

# 利用反相高效液相色谱法检测山楂果实多酚含量的方法学研究

高秀岩, 赵玉辉, 郭印山, 刘镇东, 董文轩, 吕德国

(沈阳农业大学 园艺学院, 辽宁 沈阳 110866)

**摘 要:**以山楂为试材,采用反相高效液相色谱技术,建立同时检测山楂果实中多种多酚含量的方法。结果表明:高效检测体系:色谱柱 Agilent ZORBAX Extend-C18 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相为乙腈-0.5%磷酸水溶液,梯度洗脱:0~9 min(18:82~20:80),9~25 min(20:80~50:50),25~33 min(50:50~100:0);检测波长 280 nm;柱温 30℃,流速 0.9 mL/min,进样量 20 μL,该试验可在同一色谱条件下,同时测定山楂果实中黄酮类和原花青素类的含量,通过精密度、重复性、稳定性和加样回收率试验,证明课题组前期建立的供试品溶液的制备方法,也适用于原花青素类的提取。

**关键词:**山楂;果实多酚;HPLC

**中图分类号:**S 661.5 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)23-0106-03

山楂(*Crataegus pinnatifida* Bge.)原产中国,是特有的药食两用的果树种类之一,其含有多种具有生理活性的化学成分,具有重要的药用价值,目前研究发现山楂中的活性成分主要是 2 类植物多酚,一类是以牡荆素和芦丁等为单元的黄酮类,另一类是以儿茶素、表儿茶素为单元的原花青素(Procyanidins)类。高效液相色谱(HPLC)法是现今山楂活性成分分析的主要方法<sup>[1-9]</sup>,大多研究是将黄酮类和原花青素类分开测定,也有同时分析这些成分的方法初步探索<sup>[6]</sup>,但仍需进行较多的深入研究,该试验拟建立一种应用反相高效液相色谱法同时测定山楂果实中原花青素和黄酮物质的方法,并应用于山楂不同状态和部位的多酚的含量测定。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试山楂(*C. pinnatifida* Bge.)由国家果树种质沈阳山楂圃提供,于 2012 年 10 月采收,取其树冠外围成熟、大小均一、且无病虫害的果实。

牡荆素鼠李糖苷、金丝桃苷、芦丁、儿茶素购自中国药品生物制品检定所,牡荆素购自 Sigma 公司,乙腈、甲醇均为色谱纯,磷酸、95%乙醇等其它试剂均为市售分析纯,水为重蒸馏水。

**第一作者简介:**高秀岩(1963-),女,本科,副教授,研究方向为果树种质资源评价与利用。E-mail:gaoxy024@163.com

**基金项目:**国家自然科学基金资助项目(311101515);沈阳农业大学青年教师基金资助项目(20101017)。

**收稿日期:**2013-07-25

Agilent 1200 高效液相色谱仪,包括四元泵、在线真空脱气机、柱温箱、VWD 可变波长检测器、HPCHEM 色谱工作站;Sartorius 电子天平;KQ-型数控超声波清洗器。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 色谱条件的确定** 参照山楂课题组前期<sup>[1]</sup>在山楂叶片黄酮分析方法中的流动相。以此流动相和洗脱程序对山楂果实中的牡荆素鼠李糖苷、金丝桃苷、芦丁、牡荆素、儿茶素进行了预试验,表明能够稳定的检测,在此基础上确定 5 种酚类的检测波长、柱温、流速色谱条件。

**1.2.2 对照品溶液的制备** 精密称取干燥至恒重牡荆素鼠李糖苷、金丝桃苷、芦丁、牡荆素、儿茶素 3.0 mg,用甲醇溶解并定容至 25 mL,摇匀,用 0.45 μm 微孔滤膜过滤,所得滤液作为对照品溶液。所得对照品溶液中的浓度为 120 μg/mL。

**1.2.3 供试品溶液的制备** 精密称取山楂果研磨样品 3.0 g,加入 70%乙醇 30 mL,在 40℃下,以 225 W 的超声功率提取 30 min,减压抽滤,用 70%乙醇转移至 50 mL 容量瓶中,并定容至刻度,摇匀,用 0.45 μm 微孔滤膜过滤,所得滤液为供试品溶液。

