

杨 扬,殷双双,王晓林,等. 山刺玫果提取物的质量标准[J]. 江苏农业科学,2014,42(9):248-250,261.

山刺玫果提取物的质量标准

杨 扬^{1,2}, 殷双双¹, 王晓林¹, 薛健飞¹, 钟方丽¹

(1. 吉林化工学院化学与制药工程学院, 吉林吉林 132022; 2. 吉林大学化学学院, 吉林长春 130012)

摘要:建立山刺玫果提取物的定性鉴别和含量测定方法,采用薄层色谱法对山刺玫果提取物进行定性分析;采用紫外-可见分光光度法建立山刺玫果提取物总黄酮的含量测定方法;采用高效液相色谱法建立山刺玫果提取物中槲皮素的含量测定方法,其中色谱柱为伊利特 C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),流动相为甲醇-水-磷酸-三乙胺(50:50:0.45:0.2),流速为1 mL/min,进样量为20 μL,检测波长374 nm,柱温30 ℃。建立的薄层色谱鉴别方法荧光斑点清晰,阴性无干扰;芸香苷在3.70~44.40 μg/mL($r=0.9997$)、槲皮素在0.02~0.20 μg($r=0.9999$)内线性关系良好;芸香苷平均回收率为101.32%,RSD为1.67%($n=9$),槲皮素平均回收率99.80%,RSD为1.31%($n=9$)。建立的薄层鉴别方法专属性高,含量测定方法具有良好的精密度,结果准确可靠,可用于山刺玫果提取物的质量控制。

关键词:山刺玫果;金丝桃苷;总黄酮;槲皮素

中图分类号: R284.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)09-0248-03

山刺玫果别称野蔷薇、野玫瑰、蔷薇果,系蔷薇科植物山刺玫(*Rosa davurica* Pall.)的成熟果实,广泛分布在我国东北及山西、内蒙等地,花、根、果均可入药,其果实为卵形或球形,营养丰富、酸甜可口,可抗衰老,治肠炎、食欲不振,防治心血管等疾病等,民间大量采食或用于泡酒、泡茶等,《中药大辞典》认为其有健脾理气、养血调经的作用。据报道,山刺玫果内含多种维生素、氨基酸及黄酮类化合物等成分,具有很大的开发价值,山刺玫果作为一种具有保健和治疗作用的天然产物被日益重视^[1-5]。山刺玫果中所含的总黄酮类物质具有防治高血脂和血栓所致的心脑血管疾病的功效^[6-7],其中芸香苷具有舒张血管、抗病毒、抗衰老等生物活性^[8];槲皮素具有抗炎、抗氧化、清除体内自由基的作用,对由胶原、ADP或凝血酶引起的小血小板聚集及血栓形成也有抑制作用,并有免疫增强功能及镇痛等作用^[9-10]。本研究以芸香苷为对照品采用紫外-可见分光光度法对山刺玫果提取物总黄酮的含量进行了测定,并采用高效液相色谱法对山刺玫果提取物中的槲皮素量进行了测定。

1 材料

1.1 试药

山刺玫果提取物(批号20120810、20120820、20121011、20121022、20121103)为吉林化工学院化学与制药工程学院药学系自制。槲皮素对照品(批号:100081-200907),芸香苷对照品(批号:100080-200707),金丝桃苷对照品(批号:111521-201004),均为含量测定用,购于中国食品药品检定

研究院。

1.2 仪器

TU-1810 紫外分光光度计(北京普析通用仪器有限公司);LC2000 高效液相色谱仪(上海天美科学仪器有限公司);AEG-220 电子天平(日本岛津);KQ-250B 超声波清洗器(江苏省昆山市超声仪器有限公司);ZF-20D 暗箱式紫外分析仪(上海宝山顾村电光仪器厂)。

