

· 论著 ·

RP-HPLC 法测定沙棘叶发酵前后 4 种黄酮苷类成分含量的变化

董睿方^{1,2}, 王政², 陈冷², 舒志恒^{2,3}, 韩婷², 秦路平² (1. 上海师范大学生命与环境科学学院, 上海 200234; 2. 第二军医大学药学院生药学教研室, 上海 200433; 3. 宁夏医科大学药学院生药学教研室, 宁夏 银川 750004)

[摘要] **目的** 建立反向高效液相色谱(RP-HPLC)法比较沙棘叶发酵前后芦丁、异槲皮苷、水仙苷、异鼠李素-3-O-葡萄糖苷含量的变化。**方法** 沙棘叶及其发酵茶水提液浓缩干燥后用 70% 乙醇溶解, 分析采用 HPLC 法, Extend-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-0.1% 甲酸水溶液, 流速 1 ml/min, 检测波长为 356 nm, 柱温 30 ℃。**结果** 沙棘叶中芦丁含量较高。经过发酵后, 除异槲皮苷含量略有升高外, 异鼠李素-3-O-葡萄糖苷含量变化不大, 芦丁、水仙苷含量均有所下降。上述 4 种成分在一定范围内呈现良好的线性关系, 相关系数 r 均大于 0.9997; 精密度、重复性和稳定性良好; 加样回收率在 96%~103% 之间。**结论** 沙棘叶发酵降低了芦丁和水仙苷含量, 增加了异槲皮苷含量。该法简便、可靠, 可为沙棘叶和沙棘叶发酵茶的质量评价提供科学依据。

[关键词] 反向高效液相色谱; 沙棘叶; 发酵; 黄酮苷

[中图分类号] R284.1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2017)06-0526-04

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2017.06.011

Content variation of four flavonoid glycosides in *Hippophae rhamnoides* L. leaves before and after fermentation assayed by RP-HPLC

DONG Ruifang^{1,2}, WANG Zheng², CHEN Ling², SHU Zhiheng^{2,3}, HAN Ting², QIN Luping² (1. College of Life and Environmental Sciences, Shanghai Normal University, Shanghai 200234, China; 2. Department of Pharmacognosy, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 3. Department of Pharmacognosy, School of Pharmacy, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China)

[Abstract] **Objective** To compare the changes of four flavonoid glycosides in the leaves of *Hippophae rhamnoides* L. before and after fermentation. **Methods** The water extract of *Hippophae rhamnoides* L. leaves and its fermented tea were concentrated and desiccated. The dry extracts were dissolved in 70% ethanol. The chromatographic separation was performed with RP-HPLC method on an Extend-C₁₈ column (4.6 mm×250 mm, 5 μm). Acetonitrile-0.1% formic acid was selected as mobile phase at the flow rate of 1.0 ml/min. The detection wavelength was 356 nm and the column temperature was 30 ℃. **Results** The rutin content was high in the leaves of *Hippophae rhamnoides* L. After fermentation, isoquercitrin content was increased, while the contents of rutin and narcissoside were reduced and isorhamnetin-3-O-glucoside stayed unchanged. There was a good linear relationship between the concentration and peak areas of the four compounds ($r > 0.9997$). The average recoveries were between 96%-103%. **Conclusion** This established method is rapid and reliable, which can be used for the quality control of *Hippophae rhamnoides* L. leaves and its fermented tea.

[Key words] RP-HPLC; *Hippophae rhamnoides* L. leave; fermentation; flavonoid glycosides

沙棘叶为胡颓子科(Elaeagnaceae)植物沙棘(*Hippophae rhamnoides* L.)的干燥叶子,在我国分布较为广泛,于华北、西北、西南地区均有分布^[1,2]。沙棘叶化学成分丰富,主要含有多糖类、黄

酮类、多酚类和萜类等^[3]。药理研究表明沙棘叶具有抗炎^[4]、抗疲劳^[5]、抗氧化和抗菌^[6]等多种活性。中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会(2013年第3号文件)将沙棘叶作为普通食品管理,为沙棘叶作为功能食品开发提供了依据。

