

# HPLC 同时测定大叶冬青叶中 10 种多酚成分的含量及抗氧化活性研究

王存琴\*, 陈颖, 汪雷, 崔巧玉, 段名扬, 陈国军

皖南医学院药学院, 芜湖 241002

**摘要:** 建立 HPLC 同时测定大叶冬青叶中新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、对羟基肉桂酸、芦丁、异槲皮苷、异绿原酸 B、异绿原酸 A 和异绿原酸 C 10 种多酚类化合物的定量分析方法, 研究不同产地及不同采收时期大叶冬青叶中 10 种多酚类化合物的含量差异及其抗氧化活性。采用 HPLC 测定大叶冬青叶 50% 甲醇提取液中 10 种多酚类化合物的含量, 并选用 DPPH 法对其抗氧化活性进行初步探索。结果表明, 10 种多酚类化合物分离效果较好, 标准曲线在检测范围内具有良好的线性 ( $r > 0.9995$ ), 平均加样回收率在 96.58% ~ 112.03%, RSD < 4% ( $n = 6$ )。大叶冬青叶 50% 甲醇提取液抗氧化活性良好。本实验建立的方法快速、准确、重复性好, 可用于同时测定大叶冬青叶中新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、对羟基肉桂酸、芦丁、异槲皮苷、异绿原酸 B、异绿原酸 A、异绿原酸 C 10 种成分的含量; 不同产地、不同采收时期大叶冬青叶中 10 种多酚类化合物含量存在一定差异; 不同来源大叶冬青叶 50% 甲醇提取液抗氧化能力具有明显差异。

**关键词:** 大叶冬青; 不同产地; 不同采收时期; 多酚类化合物; HPLC; 含量测定; 抗氧化活性

中图分类号: R284.2; R961

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2019)4-0557-09

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2019.4.001

## Determination of 10 polyphenol components by HPLC and antioxidant activity in the leaves of *Ilex latifolia*

WANG Cun-qin\*, CHEN Ying, WANG Lei, CUI Qiao-yu, DUAN Ming-yang, CHEN Guo-jun

College of Pharmacy, Wannan Medical College, Wuhu 241002, China

**Abstract:** This research established an HPLC method for determination of ten kinds of polyphenol including the neochlorogenic acid, chlorogenic acid, cryptochlorogenic acid, caffeic acid, p-hydroxycinnamic acid, rutin, isoquercitrin, isochlorogenic acid B, isochlorogenic acid A and isochlorogenic acid C in the leaves of *Ilex latifolia*, and investigated the content difference and the antioxidant activity. Determination of 10 polyphenols in 50% methanol extract from the leaves of *I. latifolia* by HPLC and preliminary study on its antioxidant activity by DPPH. The results showed that Ten compounds were well separated with good linear correlations ( $r > 0.9995$ ). The average recoveries of ten compounds were 96.58% -112.03% and the RSD were less than 4% ( $n = 6$ ). The 50% methanol extract from the leaves of *I. latifolia* has good antioxidant activity. The HPLC method was rapid, accurate and stable, which could be used to detect simultaneously neochlorogenic acid, chlorogenic acid, cryptochlorogenic acid, caffeic acid, p-hydroxycinnamic acid, rutin, isoquercitrin, isochlorogenic acid B, isochlorogenic acid A and isochlorogenic acid C in the leaves of *I. latifolia*. There are certain differences in the contents of ten compounds between the samples from different producing areas and harvest times. The antioxidant capacity of 50% methanol extracts from the leaves of *I. latifolia* from different sources is significantly different.