1.3 试剂

薄层色谱硅胶 G、H(青岛海洋化工集团公司),甲醇为色谱纯,三乙胺为优级纯,水为重蒸馏水,醋酸乙酯、甲酸、乙醇等其他化学试剂均为分析纯。

2 结果与分析

2.1 薄层色谱鉴别

2.1.1 对照品溶液及供试品溶液的制备 精确称取干燥至恒重的金丝桃苷对照品 5.05 mg,置于 10 mL 容量瓶中,甲醇溶解,定容,作为对照品溶液,备用。称取干燥至恒重的山刺玫果提取物 0.16 g,精确称定,置于 25 mL 容量瓶中,加 60% 乙醇溶解,定容,吸取 5 mL 于 25 mL 容量瓶中,60% 乙醇定容,作为供试品溶液,备用。

2.1.2 阴性对照液的制备 称取干燥至恒重的山刺玫果提取物 0.16 g,精确称定,50 mL 蒸馏水分散,将上述分散液经过 D-101 树脂柱,流出液重复上柱,至流出液无黄酮颜色反应,收集流出液,水浴上挥干,用适量 60% 乙醇溶解,即得除去总黄酮的阴性对照液,备用。

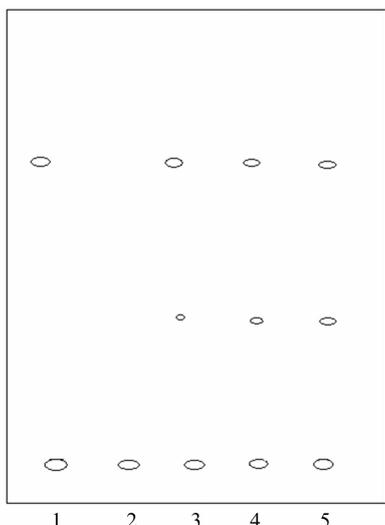
2.1.3 结果 按《中国药典》2010 年版一部附录 VI B 薄层色谱法试验^[11-12],吸取上述金丝桃苷对照品溶液、3 批供试品溶液及阴性对照溶液各 5 μL,分别点于同一层析硅胶(G)薄层板(市售铝箔片基)上,以醋酸乙酯-甲酸-水(8:1:1)为展开剂展开,取出,晾干,均匀地喷以 5% AlCl₃-乙醇溶液,用电风吹至无有机溶剂气味,置于紫外分析仪(365 nm)下检视。供试品色谱中,在与对照品色谱相应的位置上显有相同颜色的荧光斑点(图 1)。

收稿日期:2013-11-29

基金项目:吉林省科技计划(编号:20110948)。

作者简介:杨 扬(1989—),女,吉林吉林人,硕士研究生,主要从事天然产物有效成分的提取及纯化工艺研究。E-mail:15643957455@163.com。

通信作者:钟方丽,博士,教授,主要从事天然产物的研究与开发。E-mail:fanglizhong@sina.com。



1—金丝桃苷对照品溶液; 2—阴性对照液; 3~5—样品

图1 山刺玫果提取物薄层鉴别色谱图

2.2 总黄酮含量的测定

2.2.1 对照品溶液的制备 精确称取干燥至恒重的芸香苷对照品 10.0 mg, 置于 50 mL 容量瓶中, 加 60% 乙醇溶解, 定容, 摇匀, 配制成浓度为 0.2 mg/mL 的对照品溶液, 备用。

2.2.2 供试品溶液的制备 按“2.2.1”节的方法制备。

2.2.3 标准曲线的绘制 精确吸取芸香苷对照品溶液 0.5、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0 mL, 置于 25 mL 容量瓶中, 加 5% NaNO₂ 溶液 1.0 mL, 摇匀, 放置 6 min, 加 10% Al(NO₃)₃ 溶液 1.0 mL, 摇匀, 放置 6 min, 加 4% NaOH 10.0 mL, 再加 60% 乙醇定容至刻度, 摇匀, 放置 15 min。以相应的试剂为空白, 按照分光光度法, 在 505 nm 处测定其吸光度, 以吸光度为纵坐标、芸香苷对照品浓度 (mg/mL) 为横坐标绘制标准曲线^[13-14], 进行直线回归, 回归方程为: $y = 12.831x + 0.0035$, $r = 0.9997$ 。结果表明芸香苷在 3.70 ~ 44.40 μg/mL 范围内呈良好线性关系。

