水溶液作为背景电解质，对环境友好，污染小，且上机前不需样品预处理过程。利用所建实验方法还对不同提取温度下三白草中槲皮素和芦丁的提取效果进行考察，结果表明槲皮素和芦丁的含量均随温度的升高而增加，当温度高于 65 ℃时增加变缓，这将对三白草中黄酮类物质的提取起到一定的指导作用。

参考文献：

[1] 中国药典[S]. 一部. 2010：12.
[2] 江苏新医学院. 中药大辞典[M]. 上海：上海人民出版社，1977，60.
[3] 李泽友，陈 峰，任守忠，等. 三白草的化学成分和药理作用研究进展[J]. 中国药房，2007，18(6)：473-474.
[4] 马 林，吴 丰，陈若芸. 三白草科植物化学及生物活性研究进展[J]. 中国中药杂志，2003，28(3)：196-198.
[5] 许雪琴，叶蕨芝，齐秀贞，等. 反相高效液相色谱法测定三白草中槲皮素和芦丁的含量[J]. 福州大学学报(自然科学版)，2002，30(6)：870-872.
[6] 冼寒梅，周 蓉，张 宏，等. HPLC 法测定三白草中槲皮素的含量[J]. 中药材，2008，31(8)：1179-1180.
[7] 彭永芳，马银海，郭亚东，等. 高效液相色谱法快速测定三白草中黄酮类物质[J]. 理化检验(化学分册)，2007，43(6)：463-464，467.
[8] 宋春影. 三白草中黄酮类化合物的分离与检测[J]. 黑龙江医药，2005，18(3)：162-165.
[9] Horvath C R，Martos P A，Saxena P K. Identification and quantification of eight flavones in root and shoot tissues of the medicinal plant Huang-qin (*Scutellaria baicalensis* Georgi) using high-performance liquid chromatography with diode array and mass spectrometric detection[J]. *J Chromatogr A*，2005，1062(2)：199-207.
[10] 卓 越，王新春，甘永祥，等. 高效液相色谱法测定甘草中 4 种黄酮类化合物[J]. 中成药，2010，32(4)：697-698.
[11] Chen X J，Ji H，Zhang Q W，*et al*. A rapid method for simultaneous determination of 15 flavonoids in Epimedium using pressurized liquid extraction and ultra-performance liquid chromatography[J]. *J Pharmaceut Biomed*，2008，46(2)：226-235.
[12] 汪 怡，李 祥，邱蓉丽，等. 三白草中总黄酮醇提工艺的研究[J]. 中华中医药学刊，2007，25(4)：812-813.

HPLC 测定山楂叶中牡荆素-4″-O-葡萄糖苷、牡荆素鼠李糖苷、牡荆素、芦丁、金丝桃苷的含量

赵彩云[1]， 王 强[2]
(1. 江苏省徐州药品检验所，江苏 徐州 221006；2. 中国药科大学，江苏 南京 210009)

关键词：山楂叶；牡荆素-4″-O-葡萄糖苷；牡荆素鼠李糖苷；牡荆素；芦丁；金丝桃苷；HPLC

摘要：目的：用高效液相法同时测定山楂叶中牡荆素-4″-O-葡萄糖苷、牡荆素鼠李糖苷、牡荆素、芦丁、金丝桃苷的含量。方法：采用 HPLC 法，色谱柱：Sepax HP C_{18} 柱(4.6 mm×250mm，5μm)；流动相：A 为乙腈-四氢呋喃(20∶1)，B 为 0.5% 甲酸溶液，采用梯度洗脱：0～10min，A 为 14%～17%；10～26min，A 为 17%～18%；26～28min，A 为 18%～14%；检测波长：360nm，流速：1.0mL/min；柱温：32℃。结果：该方法加样回收率牡荆素-4″-O-葡萄糖苷：99.59%(RSD=0.50%)，牡荆素鼠李糖苷：99.57%(RSD=0.96%)，牡荆素：98.70%(RSD=1.10%)，芦丁：99.35%(RSD=1.16%)，金丝桃苷：99.28%(RSD=0.88%)。结论：该方法准确可靠，重现性好，可用于山楂叶的质量控制。

中图分类号：R284.1 文献标识码：A 文章编号：1001-1528(2011)03-0494-04

Determination of vitexin 4″-O-glucoside, vitexin rhamnoside, vitexin, rutin, hyperoside in Hawthorn leaves by HPLC