**Key words:** *Ilex latifolia*; different areas; different harvest times; polyphenols; HPLC; content determination; antioxidant activity

收稿日期: 2018-08-27 接受日期: 2018-12-25

基金项目: 国家自然科学基金 (81402818); 安徽省高校优秀青年人才支持计划重点项目 (gxyqZD2016177); 安徽省高等学校省级自然科学研究项目 (2014A268); 皖南医学院博士科研启动基金 (201401)

\* 通信作者 E-mail: wqcq5188b@163.com

大叶冬青 (*Ilex latifolia* Thunb.), 为冬青科 (Aquifoliaceae) 冬青属 (*Ilex*) 常绿乔木, 主要生长在海拔 900 m 以下的沟谷常绿阔叶林中, 在我国安徽、江苏、浙江、江西、福建、湖南、广西、广东等地均有分布<sup>[1]</sup>。药用其叶, 常于秋冬二季采收。大叶冬青主

要含有多酚类、三萜及其皂苷、挥发油等化学成分<sup>[2-8]</sup>。作为苦丁茶的主要来源之一,大叶冬青可用于治疗口齿疼痛、热性痢疾、目赤肿痛、热病烦渴等症<sup>[9,10]</sup>。现代研究表明,抗氧化作用是大叶冬青的主要药理活性之一,其作用的主要物质基础是所含的多酚类成分<sup>[12-18]</sup>。然而,目前大叶冬青叶中多酚类成分的含量测定研究甚少,尤其缺乏同时测定大叶冬青叶中多种多酚类成分含量的方法,相关质量评价标准的缺乏,影响了大叶冬青的开发和利用;同时,大叶冬青叶抗氧化作用与多酚类成分含量之间的相关性研究未见报道,影响了大叶冬青的药用质量和安全。本课题组拟在前期研究工作基础上<sup>[2-7,11]</sup>,建立 HPLC 同时测定大叶冬青叶中新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、对羟基肉桂酸、芦丁、异槲皮苷、异绿原酸 B、异绿原酸 A 和异绿原酸 C 10 种多酚类成分的定量分析方法,并以大叶冬青抗氧化活性为检测指标,初步探讨不同产地大叶冬青叶抗氧化活性与 10 种多酚类成分总含量间的相关性,从药效和含量两方面全面评价大叶冬青药材的质量,以便较为全面地反映大叶冬青药材的品质,为其质量标准的建立和临床应用提供理论依据。

## 1 仪器与材料

### 1.1 仪器

高效液相色谱仪 Agilent Technologies 1260 Infinity II (配二极管阵列检测器、四元泵、自动进样器)(安捷伦科技有限公司),Agilent HC-C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm, 安捷伦科技有限公司),AUW220D 型 1/10 万电子天平(日本岛津),RHP-400A 型高速多功能粉碎机(浙江永康市荣浩工贸有限公司),KQ5200E 型超声波清洗机(昆山市超声仪器有限公司),GKC 型数显控温水浴锅(上海波络实验设备有限公司)。

### 1.2 材料

新绿原酸(批号 PS13122601-1,纯度大于 98.00%)、绿原酸(批号 PS14050901,纯度大于 98.50%)、隐绿原酸(批号 PS14011403,纯度 99.06%)、咖啡酸(批号 PS161221-01,纯度大于 98.00%)、芦丁(批号 PS160113-02,纯度大于等于 95.00%)、异槲皮苷(批号 PS13061301,纯度 99.77%)、异绿原酸 B(批号 PS13111502,纯度大于 98.50%)、异绿原酸 A(批号 PS13111501,纯度大于 98.00%)和异绿原酸 C(批号 PS13110401,纯度大于 98.50%)对照品均购自成都普思生物科技有限公司;对羟基肉桂

酸(批号 D-032-161216,纯度大于等于 98%)购自上海乔羽生物科技有限公司。色谱乙腈(德国,默克股份有限公司),色谱甲醇(天津市科密欧化学试剂有限公司),水为娃哈哈饮用纯净水,磷酸(天津市福晨化学试剂厂),乙醇(无锡市苏强化工有限公司),DPPH(梯希爱(上海)化成工业发展有限公司)。

实验用大叶冬青药材 23 批,于 2017 年实地采集,经安徽中医药高等专科学校汪荣斌副教授鉴定为冬青科冬青属植物大叶冬青 *I. latifolia* 的叶,见表 1。标本均保存于皖南医学院药学院。选择其中来自不同产地的 5 个批次大叶冬青叶,分别是第 3、7、11、13、14 号进行抗氧化活性试验(见表 5)。

表 1 23 批药材产地、采收时间表

Table 1 Sources of 23 batches of sample from different producing areas and harvest times