2.2.4 仪器精密度的试验 吸取对照品溶液 2.0 mL 于 25 mL 容量瓶中, 按“2.2.3”节的方法显色, 连续测定 6 次吸光度, RSD 为 0.18%, 结果表明精密度较好。

2.2.5 中间精密度的试验 吸取对照品溶液 2.0 mL 于 25 mL 容量瓶中, 按“2.2.3”节的方法显色, 分别在 2 台仪器上连续测定 6 次吸光度, RSD 为 1.68%、1.05%, 中间精密度的 RSD 为 2.07%, 结果表明中间精密度较好。

2.2.6 稳定性试验 吸取 2.0 mL 供试品溶液于 25 mL 容量瓶中, 按“2.2.3”节的方法分别于配制后 0、1、2、4、6、8、24 h 进行显色, 测定吸光度, RSD 为 0.41%。按“2.2.3”的方法分别在显色后于 0.5、10、15、20、25、30、35、40、60 min 测定吸光度, RSD 为 1.61%, 结果表明供试品溶液在 24 h 稳定性良好, 显色后 60 min 稳定, 满足测定要求。

2.2.7 重复性试验 取同一批号山刺玫果提取物 6 份, 精确称量, 按“2.2.1”节的方法制成供试品溶液, 吸取 2.0 mL 于 25 mL 容量瓶中, 按“2.2.3”节的方法显色, 在 505 nm 处测定吸光度, RSD 为 2.38%, 结果表明重复性良好。

2.2.8 加样回收率试验 称取 9 份总黄酮含量已知的供试品, 精确称定, 每 3 份中加入 3.18、6.34、9.52 mg/mL 对照品

溶液 5.0 mL, 按“2.2.1”节的方法制备供试品溶液, 按“2.2.3”节的方法显色测定, 结果见表 1。结果表明回收率良好, 方法准确性较高, 具有可行性。

表 1 芸香苷加样回收率试验

称样量 (mg)	样品中含量 (mg)	加入量 (mg)	测得量 (mg)	回收率 (%)
42.00	30.00	15.90	46.10	101.26
40.00	29.80	15.90	46.50	105.03
40.40	30.20	15.90	46.10	100.00
40.40	30.20	31.70	61.70	99.37
40.00	29.90	31.70	62.00	101.26
40.10	29.90	31.70	61.50	99.68
40.10	29.90	47.60	78.50	102.10
39.80	29.70	47.60	78.00	101.47
40.00	29.90	47.60	78.30	101.68
平均				101.32

注: RSD 为 1.67%。

2.2.9 样品含量测定 称取 5 批供试品, 精确称定, 按“2.2.1”节的方法制备供试品溶液, 按“2.2.3”节的方法显色, 在 505 nm 处测定吸光度, 结果显示 5 批山刺玫果提取物中总黄酮的含量分别为 74.67%、73.00%、74.54%、73.21%、75.80%。

2.3 槲皮素含量测定

2.3.1 对照品溶液的制备 精确称取干燥至恒重的槲皮素对照品 10.0 mg, 置于 50 mL 容量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得浓度为 0.20 mg/mL 的槲皮素对照品溶液。

2.3.2 供试品溶液的制备 精确称取干燥的山刺玫果提取物 0.16 g, 置于具塞锥形瓶中, 加入甲醇 - 25% 盐酸溶液 (4:1) 30 mL, 密塞, 称质量, 置于 90 °C 水浴中加热回流 1 h, 放冷, 称重, 用甲醇补充缺失的质量, 摇匀, 过滤, 将滤液转移至 50 mL 容量瓶中, 甲醇稀释至刻度^[15-16], 摇匀, 吸取 5 mL 于 25 mL 容量瓶中, 流动相定容, 微孔滤膜 (0.45 μm) 过滤, 取续滤液作为供试品溶液。