ZHAO Cai-yun[1]， WANG Qiang[2]
(*1. Xuzhou Municipal Institute for Drug Control, Xuzhou 221006, China; 2. China Pharmaceutical University; Nanjing 210009, China*)

收稿日期：2010-04-12

作者简介：赵彩云(1972－)，女，硕士，副主任中药师，研究方向：中药鉴定和中成药质量。Tel：(0516)85608573 E-mail：zcy893123@163.com

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

KEY WORDS: Hawthorn leaves; vitexin 4″-O-glucoside; vitexin rhamnoside; vitexin; rutin; hyperoside; HPLC

ABSTRACT: AIM: To establish an HPLC method for simultaneously determining the level of vitexin 4″-O-glucoside, vitexin rhamnoside, vitexin, rutin, and hyperoside in *Hawthorn* leaves. **METHODS:** The HPLC method was carried out on Sepax HP C_{18} column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) at the temperature of 32 ℃; the mobile phase consisted of A: CH_3CN-THF (20∶1), B: 0.5% formic acid gradient elution profile for A was in the range of 14% -17% within 0 -10 min, 17% -18% within 10 -26 min and 18% -14% within 26 -28 min, respectively. UV detection wavelength was set at 360nm, The flow rate was 1.0 mL/min. **RESULTS:** The average recoveries were 99.59% with RSD of 0.50% for vitexin 4″-O-glucoside; 99.57% with RSD of 0.96% for vitexin rhamnoside; 98.70% with RSD of 1.10% for vitexin; 99.35% with RSD of 1.16% for rutin; 99.28% with RSD of 0.88% for hyperoside, respectively. **CONCLUSION:** The method is simple with the adequate accuracy and selectivity. It can be used for the quality control of Hawthorn leaves.

山楂叶为蔷薇科山楂属植物山里红(*Crataegus pinnatifida* Bge. var. *major* N. E. Br.)或山楂(*C. pinnatifida* Bge.)的干燥叶[1],收载于《中国药典》2010 年版一部。到目前为止,已经从山楂的叶中分离鉴定了 50 余种化学成分[2],包括黄酮类、三萜类、原花青素类和有机酸类等。现代药理实验表明,山楂叶具有降血脂、改善冠脉流量保护心肌、抑制血小板聚集和清除自由基、抗氧化等作用[3-6],黄酮类化合物是山楂叶生理活性的主要成分包括牡荆素、牡荆素-4″-O-葡萄糖苷、牡荆素鼠李糖苷、芦丁、槲皮素、金丝桃苷等。本实验用 HPLC 法对山楂叶中黄酮类成分牡荆素鼠李糖苷、牡荆素-4″-O-葡萄糖苷、牡荆素、芦丁、金丝桃苷进行了含量测定方法学的研究。结果表明该测定方法准确、灵敏、重现性好。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Waters 高效液相色谱仪(Waters 2695 泵、Waters 2996PDAD 检测器和 Empower 色谱工作站),JL-360 超声波清洗器(上海杰理科技有限公司),AE240 电子天平(梅特勒-托利多仪器有限公司)。

1.2 试药

对照品:牡荆素鼠李糖苷(111668-200401)、金丝桃苷(111521-200303)、芦丁(100080-200306)、牡荆素(111687-200501) 均购自中国药品生物制品检定所,牡荆素-4″-O-葡萄糖苷(中国药科大学中药分析教研室提供,纯度为 99%);山楂叶(来源见表 1),经王强教授鉴定为蔷薇科植物山里红 *Crataegus pinnatifida* Bge. var. *major* N. E. Br. 的叶。

乙腈、四氢呋喃均为色谱纯,水为重蒸水,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

表 1 山楂叶药材来源

Tab. 1 Habitats of Hawthorn leaves

样品编号	山楂叶药材来源(采集地)
S1	铜山汉王
S2	铜山东沿
S3	铜山柳泉
S4	丰县大沙河
S5	铜山闫窝

2.1 色谱条件

色谱柱:Sepax HP C_{18} 柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm);流动相:A 为乙腈-四氢呋喃(20∶1),B 为 0.5% 甲酸溶液,采用梯度洗脱:0 ~ 10 min, A 为 14% ~ 17%;10 ~ 26 min, A 为 17% ~ 18%;26 ~ 28 min, A 为 18% ~ 14%;检测波长:360 nm,流速:1.0 mL/min;柱温:32 ℃;进样量:10 μL。混合对照品和供试品色谱图见图 1。

