

山楂叶中总黄酮的含量测定方法研究^{*}

★ 刘荣华^{1**} 邵峰¹ 马志林¹ 余伯阳² (1. 江西中医学院现代中药制剂教育部重点实验室 南昌 330004; 2. 中国药科大学中药复方研究室 南京 210038)

摘要:目的:研究山楂(山里红)叶中总黄酮的含量测定方法。方法:选择山里红叶中某一特定化学成分(牡荆素 2"-O-鼠李糖苷),比较该成分与总黄酮的含量关系,计算其比值,以该比值为换算因子,通过测定该成分的含量推算出山里红叶中总黄酮的含量。结果:不同产地、不同采收期 16 个山里红叶样品中牡荆素 2"-O-鼠李糖苷与总黄酮的含量成显著正相关($r=0.950$, $P<0.01$),且总黄酮与牡荆素 2"-O-鼠李糖苷的含量比值(换算因子)为 1.9493 ± 0.2002 。结论:可以将牡荆素 2"-O-鼠李糖苷的含量乘以换算因子求出不同产地、不同采收期山里红叶中总黄酮的含量。

关键词:山楂;山里红;黄酮;药物分析

中图分类号:R 284.1 **文献标识码:**A

Determination of Total Flavonoids in Leaves of *Crataegus* L.

LIU Rong-hua¹, SHAO Feng¹, MA Zhi-lin¹, YU Bo-yang²

1. Key Laboratory of Modern Preparation of TCM, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Ministry of Education, Nanchang 330004

2. Department of Chinese Complex Recipe Research, China Pharmaceutical University, Nanjing 210038

Abstract: Objective: Studying the method of determination of total flavonoids in leaves of *Crataegus pinnatifida* Bge. Var. *major* N.E.Br. Methods: Vitexin 2"-O-rhamnoside was selected as the standard. The ratio of Vitexin 2"-O-rhamnoside and the total flavonoids in leaves of *Crataegus pinnatifida* Bge. Var. *major* N.E.Br. was calculated. The content of total flavonoids in leaves of *Crataegus pinnatifida* Bge. Var. *major* N.E.Br. could be counted with the result of the content of the standard multiplied by the ratio. Results: The correlation of the content of Vitexin 2"-O-rhamnoside and the total flavonoids in 16 kinds of leaves of *Crataegus pinnatifida* Bge. Var. *major* N.E.Br. from different locations and growth stages is significant, and the correlation coefficient was 0.950 ($P<0.01$, 2-tailed). The ratio of Vitexin 2"-O-rhamnoside and the total flavonoids in leaves of *Crataegus pinnatifida* Bge. Var. *major* N.E.Br. was 1.9493 ± 0.2002 . Conclusion: The total flavonoids in leaves of *Crataegus pinnatifida* Bge. Var. *major* N.E.Br. from different locations and growth stages could be calculated with the result of the content of Vitexin 2"-O-rhamnoside multiplied by the ratio.

Key words: *Crataegus* L.; Flavonoid; Pharmaceutical analysis

山楂叶主要化学成分黄酮类有降压、增加冠脉血流量、降血脂、耐缺氧、强心、改善血液流变学、抗心肌缺血、抗心律失常等作用^[1~3],临床主要用于治疗冠心病、心绞痛等^[4~7]。在国内已有山楂叶总黄酮制剂——益心酮片、心安胶囊、金甲益心酮片、复心片、益心酮分散片、益心酮滴丸、山楂叶总黄酮软胶囊、山楂叶总黄酮盐粉针剂等产品上市。山楂叶中黄酮类化合物分析方法已有不少文献报道,有比色法^[8],高效液相色谱(HPLC)法等^[9,10],然而这些研究大多只是分析

