

## 不同时期山里红叶片中多元酚类成分含量的测定

赵彩云<sup>1,2</sup>, 陈筱清<sup>1</sup>, 王强<sup>1,①</sup>, 王年鹤<sup>3</sup>, 田逸民<sup>2</sup>

(1. 中国药科大学, 江苏南京 210038; 2. 江苏省徐州药品检验所, 江苏徐州 221006;  
3. 江苏省·中国科学院植物研究所(南京中山植物园), 江苏南京 210014)

**Determination of content of polyphenolic compounds in leaf of *Crataegus pinnatifida* var. *major* at different periods**  
ZHAO Cai-yun<sup>1,2</sup>, CHEN Xiao-qing<sup>1</sup>, WANG Qiang<sup>1,①</sup>, WANG Nian-he<sup>3</sup>, TIAN Yi-min<sup>2</sup> (1. China Pharmaceutical University, Nanjing 210038, China; 2. Jiangsu Provincial Xuzhou Institute for Drug Control, Xuzhou 221006, China; 3. Institute of Botany, Jiangsu Province and the Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210014, China), *J. Plant Resour. & Environ.* 2008, 17(4): 73-74

**Abstract:** The content of polyphenolic compounds including chlorogenic acid, vitexin-4"-O-glucoside, vitexin rhamnoside, rutin, vitexin, hyperoside in leaf of *Crataegus pinnatifida* Bunge var. *major* N. E. Br. at different times was determined by HPLC. The results show that the content of polyphenolic compounds in different times is various. In April, the total content of polyphenolic compounds and the contents of chlorogenic acid, vitexin-4"-O-glucoside, vitexin rhamnoside, rutin reach the peak. And the content of every compound and the total content of these compounds decrease gradually with the plant growing, and reach the lowest point in July to August. Therefore, in order to extract polyphenolic compounds, the optimal harvest time for *C. pinnatifida* var. *major* leaf is April.

**关键词:** 山里红叶片; 多元酚类成分; 生长期; 含量测定

**Key words:** leaf of *Crataegus pinnatifida* Bunge var. *major* N. E. Br.; polyphenolic compound; growth stage; content determination

中图分类号: Q949.751.8; R284.2 文献标志码: A 文章编号: 1004-0978(2008)04-0073-02

中药山楂叶为山里红(*Crataegus pinnatifida* Bunge var. *major* N. E. Br.)或山楂(*C. pinnatifida*)的干燥叶<sup>[1]</sup>。近几年来,随着提取工艺及检测手段的提高,对山楂叶的研究取得了一定的进展。山楂叶中含有牡荆素、芦丁、牡荆素鼠李糖苷、金丝桃苷、牡荆素-4"-O-葡萄糖苷等黄酮类成分及绿原酸等酚酸类成分,具有降压、强心和清除自由基等作用<sup>[2-5]</sup>。为了合理地开发利用山楂叶,并确定其最佳采收期,作者采用 HPLC 法对不同生长期山里红叶片中的黄酮类成分和绿原酸等多元酚类成分进行了含量分析。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

供试山里红叶片采自江苏省铜山县汉王镇大窝子山,原植物由田逸民主任中药师鉴定。于 2007 年 4 月至 10 月间每月 1 日和 15 日采集同一棵山里红植株上的叶片,60℃干燥至恒质量,粉碎,过 50 目筛,置于干燥器中保存,备用。

绿原酸、金丝桃苷、芦丁和牡荆素鼠李糖苷标准品均购自中国药品生物制品检定所(纯度为 100%);牡荆素和牡荆素-4"-O-葡萄糖苷标准品由中国药科大学陈虹提供(纯度大于 99.0%)。

#### 1.2 方法

1.2.1 色谱条件 使用 Waters 高效液相色谱仪(包括 2695

泵、2996PDAD 检测器、自动进样器和 Empower 色谱工作站)进行 HPLC 分析。色谱柱为 Sepax HP C<sub>18</sub> 柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm)。流动相 A 为 V(乙腈):V(四氢呋喃) = 19:1,流动相 B 为体积分数 0.5% 的甲酸溶液,将流动相 A 与流动相 B 按不同比例混合后进行梯度洗脱:0~13 min, A 14%~17%;13~26 min, A 17%~18%;26~28 min, A 18%~14%。流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>,柱温 32℃,检测波长 360 nm,进样量 10 μL。

