

· 化学与分析 ·

不同采收期山绿茶药材绿原酸和芦丁的含量比较

郑锡任, 张龙, 陈勇*, 农莉, 刘鼎, 李怡萱

(广西中医药大学药学院, 南宁 530001)

[摘要] 目的: 考察不同采收期山绿茶药材中绿原酸和芦丁的含量及其变化规律, 为探索山绿茶最佳采收期提供依据。
方法: 从 2011 年 7 月至 2012 年 5 月, 每隔单月采摘药材 1 次, 共 6 次。采用 HPLC 测定, Phenomenex Gemini C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 以乙腈和 0.1% 磷酸进行梯度洗脱, 检测波长 330 nm, 柱温 30 °C, 流速 1.0 mL·min⁻¹。结果: 绿原酸和芦丁分别在 0.10-2.00 μg, 0.25 ~ 5.00 μg 峰面积与进样量呈良好的线性关系, 回归方程分别为 $Y = 4\ 027X + 5.262$ ($r = 1.000\ 0$), $Y = 1\ 258X - 1.406$ ($r = 1.000\ 0$), 平均回收率分别为 97.18% 和 99.36%, RSD 分别为 1.27% 和 1.91%。1 月份采收的山绿茶药材绿原酸和芦丁含量较高, 7 月份采收的山绿茶药材绿原酸和芦丁含量较低, 山绿茶药材的合理采收时间可定为 1 月。
结论: HPLC 测定山绿茶中的绿原酸和芦丁含量的方法分离度良好, 快速、准确、稳定、重复性好, 可用于山绿茶药材及其炮制品的质量控制。山绿茶在生长发育过程中, 绿原酸和芦丁含量会发生变化且有一定规律。

[关键词] 山绿茶; 绿原酸; 芦丁; 采收时间; 含量测定

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)18-0065-03

[doi] 10.11653/syfy2013180065

Chlorogenic Acid and Rutin Content Comparison of *Ilex hainanensis* Collected in Different Periods

ZHENG Xi-ren, ZHANG Long, CHEN Yong*, NONG Li, LIU Ding, LI Yi-xuan

(Faculty of Pharmacy Guangxi Traditional Chinese Medicine University, Nanning 530001, China)

[Abstract] **Objective:** Changing regularity of chlorogenic acid and rutin content were detected from *Ilex hainanensis* gathered in different periods by HPLC in order to decide the best gathering time. **Method:** Six samples of *I. hainanensis* were collected from July 2011 to May 2012 at every two months. RP-HPLC was used to determine the content of chlorogenic acid and rutin in different periods of *I. hainanensis* with the chromatographic conditions of Phenomenex Gemini C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), detected at the wavelength of 330 nm, gradient elution of acetonitrile-0.1% phosphoric acid solution as the mobile phase, column temperature of 30 °C, the flow rate was 1 mL·min⁻¹. **Result:** The linearity of chlorogenic acid and Rutin were good in the range of 0.10-2.00 μg and 0.25-5.00 μg, regress equation were $Y = 4\ 027X + 5.262$ ($r = 1.000\ 0$) and $Y = 1\ 258X - 1.406$ ($r = 1.000\ 0$), the average recovery was 97.18% and 99.36%, RSDs were 1.27%, 1.91%. The content of Chlorogenic acid and Rutin were higher in *I. hainanensis* collected in January, and the content of Chlorogenic acid and Rutin were lower in *I. hainanensis* collected in July. So the collection time could be set at January. **Conclusion:** The determination method of chlorogenic acid and rutin in *I. hainanensis* is good at resolution and reproducibility, quickly analysis, accurate and stable, which can be used for the quality control of *I. hainanensis*. There are some changing regulations of chlorogenic acid and rutin in *Ilex hainanensis* during its growing development period. The content of chlorogenic acid and rutin will help us to decide the best gathering time for *I. hainanensis*.