方法上的探讨,并且只针对单个成分进行测定,而对于山楂叶中总黄酮的含量还缺乏比较科学的测定方法。药典对山楂叶总黄酮是以芦丁为对照品通过比色法进行测定^[11],针对性不强,会受到多种因素的干扰,测定结果可信度不高。因此有必要对山楂叶总黄酮建立较为可靠的含量测定方法。本研究对山里红叶中的总黄酮含量进行了测定,兹报告如下。

1 材料与仪器

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(30472161),江西省自然科学基金资助项目(0640163)

** 通讯作者:刘荣华, Tel and fax: 0791-7118658; E-mail: rhlh@163.com

1.1 材料 槲皮素 3-O-[鼠李糖(1-4)芸香糖苷](Quercetin 3-O-[α -L-rhamnopyranosyl (1-4)- α -L-rhamnopyranosyl -(1-6)- β -glucopyranoside], I), 牡荆素 4"-O-葡萄糖苷(Vitexin 4"-O-glucoside, II), 牡荆素(Vitexin, III), 牡荆素 2"-O-鼠李糖苷(Vitexin 2"-O-rhamnoside, IV), 芦丁(Rutin, V), 金丝桃苷(Hyperoside, VI), 牡荆素 4"-O-乙酰-2"-O-鼠李糖苷(Vitexin 4"-O-acetyl-2"-O-rhamnoside, VII), 槲皮素(Quercetin, VIII), 均为作者分离所得, 并经光谱鉴定, 纯度在 95% 以上; 山里红叶采自国内, 由作者鉴定, 来源见表 1。凭证标本存于中国药科大学植物标本室。

表 1 不同产地、不同采收期山里红叶来源

样品编号	产地	采集时间
S1	甘肃省天水市	2003 年 5 月
S2	山东省济南市	2003 年 5 月
S3	江苏省连云港市	2003 年 5 月
S4	甘肃省兰州市	2003 年 5 月
S5	山东省日照市 1	2003 年 5 月
S6	山东省日照市 2	2003 年 6 月
S7	山东省日照市 3	2003 年 7 月
S8	山东省日照市 4	2003 年 8 月
S9	山东省日照市 5	2003 年 9 月
S10	山东省日照市 6	2003 年 10 月
S11	山西省晋城市 1	2003 年 4 月
S12	山西省晋城市 2	2003 年 5 月
S13	山西省晋城市 3	2003 年 6 月
S14	山西省晋城市 4	2003 年 7 月
S15	山西省晋城市 5	2003 年 8 月
S16	山西省晋城市 6	2003 年 9 月

1.2 仪器 Agilent 1100 型 HPLC 色谱仪(包括 HP 工作站、G1312A 型二元泵、G1313A 型全自动微量进样器、G1316A 型柱温箱、G1314A 型可变波长紫外检测器 VWD)。

1.3 试剂 色谱纯乙腈(Merck 公司, 德国), 双蒸水(自制), 其它所有试剂均为分析纯(购于南京化工厂)。

2 实验方法

2.1 色谱条件 Lichrospher C₁₈ 分析柱(250 mm×4.6 mm, 5 μ m)(南京汉邦科技有限公司)。流动相 A 为[乙腈-四氢呋喃(95:5, V/V)], B 为(0.5% 磷酸溶液, V/V), 梯度洗脱, 流动相 A 的浓度变化依次为: 0~12 min 由 12%→17%, 12~25 min 由 17%→18%, 25~35 min 由 18%→40%, 35~40 min 由 40%→100%, 40~45 min 为 100%, 流速 1ml/min; 柱温 30 $^{\circ}$ C; 进样量 10 μ l; 检测波长 360 nm。色谱峰根据保留时间(t_R)决定。

2.2 方法学考查^[10]

2.2.1 回收率实验 采用加样回收法, 精密称取已知含量的样品 2(S2)0.5 g, 分别加入一定量的以上 8 种对照品, 同样品溶液制备法步骤操作, 定容, 测定, 重复进样 3 次, 取其平均值求加样回收率, 结果见表 2。