1.2.2 标准曲线绘制 精密称取经 P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 减压干燥 24 h 的绿原酸、牡荆素-4"-O-葡萄糖苷、牡荆素鼠李糖苷、牡荆素、芦丁和金丝桃苷标准品,混合后用甲醇溶解并定容后作为标准品贮备液,贮备液中上述各标准品浓度分别为 0.703 6、0.662 0、0.997 0、0.042 3、0.097 3 和 0.095 4 g·L<sup>-1</sup>。精密吸取 0.5、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 和 6.0 mL 贮备液,用甲醇稀释并定容至 10 mL,按照上述色谱条件进行 HPLC 分析,分别记录各标准品不同进样浓度的峰面积。

以峰面积为因变量 Y、进样浓度为自变量 X 进行线性回归分析,得到 6 个标准品的回归方程。其中,绿原酸的回归方程为:Y = 613 256X + 18 632, r = 0.999 8, 线性范围 35.18~

收稿日期: 2008-03-21

作者简介: 赵彩云(1972—),女,江苏丰县人,本科,副主任药师,主要从事中成药及中药材的质量检验工作。

①通讯作者 E-mail: qwang49@tom.com

422.20 mg · L<sup>-1</sup>; 牡荆素-4"-O-葡萄糖苷的回归方程为:  $Y = 12\ 786X + 79\ 149$ ,  $r = 0.999\ 6$ , 线性范围 33.10 ~ 397.20 mg · L<sup>-1</sup>; 牡荆素鼠李糖苷的回归方程为:  $Y = 1\ 244\ 689X + 120\ 326$ ,  $r = 0.999\ 2$ , 线性范围 49.80 ~ 598.20 mg · L<sup>-1</sup>; 牡荆素的回归方程为:  $Y = 14\ 903X - 3\ 034$ ,  $r = 0.999\ 8$ , 线性范围 0.21 ~ 2.54 mg · L<sup>-1</sup>; 芦丁的回归方程为:  $Y = 167\ 983X - 743$ ,  $r = 0.999\ 8$ , 线性范围 4.86 ~ 58.40 mg · L<sup>-1</sup>; 金丝桃苷的回归方程为:  $Y = 20\ 886X - 7\ 054$ ,  $r = 0.999\ 9$ , 线性范围 4.77 ~ 57.20 mg · L<sup>-1</sup>。

1.2.3 样品溶液的制备及分析方法 称取样品粗粉 1.5 g, 置于具塞锥形瓶中, 加入 25 mL 体积分数 50% 的甲醇溶液, 密塞, 称质量; 用超声波提取器提取 30 min (功率 250 W, 频率 50 kHz), 冷却至室温, 称质量, 并用体积分数 50% 的甲醇补足减失的质量; 摇匀后过滤, 所得滤液即为样品溶液。

按上述色谱条件进行 HPLC 分析, 记录峰面积并按外标法计算样品中上述 6 种成分的含量。实验重复 3 次。

#### 1.2.4 方法学考察

1.2.4.1 精密度实验 取标准品贮备液 3 mL, 用甲醇稀释并定容至 10 mL, 待测。精密量取 10 μL 标准品溶液, 按上述色谱条件进行分析, 重复进样 6 次。绿原酸、牡荆素-4"-O-葡萄糖苷、牡荆素鼠李糖苷、牡荆素、芦丁和金丝桃苷的 RSD 分别为 0.81%、0.99%、0.73%、0.99%、1.23% 和 0.85%, 表明仪器的精密度良好。

1.2.4.2 重现性实验 精密称取同一批样品 6 份, 分别按样品溶液的制备方法及各色谱条件进行提取和分析。绿原酸、牡荆素-4"-O-葡萄糖苷、牡荆素鼠李糖苷、牡荆素、芦丁和金丝桃苷的 RSD 分别为 0.74%、0.86%、0.98%、0.76%、0.84% 和 1.23%, 表明本检测方法的重现性较好。

1.2.4.3 稳定性实验 精密吸取同一样品溶液, 分别于 0、2、4、6、8 和 12 h 按上述色谱条件进行分析。绿原酸、牡荆素-4"-O-葡萄糖苷、牡荆素鼠李糖苷、牡荆素、芦丁和金丝桃苷的 RSD 分别为 0.59%、0.78%、0.88%、0.83%、0.65% 和 0.72%, 表明样品溶液在 12 h 内稳定。