2.2 对照品溶液的制备

精密称取牡荆素-4″-O-葡萄糖苷、牡荆素鼠李糖苷、牡荆素、芦丁、金丝桃苷对照品适量,加甲醇溶解配制成浓度分别为 0.662 0、0.997 0、0.042 3、0.097 3、0.095 4 mg/mL 的混合溶液,作为对照品贮备液。精密吸取对照品贮备液 3 mL 置 10 mL 的量瓶中,加甲醇稀释至刻度,作为混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备

取样品粗粉约 1.5 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入 50% 甲醇溶液 25 mL,密塞,称定重量,超声处理(功率 250 W,频率 50 kHz)30 min,放冷至室温,再称定重量,用 50% 甲醇补足减失的重量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.4 线性关系考察

精密吸取对照品贮备液 0.5、1、2、3、4、5、6 mL

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

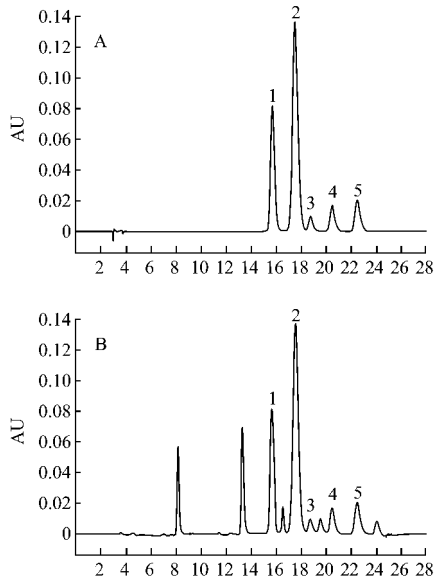

图 1 混合对照品(A)和供试品溶液(B)色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of mixed reference substances(A) and sample solution(B)

1. 牡荆素-4″-O-葡萄糖苷 2. 牡荆素鼠李糖苷 3. 牡荆素 4. 芦丁 5. 金丝桃苷

1. vitexin 4″-O-glucoside 2. vitexin rhamnoside 3. vitexin 4. rutin 5. hyperoside

置 10 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度。按上述色谱条件测定峰面积,以进样浓度为横坐标(X),峰面积为纵坐标(Y),进行线性回归,得回归方程分别为 $Y_{牡荆素\text{-}4''\text{-}O\text{-}葡萄糖苷} = 1.28 \times 10^4 X + 7.91 \times 10^4$, $r = 0.999\ 6$, $Y_{牡荆素鼠李糖苷} = 1.24 \times 10^6 X + 1.20 \times 10^5$, $r = 0.999\ 2$, $Y_{牡荆素} = 1.49 \times 10^4 X - 3.03 \times 10^3$, $r = 0.999\ 8$, $Y_{芦丁} = 1.68 \times 10^5 X - 7.43 \times 10^2$, $r = 0.999\ 8$, $Y_{金丝桃苷} = 2.09 \times 10^4 X - 7.05 \times 10^3$, $r = 0.999\ 9$。结果表明:牡荆素-4″-O-葡萄糖苷在 33.10 ~ 397.2 μg/mL 范围内,牡荆素鼠李糖苷在 49.80 ~ 598.2 μg/mL 范围内,牡荆素在 0.21 ~ 2.54 μg/mL 范围内;芦丁在 4.86 ~ 58.4 μg/mL 范围内;金丝桃苷在 4.77 ~ 57.2 μg/mL 范围内呈良好的线性关系。

2.5 精密度试验

精密吸取混合对照品溶液 10 μL 平行测定 6 次,测得牡荆素-4″-O-葡萄糖苷、牡荆素鼠李糖苷、牡荆素、芦丁、金丝桃苷峰面积 RSD 分别为 0.99%、0.73%、0.99%、1.23%、0.85%。

2.6 稳定性试验

精密吸取同一供试品溶液分别于 0、2、4、6、8、12 h 进样,测定峰面积,测得牡荆素-4″-O-葡萄糖苷、牡荆素鼠李糖苷、牡荆素、芦丁、金丝桃苷峰面积 RSD 分别为 0.78%、0.88%、0.83%、0.65%、0.72%。表明供试品溶液在 12 h 内稳定。