目前对沙棘的研究主要集中在沙棘果,《中华人民共和国药典》(2015年版一部)收录的也是沙棘果^[7]。有研究表明沙棘叶中黄酮类成分与沙棘果相似,但含量较沙棘果高^[8],因此,沙棘叶的开发利用价值更高。沙棘叶中黄酮成分含量研究多是水解后

[基金项目] 全军后勤科研计划重大专项(AWS14C001)

[作者简介] 董睿方,硕士,Email:dongruifang12@126.com

[通讯作者] 秦路平,博士,教授,博士生导师,研究方向:生药资源开发利用与品质研究, Tel: (021)81871309, Email: qinluping@126.com

测定苷元槲皮素、山奈酚、异鼠李素的含量^[9],对沙棘叶发酵前后黄酮苷含量变化未见报道。本实验通过建立 HPLC 检测方法,对沙棘叶发酵前后 4 种黄酮苷类成分含量的变化进行比较研究,为进一步探讨沙棘叶的质量控制提供依据。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 Agilent 1200 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司),包括 G1322A 自动脱气机、G1311A 真空泵、G1329A 自动进样器、G1316A 柱温箱、G1315B DAD 检测器;Extend-C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm)色谱柱;AL104 万分之一电子天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司];BP211D 十万分之一电子天平(Sartorius 公司);旋转蒸发器(RE-52C 上海青浦沪西仪器厂);USC-702 超声波清洗器(上海波龙电子设备有限公司);HWS24 型电热恒温水浴锅(上海一恒科学仪器有限公司)。

1.2 试剂 对照品芦丁(批号:YM0313SA14,上海源叶生物科技有限公司),异槲皮苷(批号:150617)、水仙苷(批号:110722)、异鼠李素-3-O-葡萄糖苷(批号:150721)均购自上海融禾医药科技发展有限公司,以上标准品纯度均>98%。流动相所用乙腈为色谱纯,甲酸为分析纯,均购自国药集团化学试剂有限公司,水为娃哈哈纯净水。沙棘叶和发酵后的沙棘茶由宜兴市茗峰茶叶有限公司提供(生产批号:2105112408、2015062303、2015061207、2015070201-1、2015070201-2),沙棘叶由第二军医大学药学院生药学教研室秦路平教授鉴定,以上标本凭证保存于第二军医大学药学院植物标本馆。

2 方法与结果

2.1 色谱条件的选择 采用美国 Agilent 1200 高效液相色谱仪,Extend-C₁₈ 柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm);流动相为乙腈-0.1% 甲酸水溶液梯度洗脱(0~5 min, 14% 乙腈;5~10 min, 14%~18% 乙腈;10~16 min, 18%~20% 乙腈;16~20 min, 20%~28% 乙腈;20~25 min, 28%~32% 乙腈;25~30 min, 32%~45% 乙腈),流速为 1 ml/min,柱温为 30 °C,检测波长 356 nm,进样量 10 μl。色谱图见图 1。

2.2 混合对照品溶液的制备 精密称取对照品芦丁 7.01 mg、异槲皮苷 2.32 mg、水仙苷 4.85 mg、异鼠李素-3-O-葡萄糖苷 2.10 mg,将上述对照品溶于 70% 乙醇溶液中,25 ml 容量瓶定容,配制混合对照品溶液。精密量取 0.5、1、2、4、6、8 ml 于 25 ml 容

量瓶中定容,过 0.45 μm 微孔滤膜,4 °C 冰箱中保存,备用。

2.3 供试品溶液的制备 称取沙棘叶和发酵后的沙棘叶茶各 2.5 mg,置于 250 ml 圆底烧瓶中加水 200 ml,90 °C 回流提取 2 次,每次 15 min,过滤,2 次提取液分别浓缩蒸干,观察色泽及计算干浸膏量;浸膏用 70% 乙醇溶解,定容于 50 ml 容量瓶中,过 0.45 μm 微孔滤膜,即得。