2.2.2 对照品溶液配制及标准曲线绘制 样品测定采用外标法依据峰面积计算含量。取以上 8 种对照品的混合制备成混合对照品溶液, 将混合对照品溶液稀释到 6 个不同的浓度, 按以上色谱条件进样测定混合对照品各对应峰的峰面

积, 绘制标准曲线, 求出相关系数和线性范围。见表 3。

表 2 山里红叶加样回收试验结果

被分析物	原含量/mg	加入量/mg	测得量/mg	加样回收率(%)	RSD(%)
I	1.059	1.002	2.064	100.3	1.02
II	1.606	1.495	3.146	103	0.95
III	1.771	1.556	3.377	103.2	2.14
IV	6.32	5.054	11.25	97.6	1.93
V	0.0517	0.0543	0.1051	98.3	1.64
VI	0.2685	0.3005	0.5714	100.8	2.06
VII	0.361	0.4126	0.7856	102.9	1.48
VIII	0.0321	0.0395	0.07053	97.3	3.02

表 3 山里红叶 8 种对照品的

标准曲线、重现性、稳定性及检测限 / μ g·ml⁻¹

被分析物	标准曲线	R ²	线性范围	LOD	LOQ	日内 RSD (n=6)	日间 RSD (n=15)
I	$y=1118.36x-2.93$	0.999 9	1.0~100	0.19	0.63	0.89%	5.23%
II	$y=1370.10x+49.24$	0.999 9	9.5~950	0.28	0.89	0.92%	4.53%
III	$y=1603.99x+23.81$	0.999 9	10.1~1010	0.30	1.02	0.91%	4.43%
IV	$y=2029.75x+4.03$	0.999 9	1.1~110	0.15	0.50	0.94%	6.15%
V	$y=1691.5x+11.99$	0.999 4	1.2~120	0.17	0.55	0.83%	5.65%
VI	$y=2438.03x+9.56$	0.999 8	1.09~109	0.13	0.42	0.93%	3.22%
VII	$y=1021.52x+63.98$	0.999 9	9.9~990	0.38	1.12	0.54%	4.89%
VIII	$y=4536.60x-10.66$	0.999 9	0.87~87	0.024	0.081	0.66%	3.79%

2.2.3 最小检出浓度测定 不断稀释标准品溶液进样检测, 求出其信-噪比, 最低检测限(LOD)和最小定量限(LOQ)分别以信-噪比(S/N)3 和 10 为限。各对照品的 LOD 值和 LOQ 值见表 3。

2.2.4 方法的精密度和稳定性实验 分别通过日内稳定性实验和日间稳定性实验进行考查, 日内稳定性实验在相同条件下对混合对照品溶液分别重复进样 6 次, 测定其峰面积, 求出 RSD 值。日间稳定性实验在 3 天内完成, 每天对混合对照品溶液分别重复进样 5 次(等间隔时间进样), 测定其峰面积, 求出 RSD 值。结果见表 3。

2.3 样品溶液制备与测定^[10]

2.3.1 样品溶液制备方法学考查 取样品 1(S1)6 份, 60 $^{\circ}$ C 干燥至恒重(6h 左右)粉碎成 60 目粉末, 每份精密称取 2.5 g, 分别加入 50% 甲醇溶液 60 ml, 回流提取 60 min, 滤过, 再用 50% 甲醇 40 ml 回流提取 10 min, 滤过, 合并滤液, 减压浓缩至 20 ml 左右, 再加 80% 甲醇定容到 50 ml。按以上色谱条件进样 10 μ l, 以牡荆素 2"-O-鼠李糖苷含量为考查指标, 分别对 6 份样品溶液进行重复性测定, 结果 6 份样品溶液中牡荆素 2"-O-鼠李糖苷含量差异不大(RSD=3.59%)。因此样品溶液制备均用此方法。

