基金项目(2012RFQYS042)
[第一作者] 任晓蕾,硕士,助理研究员,从事中药制剂分析及质量标准研究, Tel: 0451-55665478, E-mail: paopao-009@163.com
[通讯作者] *王伟明,博士,研究员,从事中药新药开发 Tel: 0451-55665478, E-mail: zyyjy@163.com

1.2 仪器与试剂 UV-160A 型可见-紫外分光光度计(日本岛津公司),KQ-300DB 型数控超声仪(昆山市超声仪器有限公司),RE-52 型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂),BP211D 型电子天平(德国 Sartorius 公司),HWS26 型水浴锅(上海一恒科技有限公司)。

芦丁对照品(批号 100080-200306,中国药品生物制品检定所提供);亚硝酸钠、硝酸铝、氢氧化钠均为分析纯,水为自制超纯水;AB-8 大孔树脂(南开大学化工厂)。

2 方法与结果

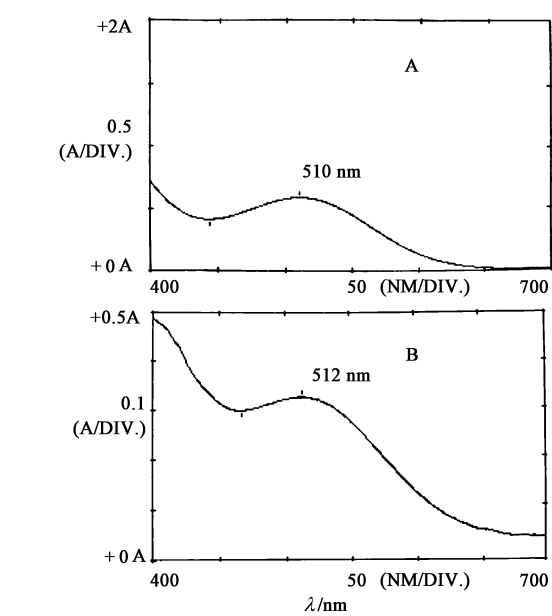
2.1 对照品溶液的制备 精密称取在 60 ℃减压干燥至恒重的芦丁对照品 5.11 mg,置 50 mL 量瓶中,加 60%乙醇适量,置 80 ℃水浴中加热,使溶解,放冷,用 60%乙醇稀释至刻度,摇匀,即得(每 1 mL 含无水芦丁 0.102 2 mg)。

2.2 供试品溶液的制备 精密称取青龙衣(切碎)约 2 g,精密称定,加入 100 mL 75%乙醇,加热回流 1 h,放冷,补足失重。精密吸取续滤液 20 mL,蒸干,用 1~2 mL 水溶解,加至已处理好的大孔树脂柱(AB-8 型大孔树脂,内径 1 cm,装量 14 cm)上,保留 1 h,用 50 mL 水洗脱,弃去洗脱液,再用 75%乙醇 50 mL 洗脱,收集洗脱液,即得。

2.3 测定波长的选择 取芦丁对照品溶液(0.102 2 g·L⁻¹)3.0 mL 及供试品溶液 3.0 mL,分别置 10 mL 量瓶中,加 5%亚硝酸钠溶液 0.3 mL,摇匀,放置 6 min,再加入 10%硝酸铝溶液 0.3 mL,摇匀,放置 6 min,再加氢氧化钠溶液(1 mol·L⁻¹)4 mL,用 30%乙醇稀释至刻度,放置 10 min,测定最大吸收波长。结果芦丁对照品和青龙衣样品显色后在(510 ± 2) nm 处均可见最大吸收峰(见图 1),故确定本方法的测定波长为 510 nm。

2.4 线性关系考察 精密量取对照品溶液 1.0, 2.0,3.0,4.0,5.0 mL,分别置 10 mL 量瓶中,加 5%亚硝酸钠溶液 0.3 mL,摇匀,放置 6 min,再加入 10%硝酸铝溶液 0.3 mL,摇匀,放置 6 min,再加氢氧化钠溶液(1 mol·L⁻¹)4 mL,用 30%乙醇稀释至刻度,放置 10 min,照分光光度法(附录 VA),在 510 nm 波长处测定吸收度,同时作空白,以吸光度(A)为横坐标,浓度(C)为纵坐标,绘制标准曲线,得线性回归方程为 $C = 0.086\ 41A + 0.000\ 3$ ($r = 0.999\ 7$),表明芦丁在 10.22~51.10 mg·L⁻¹线性关系良好。

2.5 精密度试验 取对照品溶液 3 mL,按 2.4 项



A. 芦丁对照品溶液显色后光谱;B. 青龙衣样品溶液显色后光谱

图 1 青龙衣紫外-可见吸收光谱

下方法操作,连续 6 次测定溶液的吸光度,RSD 0.91%,表明仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验 取同一供试品溶液,分别于 0.5,1,2,3,4 h 测定吸光度,计算得其 RSD 1.94%,样品在 4 h 内稳定。

2.7 重复性试验 取同一采集时间样品 6 份,按照供试品溶液制备方法制备,按照 2.4 项下方法测定其吸光度,结果总黄酮的平均质量分数为 3.16 mg·g⁻¹,RSD 1.35%,表明本方法重复性良好。

