

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2020.23.005

罗汉松种子总黄酮含量测定*

刘欣宇,吕玉媛,林乐珍,黄增琼[△]

(广西医科大学药学院,广西南宁 530021)

摘要:目的 建立测定罗汉松种子总黄酮含量的紫外-可见分光光度法。方法 采用70%乙醇回流提取罗汉松种子中的总黄酮,以芦丁为对照品,经显色后,以紫外-可见分光光度计于253 nm波长处测定总黄酮含量。结果 芦丁质量浓度在0.639~1.758 μg/mL范围内与吸光度线性关系良好,线性回归方程为 $Y=0.9044X+1.0733$ ($r=0.9973$);平均加样回收率为101.60%,RSD为2.34%($n=6$);罗汉松种子中总黄酮平均含量为4.66%。结论 该方法操作简便,重复性好,适用于测定罗汉松种子中的总黄酮含量。

关键词:罗汉松种子;紫外-可见分光光度法;总黄酮;含量

中图分类号:R932;R284.1;R286.0

文献标识码:A

文章编号:1006-4931(2020)23-0021-03

Content Determination of Total Flavonoids in the Seed of *Podocarpus Macrophyllus*

LIU Xinyu, LYU Yuyuan, LIN Lezhen, HUANG Zengqiong

(College of Pharmacy, Guangxi Medical University, Nanning, Guangxi, China 530021)

Abstract: Objective To establish an ultraviolet-visible spectrophotometry method for the content determination of total flavonoids in the seed of *Podocarpus macrophyllus*. **Methods** Total flavonoids were extracted in the seed of *Podocarpus macrophyllus* by reflux method with 70% ethanol as extraction solvent. The rutin was used as the reference substance, and the content of total flavonoids was detected by ultraviolet-visible spectrophotometry at 253 nm after the samples were coloured. **Results** Rutin showed a good linear relationship in the range of 0.639~1.758 μg/mL and the linear regression equation was as follows: $Y=0.9044X+1.0733$ ($r=0.9973$). The average recovery was 101.60% and RSD was 2.34% ($n=6$). The average content of total flavonoids in the seed of *Podocarpus macrophyllus* was 4.66%. **Conclusion** The method is simple and reproducible, which is suitable for the content determination of total flavonoids in the seed of *Podocarpus macrophyllus*.

Key words: the seed of *Podocarpus macrophyllus*; ultraviolet-visible spectrophotometry; total flavonoids; content

罗汉松实为罗汉松科罗汉松属植物罗汉松 *Podocarpus macrophyllus*(Thunb.) D. Don 或短叶罗汉松 *Podocarpus macrophyllus*(Thunb.) D. Don var. *maki*(Sieb.) Endl. 的果实,由种子和花托组成,具有补肾益肺、大补元气功效,用于治疗心胃痛和血虚、面色萎黄^[1]。罗汉松

实含有多糖^[2]、川芎嗪、石竹烯等化学成分^[3];罗汉松茎、枝叶中含有丰富的黄酮类化合物^[4-5]和萜类化合物^[6-7]。现代药理学研究表明,罗汉松提取物具有保护心脏、抑制胃癌细胞、调节血脂、抗氧化及保护肝脏作用^[8-11],可能与其所含黄酮类成分有关。目前,关于罗汉