2.3.2 样品溶液制备与测定 分别取以上 16 个山里红叶样品按上述方法制备成 50 ml 甲醇溶液。按上述色谱条件进样 10 μ l, 用外标法求算山楂叶中这 8 种成分的含量, 同时计算这 8 种成分的总含量。

2.4 牡荆素 2"-O-鼠李糖苷与总黄酮含量关系分析

用 SPSS 软件的相关性分析功能对 16 个山里红叶样品中牡荆素 2"-O-鼠李糖苷的含量与总黄酮含量之间进行相关性分析, 计算其相关系数, 并计算出两者之间的换算因子。

3 实验结果

3.1 样品中 8 种黄酮的含量

通过以上实验测得不同产地、不同采收期 16 个山里红

叶中样品中 8 种黄酮成分含量及其总含量,结果见表 4。

表 4 不同产地、不同采收期山里红叶中总黄酮的含量

mg·g⁻¹

样品	被分析物	含量(n=3)								总黄酮含量
		I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	
S1	tr		1.007	8.191	6.2717	0.1438	1.542	tr	nd	11.1555
S2		2.118	3.212	3.542	12.46	0.1034	0.5369	0.7219	0.06426	22.7585
S3		0.9319	1.241	4.867	6.775	tr	0.3776	0.2166	tr	14.4091
S4		1.575	1.683	2.232	7.469	0.1677	0.2915	0.4253	tr	13.8435
S5		2.179	3.249	3.473	11.58	0.145	0.5785	0.7773	0.0708	22.05
S6		1.896	1.632	2.062	6.807	tr	0.252	0.2479	tr	12.9
S7		0.9899	1.438	1.976	6.245	0.325	0.2109	0.3905	tr	11.58
S8		0.6553	1.253	1.962	5.982	0.663	0.2078	0.3037	tr	11.03
S9		1.575	1.683	2.232	7.469	0.168	0.2915	0.4253	tr	13.84
S10		2.639	1.609	1.367	4.901	0.293	0.2706	0.8138	tr	11.89
S11		2.171	1.709	5.057	10.26	0.243	0.3561	0.1549	tr	19.95
S12		2.229	1.827	4.679	10.82	0.166	0.3842	0.1921	tr	20.3
S13		2.59	1.998	2.104	8.025	0.083	0.2798	0.4345	tr	15.51
S14		0.9773	1.432	1.426	5.761	0.151	0.2051	0.4524	tr	10.4
S15		0.827	1.167	1.676	5.813	0.198	0.1818	0.3915	tr	10.25
S16		0.8132	1.105	1.538	5.606	0.114	0.1758	0.4316	tr	9.784

注:tr:signal to noise ratio (S/N) is between 3 and 10 (content<LOQ);nd:not detected or S/N < 3 (content<LOD)。

3.2 牡荆素 2"-O-鼠李糖苷与总黄酮的含量关系

以 8 种黄酮的总含量为总黄酮含量,对不同产地和不同采收期 16 份山里红叶样品中牡荆素 2"-O-鼠李糖苷与总黄酮的含量进行相关性分析,结果表明两者成显著正相关($r=0.950, P<0.01$)。说明山里红叶中牡荆素 2"-O-鼠李糖苷的变化与总黄酮的变化具有高度的正相关关系。

另外根据表 3 分别计算出 16 份样品中总黄酮的平均含量为 (14.1141 ± 3.8366) mg/g,牡荆素 2"-O-鼠李糖苷平均含量为 (7.2670 ± 1.9828) mg/g。从两者的平均含量可以算出两者的比例关系为:总黄酮/牡荆素 2"-O-鼠李糖苷 = (1.9493 ± 0.2002) 。因此对于山里红叶来说,可以用牡荆素 2"-O-鼠李糖苷的含量来推算总酚性成分的含量。计算公式如下:

$$C(\text{mg/g}) = f \times A(\text{mg/g})$$

($f=1.9493 \pm 0.2002$,为换算因子;C 为总酚性成分含量;A 为牡荆素 2"-O-鼠李糖苷含量)