2.8 加样回收率实验 取已知含量的青龙衣 0.5 g,精密称定,以当前取样含量 1:1 准确加入芦丁对照品,按 2.2 项下“加入 100 mL 75%乙醇…”起处理,样品溶液按 2.4 项下方法测定,计算总黄酮回收率,结果平均回收率为 100.56%,RSD 1.47%,见表 1。

表 1 总黄酮含量测定加样回收率试验(n=3)

取样量 /g	样品含量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
0.510 2	1.612	1.59	3.202	99.96	100.56	1.47
0.500 6	1.582	1.60	3.180	99.87		
0.518 7	1.639	1.61	3.287	102.38		
0.509 5	1.610	1.57	3.124	102.13		
0.500 9	1.583	1.62	3.212	100.55		
0.504 8	1.595	1.60	3.171	98.48		

2.9 不同采集时间青龙衣总黄酮含量测定 取各采集时间青龙衣 2 g,精密称定,按照 2.2 项下制备

供试品溶液,测定其中总黄酮含量,结果见表 2。

表 2 不同采集时间青龙衣总黄酮含量(n=5)

采集时间	平均单枚质量	总黄酮含量
	/g	/mg·g ⁻¹
2009-07-01	16.45	3.15
2009-07-16	45.22	3.49
2009-08-03	47.08	3.90
2009-08-22	50.36	3.98
2009-09-14	50.44	3.96

测定结果表明,青龙衣中总黄酮含量随果实生长不断发生变化,7 月 1 日(初伏前)样品总黄酮含量较低,7 月 16 初伏后总黄酮含量总体呈逐步增加的趋势,并且有一个快速增长的过程,到入伏后期(8 月 22)含量达到峰值,伏天过后(9 月 14)总黄酮含量略有下降,但单枚中总量与入伏后期含量基本持平。9 月 28 日,采集区核桃楸果实均已掉落,未检测到样品含量,故青龙衣采集期较短,“伏天”采集为佳。

2.10 不同采集时间叶、皮、茎黄酮含量 分别取不同时期采集皮、茎、叶 0.5 g 左右,精密称定,按照 2.2 项下制备供试品溶液,测定其中总黄酮含量,结果见图 2。

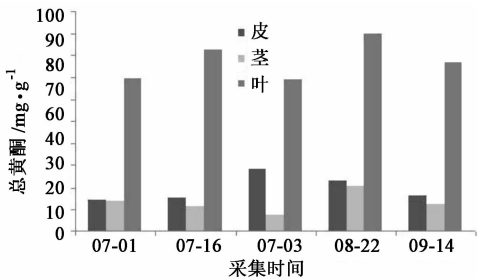


图 2 不同采集时间叶、皮、茎黄酮含量

由上图可知,皮、茎、叶中总黄酮含量未呈现与青龙衣总黄酮一致的明显变化规律。按每个采收时间分析,各药用部位总黄酮含量均呈现叶>皮>茎规律。

3 讨论

二十四节气是中国古代订立的一种用来指导农事的历法,能够准确反映季节的变化,指导农业、种植活动,因此本文选择“初伏(夏至后的第三个庚

日)”作为总黄酮含量变化的考察时间点,含量变化规律明确,具有参考价值。铜矿产区为本地区核桃楸主产区,资源丰富,因此选用此地核桃楸为研究对象。青龙衣中黄酮积累规律为,初伏前总含量较低,入伏后总含量呈逐步增加的趋势,且有一个快速增长的过程,伏天过后含量稍有下降,但单枚中总量与入伏后期含量基本持平,出伏后约 1 个月采集区核桃楸果实掉落,故青龙衣采集期较短,“伏天”采集为佳;各采收时期不同药用部位总黄酮含量均呈现叶>皮>茎规律。

预实验中筛选几种除色素方法,采用 H₂O₂ 除色素,因其氧化能力过强,使总黄酮类成分破坏;活性炭对青龙衣中色素吸附能力较弱,处理后溶液颜色未有明显变化,仍对含量测定有较大影响;筛选非极性树脂 X-5、弱极性树脂 AB-8 及极性树脂 NKA-9 对色素吸附能力,极性树脂 NKA-9 对目标成分吸附率较低,未能达到纯化作用;非极性树脂 X-5 与弱极性树脂 AB-8 吸附率相当,但前者解吸能力弱,对成分含量造成损失,因此选择 AB-8 型大孔树脂对青龙衣黄酮成分进行色素纯化处理。

[参考文献]

[1] 常仁龙,孙佳明,张博. 核桃楸叶化学成分研究[J]. 中成药,2009,31(7):1082.

[2] 段玉敏,张洪娟,张志华,等. 青龙衣胶囊在荷瘤小鼠体内抗肿瘤活性的研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(9):125.

[3] 林瑞新,杨淑莉,房学东,等. 核桃楸树皮乙酸乙酯提取物对原位移植荷胃癌小鼠的抑瘤作用[J]. 吉林大学学报:医学版,2011,37(2):260.

[4] 王燕,常杰,许锋,等. 胡桃科植物黄酮类化合物研究进展[J]. 现代农业科学,2008,15(11):5.

[5] 张丽,贺金华,王新堂. 香青兰中总黄酮的纯化与含量测定[J]. 新疆中医药,2009,27(2):67.

[6] 孙成宏,邓虹珠,易延遼. 紫外分光光度法测定复方红景天片中总黄酮含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2009,15(4):22.

[7] 张彦,金向群,时颖. 紫外分光光度法测定骨宝听肾片中总黄酮的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2009,15(4):17.

[责任编辑 顾雪竹]