2.7 重复性试验

精密称取同一批样品 5 份,分别按供试品溶液制备方法制备,测定样品中各成分的含量,牡荆素-4″-O-葡萄糖苷、牡荆素鼠李糖苷、牡荆素、芦丁、金丝桃苷含量 RSD 分别为 0.86%、0.98%、0.76%、0.84%、1.23%。表明方法重现性较好。

2.8 加样回收率测定

精密称取已知各成分含量的供试品 S1 0.75 g,精密加入一定量的牡荆素-4″-O-葡萄糖苷、牡荆素鼠李糖苷、牡荆素、芦丁、金丝桃苷对照品,平行试验 5 次,按 2.3 项下方法制备,测定相应峰面积,计算含量和回收率,结果:牡荆素-4″-O-葡萄糖苷、牡荆素鼠李糖苷、牡荆素、芦丁、金丝桃苷平均加样回收率分别为 99.59%、99.57%、98.70%、99.35%、99.28%;RSD 分别为 0.50%、0.96%、1.10%、1.16%、0.88%。见表 2 ~ 6。

表 2 牡荆素-4″-O-葡萄糖苷回收率试验结果

Tab. 2 Result of recovery test for vitexin 4″-O-glucoside

取样量/g	样品含量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
0.749 4	1.116 1	1.068 0	2.181 1	99.67		
0.750 8	1.118 7	1.068 0	2.184 2	99.76		
0.749 0	1.116 0	1.068 0	2.187 1	100.3	99.59	0.50
0.745 6	1.110 9	1.068 0	2.167 9	99.01		
0.753 4	1.122 6	1.068 0	2.182 0	99.23		

表 3 牡荆素鼠李糖苷回收率试验结果

Tab. 3 Result of recovery test for vitexin rhamnoside

取样量/g	样品含量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
0.749 4	3.739 5	3.630 0	7.342 0	99.26		
0.750 8	3.746 5	3.630 0	7.316 4	98.35		
0.749 0	3.737 5	3.630 0	7.403 3	101.0	99.57	0.96
0.745 6	3.720 5	3.630 0	7.341 3	99.75		
0.753 4	3.769 6	3.630 0	7.380 0	99.48		

表 4 牡荆素回收率试验结果

Tab. 4 Result of recovery test for vitexin

取样量/g	样品含量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
0.749 4	0.044 96	0.044 61	0.088 81	98.30		
0.750 8	0.045 05	0.044 61	0.088 42	97.22		
0.749 0	0.044 94	0.044 61	0.089 63	100.2	98.70	1.10
0.745 6	0.044 74	0.044 61	0.088 82	98.81		
0.753 4	0.045 20	0.044 61	0.089 35	98.98		

2.9 样品测定

分别取不同采集地的山楂叶,按供试品溶液制

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

表 5 芦丁回收率试验结果

Tab. 5 Result of recovery test for rutin

取样量/g	样品含量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
0.749 4	0.157 4	0.149 1	0.307 0	100.3		
0.750 8	0.157 3	0.149 1	0.303 3	97.92		
0.749 0	0.157 6	0.149 1	0.305 5	99.20	99.35	1.16
0.745 6	0.156 6	0.149 1	0.306 8	100.7		
0.753 4	0.158 2	0.149 1	0.305 2	98.67		

表 6 金丝桃苷回收率试验结果

Tab. 6 Result of recovery test for hyperoside

取样量/g	样品含量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
0.749 4	0.591 7	0.592 8	1.181 6	99.52		
0.750 8	0.592 0	0.592 8	1.174 2	98.21		
0.749 0	0.593 1	0.592 8	1.182 7	99.46	99.28	0.88
0.745 6	0.589 0	0.592 8	1.184 8	100.5		
0.753 4	0.595 2	0.592 8	1.180 4	98.72		

备方法，平行制备 3 份，分别精密吸取混合对照品溶液及供试品溶液各 10 μL，测定，按外标法计算含量，结果见表 7。

3 讨论

3.1 通过对 5 个对照品 LC-PDAD 紫外吸收波长的扫描可知，5 种成分分别在 350、335、360、335、360 nm 处有最大吸收，考虑到 5 个组分要在一个色谱系统中同时检出又要使样品中各个成分有较大的响应值，且其他成分对其干扰较少，参阅有关文献[1,7-9]，选择 360nm 作为检测波长，在该波长处 5 个组分均有较强吸收，干扰少，且分离效果良好。

