

# 承德产山楂叶中总黄酮和 5 种黄酮类成分含量的动态分析

王肖,杜义龙,赵胜男,潘海峰\*

(承德医学院,河北省中药研究与开发重点实验室,河北承德 067000)

**[摘要]** **目的:**对不同月份承德产山楂叶中总黄酮以及牡荆素葡萄糖苷、牡荆素鼠李糖苷、牡荆素、芦丁、金丝桃苷 5 种黄酮类成分进行含量测定及动态分析,以确定山楂叶的最佳采收期。**方法:**采用紫外分光光度法测定不同月份山楂叶中总黄酮含量,同时用高效液相色谱法测定 5 种黄酮类成分含量,并分析其不同月份含量的动态变化。Agilent ZORBAX SB-C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm),流动相 0.1% 甲酸水溶液-乙腈-四氢呋喃梯度洗脱,流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>,检测波长 340 nm,柱温 30 ℃,进样量 10 μL。**结果:**山楂叶总黄酮及牡荆素葡萄糖苷、牡荆素鼠李糖苷、金丝桃苷含量 6 月份最高,牡荆素、芦丁含量 7 月份最高。**结论:**若以提取山楂叶中黄酮类成分为目的,建议 6 月份采集。

**[关键词]** 山楂叶; 含量测定; 紫外分光光度法; 高效液相色谱; 动态分析

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)17-0171-05

**[doi]** 10.11653/syjf2013170171

## Dynamic Analysis of Total Flavonoids and Five Flavonoid Components in Hawthorn Leaves from Chengde

WANG Xiao, DU Yi-long, ZHAO Sheng-nan, PAN Hai-feng\*

(Key Laboratory of Study and Development of Traditional Chinese Medicine in Hebei Province, Chengde Medical University, Chengde 067000, China)

**[Abstract]** **Objective:** To determine the content and analyze the dynamic changes of the total flavonoids and five flavonoid components of vitexin-glucoside, vitexin-rhamnoside, vitexin, rutin, hyperoside of different months in hawthorn leaves from Chengde, and then determine the optimal harvest time. **Method:** The content of the total flavonoids in hawthorn leaves was determined by UV spectrophotometry, and the five flavonoid components were determined by high performance liquid chromatography (HPLC) to analyze the dynamic changes of the content in different months. An Agilent ZORBAX SB-C<sub>18</sub> column (4.6 mm×250 mm, 5 μm) was used with the mobile phase of 0.1% formic acid aqueous solution-acetonitrile-tetrahydrofuran at 30 ℃. The flow rate was 1.0 mL·min<sup>-1</sup>. The detection wavelength was set at 340 nm. Injection volume was 10 μL. **Result:** The content of the total flavonoids and vitexin-rhamnoside, vitexin-glucoside, hyperoside in hawthorn leaves were the highest in June. The content of vitexin and rutin was the highest in July. **Conclusion:** It is suggested that the best harvest time of hawthorn leaves for extracting flavonoid components is in June.

**[Key words]** hawthorn leaves; assay; UV spectrophotometry; HPLC; dynamic analysis

**[收稿日期]** 20130111(006)

**[基金项目]** 2010 年承德市科学技术研究与发展计划项目 (20101312)

**[第一作者]** 王肖,在读研究生,从事中药分析研究, Tel: 15133874424, E-mail: wangxiao881105@163.com

**[通讯作者]** \*潘海峰,硕士,副主任药师,从事中药分析研究, Tel: 0314-2291186, E-mail: phf2301@163.com

山楂叶为蔷薇科植物山里红或山楂的干燥叶,夏、秋二季采收。具有活血化瘀、理气通脉、化浊降脂的作用,用于气滞血瘀、胸痹心痛、胸闷憋气、心悸健忘、眩晕耳鸣和高血脂症<sup>[1-2]</sup>。主要有效成分为黄酮类<sup>[3-5]</sup>、有机酸类和一些微量元素<sup>[6-7]</sup>等,主产于河北承德、山东、山西和辽宁等地<sup>[8]</sup>。目前测定黄酮类成分的方法很多,有紫外分光光度法和高效