**1.2.4 方法学考察** 牡荆素鼠李糖苷、金丝桃苷、芦丁、牡荆素 4 种黄酮的提取方法已建立<sup>[1]</sup>为:以 70%乙醇为提取溶剂,料液比 1:10 g/mL,在温度 40℃条件下,以 225 W 的超声功率提取 30 min。因此方法学的考察部分仅对儿茶素进行测定。线性关系:精密吸取对照品溶液 0.25、0.50、1.00、2.00、4.00、8.00 mL,分别移置 10 mL

容量瓶中,用甲醇定容至刻度,摇匀,用 0.45  $\mu\text{m}$  微孔滤膜过滤,即得到 6 个浓度梯度的黄酮对照品溶液。将其分别进样 20  $\mu\text{L}$ ,按所确定的色谱条件测定峰面积,结果以峰面积值为横坐标(X),以进样量为纵坐标(Y)进行线性回归。精密性试验:精密吸取供试品溶液 20  $\mu\text{L}$ ,按所确定的色谱条件,连续进样 5 次,分别测定峰面积,计算儿茶素的 RSD 值(相对标准偏差,Relative standard deviation)。重复性试验:取同一样品 5 份,按照 1.2.3 项的方法制备供试品溶液,并按所确定的色谱条件进行测定,计算儿茶素的平均含量和 RSD 值。稳定性试验:在室温条件下,精密吸取同一供试品溶液,按所确定的色谱条件,分别于 0、1、2、3、4、12、24 h 进样测定,计算儿茶素的 RSD 值。加样回收率试验:精密称取已知含量的样品 3.0 g,加入不同量的对照品,按照 1.2.3 项操作,测定 5 次,计算儿茶素的平均回收率和 RSD 值。

## 2 结果与分析

### 2.1 山楂果实黄酮高效检测体系的确定

2.1.1 流动相的选择 流动相的选择参照课题组前期在山楂叶片黄酮的测定结果<sup>[1]</sup>,流动相为乙腈-0.5%磷酸水溶液,洗脱程序为 0~9 min(18:82~20:80),9~25 min(20:80~50:50),25~33 min(50:50~100:0)。

2.1.2 检测波长的确定 前期试验表明牡荆素鼠李糖苷、金丝桃苷、芦丁、牡荆素最大吸收波长范围为 230~345 nm<sup>[1-2]</sup>,儿茶素、表儿茶素类的最大吸收波长在 270~280 nm<sup>[6,8-9]</sup>,该试验选择检测波长为 280 nm。

2.1.3 柱温的选择 该试验分别选择了 25、30 和 35℃ 3 个柱温条件下进行了分析,由图 1 可以看出,经进样比较,以柱温 25℃ 和 30℃ 条件下效果较好。该试验测定选用的柱温为 30℃。

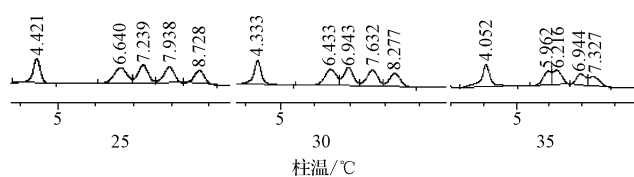


图 1 不同柱温下的 HPLC

Fig. 1 HPLC of reference substances under different column temperatures

2.1.4 流速的确定 该试验分别在 0.6、0.9、1.2 mL/min 流速条件下进行了比较分析,以 0.9 mL/min 流速的黄酮分离效果最好,结果见图 2。

综上所述,从检测波长、柱温、流速等确定最佳高效液相色谱条件为:色谱柱 Agilent ZORBAX Extend-C18 柱(250 mm×4.6 mm,5  $\mu\text{m}$ );流动相为乙腈-0.5%磷酸水溶液梯度洗脱:0~9 min(18:82~20:80),9~25 min(20:80~50:50),25~33 min(50:50~100:0);检测波长:280 nm;柱温:30℃,流速:0.9 mL/min,进样量 20  $\mu\text{L}$ 。对照品的色谱图见图 2。