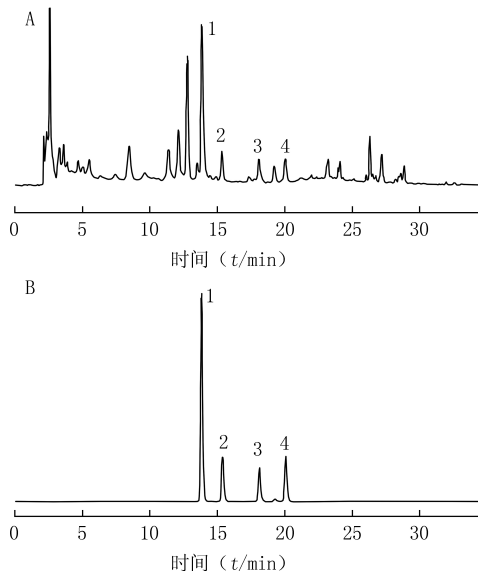


图 1 沙棘叶中 4 种黄酮苷成分的 HPLC 图
A. 对照品;B. 沙棘叶样品;1. 芦丁;2. 异槲皮苷;
3. 水仙苷;4. 异鼠李素-3-O-葡萄糖苷

2.4 方法学考察

2.4.1 线性关系、检测限(LOD)与定量限(LOQ)

取“2.1”项下不同浓度混合对照品溶液,进样量为 10 μl,按“2.3”项下色谱条件注入液相色谱仪中,重复进样 3 次,记录色谱峰面积。以浓度(X)为横坐标,峰面积平均值(Y)为纵坐标,绘制标准曲线并进行回归计算,各成分回归方程和线性范围分别为芦丁: $Y=8388.1751X+3.9402$, $r=0.9999$,线性范围 10.40~167.00 μg/ml,LOD 和 LOQ 分别为 0.35 和 1.12 μg/ml;异槲皮苷: $Y=11473.4331X+2.6213$, $r=0.9997$,线性范围 1.60~25.60 μg/ml,LOD 和 LOQ 分别为 0.27 和 0.86 μg/ml;水仙苷: $Y=10290.3117X-22.3695$, $r=0.9997$,线性范围 3.60~28.80 μg/ml,LOD 和 LOQ 分别为 1.04 和 3.26 μg/ml;异鼠李素-3-O-葡萄糖苷: $Y=11103.4065X+2.3150$, $r=0.9998$,线性范围 1.68~26.88 μg/ml,LOD 和 LOQ 分别为 0.32 和 1.12 μg/ml;结果表明各化合物在各自质量浓度范

围内线性关系良好。

2.4.2 精密度试验 分别吸取“2.2”项下混合对照品溶液,按“2.3”项下色谱条件,重复进样6次,每次进样量为10 μl,测定峰面积,计算4个化合物峰面积RSD分别为0.58%、0.69%、0.81%、0.54%,表明仪器的精密度良好。

2.4.3 重复性试验 称取未发酵沙棘叶2.5 g,精密称定6份,按“2.2”项下方法制备供试品溶液,以“2.3”项下色谱条件分别进行测定,进样10 μl。记录芦丁、异槲皮苷、水仙苷、异鼠李素-3-O-葡萄糖苷的峰面积,代入“2.4.1”项下线性回归方程,进行计算。样品中4种成分的平均含量分别为7.260、0.204、0.350、0.226 mg/g, RSD依次为1.82%、1.51%、1.73%、1.92%,表明该方法重复性良好。

2.4.4 稳定性试验 精密吸取同一供试品溶液,按“2.3”项下色谱条件分别在0、2、4、6、8、12、24 h进样测定,记录色谱峰面积,计算其RSD分别为1.02%、1.38%、1.56%、1.86%,结果表明供试品溶液在24 h内稳定。

2.4.5 加样回收率试验 取已知含量的未发酵沙棘叶6份,每份2.5 g,精密称定,分别加入已知含量一半的80%、100%和120% 3个质量浓度水平的混合标准品溶液,溶剂挥干,按“2.2”项下方法制备供试品溶液,以“2.3”项下色谱条件分别进样测定,计算加样回收率,结果见表1。结果芦丁、异槲皮苷、水仙苷、异鼠李素-3-O-葡萄糖苷的平均加样回收率分别为96.86%、98.35%、101.05%、99.00%,4种黄酮苷类成分回收率RSD分别为1.57%、1.25%、2.40%、1.92%。