编号 No.	来源 Source	采收时间 Harvest time
S1	安徽南陵县	2017.10
S2	安徽南陵县	2017.10
S3	安徽南陵县	2017.10
S4	安徽石台县	2017.10
S5	安徽石台县	2017.10
S6	安徽石台县	2017.10
S7	安徽石台县	2017.10
S8	安徽石台县	2017.10
S9	安徽石台县	2017.10
S10	安徽石台县	2017.10
S11	广西南宁市	2017.10
S12	广西南宁市	2017.10
S13	安徽祁门县	2017.10
S14	安徽芜湖市	2017.01
S15	安徽芜湖市	2017.03
S16	安徽芜湖市	2017.05
S17	安徽芜湖市	2017.06
S18	安徽芜湖市	2017.07
S19	安徽芜湖市	2017.08
S20	安徽芜湖市	2017.09
S21	安徽芜湖市	2017.10
S22	安徽芜湖市	2017.11
S23	安徽芜湖市	2017.12

## 2 方法与结果

### 2.1 HPLC 同时测定大叶冬青叶中 10 种多酚类成分的含量

#### 2.1.1 色谱条件

采用 Agilent HC-C<sub>18</sub> (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱; 流动相为 0.2% 磷酸乙腈 (A)-0.2% 磷酸水 (B) 进行梯度洗脱, 洗脱程序: 0 ~ 15 min, 10% A; 15 ~ 16 min, 10% ~ 16% A; 16 ~ 30 min, 16% A; 30 ~ 31 min, 16% ~ 18% A; 31 ~ 50 min, 18% A; 柱温 40 °C; 流速 1.0 mL/min; 检测波长 320 nm; 进样量为 10 μL。在上述色谱条件下, 供试样品中新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、对羟基肉桂酸、芦丁、异槲皮苷、异绿原酸 B、异绿原酸 A 和异绿原酸 C 色谱峰的保留时间与对照品保持一致。对照品溶液和供试样品溶液 HPLC 图 (见图 1)。

#### 2.1.2 对照品溶液的制备

精密称取对照品新绿原酸 10.92 mg, 绿原酸

18.36 mg, 隐绿原酸 10.92 mg, 芦丁 29.80 mg, 异槲皮苷 5.08 mg, 异绿原酸 B 11.28 mg, 异绿原酸 A 5.82 mg, 异绿原酸 C 4.06 mg, 咖啡酸 2.08 mg, 对羟基肉桂酸 1.60 mg 混合置于 20 mL 容量瓶中, 用 50% 甲醇超声溶解并定容至刻度, 摇匀, 过 0.22 μm 微孔滤膜, 即得混合对照品储备溶液。质量浓度分别为 0.546、0.918、0.546、1.490、0.254、0.564、0.291、0.20、0.104、0.08 mg/mL, 4 °C 冷藏保存备用。

#### 2.1.3 供试品溶液的制备

精密称取不同产地大叶冬青叶粗粉约 2.0 g (过 4 号筛), 分别置 250 mL 具塞锥形瓶中, 加 50% 甲醇 125 mL, 称定重量, 80 °C 超声提取 50 min, 放冷, 再称定重量, 加 50% 甲醇溶液补足减失重量, 摇匀, 滤过, 取续滤液 50 mL, 水浴蒸干, 用适量 50% 甲醇转移至 10 mL 容量瓶中并定容至刻度, 摇匀, 过 0.22 μm 微孔滤膜, 即得供试品溶液。

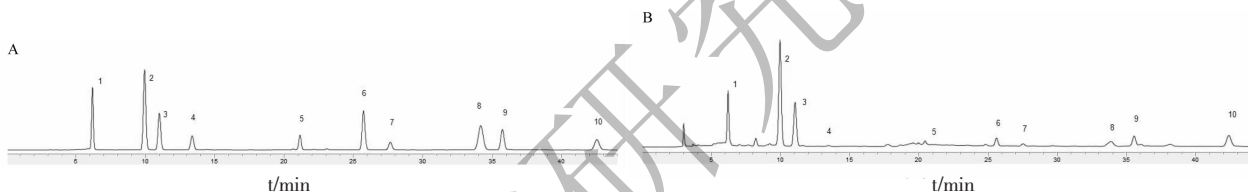


图 1 对照品 (A) 与样品 (B) HPLC 图

Fig. 1 Chromatograms of reference standards (A) and Sample (B)