液相色谱法<sup>[9-11]</sup>等。承德是山楂叶主产地,种植广泛,本实验进一步优化色谱条件,采用高效液相色谱法测定了不同月份山楂叶中牡荆素葡萄糖苷、牡荆素鼠李糖苷等 5 种黄酮类成分的含量,同时用紫外分光光度法测定了总黄酮的含量,分别对 5 种主要黄酮类成分和总黄酮进行了不同月份含量考察,以确定山楂叶的最佳采收期,从而为合理开发承德山楂叶资源提供科学依据。

## 1 材料

山楂叶采自承德围场县、丰宁县、兴隆县,5 月到 11 月每月采集 1 次,采摘后立即暴晒、晾干。山楂叶药材由承德民族师范学院董建新教授鉴定为蔷薇科山楂属植物山楂 *Crataegus pinnatifida* Bge. 的干燥叶。

Agilent 1200 Series 高效液相色谱仪(G1322A 在线脱气机、G1311A 四元泵、G1316A 柱温箱、G1315D 二极管阵列检测器、G1329A 自动进样器), Agilent Chemstation 色谱工作站(美国安捷伦), HP-8453 型紫外-可见分光光度计, HC-2062 高速离心机(科大创新股份有限公司), KQ-700 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司), AG-245 型(1/10 万)电子分析天平(瑞士梅特勒-托利多)

牡荆素鼠李糖苷对照品(批号 111668-200602)、芦丁对照品(批号 100080-200707)、牡荆素对照品(批号 111687-200602)、金丝桃苷对照品(批号 111521-201004)均购自中国药品生物制品检定所,纯度均 > 99%, 牡荆素葡萄糖苷(批号 A0513)购自成都曼思特生物科技有限公司,纯度 > 99%。

甲醇、乙腈为色谱纯(Fisher Scientific, USA), 四氢呋喃为色谱纯(Mreda Technology Inc, USA), 水为娃哈哈纯净水(河北省高碑店市经济开发区), 其他试剂为分析纯。

## 2 方法与结果

### 2.1 总黄酮含量测定<sup>[1]</sup>

**2.1.1 标准曲线的制备** 精密称取在 120 °C 干燥至恒重的芦丁对照品 25 mg, 置 50 mL 量瓶中, 加乙醇适量, 超声处理使溶解, 放冷, 加乙醇至刻度, 摇匀。精密吸取 20 mL, 置 50 mL 量瓶中, 加水至刻度, 摇匀, 即得对照品溶液(每 1 mL 含无水芦丁 0.2 mg)。精密量取对照品溶液 1, 2, 3, 4, 5, 6 mL, 分别置 25 mL 量瓶中, 各加水至 6 mL, 加 5% 亚硝酸钠溶液 1 mL, 摇匀, 放置 6 min, 加 10% 硝酸铝溶液 1 mL, 摇匀, 放置 6 min, 加氢氧化钠试液 10 mL, 再

加水至刻度, 摇匀, 放置 15 min, 以相应试剂为空白, 立即照紫外-可见分光光度法, 在 500 nm 的波长处测定吸光度, 以吸光度为纵坐标, 浓度为横坐标, 绘制标准曲线。得标准曲线方程  $Y = 9.708 3X - 0.008 2$  ( $r = 0.999 8$ )。

**2.1.2 供试品溶液的制备** 取山楂叶细粉(过 60 目筛) 1 g, 精密称定, 置索氏提取器中, 加三氯甲烷 45 mL 加热回流提取至提取液无色(约 6 h), 弃去三氯甲烷液, 药渣挥去三氯甲烷, 加甲醇 45 mL 继续提取至无色(约 4 h), 提取液于蒸发皿中蒸干, 残渣加稀乙醇溶解, 转移至 50 mL 量瓶中, 加稀乙醇至刻度, 摇匀, 滤过, 精密量取续滤液 5 mL, 置 25 mL 量瓶中, 加水稀释至刻度, 摇匀。精密量取 2 mL, 置 25 mL 量瓶中, 作为供试品溶液。