2.3.3 色谱条件及适应性试验 色谱柱为伊利特 C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相为甲醇 - 水 - 磷酸 - 三乙胺 (50:50:0.45:0.2), 流速为 1.0 mL/min, 检测波长为 374 nm, 柱温为 30 °C, 进样量为 20 μL。在此条件下, 槲皮素的保留时间为 8.7 min, 分离度为 2.4, 理论塔板数为 5 100, 其 HPLC 图如图 2 所示。

2.3.4 标准曲线的绘制 吸取对照品溶液适量, 配成浓度分别为 1.0、2.0、4.0、6.0、8.0、10.0 μg/mL 的系列对照品溶液, 分别进样 20 μL, 以槲皮素峰面积积分值 y 为纵坐标, 进样量 x (μg) 为横坐标, 绘制标准曲线, 回归方程为: $y = 3 \times 10^6 x - 11 000$, $r = 0.9999$ 。结果表明, 槲皮素的进样量在 0.02 ~ 0.20 μg 范围内呈良好的线性关系。

2.3.5 重复性试验 取同一批号山刺玫果提取物 6 份, 按“2.3.1”节中已定的方法制备供试品溶液, 各进样 20 μL 进行测定, 结果显示槲皮素峰面积的 RSD 为 1.68%, 说明该方法具有良好的重复性。

2.3.6 仪器精密度的试验 称取 20 μg/mL 的槲皮素对照品溶液, 连续进样 6 次, 每次进样 20 μL, 结果显示槲皮素峰面

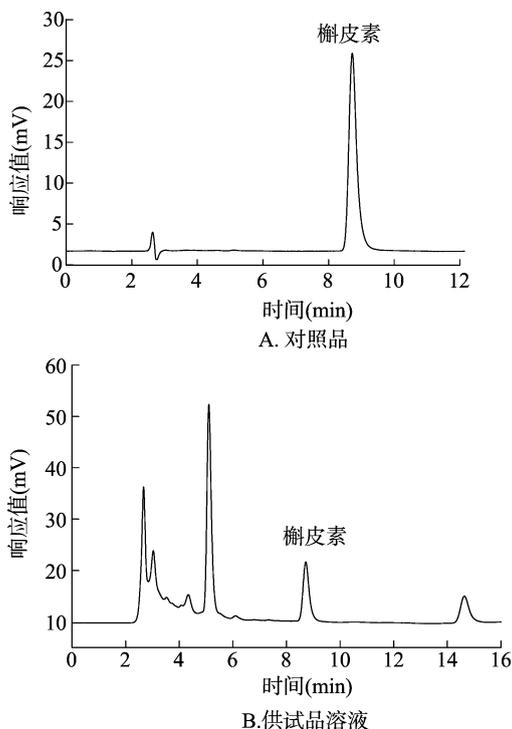


图2 山刺玫果提取物的 HPLC 图示

积的 RSD 为 0.98%, 说明仪器精密度良好。

2.3.7 稳定性试验 吸取供试品溶液, 在同一色谱条件下, 分别于 0、1、2、3、4、5、6、7、8 h 进样 20 μL , 结果显示槲皮素的峰面积 RSD 为 1.57%, 说明供试品溶液在室温下 8 h 稳定。

2.3.8 加样回收率试验 称取 9 份槲皮素含量已知的供试品, 每 3 份中分别加入 0.20 mg/mL 槲皮素对照品溶液 1.50、1.88、2.25 mL, 按“2.3.1”节的方法制备供试品溶液, 在上述色谱条件下进行含量测定, 结果见表 2。