注: 1 新绿原酸, 2 绿原酸, 3 隐绿原酸, 4 咖啡酸, 5 对羟基肉桂酸, 6 芦丁, 7 异槲皮苷, 8 异绿原酸 B, 9 异绿原酸 A, 10 异绿原酸 C。

Note: 1 neochlorogenic acid, 2 chlorogenic acid, 3 cryptochlorogenic acid, 4 caffeic acid, 5 p-hydroxycinnamic acid, 6 rutin, 7 isoquercitrin, 8 isochlorogenic acid B, 9 isochlorogenic acid A, 10 isochlorogenic acid C.

#### 2.1.4 线性关系考察

精密吸取混合对照品储备溶液适量, 用 50% 甲醇稀释成不同浓度的对照品溶液, 按照 2.1.1 项下的色谱条件测定新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、对羟基肉桂酸、芦丁、异槲皮苷、异绿原酸 B、异

绿原酸 A 和异绿原酸 C 的峰面积, 平行测定 3 次, 求得峰面积平均值, 以对照品浓度 (mg/mL) 的常用对数为横坐标 (X), 色谱峰面积的常用对数为纵坐标 (Y), 绘制标准曲线, 结果见表 2。

表 2 大叶冬青叶 10 种酚酸类成分线性关系 (n=6)

Table 2 The linear relationship of 10 components in the leaves of *Ilex latifolia* (n=6)

化合物 Compounds	回归方程 Regression equation	相关系数 r	线性范围 Linear range (μg/mL)
Neochlorogenic acid	$Y = 2.843X + 94.57$	0.9999	16.80 ~ 546.00
Chlorogenic acid	$Y = 2.820.1X + 193.03$	0.9995	28.25 ~ 918.00
Cryptochlorogenic acid	$Y = 2.383X + 29.107$	0.9999	16.80 ~ 546.00
Caffeic acid	$Y = 5.458.1X - 2.655.3$	0.9998	3.20 ~ 104.00
P-hydroxycinnamic acid	$Y = 5.866.5X - 1.326$	0.9999	2.46 ~ 80.00
Rutin	$Y = 981.84X - 2.756.3$	0.9999	45.85 ~ 1490.00

续表 2 (Continued Tab. 2)

化合物 Compounds	回归方程 Regression equation	相关系数 <i>r</i>	线性范围 Linear range ( $\mu\text{g/mL}$ )
Isoquercitrin	$Y = 1\,343.4X - 2\,527.2$	0.9998	7.82 ~ 254.00
Isochlorogenic acid B	$Y = 2\,866.7X - 18.894$	0.9999	17.35 ~ 564.00
Isochlorogenic acid A	$Y = 3\,211.6X + 10.69$	0.9999	8.95 ~ 291.00
Isochlorogenic acid C	$Y = 3\,384.3X - 5.3361$	0.9999	6.25 ~ 203.00

### 2.1.5 精密度试验

精密吸取混合对照品溶液 10  $\mu\text{L}$ , 连续进样 6 次, 测定峰面积, 计算相对应的 RSD, 得出新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、对羟基肉桂酸、芦丁、异槲皮苷、异绿原酸 B、异绿原酸 A 和异绿原酸 C 对应峰面积的 RSD 分别为 0.33%、0.12%、0.12%、0.11%、0.12%、0.18%、0.09%、0.22%、0.22% 和 0.21%, 表明仪器精密度很好。

### 2.1.6 重复性试验

精密称取同一样品 (S13), 按 2.1.3 项下方法平行制备 6 份供试品溶液, 照 2.1.1 项下色谱条件, 分别进样 10  $\mu\text{L}$ , 测定新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、对羟基肉桂酸、芦丁、异槲皮苷、异绿原酸 B、异绿原酸 A、异绿原酸 C 的色谱峰面积, 计算平均质量分数分别为 0.17%、0.75%、0.23%、0.0037%、0.0018%、0.50%、0.072%、0.060%、0.049%、0.068%, 其 RSD 分别为 0.91%、0.77%、1.02%、4.46%、4.54%、2.57%、1.64%、2.35%、2.58%、