[Key words] *Ilex hainanensis*; chlorogenic acid; rutin; gathering time; determination

[收稿日期] 20130222(008)

[基金项目] 国家自然科学基金地区科学基金项目(81060344); 广西自然科学基金创新研究团队项目(2011GXNSFF018006)

[第一作者] 郑锡任, 在读研究生, 从事药品质量控制方法的研究, Tel: 13557116814, E-mail: 409218101@qq.com

[通讯作者] * 陈勇, 教授, 硕士生导师, 从事中药及其制剂质量分析的科学与科研, Tel: 18978947922, E-mail: cy6381@163.com

山绿茶为冬青科植物海南冬青的干燥叶,主要分布于海南、广西、广东等地,已收载于《广西中药材标准》(1990 年版)^[1]和《广西壮药质量标准》(第 1 卷 2008 年版)^[2],具有清热解毒、平肝潜阳、活血化瘀的功效,民间用于治疗咽喉肿痛等呼吸系统炎症。近年来研究表明,山绿茶具有明显的降血压、降血脂作用^[3-4],临床上用于治疗高血压病。山绿茶含黄酮类、三萜酸类、绿原酸、鞣酸等成分。目前对山绿茶的研究主要集中在炮制与临床研究等方面^[3-11],有关不同采收期山绿茶药材中绿原酸和芦丁的含量测定研究尚未见报道。叶类药材一般是在植物生长旺盛时和花朵初开时采收,采摘过早,叶片正在增大,产量、质量都较低;采摘过迟,叶中贮藏的有效成分转移到花或果实中,产量和质量也会偏低,故适时采收和药材质量有密切关系^[12-13]。本实验采用高效液相色谱法测定山绿茶中绿原酸和芦丁含量,通过考察广西上林县 1~11 月采收的山绿茶中绿原酸和芦丁含量的动态变化,为确定山绿茶的最佳采收时间提供实验依据。

1 材料

山绿茶药材采自广西上林县,从 2011 年 7 月至 2012 年 5 月,每隔单月采摘 1 次,共 6 次,经广西中医药大学陈勇教授鉴定,符合广西中药材标准(1990 年版)山绿茶项下药材品种,鉴定为冬青科冬青属植物海南冬青 *Ilex hainanensis* Merr 的干燥叶。

绿原酸对照品(上海融禾医药科技发展有限公司,批号 111231,供含量测定用),芦丁对照品(上海融禾医药科技发展有限公司,批号 120115,供含量测定用)。

Agilent 1260 型高效液相色谱仪,Agilent 1260 series 色谱工作站(美国安捷伦科技公司),LG16-WA 型高速微量离心机(北京京立离心机有限公司),KQ5200B 型超声清洗器(昆山市超声仪器有限公司),Millipore Simplicity-185 型超纯水器(美国密理博公司),BP211D 型电子分析天平(德国赛多利斯),AE100S 型电子分析天平(梅特勒-托利多仪器上海有限公司),101A-3E 型电热鼓风干燥箱(上海实验仪器厂有限公司)。

乙腈为色谱纯(Fisher 公司),水为超纯水,其他试剂均为分析纯(国药集团化学试剂有限公司)。

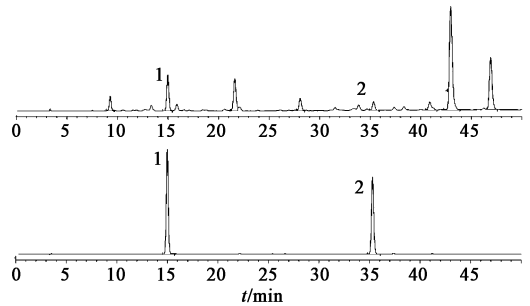
2 方法和结果

2.1 色谱条件 Phenomenex Gemini C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈(A)-0.1% 磷酸(B),按表 1 进行梯度洗脱,检测波长 330 nm,

流速 1.0 mL·min⁻¹,柱温 30 ℃,进样量 10 μL,理论塔板数以绿原酸峰计不低于 3 000。绿原酸主峰与前后相邻两峰的分度度不 < 1.5。液相色谱条件见表 1,样品及混合对照品溶液色谱图见图 1。