表 2 槲皮素加样回收率试验结果

称样量 (g)	样品中含量 (μg)	加入量 (μg)	测得量 (μg)	回收率 (%)
0.160 6	376.45	300.00	674.00	99.18
0.160 4	375.98	300.00	673.97	99.33
0.160 2	375.51	300.00	680.73	101.74
0.160 3	375.27	376.00	752.50	100.33
0.161 1	375.04	376.00	739.58	96.95
0.160 3	375.51	376.00	752.00	100.13
0.160 2	375.04	450.00	825.50	100.10
0.160 5	375.27	450.00	828.20	100.65
0.160 2	375.51	450.00	825.34	99.96
平均				99.82

注: RSD 为 1.31%。

2.3.9 样品含量测定 称取 3 批样品, 精确称定, 按“2.3.1”节中已定的方法制备供试品溶液, 分别进样 20 μL , 测定槲皮素峰面积, 计算其含量, 结果 3 批样品中槲皮素的含量分别为 0.221%、0.220%、0.224%。

3 结论与讨论

3.1 薄层色谱条件的选择

3.1.1 展开剂的选择 分别以醋酸乙酯 - 甲酸 - 水

(8:1:1, 9:1:1, 7:1:1, 10:1:1, 12:1:1, 20:1:1)、甲醇 - 冰醋酸 - 水 (4:1:5)、苯 - 醋酸乙酯 - 甲酸 (5:4:1, 6:4:1)、三氯甲烷 - 甲醇 - 水 (28:10:1) 为展开剂对展开系统进行比较, 结果显示醋酸乙酯 - 甲酸 - 水 (8:1:1) 系统金丝桃苷比移值适中, 斑点分离效果好。

3.1.2 硅胶板的选择 分别吸取供试品溶液 3 批、金丝桃苷对照品溶液及阴性对照溶液, 分别考察自制硅胶 G 板 (玻璃片基)、自制硅胶 H 板 (玻璃片基)、层析硅胶 (G) 薄板 (铝箔片基)、层析硅胶 (G) 薄板 (玻璃片基) 的展开效果, 结果表明层析硅胶 (G) 薄板 (铝箔片基) 展开效果良好, 荧光斑点清晰。

3.1.3 显色剂的选择 根据山刺玫果提取物的主要化学成分为黄酮类化合物, 显色时选择 9% FeCl_3 、5% AlCl_3 - 乙醇溶液为显色剂进行显色, 结果显示, 5% AlCl_3 - 乙醇溶液为显色剂, 荧光斑点清晰, 所以宜以 5% AlCl_3 - 乙醇溶液为显色剂。

3.2 测定槲皮素含量的供试品溶液制备方法的确定

在槲皮素含量测定中, 对供试品溶液制备方法进行研究, 分别对水解液的用量、水解时间和水解温度进行探索。

3.2.1 水解液用量的选择 取 6 份干燥的山刺玫果提取物 0.16 g, 精确称定, 置于具塞锥形瓶中, 分别加入甲醇 - 25% 盐酸溶液 (4:1) 10、15、20、25、30、35 mL, 密塞, 称质量, 分别于 50 $^{\circ}\text{C}$ 下进行水解, 每次水解时间为 0.5 h。放冷, 称重, 用甲醇补充减少的质量, 摇匀, 过滤, 将滤液转移至 50 mL 容量瓶中, 甲醇稀释至刻度, 摇匀, 吸取 5 mL 于 25 mL 容量瓶中, 流动相定容, 微孔滤膜 (0.45 μm) 过滤, 取续滤液作为供试品溶液, 进样 20 μL , 峰面积分别为 27 146、28 147、30 009、34 359、34 479、33 380, 根据峰面积选择水解液用量为 30 mL。