**2.1.3 样品的测定** 按 2.1.1 项下的方法, 自“加水至 6 mL”起依法测定吸光度, 从标准曲线上读出围场县、丰宁县、兴隆县不同月份供试品溶液的浓度, 计算即得。

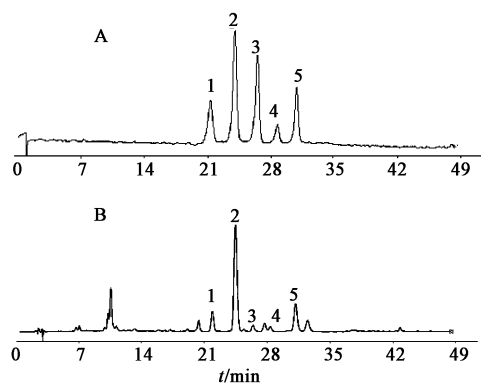
### 2.2 5 种黄酮类成分含量测定

**2.2.1 高效液相色谱条件** Agilent ZORBAX SB-C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相 0.1% 甲酸水溶液(A)-乙腈(B)-四氢呋喃(C), 梯度洗脱(0 ~ 20 ~ 30 ~ 40 ~ 50 min), A(90% ~ 84% ~ 84% ~ 78% ~ 74%), B(8% ~ 14% ~ 14% ~ 20% ~ 24%), C(2% ~ 2% ~ 2% ~ 2% ~ 2%), 检测波长 340 nm, 流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 柱温 30 °C, 进样量 10 μL。

**2.2.2 对照品溶液的制备** 精密称取牡荆素葡萄糖苷 1.6 mg、牡荆素鼠李糖苷 4.0 mg、牡荆素 1.6 mg、芦丁 0.5 mg、金丝桃苷 1.2 mg, 置于 10 mL 量瓶中, 甲醇溶解定容, 制成每 1 mL 含牡荆素葡萄糖苷 0.16 mg、牡荆素鼠李糖苷 0.40 mg、牡荆素 0.16 mg、芦丁 0.05 mg、金丝桃苷 0.12 mg 的 5 种混合对照品溶液, 作为对照品储备液, 备用, 见图 1。

**2.2.3 供试品溶液的制备** 精密称取山楂叶 0.5 g, 置于 25 mL 量瓶中, 70% 甲醇定容, 超声提取 30 min, 补足甲醇, 过滤, 取续滤液离心 10 min (12 000 r·min<sup>-1</sup>), 上清液用 0.45 μm 滤膜过滤, 续滤液作为供试品溶液, 见图 1。

**2.2.4 线性关系考察** 精密量取 2.2.2 项下对照品储备液 5 mL 置 10 mL 量瓶中, 甲醇定容, 摇匀, 作为 2 号溶液。按倍比稀释法制备 3, 4, 5, 6 号溶液。分别进样 10 μL, 按 2.2.1 项下色谱条件测定峰面积, 结果以质量浓度(g·L<sup>-1</sup>)为横坐标(X), 以峰面积为纵坐标(Y)进行线性回归, 绘制标准曲线, 结果



A. 对照品;B. 供试品;  
1. 牡荆素葡萄糖苷;2. 牡荆素鼠李糖苷;  
3. 牡荆素;4. 芦丁;5. 金丝桃苷

图1 山楂叶的HPLC

见表1。

表1 5种黄酮类成分的回归方程与线性范围

化合物	回归方程	R <sup>2</sup>	线性范围/μg
牡荆素葡萄糖苷	$Y = 15\ 875X - 9.631\ 3$	0.999 9	0.050 ~ 1.600
牡荆素鼠李糖苷	$Y = 15\ 404X - 50.888$	0.999 9	0.125 ~ 4.000
牡荆素	$Y = 29\ 450X - 42.976$	0.999 9	0.050 ~ 1.600
芦丁	$Y = 19\ 755X - 17.858$	0.999 6	0.015 625 ~ 0.500
金丝桃苷	$Y = 22\ 538X - 30.634$	0.999 8	0.037 5 ~ 1.200