1.73%, 结果表明该方法重复性良好。

### 2.1.7 稳定性试验

精密称定大叶冬青药材粉末约 2.0 g, 按供试品溶液制备方法制备供试品溶液, 照 2.1.1 项色谱条件操作, 分别在室温下放置 0、2、4、8、12、24 h 后进样分析, 记录峰面积。结果显示, 新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、对羟基肉桂酸、芦丁、异槲皮苷、异绿原酸 B、异绿原酸 A 和异绿原酸 C 对应峰面积的 RSD 分别为 1.27%、1.18%、2.90%、1.43%、1.04%、1.40%、0.97%、1.08%、1.84%、2.66%。说明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

### 2.1.8 加样回收率试验

精密称取已知含量的大叶冬青样品 (S13) 6 份, 精密加入对照品适量, 按 2.1.3 项所述的制备方法制备供试品溶液, 照 2.1.1 项条件进行含量测定, 计算 10 种成分的平均回收率及 RSD, 结果见表 3。10 种待测的成分的平均回收率在 96.58% ~ 112.03%, RSD 均小于 4.0%, 表明方法的回收率良好。

表 3 大叶冬青叶中 10 种成分的质量分数及对应 RSD ( $n=6$ )Table 3 Determination of the recovery rate of 10 components and corresponding RSD in the leaves of *Ilex latifolia* ( $n=6$ )

化合物 Compounds	样品中量 Amount in sample (mg)	加入量 Amount added (mg)	测得的量 Measured quantity (mg)	回收率 Recovery rate (%)	平均回收率 Average recovery rate (%)	RSD (%)
新绿原酸 Neochlorogenic acid	3.2724	2.1000	5.2570	97.85	96.58	0.90
	3.2818	2.1000	5.1995	96.61		
	3.2897	2.1000	5.2470	97.36		
	3.2893	2.1000	5.1765	96.05		
	3.2867	2.1000	5.1725	96.03		
	3.3141	2.1000	5.1760	95.60		
绿原酸 Chlorogenic acid	14.6761	3.5325	18.2055	99.98	99.08	0.73
	14.9182	3.5325	18.3195	99.29		
	14.9342	3.5325	18.4390	99.85		
	14.4425	3.5325	17.6850	98.39		
	14.6393	3.5325	17.9155	98.59		
	14.9132	3.5325	18.1515	98.41		

续表 3 (Continued Tab. 3)

化合物 Compounds	样品中量 Amount in sample (mg)	加入量 Amount added (mg)	测的量 Measured quantity (mg)	回收率 Recovery rate (%)	平均回收率 Average recovery rate (%)	RSD (%)
隐绿原酸 Cryptochlorogenic acid	4.5475	2.1000	6.6965	100.74	99.81	0.87
	4.4632	2.1000	6.5555	99.89		
	4.5060	2.1000	6.6675	100.93		
	4.4176	2.1000	6.4770	99.38		
	4.4049	2.1000	6.4415	99.02		
	4.4636	2.1000	6.4905	98.89		
咖啡酸 Caffeic acid	0.0710	0.4025	0.4812	101.64	101.57	1.03
	0.0747	0.4025	0.4794	100.46		
	0.0756	0.4025	0.4820	100.81		
	0.0795	0.4025	0.4862	100.87		
	0.0712	0.4025	0.4866	102.70		
	0.0741	0.4025	0.4907	102.96		
对羟基肉桂酸 P-hydroxycinnamic acid	0.0382	0.3075	0.3858	111.60	112.03	3.26
	0.0371	0.3075	0.3614	104.87		
	0.0360	0.3075	0.3896	113.39		
	0.0337	0.3075	0.3872	113.49		
	0.0338	0.3075	0.3897	114.17		
	0.0367	0.3075	0.3946	114.64		
芦丁 Rutin	9.9244	5.7300	15.6700	100.10	100.52	0.38
	9.8427	5.7300	15.6275	100.35		
	9.7915	5.7300	15.5365	100.10		
	9.1948	5.7300	15.0670	100.95		
	9.7869	5.7300	15.6420	100.81		
	9.4450	5.7300	15.2950	100.79		
异槲皮苷 Isoquercitrin	1.4129	0.9755	2.4825	103.85	103.89	1.02
	1.4546	0.9755	2.4860	102.22		
	1.4372	0.9755	2.4925	103.23		
	1.3641	0.9755	2.4480	104.55		
	1.4037	0.9755	2.5055	105.23		
	1.3908	0.9755	2.4700	104.29		
异绿原酸 B Isochlorogenic acid B	1.2295	2.1700	3.5625	104.79	107.52	1.86
	1.2258	2.1700	3.5785	105.37		
	1.1747	2.1700	3.6115	107.98		
	1.1522	2.1700	3.5925	108.14		
	1.1604	2.1700	3.6355	109.16		
	1.1719	2.1700	3.6655	109.68		
异绿原酸 A Isochlorogenic acid A	0.9956	1.1200	2.0505	96.93	101.33	3.60
	0.9945	1.1200	2.0565	97.23		
	0.9596	1.1200	2.1265	102.26		