4 讨论

4.1 选择 8 个黄酮类成分代表总黄酮的依据

山楂叶中主要成分为黄酮类、聚合黄烷类、酚酸类以及一些三萜类,其中以黄酮类成分为主。本实验在以往化学研究的基础上选择山里红叶中尽可能多的黄酮类成分进行测定。同时,为了避免其它成分对测定结果的干扰,选择了 360 nm 检测波长,在该波长下对所有山楂叶样品进行检测,最后确定了 8 个黄酮类成分,这 8 种黄酮在所有山里红叶样品中 HPLC 峰面积之和占总峰面积的 90% 以上。也就是说,这 8 种黄酮成分的含量基本能代表山里红叶中总黄酮的含量。

4.2 较比色法的优势

目前对总黄酮的含量测定基本上都是采用比色法。该方法是在没有足够多的对照品的情况下不得已的做法,其缺点是:(1)杂质(如聚合黄烷醇类、酚酸类)对测定结果干扰比

较大,我们曾对比色法进行过比较,结果发现比色法测定的山楂叶中总黄酮含量高达 6%~9%,这个结果与以往报道的结果(1%~2%左右)^[12]差异很大;(2)比色法均是以芦丁为对照品进行测定,测得的结果是相当于芦丁的量,这种测定结果并不能代表所测黄酮的真实含量。而本研究通过牡荆素 2"-O-鼠李糖苷的含量测定结果,利用换算因子推算出总黄酮的含量,测得 16 个山里红叶样品中总黄酮含量为 0.98%~2.3%。该方法较比色法要准确得多。

4.3 选择牡荆素 2"-O-鼠李糖苷测定总黄酮含量的依据

本研究分别对 6 个不同产地以及山东日照和山西晋城两个产地的 6 个不同采收期山里红叶中以上 8 种黄酮成分的含量与总黄酮含量进行过相关性分析,结果发现其它 7 种黄酮与总黄酮含量的相关系数均比较小,而牡荆素 2"-O-鼠李糖苷与总黄酮含量呈显著的正相关($r=0.95$),而且在山里红叶中含量最高。因此这个计算公式:[总黄酮含量(mg/g) = $(1.9493 \pm 0.2002) \times$ 牡荆素 2"-O-鼠李糖苷含量(mg/g)]能用于山里红叶中总黄酮的含量测定,而对于其它种山楂叶的总黄酮含量测定是否适用,还有待进一步研究。

4.4 样品溶液制备方法的选择依据

本实验分别采用了回流提取和超声提取制备山楂叶样品溶液,回流提取法如上述所示,超声提取法则是精密称取 0.5 g 山楂叶粉末置 10 ml 容量瓶中,加甲醇至刻度,超声提取 30min 后补充甲醇至刻度,摇匀后取上清液测定。结果表明,回流提取法的重现性较超声提取法要好。

参考文献

- [1]Chang Q,Zuo Z,Harrison F,etal.Hawthorn [J].J Clin Pharmacol, 2002,42(6):605-612.
- [2]许正斌,高奎斌,许双贵.山楂叶综述[J].特产科学实验,1987,(1):29-31.
- [3]Rigelsky JM,Sweet BV.Hawthorn: pharmacology and therapeutic uses [J].Am J Health Syst Pharm,2002,59(5):417-422.

HPLC 法测定穿心莲叶中穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯的含量

★ 黄筱琴¹ 陈建华² 杨安金³ (1. 江西省南昌市第九医院 南昌 330002; 2. 南昌工程学院医院 南昌 330099; 3. 江西中医学院 南昌 330004)