*基金项目:广西自然科学基金[2020GXNSFAA259039]。

第一作者:刘欣宇,女,土家族,在读硕士研究生,研究方向为天然产物提取分离纯化及结构修饰,(电子信箱)390696135@qq.com。

[△]通信作者:黄增琼,男,壮族,博士研究生,研究方向为中药民族药,(电子信箱)huangzengqiong@163.com。

- [11] 王翰华,陈雁虹,姜雨辰. 浙贝母-知母药对的止咳、化痰及平喘作用研究[J]. 中华中医药杂志,2019,34(6):2474-2476.
- [12] 张佩月. 中药汤剂治疗肺燥咳嗽疗效观察[J]. 山西中医,2015,31(6):44-45.
- [13] 丁天宇,覃文慧,郝二伟,等. 治疗咳嗽中药专利复方的用药规律分析[J]. 中草药,2019,50(22):5639-5644.
- [14] 时登龙,刘代媛,曹喆,等. 苦杏仁药理作用及炮制工艺研究进展[J]. 亚太传统医药,2018,14(12):106-109.
- [15] 叶广亿,李书渊,陈艳芬,等. 枇杷叶不同提取物的止咳化痰平喘作用比较研究[J]. 中药药理与临床,2013,29(2):100-102.
- [16] 梁仲远. 桔梗水提液的镇咳、祛痰作用研究[J]. 中国药房,2011,22(35):3291-3292.
- [17] 张娜,吴绍康,沈先荣,等. 枇杷叶水提物祛痰止咳及抗炎作用研究[J]. 中华中医药学刊,2014,32(9):2175-2177.
- [18] 于辉,李春香,宫凌涛,等. 甘草的药理作用概述[J]. 现代生物医学进展,2006,6(4):77-79.
- [19] HUANG Y, LI J, MENG XM, et al. Effect of Triterpene Acids of *Eriobotrya japonica*(Thunb.) Lindl. Leaf and MAPK Signal Transduction Pathway on Inducible Nitric Oxide Synthase Expression in Alveolar Macrophage of Chronic Bronchitis Rats[J]. *Am J Chin Med*,2009,37(6):1099-1111.
- [20] 谭冰心,黄仪有,彭光天,等. 不同产地枇杷叶粗提物抑制磷酸二酯酶4活性研究[J]. 药物评价研究,2017,40(6):769-772.
- [21] 王洪伟,盛邦跃,林超. 桑白皮药理作用研究进展[J]. 中医学报,2019,34(6):1183-1187.
- [22] 秦向征,李良昌,延光海,等. 桑白皮水提取物对哮喘模型小鼠支气管肺泡灌洗液中炎性细胞的影响[J]. 延边大学医学学报,2011,34(2):93-95.

(收稿日期:2020-07-24)

松种子中总黄酮含量测定方法的研究报道较少,尚无法确定其总黄酮的含量。本研究中采用紫外-可见分光光度法测定罗汉松种子中总黄酮含量,可为今后罗汉松实的质量标准研究及药理活性研究提供科学依据。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

万能粉碎机(无锡久平仪器有限公司);XS-205DU型天平(瑞士梅特勒-托利多仪器有限公司,精度为十万分之一);KQ-500DB型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司,功率为500 W,频率为40 kHz);CD-UPH-II-20T型超纯水器(成都超纯科技有限公司);TU-1901型双光束紫外-可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司)。

1.2 试剂

罗汉松种子采自广西北海,经广西医科大学药学院生药学教研室李琼讲师鉴定为正品,符合药典规定;芦丁对照品(成都麦德生科技有限公司,批号为RP190213);氢氧化钠(天津市光复发展科技有限公司,分析纯);亚硝酸钠(天津博迪化工股份有限公司,分析纯);硝酸铝(天津市大茂化学试剂厂,分析纯,批号为20180502)。

2 方法与结果

2.1 溶液制备

对照品溶液:取芦丁对照品50 mg,精密称定,置烧杯内,加入30 mL 70%乙醇,超声溶解(功率为500 W,频率为40 kHz),转移至50 mL容量瓶中,以70%乙醇定容,摇匀,配制成质量浓度为0.951 4 mg/mL的芦丁贮备液,置4℃冰箱中保存,备用。取芦丁对照品20 mg,精密称定,置烧杯内,加入40 mL 70%乙醇,超声溶解(功率为500 W,频率为40 kHz),转移至100 mL容量瓶中,以70%乙醇定容,摇匀,配制成质量浓度为0.199 8 mg/mL的芦丁对照品溶液,置4℃冰箱保存,备用。

供试品溶液:取罗汉松种子粗粉200 g,置圆底烧瓶中,加入6倍量70%乙醇,回流提取1 h,过滤,收集滤液;滤渣重复提取1次,合并2次提取液,减压浓缩,80℃烘干,得罗汉松种子乙醇提取物干膏,备用。称取罗汉松种子乙醇提取物干膏50 mg,置烧杯中,加入40 mL 70%乙醇,超声处理(功率为500 W,频率为40 kHz)30 min,溶液转移至100 mL容量瓶中,以70%乙醇定容,摇匀,即得,置4℃冰箱保存。

空白对照溶液:量取70%乙醇置25 mL容量瓶中,摇匀,即得。

2.2 显色方法

取对照品溶液、空白对照溶液和供试品溶液各适量,置25 mL容量瓶中,精密加入5% NaNO₂溶液1 mL,摇匀,静置6 min,再加入10% Al(NO₃)₃溶液1 mL,摇匀,

静置6 min,最后加入4% NaOH溶液5 mL,以70%乙醇溶液定容,摇匀,静置15 min显色。

2.3 测定波长选择

精密量取芦丁对照品溶液0.2 mL、供试品溶液和空白对照溶液各0.3 mL,按2.2项下方法显色,以空白对照溶液调零,于190~700 nm波长范围分别扫描对照品溶液和供试品溶液。结果,两者于253 nm波长处均有最大吸收,故确定测定波长为253 nm。