**2.2.5 精密度试验** 精密吸取2号混合对照品溶液10 μL,按2.2.1项下色谱条件,连续进样6次,分别测定峰面积,计算牡荆素葡萄糖苷、牡荆素鼠李糖苷、牡荆素、芦丁和金丝桃苷的RSD,分别为

0.9%,1.1%,1.0%,0.7%,0.8%,均<3%,表明精密度良好。

**2.2.6 重复性试验** 取兴隆县6月份山楂叶6份,每份约0.5 g,按2.2.3项下方法制备供试品溶液,按2.2.1项下色谱条件进行测定,计算牡荆素葡萄糖苷、牡荆素鼠李糖苷、牡荆素、芦丁和金丝桃苷的RSD,分别为0.9%,1.2%,0.8%,0.9%,1.2%,均<3%,表明试验重复性良好。

**2.2.7 稳定性试验** 在室温条件下,取兴隆县6月份供试品溶液,按2.2.1项下色谱条件分别在0,4,8,12,16,24 h不同时间点进样测定,计算牡荆素葡萄糖苷、牡荆素鼠李糖苷、牡荆素、芦丁和金丝桃苷的RSD,分别为1.1%,1.3%,0.8%,1.2%,1.9%,均低于3%,说明样品溶液在24 h内稳定性良好。

**2.2.8 加样回收率试验** 取已知含量的兴隆县6月份山楂叶6份,每份约0.25 g,精密称定,分别精密加入对照品牡荆素葡萄糖苷、牡荆素鼠李糖苷、牡荆素、芦丁、金丝桃苷相当于0.25 g生药材所含的量,按2.2.3项下方法制备供试品溶液,按2.2.1项下色谱条件测定,计算回收率,结果见表2。

**2.2.9 样品测定** 按2.2.3项下方法制备围场县、丰宁县、兴隆县不同月份的山楂叶供试品溶液,按2.2.1项下色谱条件测定牡荆素葡萄糖苷、牡荆素鼠李糖苷、牡荆素、芦丁和金丝桃苷的含量,结果见表3和图2。

表2 山楂叶中5种黄酮类成分的加样回收率试验

成分	称样量/g	样品含量/μg	加入量/μg	测得量/μg	回收率/%	平均值/%	RSD/%
牡荆素葡萄糖苷	0.251 7	397.22	396.80	800.92	101.74	99.93	1.9
	0.250 9	394.84		799.10	101.88		
	0.251 6	394.63		783.69	98.05		
	0.252 2	395.76		784.74	98.03		
	0.250 6	396.54		785.48	98.02		
	0.251 1	395.37		799.59	101.87		
牡荆素鼠李糖苷	0.251 7	5 324.75	2 604.00	2 605.13	104.44	102.18	2.1
	0.250 9	5 207.79		2 604.57	99.97		
	0.251 6	5 319.51		2 604.32	104.24		
	0.252 2	5 208.10		2 603.84	100.01		
	0.250 6	5 321.02		2 606.09	104.26		
	0.251 1	5 211.38		2 603.99	100.13		
牡荆素	0.251 7	178.36	88.00	88.75	101.83	100.24	1.5
	0.250 9	174.23		87.46	98.60		
	0.251 6	177.87		88.37	101.71		

续表 2

成分	称样量/g	样品含量/ $\mu\text{g}$	加入量/ $\mu\text{g}$	测得量/ $\mu\text{g}$	回收率/%	平均值/%	RSD/%
芦丁	0.252 2	174.90		87.96	98.79	99.89	1.9
	0.250 6	177.27		87.79	101.68		
	0.251 1	176.00		89.03	98.83		
	0.251 7	297.36	147.50	147.34	101.71		
	0.250 9	292.65		147.95	98.10		
	0.251 6	297.07		146.71	101.94		
	0.252 2	291.21		146.98	97.78		
	0.250 6	297.90		147.88	101.71		
金丝桃苷	0.251 1	292.71		148.01	98.10	99.88	1.6
	0.251 7	981.29	487.20	486.34	101.59		
	0.250 9	981.59		487.33	101.45		
	0.251 6	965.85		487.47	98.19		
	0.252 2	965.99		486.97	98.32		
	0.250 6	967.11		488.05	98.33		
	0.251 1	981.72		487.39	101.40		