表 1 流动相洗脱程序

t/min	流动相 A/%	流动相 B/%
0	9	91
20	15	85
50	25	75



1. 绿原酸; 2. 芦丁

图 1 样品(A)及混合对照品(B)溶液 HPLC

2.2 混合对照品溶液的制备 取干燥至恒重的绿原酸对照品 2.0 mg 和芦丁 5.0 mg,精密称定,置 10 mL 量瓶中,用 50% 乙醇溶解并稀释至刻度,摇匀。精密吸取上述溶液 5 mL,置 10 mL 量瓶中,加 50% 乙醇至刻度,摇匀,即得含绿原酸 0.10 g·L⁻¹ 和芦丁 0.25 g·L⁻¹ 的混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备 取山绿茶药材干燥粉末(过 40 目筛)2.0 g,精密称定,置 100 mL 锥形瓶中,精密加入 50% 乙醇 40 mL,称定质量,水浴加热回流提取 30 min,放冷,用 50% 乙醇补足减损的质量,滤过,取续滤液约 2 mL,离心 10 min (10 000 r·min⁻¹),取上清液作为供试品溶液。

2.4 线性关系考察 精密吸取经稀释的混合对照品溶液(含绿原酸 0.10 g·L⁻¹ 和芦丁 0.25 g·L⁻¹) 1, 4, 8, 12, 15, 20 μL, 分别注入高效液相色谱仪测定,以对照品进样量(μg)为横坐标(X),峰面积为纵坐标(Y),绘制标准曲线,计算回归方程 $Y_{\text{绿原酸}} = 4\,027X + 5.262$ ($r = 1.000\,0$),表明绿原酸对照品在 0.10~2.00 μg 与峰面积呈良好的线性; $Y_{\text{芦丁}} = 1\,258X - 1.406$ ($r = 1.000\,0$),表明芦丁对照品在 0.25~5.00 μg 与峰面积呈良好的线性关系。

2.5 方法学考察

2.5.1 精密度试验 精密吸取同一混合对照品溶液 10 μL,重复进样 6 次,分别测定绿原酸与芦丁峰面积。绿原酸平均峰面积值为 4 005.97, RSD

0.04% ($n=6$); 芦丁平均峰面积为 3 137.77, RSD 0.10% ($n=6$), 表明仪器精密度较好。

2.5.2 稳定性试验 精密吸取同一批供试品溶液 10 μL , 在 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 内分别测定峰面积。在 24 h 绿原酸平均峰面积值为 1 329.62, RSD 0.20% ($n=6$); 芦丁平均峰面积值为 923.60, RSD 1.81% ($n=6$)。说明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.5.3 重复性试验 取同一批供试品, 精密称取 2.0 g, 共取 6 份, 按供试品溶液制备项下方法制备, 进样测定。绿原酸平均含量为 0.631 3 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$, RSD 0.33%; 芦丁平均含量为 1.441 9 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$, RSD 0.86%。说明供试品溶液重复性良好。

2.5.4 加样回收试验 取已知含量(绿原酸含量为 0.86 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$, 芦丁 1.24 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$) 山绿茶(2011-09)干燥粉末 6 份, 每份 1 g, 精密称定, 分别加入一定量绿原酸对照品溶液(0.504 0 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) 和芦丁对照品溶液(0.499 6 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), 按 2.3 项下供试品溶液制备方法处理, 按上述色谱条件测定, 计算回收率, 结果见表 2。

表 2 绿原酸、芦丁加样回收率测定

成分	原有量	加入量	测得量	回收率	平均回收率	RSD
	/mg	/mg	/mg	/%	/%	/%
绿原酸	0.860 4	0.680 0	1.518 8	96.82	97.18	1.27
	0.860 4	0.680 0	1.526 8	97.99		
	0.860 3	0.850 0	1.676 9	96.07		
	0.860 3	0.850 0	1.682 6	96.73		
	0.860 7	1.020 0	1.873 3	99.28		
	0.860 5	1.020 0	1.841 6	96.18		
芦丁	1.241 6	0.992 0	2.201 3	96.74	99.36	1.91
	1.241 6	0.992 0	2.240 2	100.66		
	1.242 2	1.240 0	2.491 9	100.78		
	1.242 4	1.240 0	2.454 6	97.76		
	1.242 7	1.488 0	2.711 9	98.74		
	1.242 0	1.488 0	2.751 7	101.46		