2.4 方法学考察

线性关系考察:精密吸取质量浓度为0.199 8 mg/mL的芦丁对照品溶液0.08,0.10,0.14,0.18,0.22 mL,分别置25 mL容量瓶中,用70%乙醇定容,摇匀,得质量浓度分别为0.639,0.799,1.119,1.439,1.758 μg/mL的系列标准溶液。按2.2项下方法显色。以显色后的空白对照溶液调零,于253 nm波长处测定吸光度值,以吸光度(A)为纵坐标、芦丁对照品溶液质量浓度(C, μg/mL)为横坐标进行线性回归,得回归方程 $A = 0.9044X + 1.0733$, $r = 0.9973$ 。结果表明,芦丁对照品溶液质量浓度在0.639~1.758 μg/mL范围内与吸光度线性关系良好。

精密度试验:取质量浓度为0.799 μg/mL的芦丁对照品溶液,以显色后的空白对照溶液调零,重复测定6次。结果总黄酮吸光度的RSD为0.23% ($n=6$),表明仪器精密度良好。

重复性试验:取提取物干膏样品50 mg,共6份,精密称定,按2.1项下方法制备供试品溶液,精密量取0.1 mL,按2.2项下方法显色,以显色后的空白对照溶液调零,测定供试品溶液的吸光度。结果总黄酮平均含量为335.12 mg/g, RSD为1.20% ($n=6$),表明方法重复性良好。

稳定性试验:精密吸取0.1 mL已知含量的供试品溶液,按2.2项下方法显色,室温放置,以显色后的空白对照溶液调零,测定供试品溶液在15,30,45,60 min时的吸光度。结果60,45,30 min内溶液吸光度值的RSD分别为5.05%,4.22%,0.75% ($n=3$),表明供试品溶液在30 min内稳定性良好。

加样回收试验:取提取物干膏(批号为20180702)25 mg,共6份,精密称定,分别加入质量浓度为0.951 4 mg/mL的芦丁贮备液8 mL,按2.1项下方法制备供试品溶液。各取0.1 mL供试品溶液,按2.2项下方法显色。以显色后的空白对照溶液调零,测定吸光度,计算加样回收率。结果见表1。

2.5 样品含量测定

取同批提取物干膏(批号为20180702)50 mg,共3份,精密称定,按2.1项下方法制备供试品溶液,各取0.1 mL,

表1 总黄酮加样回收试验结果($n=6$)

取样量(g)	样品含量(mg)	加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	$\bar{X}$ (%)	RSD(%)
0.025 1	7.414 0	7.611 2	14.891 1	98.24	101.60	2.34
0.025 1	7.414 0	7.611 2	15.056 9	100.42		
0.024 9	7.355 0	7.611 2	15.084 6	101.56		
0.024 9	7.355 0	7.611 2	15.250 4	103.73		
0.024 9	7.355 0	7.611 2	15.333 4	104.82		
0.024 9	7.355 0	7.611 2	15.029 3	100.83		

按2.2项下方法显色。以显色后的空白对照溶液调零,测定吸光度。结果黄酮平均含量为323.50mg/g,按干膏提取率14.42%计算,罗汉松种子中总黄酮含量为4.66%。

3 讨论

3.1 提取方法选择

采用回流提取法提取罗汉松种子中的总黄酮,与超声提取法^[12]相比,其对样品粒径没有严格要求,对仪器设备的要求相对较低,可用于大规模提取。提取溶剂的体积分数、料液比、提取时间、提取温度等均会对黄酮类化合物的提取效果产生影响^[13],后续可通过正交试验对提取工艺进行优化,以确定最佳提取工艺条件。

3.2 试验条件选择

$\text{NaNO}_2 - \text{Al}(\text{NO}_3)_3 - \text{NaOH}$ 显色法可使黄酮类化合物开环生成查耳酮而显色^[14]。本研究中发现,显色剂的用量和加入试剂后的放置时间对测定结果存在较大影响。因此,应控制好显色剂用量,并严格控制显色时间。经 $\text{NaNO}_2 - \text{Al}(\text{NO}_3)_3 - \text{NaOH}$ 显色后,芦丁在510 nm波长附近有最大吸收^[15]。本研究中,经紫外扫描发现,芦丁对照品和提取物乙醇溶液均在253 nm波长处有最大吸收,而在510 nm波长附近无吸收峰。因此,选择253 nm为测定波长。稳定性试验结果显示,供试品溶液室温放置45 min后,稳定性较差,可能与加入氢氧化钠后反应产物结构不稳定和颜色发生改变有关。经测定,供试品溶液室温放置30 min稳定性较好,故采用该方法测定罗汉松种子中总黄酮含量时,样品溶液配制后需在30 min内完成。