2.5 样品测定 取未发酵沙棘叶和5个批次沙棘叶发酵茶各2.5 g,按“2.2”项下方法制备供试品溶液,以“2.3”项下色谱条件测定各供试样品中4种成分含量,比较发酵前后浸膏量以及黄酮苷含量变化(表2)。发酵后提取液色泽较深,呈深棕红色;原料叶提取液色泽较浅。

3 讨论

分别对芦丁、异槲皮苷、水仙苷、异鼠李素-3-O-葡萄糖苷溶液进行紫外全波长扫描,其最大吸收波长均在356 nm左右,与文献[10-13]报道一致,在该波长下测定样品,各成分峰形较好,基线平稳,故选取356 nm作为检测波长。对流动相甲醇-水系统、乙腈水系统和乙腈-0.1%甲酸水系统进行考察,最终选择乙腈-0.1%甲酸水作为流动相。

对前后2次提取4种黄酮苷含量比较发现,第

表1 加样回收率试验结果(n=6)

成分	已知量 (m/mg)	加入量 (m/mg)	测得量 (m/mg)	回收率 (%)	平均加样 回收率 (%)	RSD (%)
芦丁	7.254	2.902	9.826	96.75	96.86	1.57
	7.256	2.902	9.758	96.06		
	7.255	3.628	10.389	95.46		
	7.256	3.628	10.405	95.60		
	7.257	4.352	11.532	99.34		
	7.256	4.352	11.371	97.96		
异槲皮苷	0.203	0.082	0.281	98.60	98.35	1.25
	0.204	0.082	0.282	98.60		
	0.201	0.100	0.289	96.01		
	0.203	0.100	0.302	99.67		
	0.200	0.123	0.319	98.76		
	0.205	0.123	0.323	98.48		
水仙苷	0.352	0.142	0.492	99.60	101.05	2.40
	0.350	0.142	0.485	98.58		
	0.353	0.175	0.542	102.65		
	0.348	0.175	0.545	104.21		
	0.352	0.212	0.556	98.58		
	0.349	0.212	0.576	102.67		
异鼠李素-3-O-葡萄糖苷	0.226	0.092	0.312	98.11	99.00	1.92
	0.224	0.092	0.314	99.37		
	0.225	0.113	0.342	101.18		
	0.226	0.113	0.327	96.46		
	0.226	0.136	0.354	97.79		
	0.225	0.136	0.365	101.11		

表2 样品干浸膏得率和成分含量测定结果(n=3)

样品 批号	干浸膏 得率 (%)	成分含量(mg/g)			
		芦丁	异槲皮苷	水仙苷	异鼠李素-3-O-葡萄糖苷
2015112408	25.36	3.074	0.354	0.197	0.096
2015062303	24.20	3.936	0.251	0.262	0.187
2015061207	22.80	3.054	0.250	0.268	0.189
2015070201-1	22.76	4.301	0.181	0.281	0.220
2015070201-2	24.68	5.547	0.213	0.312	0.260
沙棘原料叶	30.20	7.260	0.204	0.350	0.226

注:成分含量为第1次提取的

2次提取所测指标含量较低,均不在线性范围内,所以提取一次即能将所测黄酮苷较好地溶出。沙棘叶经过发酵后芦丁含量下降明显,异槲皮苷含量有所增加。从黄酮苷类活性成分角度考虑,不进行发酵更为有益,但其色泽偏黄,酸味较重,口感较差。笔者同时考察了其溶出速率,经过发酵后沙棘中的黄酮溶出速率极快,3~5 min 色泽即可发生明显变化,酸味消失,这是因为沙棘叶经过低温发酵-加压、减压的揉捻过程,使其细胞破裂,细胞内容物更易浸出,所以色泽较深,呈深棕红色,口感更佳。综合考