3.2 曾试用甲醇-水、乙腈-水、乙腈-甲酸（乙酸）进行不同等度洗脱和梯度实验，结果表明，在乙腈-甲酸的系统中加入四氢呋喃，既可以使相关峰达到有效分离，又可改善目标化合物的峰拖尾现象。因此选择乙腈-四氢呋喃-甲酸作为流动相。

表 7 样品含量测定结果（n =3）

Tab. 7 Analytical results of samples

样品	牡荆素-4″-O-葡萄糖苷		牡荆素鼠李糖苷		牡荆素		芦丁		金丝桃苷	
	平均含量/(mg/g)	RSD/%	平均含量/(mg/g)	RSD/%	平均含量/(mg/g)	RSD/%	平均含量/(mg/g)	RSD/%	平均含量/(mg/g)	RSD/%
S1	1.49	0.86	4.99	0.98	0.06	0.76	0.21	0.84	0.79	1.23
S2	2.15	0.92	9.39	0.62	0.05	1.03	0.41	1.04	0.78	0.72
S3	1.81	1.03	4.37	0.75	0.06	1.07	0.26	1.15	0.54	0.93
S4	1.55	0.95	4.73	0.90	0.06	0.96	0.22	0.96	0.64	0.87
S5	1.26	0.85	5.74	0.84	0.04	0.89	0.23	1.20	0.78	1.10

3.3 《中国药典》2010 年版一部收载了山楂叶，其质控指标成分为总黄酮及金丝桃苷。从结果可以看出金丝桃苷虽为主要活性成分之一，但含量非常低（药典规定应不少于 0.050%）。研究表明：牡荆素鼠李糖苷具有扩张血管、保护损伤的心肌组织等作用[10]，与山楂叶的功效作用相一致，因此，仅选择金丝桃苷作为质控指标值得商榷，而牡荆素 4″-O-葡萄糖苷、牡荆素鼠李糖苷为山楂叶中重要的药理活性成分，含量较高，且为专属性成分，更适宜作为山楂叶的质控指标。

参考文献：

[1] 中国药典[S]. 一部. 2010:30.
[2] 陈四平，臧亚茹. 山楂叶的研究进展[J]. 承德医学院学报，2003，20(2):164-165.
[3] 张文洁，杨 英，张 辉. 山楂叶提取物对高血脂大鼠的影响[J]. 辽宁中医杂志，2008，35(2):307-308.
[4] 叶希韵，张 隆，张 静，等. 山楂叶总黄酮对乳鼠心肌细胞缺血缺氧损伤的实验研究[J]. 中国现代应用药学，2005，22(3):202-204.
[5] 蔡久英. 山楂叶汤和银杏叶片对冠状动脉粥样硬化性心脏病患者血脂载脂蛋白和血小板聚集功能影响的比较[J]. 中国中西医结合急救杂志，1999，6(8):344-346.
[6] 于秋红，黄沛力，张淑华，等. 山楂叶提取物抗氧化作用[J]. 中国公共卫生，2006，22(4):463-464.
[7] 王福成，豆文太，朱文学. HPLC 测定山楂精中牡荆苷、牡荆苷-2″-O 鼠李糖苷、金丝桃苷、芦丁的含量[J]. 中成药，2002，24(2):122-124.
[8] Chen Jia，Song Shaojiang，Song Ning. Simultaneous determination of 2″-O-rhamnosyl vitexin and vitexin in Chinese hawthorn leaf and its extract by RP-HPLC[J]. *J Chin Pharm Sci*. 2006，15(1):51-54.
[9] Ma Guo，Jiang Xuehua，Huang Ting，*et al*. Simultaneous determination of five major components in Hawthorn leaves extract by HPLC[J]. *West China J Pharma Sci*，2007，22(5):547-549.
[10] 朱晓新，李连达，刘建勋，等. 牡荆素鼠李糖苷对脐静脉内皮细胞缺氧再给氧损伤的影响[J]. 中国实验方剂学杂志，2005，11(6):30-33.

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net