3.3 方法评价

罗汉松种子挥发油中的川芎嗪可能是罗汉松实具有治心胃痛功效的主要原因。本研究结果显示,罗汉松种子中总黄酮含量较高(4.66%),具有进一步研究的价值。大量研究显示,黄酮类化合物具有抗氧化、调血脂、改善心肌供血、抗肿瘤、抗糖尿病、抗病毒等药理作用^[16-19]。推测罗汉松实治心胃痛的功效还可能与其中所含的黄酮类成分有关。本方法操作简单,重复性良好,准确性较高,可作为罗汉松种子总黄酮的含量测定方法,也可作为罗汉松实药材质量控制及相关药理学研究提供参考。

参考文献:

- [1] 南京中医药大学. 中药大辞典(第二版)[M]. 上海:上海科学技术出版社,2006:1912-1913.
- [2] 庞逸敏,林彩琴,潘娇红,等. 罗汉松实多糖含量测定方法研究[J]. 中国药业,2016,25(13):22-24.
- [3] 赵凯丽,黄增琼. 罗汉松种子挥发油及石油醚提取物GC-MS分析[J]. 西北药学杂志,2018,33(2):153-157.
- [4] 韦锦梅,陆梅元,韦秀梅,等. 罗汉松茎中总黄酮的提取工艺优化及其含量测定[J]. 湖北农业科学,2019,58(18):98-101.
- [5] 郑玉蓉,吴慧仪,潘素静,等. 罗汉松叶中总黄酮的提取与纯化富集工艺研究[J]. 广东药科大学学报,2017,33(1):23-27.
- [6] FENG ZL, ZHANG LL, ZHENG YD, et al. Norditerpenoids and dinorditerpenoids from the seeds of *Podocarpus nagi* as cytotoxic agents and autophagy inducers[J]. J Nat Prod, 2017, 80(7): 2110-2117.
- [7] 王 彬. 罗汉松和金果榄的化学成分及生物活性研究[D]. 济南:山东大学,2016.
- [8] QIAO Y, SUN WW, WANG JF, et al. Flavonoids from *Podocarpus macrophyllus* and their cardioprotective activities[J]. J Asian Nat Prod Res, 2014, 16(2):222-229.
- [9] 周 燕, 隗 磊, 谭志明, 等. 罗汉松种子提取物对人胃癌细胞的体外抑制作用[J]. 中国药业,2014,23(13):13-15.
- [10] 隗 磊. 罗汉松实种托醇提物降血脂、抗氧化及保肝作用的研究[D]. 武汉:湖北中医药大学,2015.
- [11] 袁堂丰,瞿利民,郭 婕. 响应面法优化罗汉松总二萜提取及抗氧化研究[J]. 中南林业科技大学学报,2019,39(6):114-120.
- [12] 黄凤音,甄丹丹,丘 琴,等. 正交试验法优选罗汉松果实中总黄酮的提取工艺[J]. 广西中医药,2018,41(2):69-71.
- [13] 滕树锐,刘鹏飞,江 念,等. 紫鸭跖草总黄酮提取工艺优化及抗氧化研究[J]. 湖北民族学院学报(自然科学版),2017,35(2):171-175.
- [14] 李世燕,闫公听,朱 丹,等. 分光光度法测定毛酸浆果中总黄酮含量的研究[J]. 食品研究与开发,2016,37(13):129-134.
- [15] 邢佰颖,陈新梅,秦 乐,等. 两种显色法测定昆仑雪菊总黄酮含量的比较研究[J]. 化工时刊,2016,30(12):23-25.
- [16] 李 捷,陈依春,崔海燕,等. 西藏当归总黄酮含量对比及体外抗氧化活性[J]. 中国药理学与毒理学杂志,2019,33(9):710.
- [17] 李 佳. 杜仲叶黄酮的提取方法及其生物活性研究进展[J]. 食品工业科技,2019,40(7):346-350.
- [18] 聂 阳,黄海潮,陈新颖,等. 甘木通总黄酮对大鼠心肌缺血/再灌注损伤的保护作用[J]. 中成药,2016,38(12):2677-2679.
- [19] 战妍妃,李媛媛,安欣欣,等. 石韦的抗病毒黄酮部位及有效化学成分[J]. 暨南大学学报(自然科学与医学版),2018,39(6):470-480.

(收稿日期:2020-06-20)