摘要:目的:测定不同产地的穿心莲药材中穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯的含量。方法:采用高效液相色谱(HPLC)法,Merck-Lichrospher RP-C₁₈柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),流动相为甲醇-水(60:40);检测波长:226 nm(用于检测穿心莲内酯),254 nm(用于检测脱水穿心莲内酯);流速:0.8 ml/min;柱温:35℃。结果:实验表明测定方法在4 h内是稳定的,穿心莲内酯线性范围0.050~1.500 μg,脱水穿心莲内酯线性范围0.048~1.440 μg,平均加样回收率分别为100.9%和98.2%,RSD分别为3.4%(n=6)和3.2%(n=6)。结论:用HPLC法测定穿心莲药材中穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯的含量方法准确、灵敏、稳定,可作为控制穿心莲质量的方法。

关键词:穿心莲;穿心莲内酯;脱水穿心莲内酯;含量测定;HPLC

中图分类号:R 284.1 **文献标识码:**A

Determination of the Content of Andrographolide and Dehydro-andrographolide in *Hebra Andrographis* by HPLC Method

HUANG Xiao-qin¹, CHEN Jian-hua², YANG Jin-an³

1. The Ninth Hospital of Nanchang City, Jiangxi Province, Nanchang 330002

2. The Hospital of Nanchang Institute of Technology, Nanchang 330099

3. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004

Abstract: Objective: To investigate the contents of andrographolide and dehydro-andrographolide in *Hebra andrographis*. Methods: HPLC was performed on Merck-Lichrospher RP-C₁₈(250 mm×4.60 mm, 5 μm). The chromatographic conditions were as follows: Methanol-Water (60:40) as mobile phase, flow rate is 0.8 ml/min, detecting wave length at 226 nm (andrographolide) and 254 nm (dehydro-andrographolide), column temperature was 35℃. Results: A good linearity of andrographolide was shown in range of 0.050~1.500 μg ($r=0.9999$), and that of dehydro-andrographolide was 0.048~1.440 μg ($r=0.9999$), the average recovery rate were 100.9% (andrographolide) and 98.2% (dehydro-andrographolide), there RSD were 3.4% (andrographolide) and 3.2% (dehydro-andrographolide). Conclusion: this method can supply evidence for the equality evaluation of *Hebra andrographis*.

Key words: *Hebra andrographis*; Andrographolide; dehydro-andrographolide; Content Determination; HPLC

[4] Beier A, Konigstein RP, Samec V. Clinical experiences with a crataegus pentaerythrityl-tetranitrate combination drug in heart diseases due to coronary sclerosis in old age[J]. Wien Med Wochenschr, 1974, 124(24): 378-381.

[5] Taskov M. On the coronary and cardiotonic action of crataegon[J]. Acta Physiol Pharmacol Bulg, 1977, 3(4): 53-57.

[6] Ammon HP, Handel M. Crataegus, toxicology and pharmacology. Part II: Pharmacodynamics[J]. Planta Med, 1981, 43(3): 209-239.

[7] 薛冬. 益心酮片的制备与临床观察[J]. 中成药, 1999, 21(8): 436.

[8] 元晓梅, 蒋明蔚, 胡正芝. 聚酰胺吸附-硝酸铝显色法测定山楂及山楂制品中总黄酮含量[J]. 食品与发酵工业, 1996, (4): 27-32.

[9] Rehwal A, Meier B, Sticher O. Qualitative and quantitative re-

versed-phase high-performance liquid chromatography of flavonoids in Crataegus leaves and flowers [J]. Journal of Chromatography A, 1994, 677: 25-33.

[10] LIU Rong-Hua, YU Bo-Yang, QIU Sheng-Xiangs, et al. Comparative analysis of eight major polyphenolic components in leaves of Crataegus L. by HPLC[J]. Chin J Nat Med, 2005, 3(3): 162-167.

[11] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[S]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 22.

[12] Lamaison, J. L.; Carnat, A. Content of principal flavonoids of the flowers and leaves of Crataegus monogyna Jacq. and Crataegus laevigata (Poir.) DC. (Rosaceae)[J]. Pharmaceutica Acta Helvetica, 1990, 65(11): 315-20.

(收稿日期: 2007-11-01)