表 3 承德 3 个产地不同月份山楂叶中黄酮类成分的含量 ( $n=3$ )

%

产地	黄酮类成分	5 月	6 月	7 月	8 月	9 月	10 月	11 月
围场县	总黄酮	6.279	7.794	6.930	7.114	5.771	7.404	6.687
	牡荆素葡萄糖苷	0.028	0.154	0.048	0.014	0.404	0.301	0.159
	牡荆素鼠李糖苷	0.859	1.139	1.005	1.057	0.775	0.548	1.041
	牡荆素	0.044	0.080	0.065	0.046	0.016	0.061	0.035
	芦丁	0.023	0.051	0.050	0.032	0.039	0.061	0.059
	金丝桃苷	0.152	0.061	0.052	0.043	0.024	0.064	0.195
	总黄酮	6.317	7.901	7.058	8.641	6.038	7.816	6.831
丰宁县	牡荆素葡萄糖苷	0.049	0.125	0.012	0.014	0.011	0.073	0.022
	牡荆素鼠李糖苷	0.512	0.984	0.822	0.809	0.886	1.024	0.984
	牡荆素	0.081	0.086	0.079	0.052	0.047	0.045	0.056
	芦丁	0.042	0.058	0.110	0.097	0.086	0.051	0.068
	金丝桃苷	0.090	0.219	0.151	0.369	0.242	0.141	0.241
	总黄酮	6.132	7.883	6.894	6.954	5.632	6.915	6.473
	牡荆素葡萄糖苷	0.011	0.153	0.019	0.018	0.012	0.021	0.014
兴隆县	牡荆素鼠李糖苷	0.856	1.052	0.956	0.937	0.573	0.845	0.657
	牡荆素	0.056	0.041	0.124	0.064	0.053	0.049	0.073
	芦丁	0.067	0.059	0.068	0.078	0.048	0.082	0.031
	金丝桃苷	0.253	0.251	0.274	0.110	0.137	0.276	0.077
	总黄酮	6.243	7.859	6.961	7.510	5.814	7.378	6.664
	牡荆素葡萄糖苷	0.029	0.144	0.026	0.015	0.142	0.132	0.065
	牡荆素鼠李糖苷	0.742	1.058	0.928	0.934	0.745	0.806	0.894
平均值	牡荆素	0.060	0.069	0.089	0.054	0.039	0.052	0.055
	芦丁	0.044	0.056	0.076	0.069	0.058	0.065	0.053
	金丝桃苷	0.165	0.177	0.159	0.171	0.134	0.160	0.171