续表 3 (Continued Tab. 3)

化合物 Compounds	样品中量 Amount in sample (mg)	加入量 Amount added (mg)	测的量 Measured quantity (mg)	回收率 Recovery rate (%)	平均回收率 Average recovery rate (%)	RSD (%)
异绿原酸 C Isochlorogenic acid C	0.9291	1.1200	2.0965	102.32	100.48	3.25
	0.9255	1.1200	2.1785	106.50		
	0.9588	1.1200	2.1355	102.72		
	1.2760	0.7825	2.1715	105.49		
	1.2623	0.7825	2.0605	100.76		
	1.4209	0.7825	2.1330	96.80		
	1.3426	0.7825	2.0595	96.92		
	1.3480	0.7825	2.1645	101.60		
	1.4064	0.7825	2.2180	101.32		

## 2.1.9 样品含量测定

按 2.1.3 项下方法制备供试品溶液, 照 2.1.1 项色谱条件进行测定, 记录峰面积, 用外标法计算

23 批大叶冬青药材中 10 种化合物的含量, 见表 4, 图 2 和图 3。

表 4 23 批大叶冬青叶药材中 10 种成分的质量分数

Table 4 The mass fraction of 10 components of the leaves of *Ilex latifolia* from 23 batches of sample

编号 No.	新绿原酸 Neochlorogenic acid	绿原酸 Chlorogenic acid	隐绿原酸 Cryptochlorogenic acid	咖啡酸 Caffeic acid	对羟基肉桂酸 P-hydroxycinnamic acid
S1	0.1997	0.4145	0.2518	-	0.0364
S2	0.2057	0.6062	0.3104	0.0090	0.0139
S3	0.1692	0.6069	0.2431	-	0.0044
S4	1.5522	5.7733	1.9761	0.0261	0.0128
S5	0.7197	1.8784	0.9017	0.0174	0.0263
S6	1.0132	4.1568	1.2521	0.0368	0.0142
S7	1.0668	2.7059	1.1009	0.0310	0.0139
S8	0.1213	0.2400	0.1911	0.0098	0.0222
S9	0.7127	2.8794	1.2255	0.0260	0.0173
S10	2.6399	6.4133	3.0595	0.0435	0.0201
S11	1.6576	5.3334	2.4728	0.0455	0.0142
S12	1.1743	2.9902	1.4710	0.1782	0.0484
S13	0.9042	3.9448	1.4196	0.0170	0.0083
S14	5.6835	8.3616	6.2645	0.0927	0.0284
S15	0.4491	0.4149	0.4380	0.0115	0.0057
S16	0.1606	0.2302	0.2336	-	0.0064
S17	0.9522	0.6212	0.6456	0.0131	0.0092
S18	0.1012	0.4968	0.1673	-	0.0095
S19	0.1643	0.7179	0.2586	-	0.0141
S20	2.3096	3.2251	2.8815	0.0460	0.0161
S21	2.8855	3.6850	2.9718	0.0416	0.0071
S22	4.2270	4.5925	4.4713	0.0795	0.0161
S23	3.4394	5.0116	3.9217	0.0659	0.0198