虑多方面因素,课题组更倾向于选择沙棘叶发酵茶作为一种辅助的保健饮品。

【参考文献】

- [1] Li G, Du S, Guo K. Evaluation of limiting climatic factors and simulation of a climatically suitable habitat for Chinese Sea buckthorn[J]. PLoS one, 2015, 10(7): e0131659.
- [2] 陈 维.青藏高原沙棘属植物资源与品质评价[D].成都:四川大学,2007.
- [3] Wagner H, Ulrich-Merzenich G. Evidence and Rational Based Research on Chinese Drugs[M]. Germany:Springer Vienna, 2013: 181-236.
- [4] Ganju L, Padwad Y, Singh R, et al. Anti-inflammatory activity of seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides*) leaves[J]. Int Immunopharmacol, 2005, 5(12): 1675-1684.
- [5] Yogendra Kumar MS, Tirpude RJ, Maheshwari DT, et al. Antioxidant and antimicrobial properties of phenolic rich fraction of seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) leaves *in vitro*[J]. Food Chem, 2013, 141(4): 3443-3450.
- [6] Ni W, Gao T, Wang H, et al. Anti-fatigue activity of polysaccharides from the fruits of four Tibetan plateau indigenous medicinal plants[J]. J Ethnopharmacol, 2013, 150(2): 529-535.
- [7] 国家药典委员会.中华人民共和国药典(2015年版)一部[S].北京:中国医药科技出版社,2015:184-185.
- [8] 李春英,王 微,赵春建,等.沙棘不同部位总黄酮含量的测定及比较[J].植物研究,2005, 25(4):453-456.
- [9] 郁长治,郑永刚,吴旭东,等. RP-HPLC法测定沙棘叶中黄酮苷的含量[J].中国当代医药,2012, 19(11): 51-52.
- [10] Zu Y, Li C, Fu Y, et al. Simultaneous determination of catechin, rutin, quercetin kaempferol and isorhamnetin in the extract of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) leaves by RP-HPLC with DAD[J]. J Pharm Biomed Anal, 2006, 41(3): 714-719.
- [11] 李 坤,王明芳,薛非非,等.荷叶炒炭过程中金丝桃苷,异槲皮苷与槲皮素含量变化规律研究[J].世界科学技术-中医药现代化,2016(1): 112-117.
- [12] 马志强,刘彬丽,刘 璐,等.不同厂家舒血宁注射液中芦丁和水仙苷的 HPLC 含量测定[J].北京中医药大学学报,2013, 36(11):768-770.
- [13] Barreca D, Laganà G, Leuzzi U, et al. Evaluation of the nutraceutical, antioxidant and cytoprotective properties of ripe pistachio (*Pistacia vera* L., variety Bronte) hulls[J]. Food Chem, 2016, 196: 493-502.

[收稿日期] 2016-05-30 [修回日期] 2017-09-11

[本文编辑] 李睿旻

(上接第 498 页)

- [27] Laskowitz DT, Mckenna SE, Song P, et al. COG1410, a novel apolipoprotein E-based peptide, improves functional recovery in a murine model of traumatic brain injury[J]. J Neurotr, 2007, 24(7): 1093-1107.
- [28] 贺 杰,庞金伟,吴 越,等.载脂蛋白 E 短肽 COG1410 对蛛网膜下腔出血后早期脑水肿的影响[J].第三军医大学学报, 2016, 38(4):350-355.
- [29] Wu Y, Pang J, Peng J, et al. An apoE-derived mimic peptide, COG1410, alleviates early brain injury via reducing apoptosis and neuroinflammation in a mouse model of subarachnoid hemorrhage[J]. Neurosci Lett, 2016, 627: 92-99.

[收稿日期] 2017-07-17 [修回日期] 2017-10-17

[本文编辑] 陈盛新

(上接第 519 页)

- [9] 刘丽雅,韩永龙,余 奇,等.消癌平注射液等 4 种抗肿瘤中药注射剂对人肝微粒体中 CYP450 酶 7 种亚型的体外抑制作用研究[J].中国临床药理学与治疗学,2014, 19(5): 522-527.
- [10] 谢丽艳.消癌平注射液药物相互作用研究[D].南京:南京中医药大学,2013.
- [11] 曾庆花.消癌平注射液的药代动力学及相互作用研究[D].上海:第二军医大学,2013.

[收稿日期] 2017-01-04 [修回日期] 2017-05-19

[本文编辑] 李睿旻