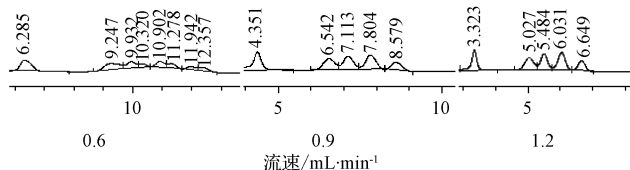


图 2 不同流速下的 HPLC

Fig. 2 HPLC of reference substances at different flow rates

### 2.2 山楂果实黄酮高效检测体系的方法学考察

2.2.1 线性关系 以峰面积值为横坐标(x),以进样量为纵坐标(y)进行线性回归,儿茶素回归方程儿茶素: $y=0.0483x-0.8017$ , $R^2=0.9980$ 。

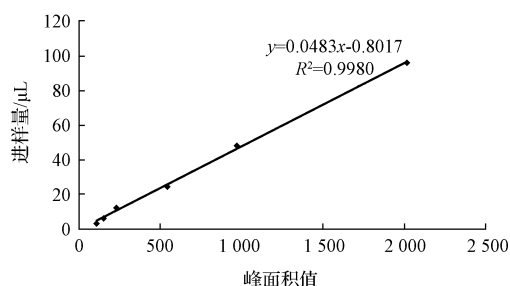


图 3 儿茶素线性回归方程

Fig. 3 Linear regression equation of catechinic acid

2.2.2 精密性试验 在色谱法的方法学考察中,RSD 值的大小主要用来评价其方法条件的可靠性和准确性,一般要求小于 3%。由表 1 可知,所得儿茶素的平均峰面积值为 346.62,RSD 值为 0.42%(<3%),说明儿茶素在此色谱条件下进行测定,所得结果准确可靠。

表 1 儿茶素精密性试验结果(n=5)

Table 1 Precision results of catechinic acid (n=5)

进样次数 No.	峰面积值 Peak area	平均值 Mean	相对标准偏差 Relative standard deviation/%
1	348.8	346.62	0.42
2	346.2		
3	346.4		
4	346.9		
5	344.8		

2.2.3 重复性试验 由表 2 可知,所得儿茶素的平均含量为 0.0229%,RSD 值为 1.07%(<3%),说明儿茶素在此色谱条件下进行测定,所得结果准确可靠。

表 2 儿茶素重复性试验结果(n=5)

Table 2 Reproducibility results of catechinic acid (n=5)

样品号 No.	样品重 Sample weight/g	峰面积值 Peak area	儿茶素含量 Content of vitexin/%	平均值 Mean / %	相对标准偏差 Relative standard deviation/%
1	3.0052	301.9	0.0229	0.0229	1.07
2	3.0155	307.5	0.0233		
3	3.0937	309.9	0.0229		
4	3.0821	306.3	0.0227		
5	3.0811	306.6	0.0227		

2.2.4 稳定性试验 由表3可知,所得儿茶素的平均峰面积为652.9,RSD值为1.56%(<3%),说明供试品溶液在24 h内稳定。

表3 儿茶素稳定性试验结果(n=5)

Table 3 Stability results of catechinic acid(n=5)

放置时间 Time/h	峰面积值 Peak area	平均值 Mean	相对标准偏差 Relative standard deviation/%
0	658.9	652.9	1.56
1	644.7		
2	641.4		
3	650.3		
4	644.4		
12	665.2		
24	665.4		

2.2.5 加样回收率试验 由表4可以看出,儿茶素的平均回收率(n=5)分别为100%,RSD分别为2.86%(<3%)。儿茶素在此色谱条件下进行测定,所得结果准确可靠。

表4 儿茶素加样回收率(n=5)

Table 4 Recovery of catechinic acid(n=5)

取样量 Sample weight/g	样品中量 Content /mg	加入量 Addition /mg	测得量 Metered content/mg	回收率 Recovery /%	平均值 Mean /%	相对标准偏差 Relative standard deviation/%
3.0723	0.7034	0.4320	1.137	100.3	100	2.86
3.0158	0.7027	0.4320	1.146	102.6		
3.0829	0.7060	0.4320	1.150	102.7		
3.0161	0.6846	0.4320	1.100	96.2		
3.0607	0.6946	0.4320	1.119	98.2		