3.2.2 水解时间的选择 取 6 份干燥的山刺玫果提取物 0.16 g, 精确称定, 置于具塞锥形瓶中, 加入甲醇 - 25% 盐酸溶液 (4:1) 30 mL, 密塞, 称质量, 50 $^{\circ}\text{C}$ 进行水解, 每次水解时间分别为 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 h。按“3.2.1”节中的方法稀释过滤, 取续滤液作为供试品溶液, 进样 20 μL , 峰面积为 31 326、32 636、35 966、46 117、42 897、40 699, 根据峰面积选择水解时间为 2.0 h。

3.2.3 水解温度的选择 按“3.2.2”节中的方法称取提取物加入水解液, 分别于 50、60、70、80、90、100 $^{\circ}\text{C}$ 下进行水解, 每次水解时间为 2.0 h。按“3.2.1”节中的方法稀释过滤, 取续滤液作为供试品溶液, 进样 20 μL , 峰面积分别为 49 692、51 232、62 290、63 009、74 759、68 396, 根据峰面积选择水解温度为 90 $^{\circ}\text{C}$ 。

供试品溶液制备方法为: 称取干燥的山刺玫果提取物 0.16 g, 精确称定, 置于具塞锥形瓶中, 加入水解液甲醇 - 25% 盐酸溶液 (4:1) 30 mL, 90 $^{\circ}\text{C}$ 水解 2.0 h。

本试验分别采用 HPLC、UV 法对山刺玫果提取物中槲皮素、总黄酮的含量测定进行了相关的探索, 并建立了山刺玫果提取物的薄层鉴别方法, 本试验建立的薄层鉴别方法斑点清晰、简便快捷, 建立的含量测定方法专属性强、操作简便、线性关系良好, 回收率、重现性符合要求, 可以更全面地对山刺玫果提取物进行质量控制, 为进一步开发山刺玫果提供了理论依据。

(下转第 261 页)

研究表明,2013年该公司农产品加工质量安全控制水平在冬季、秋季较高,夏季稍差,春季最低(图4)。总体而言,该公司农产品加工的质量控制水平呈改善提升状态。2013年其质量安全控制水平呈现出冬季>秋季>夏季>春季,说明2013年春季、夏季生产环节出现了不容忽视的质量安全控制问题,应重点查明原因,并制定相应的措施加以改进。同时2013年冬季、秋季比夏季、春季有所改进,说明相关部门采取了一系列措施,使得农产品检测合格率、农产品良种投入水平、产地环境状况等指标已有一定改进。

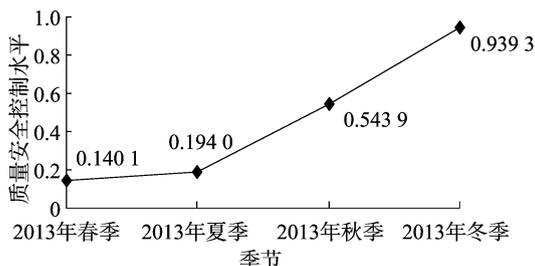


图4 农产品加工全供应链质量安全控制水平的TOPSIS综合分析

4 基于 HACCP 质量安全控制的优化方案

4.1 质量安全控制部门的改革

传统的质量安全控制部门主要职能仅是负责出货前的品质检验,而改革后新的质量安全控制部门除了验货职能以外,还要进行 HACCP 分析与控制,控制流程从种植基地到最终消费的质量安全预防与控制。负责全供应链的原料、制品、成品及货架陈列品的质量测试与控制改善。其职能从原来单纯

(上接第 250 页)

参考文献:

- [1] 金哲雄, 齐典. 刺玫果鞣质预防肿瘤作用研究[J]. 中华中医药学刊, 2007, 25(4): 647-648.
- [2] 庄志军, 钟方丽, 杨英杰, 等. 刺玫果中总黄酮的提取与分析[J]. 中成药, 2007, 29(9): 1394-1395.
- [3] 程东岩, 王隶书, 范艳君, 等. 刺玫果总黄酮纯化工艺研究[J]. 时珍国医国药, 2011, 22(3): 664-665.
- [4] 俞作仁, 王文莉, 吕娟涛. 刺玫果化学成分及药理作用研究进展[J]. 中草药, 2002, 33(2): 188-190.
- [5] 何晓燕, 张馨木, 常淑芳, 等. 刺玫果水煎液对动物胃肠运动的影响[J]. 时珍国医国药, 2006, 17(11): 2147-2148.
- [6] 钟方丽, 陈帅, 关晓侠. 微波法提取刺玫果总黄酮工艺研究[J]. 江苏农业科学, 2010(6): 449-451.
- [7] 王领弟, 李艳荣, 潘海峰, 等. 不同产地刺玫果中总黄酮含量的测定[J]. 承德医学院学报, 2012, 29(1): 5-7.
- [8] 周浓, 杨勤, 杨敏, 等. HPLC 法同时测定川楝子中芦丁、异槲皮苷和槲皮素的含量[J]. 药物分析杂志, 2013, 33(2): 225-

的质量安全控制扩展成全供应链全过程的质量安全控制。

4.2 落实质量安全控制, 建立契约化信用控制模式

首先,应以客户为中心,全供应链全员积极参与;其次,强化结构功能的系统性集成控制,形成从种植基地到市场的过程化控制;再次,基于 PDCA 多循环的持续改进和实施的科学决策和有效执行,实现相关利益者的契约化共赢;最后,通过 HACCP 科学分析判定,采用先进适用的组织模式,对影响农产品加工质量的关键因素强化控制。

4.3 融合新技术, 建立信用控制模式

运用新技术对农产品加工质量进行全流程追溯,有效实现对农产品种植、生长等相关信息的采集。在加工环节,通过编码技术对农产品进行唯一标志处理,从而实现农产品的身份识别。在运输过程中,通过无线射频识别技术(RFID)、全球定位系统(GPS)、“3G”技术实现对运输过程中的全程监控。在销售环节,通过条码技术,实现对农产品流向的控制,从而保障农产品全程的可追溯性,做到有源可查,流向可知。

参考文献:

- [1] 虞娜, 吴昌娟, 张玉玲, 等. 基于熵权的 TOPSIS 模型在保护地番茄水肥评价中的应用[J]. 沈阳农业大学学报, 2012, 43(4): 456-460.
- [2] 岳文辉, 王晓俊, 韩自强. 基于熵权法和 TOPSIS 的发动机关键零部件加工过程绿色特性评价[J]. 制造技术与机床, 2013(12): 36-39.
- [3] 邬钧云. 基于熵权法和 Topsis 评价的用户满意度研究[J]. 合作经济与科技, 2012(5): 32-33.
- [4] 229.
- [5] 海力茜·陶尔大洪, 马桂芝, 王菁, 等. HPLC 测定维药恰玛古儿药材中槲皮素的含量[J]. 中国现代应用药学, 2013, 30(2): 169-171.
- [6] 刘维信, 冯希环, 蔡宋宋, 等. 大葱槲皮素含量的测定[J]. 中国农学通报, 2008, 24(3): 266-269.
- [7] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 2010版. 北京:中国医药科技出版社, 2010.
- [8] 钟方丽, 王晓林, 张俭. 山玫片的薄层鉴别研究[J]. 吉林化工学院学报, 2007, 24(4): 6-8.
- [9] 王隶书, 王海生, 高军, 等. 山刺玫不同药用部位中总黄酮的含量测定[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(10): 56-58.
- [10] 任静, 李多伟, 王童文, 等. 超声萃取苹果渣中总黄酮工艺的研究[J]. 中成药, 2003, 25(9): 761-762.
- [11] 梁洁, 柳贤福, 孙正伊, 等. HPLC 测定鱼腥草配方颗粒中槲皮素含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(11): 140-143.
- [12] 刘燕, 唐铁鑫. 野牡丹中槲皮素的测定[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(12): 85-87.