1.2.4.4 加样回收率实验 精密称取已知含量的样品 6 份, 分别精密加入 2.0、3.0 和 4.0 mL 混合标准品溶液, 其中, 绿原酸、牡荆素-4"-O-葡萄糖苷、牡荆素鼠李糖苷、牡荆素、芦丁和金丝桃苷的浓度分别为 0.375 2、0.356 0、1.210 0、0.014 9、0.049 7 和 0.197 6 g · L<sup>-1</sup>, 按样品溶液制备方法及各色谱条件进行提取和分析。上述 6 种成分平均加样回收率依次为 99.24%、99.26%、99.36%、97.24%、99.22% 和 98.78%。

## 2 结果和讨论

不同采样期山里红叶片中绿原酸、牡荆素-4"-O-葡萄糖苷、牡荆素鼠李糖苷、牡荆素、芦丁和金丝桃苷的含量见表 1。由表 1 可见, 除牡荆素和金丝桃苷外, 4 月份 (花期) 山

里红叶片中其他 4 种多元酚类成分的含量及 6 种成分的总含量在全年中均最高, 但随生长期的推移, 各成分的含量均降低, 尤其在 7 月份至 8 月份, 各成分的含量均在低谷, 说明 4 月份是多元酚类成分合成及积累的旺盛时期, 而 7 月份至 8 月份是各成分合成及积累的低谷时期。

值得注意的是, 6 月 1 日采集的山里红叶片中, 牡荆素的含量明显高于其他时期, 牡荆素含量的突然增高可能与植株的次生代谢过程有关, 其原因有待进一步实验研究。

根据上述研究结果可以看出, 如果以提取多元酚类化合物为目的, 山里红叶片最适宜的采收期为 4 月份, 此时多元酚类成分的含量最高。此外, 由于春天新叶萌发前后 (4 月份) 山里红叶片的次生代谢活跃, 各种多元酚类成分的含量较高, 且叶片幼嫩, 可采摘叶片制成茶, 或提取有效成分后做成保健饮料, 以提高山里红叶片的药用价值。

表 1 不同生长期 (2007 年) 山里红叶片中多元酚类成分的含量<sup>1)</sup>  
Table 1 Content of polyphenolic compounds in leaf of *Crataegus pinnatifida* Bunge var. *major* N. E. Br. at different dates in 2007<sup>1)</sup>

日期 (MM/DD) Date	不同成分的含量/mg · g <sup>-1</sup> Content of different compounds						Total
	I	II	III	IV	V	VI	
04/15	3.92	5.30	19.18	0.18	0.58	0.48	29.64
05/01	1.84	1.90	9.06	0.08	0.33	0.40	13.61
05/15	1.48	2.06	7.27	0.07	0.30	0.46	11.64
06/01	0.88	2.15	6.65	0.36	0.21	0.49	10.74
06/15	0.89	1.71	6.05	0.13	0.21	0.43	9.42
07/01	0.59	1.71	6.07	0.15	0.23	0.52	9.27
07/15	0.60	1.45	5.27	0.04	0.19	0.65	8.20
08/01	0.75	1.48	5.52	0.05	0.20	0.70	8.70
08/15	0.96	1.51	5.60	0.05	0.20	0.68	9.00
09/01	1.15	1.53	5.39	0.08	0.23	0.79	9.17
09/15	1.53	1.82	5.79	0.10	0.25	0.89	10.38
10/01	1.51	1.50	5.57	0.12	0.15	0.29	9.14
10/15	1.80	1.56	5.59	0.14	0.14	0.28	9.51

<sup>1)</sup>表中数据为 3 次重复的平均值 The datums in this table are the average of three replications; I: 绿原酸 Chlorogenic acid; II: 牡荆素-4"-O-葡萄糖苷 Vitexin-4"-O-glucoside; III: 牡荆素鼠李糖苷 Vitexin rhamnoside; IV: 牡荆素 Vitexin; V: 芦丁 Rutin; VI: 金丝桃苷 Hyperoside.

#### 参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 2005 年版 (一部) [M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 22.
- [2] 丁香苞, 姜岩青, 仲英, 等. 山楂叶化学成分的研究[J]. 中国中药杂志, 1990, 15(5): 39-41.
- [3] 张培成, 徐绪绪. 山楂叶化学成分研究[J]. 药学学报, 2001, 36(10): 754-757.
- [4] 宋少江, 陈佳, 寇翔, 等. 山楂叶的化学成分[J]. 沈阳药科大学学报, 2006, 23(2): 88-90, 96.
- [5] 刘荣华, 余伯阳, 邱声祥, 等. 山楂叶中多元酚类成分抗超氧阴离子活性研究及构效关系分析[J]. 中国药理学杂志, 2005, 40(14): 1066-1069.