续表 4 23 批大叶冬青叶药材中 10 种成分的质量分数

Table 4 The mass fraction of 10 components of the leaves of *Ilex latifolia* from 23 batches of sample

No.	芦丁 Rutin	异槲皮苷 Isoquercitrin	异绿原酸 B Isochlorogenic acid B	异绿原酸 A Isochlorogenic acid A	异绿原酸 C Isochlorogenic acid C
S1	0.2125	-	0.0996	0.0694	0.0892
S2	0.1810	-	0.1927	0.1874	0.1757
S3	1.1654	0.1241	0.2968	0.1620	0.1621
S4	1.2229	0.3746	1.1919	0.1582	1.5265
S5	0.7553	0.1098	0.9572	1.4437	1.5053
S6	0.7713	0.1971	0.9116	1.9300	1.9967
S7	0.4496	0.1688	1.0016	1.3384	1.5887
S8	-	-	0.2710	0.2771	0.2896
S9	0.4116	0.0543	1.1719	2.0255	2.4832
S10	0.7042	0.0805	2.6000	3.4139	4.9619
S11	0.0973	0.0893	1.6875	1.4681	2.3721
S12	0.6198	0.1682	3.7994	3.8102	5.2662
S13	1.2481	0.3796	0.2833	0.9579	0.9708
S14	3.3476	0.6396	0.8222	0.4218	0.5685
S15	1.2926	0.1400	0.1806	0.1182	0.0353
S16	0.9236	0.0932	0.1697	0.1744	0.0359
S17	0.1105	-	0.1257	0.0196	0.0404
S18	1.8820	0.2133	0.2809	0.3218	0.1053
S19	3.7182	0.4285	0.3667	0.4376	0.2332
S20	0.7039	0.0825	0.4144	0.1478	0.1975
S21	2.7274	0.3398	0.5084	0.2508	0.3049
S22	0.7612	0.0728	0.5146	0.1795	0.2739
S23	3.3117	0.3986	0.6643	0.3746	0.6087

## 2.2 DPPH 法测定大叶冬青叶的抗氧化活性

DPPH 在含有自由基的化学反应中作为一种监测反应的物质,典型的用于抗氧化成分的体外抗氧化活性评价<sup>[19]</sup>。本实验选择广泛用于定量测定生物试样和食品抗氧化能力的 DPPH 法进行大叶冬青叶的抗氧化活性测定。

### 2.2.1 溶液的制备

**DPPH·乙醇溶液:**精密称取 DPPH 粉末 9.85 mg 至 250 mL 棕色容量瓶中,加 200 mL 无水乙醇,超声 30 min 后加无水乙醇定容至刻度,摇匀,分别制成 0.10 mmol/L 的 DPPH·乙醇溶液。避光,备用。

**大叶冬青样品溶液:**①供方法学考察,取大叶冬青粉末约 0.6 g,精密称定,置 250 mL 具塞锥形瓶中,精密加入 50% 甲醇溶液 200 mL,称定重量,80 °C 超声提取 50 min,放冷,再称定重量,加 50% 甲醇

溶液补足减失重量,摇匀,滤过,取续滤液 100 mL,水浴蒸干,定容至 50 mL 容量瓶中,作为大叶冬青储备液,质量浓度 6.0 g/L(药材)。②供活性测定,分别取不同体积的大叶冬青储备液,置 10 mL 量瓶中,加 50% 甲醇稀释并定容至刻度,摇匀,制成药材质量浓度分别为 5.40、4.80、4.20、3.60、3.00、2.40、1.80、1.20 g/L(药材)的安徽南陵产大叶冬青 50% 甲醇提取液,药材质量浓度分别为 1.05、0.90、0.75、0.60、0.45、0.30 g/L(药材)的安徽芜湖产大叶冬青 50% 甲醇提取液,药材质量浓度分别为 1.80、1.50、1.20、0.90、0.60、0.30 g/L(药材)的安徽石台产大叶冬青 50% 甲醇提取液,药材质量浓度分别为 1.80、1.50、1.20、0.90、0.60、0.30 g/L(药材)的安徽祁门大叶冬青 50% 甲醇提取液和药材质量浓度分别为 0.30、0.45、0.60、0.75、0.90、1.05 g/L(药材)的广西南宁大叶冬青 50% 甲醇提取液,备