3 含量测定

取不同采收期山绿茶药材, 按 2.3 项下制备供试品溶液, 精密吸取供试品溶液和对照品溶液各 10 μL , 进样, 测定峰面积, 用外标法计算各样品中绿原酸和芦丁的含量, 结果见表 3。

表 3 不同采收期山绿茶药材中绿原酸和芦丁含量测定 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$

采收时间	绿原酸	芦丁
2012-01	0.959 1	1.859 2
2012-03	0.681 6	1.713 4
2012-05	0.584 3	1.703 1
2011-07	0.279 0	1.437 6
2011-09	0.639 0	1.574 4
2011-11	0.678 2	1.559 1

4 讨论

采用回流法, 长时间加热回流提取可能会使绿原酸受热分解而导致含量下降^[13], 因此提取时间不宜过长, 本实验以回流提取 30 min 为宜。

在流动相的选择中, 经过反复摸索选择酸性流动相, 原因可能为绿原酸是有机酸, 酸性条件可抑制其电离, 使峰形稳定, 分离度更好。

采用 HPLC 测定不同采收期山绿茶药材绿原酸和芦丁的含量, 分离度良好, 快速、准确、稳定、重复性好, 可用于山绿茶药材及其炮制品的质量控制。

不同采收时期山绿茶, 绿原酸芦丁含量有较大变化。其中 1 月份采收的山绿茶药材绿原酸和芦丁的含量最高, 7 月份采收的山绿茶药材绿原酸和芦丁含量较低, 提示 1 月份采收山绿茶药材比较适宜, 具体原因还有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] 广西卫生厅. 广西中药材标准[S]. 南宁: 广西科学技术出版社, 1990: 20, 137.
- [2] 广西食品药品监督管理局. 广西壮药质量标准. 第 1 卷[S]. 南宁: 广西科学技术出版社, 2008: 41.
- [3] 李萍, 谢金鲜, 陈勇, 等. 山绿茶不同炮制品降压作用的实验研究[J]. 中药材, 2008, 31(9): 1309.
- [4] 李萍, 谢金鲜, 陈勇, 等. 山绿茶不同炮制品对实验性高脂血症鹌鹑血脂的影响[J]. 中药材, 2008, 31(11): 1627.
- [5] 李萍, 彭百承, 李上球, 等. 山绿茶醇提物对四氧嘧啶诱导糖尿病小鼠的降血糖作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(10): 137.
- [6] 刘元, 韦焕英, 龙杰超, 等. 山绿茶降压片治疗高血压药效学研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(1): 86.
- [7] 陈勇, 谢臻, 李艳苓. 山绿茶不同炮制品中总黄酮的含量测定[J]. 时珍国医国药, 2006, 17(11): 2166.
- [8] 陈勇, 谢臻, 李立, 等. 山绿茶药材质量标准的研究[J]. 中华中医药杂志, 2011, 26(7): 1606.
- [9] 陈勇, 李耀华, 谢臻, 等. 山绿茶不同炮制品中绿原酸的含量比较[J]. 中药材, 2005, 28(2): 107.
- [10] 陈勇, 李艳苓, 李立, 等. HPLC 法测定山绿茶不同炮制品中绿原酸和芦丁的含量[J]. 广西科学院学报, 2006, 22(S): 416.
- [11] 赵宾. 山绿茶降压片在治疗高血压良性肾动脉硬化症中的应用[J]. 中国现代药物应用, 2008, 2(17): 26.
- [12] 郭翠玲, 郭庆中. 中药材采收季节与方法[J]. 现代农业科技, 2007(15): 151.
- [13] 阎东海. 提取三要素在金银花提取过程中对绿原酸提出率及稳定性的相关性研究[J]. 中国中药杂志, 1994, 19(9): 545.

[责任编辑 顾雪竹]