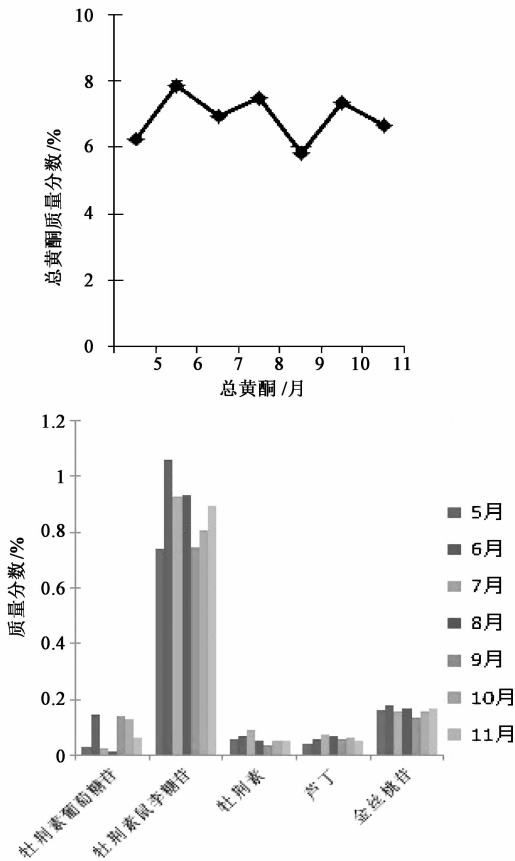


图2 不同月份承德山楂叶中黄酮类成分的含量动态变化

由表3、图2可知,总黄酮含量随采收期的不同而变化,含量在5.632%~8.641%,共有3个高峰期,分别为6,8,10月,其中以6月份最高。5种单体黄酮中,牡荆素鼠李糖苷含量最高,在0.512%~1.139%,有3个高峰期6,8,11月,且以6月份含量最高。金丝桃苷含量在0.024%~0.369%,有3个高峰期6,8,11月,且以6月份含量最高。牡荆素葡萄糖苷、牡荆素、芦丁的含量整体水平均较低,在0.05%上下浮动,其中牡荆素葡萄糖苷含量为6月份最高,牡荆素、芦丁含量均为7月份最高。

### 3 讨论

对甲醇-水、乙腈-水、0.5%甲酸水溶液-乙腈-四氢呋喃-甲醇等系统以及不同的色谱柱进行了筛选,结果使用Agilent ZORBAX SB-C<sub>18</sub>(4.6 mm×250 mm, 5 μm)色谱柱,以0.1%甲酸水溶液-乙腈-四氢呋喃为流动相梯度洗脱,缩短了分析时间,改善了峰形,保证了主要成分峰的数目和良好的分离度,而且各色谱峰的响应值适中。

所用山楂叶采集后立即暴晒、晾干,减少了黄酮

类成分的分解。

牡荆素鼠李糖苷是山楂叶的主要黄酮类成分,研究发现,承德产山楂叶总黄酮、牡荆素鼠李糖苷含量在6,8月份含量较高,尤以6月最高,8月次之。因此,若以提取山楂叶中黄酮类化合物为目的,应选择6月份采收。文献也有报道,山楂叶总黄酮8月份含量最高<sup>[10-11]</sup>,与本实验基本吻合,可能不同产地略有差异。

有关山楂叶主要黄酮类成分含量动态变化的研究较少,分别对5种主要黄酮类成分和总黄酮进行了不同月份含量考察,从部分到整体的全面监测,为承德产山楂叶最佳采收期的确立以及进一步开发提供了重要理论依据。

### [参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:30.
- [2] 杨华,张知贵,李小慧. 山楂叶总黄酮对高脂血症大鼠血脂和血液流变性的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,18(12):257.
- [3] 徐红蕾,周婷婷,范国荣. 山楂叶化学成分的HPLC-DAD/ESI-MS分析[J]. 药学实践杂志,2009,27(1):40.
- [4] 郭琦丽,吕武清. 山楂叶的研究进展[J]. 中国药业,2007,16(22):60.
- [5] 王领弟,李艳荣,张晓锋,等. 山楂叶指纹图谱研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(19):74.
- [6] 梁淑芳,黄汉民,马柏林,等. 山楂叶的化学成分及其开发利用[J]. 陕西林业科技,1996(3):5.
- [7] 卢文胜,危华玲. 高效液相色谱法测定山楂叶提取物中熊果酸的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2008,14(6):15.
- [8] 中国科学院. 中国植物志. 第36卷[M]. 北京:科学出版社,1997:189.
- [9] 潘海峰,王领弟,李艳荣,等. HPLC测定山楂叶中7种成分的含量[J]. 中药材,2012,35(6):925.
- [10] 李宏伟,张守勤,窦建鹏,等. 不同生长期山楂叶中黄酮类化合物的含量测定[J]. 时珍国医国药,2007,18(4):773.
- [11] 李永杰,马秀琴,冷爱晶,等. 不同采收期山楂叶中总黄酮含量测定[J]. 辽宁中医药大学学报,2011,13(1):54.

[责任编辑 顾雪竹]