### 3 讨论与结论

山楂果实多酚的提取方法为以70%乙醇为提取溶剂,料液比1:10 g/mL,在温度40℃条件下,以225 W的超声功率提取30 min。

山楂果实多酚高效检测体系以Agilent ZORBAX Extend-C18柱(250 mm×4.6 mm,5 μm);乙腈-0.5%磷酸水溶液梯度洗脱程序:0~9 min(18:82~20:80),9~25 min(20:80~50:50),25~33 min(50:50~100:0);检测波长280 nm;柱温30℃,流速0.9 mL/min,进样量20 μL,建立起山楂果实多酚高效检测体系。在同一色谱条件下,可同时测定山楂果实中牡荆素、牡荆素鼠李糖苷、金丝桃苷、芦丁和儿茶素等5种多酚类成分的含量,能够全面评价山楂果实的药用质量,方法简便,精密度高,重现性好,为山楂果实多酚含量的测定提供了一个有效方法,也为进一步开发利用山楂果实资源,进行质量评价提供了科学依据。

### 参考文献

- [1] 鲁巍巍. 中国山楂属(*Crataegus* spp.)植物叶黄酮多样性及其代谢生理研究[D]. 沈阳:沈阳农业大学,2008.
- [2] 何雅君,苏娟,杨茜,等. HPLC同时测定山楂提取物中绿原酸和牡荆素鼠李糖苷的含量[J]. 中国中药杂志,2012,37(6):829-831.
- [3] 王光忠,肖锦. 高效液相色谱法测定山楂总黄酮提取物中芦丁和金丝桃苷的含量[J]. 湖北中医学院学报,2009,11(3):32-33.
- [4] 袁冬梅,李一婧. 山楂叶中黄酮含量的高效液相色谱法测定[J]. 中国酿造,2007(12):66-68.
- [5] 龚青,张叶萍,祝明. RP-HPLC法测定山楂叶中牡荆素鼠李糖苷及牡荆素葡萄糖苷的含量[J]. 中草药,2005,36(3):448-449.
- [6] 李建中,马良,崔同. 山楂果实中主要活性物质的高效液相色谱分析[J]. 色谱,2005,23(1):112.
- [7] 孙蓓,钱均强. HPLC法测定山楂中芦丁的含量[J]. 中国中药杂志,2007,23(2):2573-2574.
- [8] 刘建利,原江峰,阎娥,等. 山楂多酚含量的反相高效液相色谱法测定[J]. 食品科学,2009,30(14):163-166.
- [9] 刘霞,赵淑春. 山楂黄酮类成分的分析测定[J]. 吉林农业大学学报,1997,19(3):17-19.

## Methodology Investigation of Reversal HPLC Measuring the Content of Fruit Polyphenol in Hawthorn

GAO Xiu-yan,ZHAO Yu-hui,GUO Yin-shan,LIU Zhen-dong,DONG Wen-xuan,LV De-guo  
(College of Horticulture,Shenyang Agricultural University,Shenyang,Liaoning 110866)

**Abstract:** With hawthorn as material, by reverse phase high performance liquid chromatography (HPLC), method of detection of various polyphenol content in hawthorn fruit were established. The results showed that the high performance detection system was as follows: chromatographic column was Agilent ZORBAX Extend-C18 column (250 mm×4.6 mm, 5 μm); moving phase was acetonitrile-0.5% phosphoric acid solution; gradient elution: 0~9 min(18:82~20:80), 9~25 min(20:80~50:50), 25~33 min(50:50~100:0); testing wavelength was 280 nm; column temperature was 30℃; flow velocity was 0.9 mL/min, injection volume was 20 μL. This method can determine flavone and procyanidine contents in hawthorn fruit simultaneously under the same condition. According to the accuracy test, repeatability test, stability test it and recovery test indicated that the previously established sample solution preparation method was also suitable for procyanidine abstraction.

**Key words:** hawthorn; fruit polyphenol; HPLC