用。③空白样品溶液,取 6 mL 无水乙醇与 1.0 mL 50% 甲醇溶液,置 15 mL 具塞刻度试管中,混匀,即得。

### 2.2.2 测定方法<sup>[20]</sup>

取 0.10 mmol/L DPPH · 乙醇溶液 6 mL,置 15 mL 具塞刻度试管中,分别加入不同浓度大叶冬青样品溶液 1.0 mL,摇匀,反应 65 min 后,将 6 mL 无水乙醇与 1.0 mL 50% 甲醇溶液作为空白组,6 mL DPPH · 乙醇溶液与 1.0 mL 50% 甲醇溶液作为对照

组。在紫外-可见分光光度计 517 nm 波长下测定其吸光度,并计算自由基清除率。自由基清除能力计算公式如下:清除率 =  $[1 - (A_{\text{sample}} - A_{\text{blank}}) / A_{\text{control}}] \times 100\%$ 。

### 2.2.3 抗氧化能力的测定

分别取不同产地的大叶冬青药材,按 2.2.1 项下方法制备大叶冬青 50% 甲醇溶液,照 2.2.2 项下方法进行测试,得到不同药材浓度下各溶液的吸光度,并计算清除率及 IC<sub>50</sub> 值(见表 5)。

表 5 不同产地大叶冬青抗氧化能力测定

Table 5 Determination of antioxidant ability of the leaves from *Ilex latifolia* in different habitats

No.	来源 Origin	量效关系 Dose-effect relationship	相关系数 <i>r</i>	IC <sub>50</sub> (药材) (Medicinal herbs) (g/L)	量效范围(药材) Range of effect (Medicinal herbs) (g/L)
S3	安徽南陵县	$Y = 10.324X + 6.4497$	0.9969	4.2184	1.200 ~ 5.400
S14	安徽芜湖市	$Y = 71.207X + 5.8842$	0.9977	0.6195	0.300 ~ 1.050
S7	安徽石台县	$Y = 39.59X + 8.3047$	0.9941	1.0532	0.300 ~ 1.800
S13	安徽祁门县	$Y = 40.221X + 10.102$	0.9961	0.9920	0.300 ~ 1.800
S11	广西南宁市	$Y = 66.035X + 8.2148$	0.9982	0.6326	0.300 ~ 1.050

### 2.2.4 大叶冬青抗氧化能力与 10 种多酚类成分含量相关性初步分析

结合表 4 和表 5 分析,5 批不同产地大叶冬青样品中 10 种多酚成分总含量较高者,对应 IC<sub>50</sub> 相应较低,其抗氧化活性相对较好,其中安徽芜湖一月份采集样品中总多酚含量最高,抗氧化活性最好,IC<sub>50</sub> 值最低。广西南宁采集样品 10 种多酚成分总含量比安徽石台样品含量略低,但其抗氧化活性优于安徽石台样品,通过对这两个产地大叶冬青叶 10 种多酚类成分含量比对发现,广西南宁样品中新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸三者含量均高于安徽石台样品。进一步分析 5 批不同产地(3、7、11、13、14 号)大叶冬青叶中 10 种多酚类成分含量差异,结果显示新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸三者含量高者抗氧化活性好。据此推测,大叶冬青叶抗氧化能力大小与 10 种多酚成分总含量有关,其中新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸三者含量对大叶冬青叶抗氧化能力大小影响较大。

## 3 结论

本文建立了 HPLC 同时测定大叶冬青叶中新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、对羟基肉桂酸、芦丁、异槲皮苷、异绿原酸 B、异绿原酸 A 和异绿原酸 C 10 种多酚类成分含量的方法。以 10 种多酚类成分总含量和浸出物含量为考察指标,比较不同超声时间(30、50、80 min),不同提取溶剂(甲醇、50% 甲

醇、乙醇、50% 乙醇、水),不同超声温度(30、60、80 ℃)对提取效率的影响,最终选择 50% 甲醇为提取溶剂,温度为 80 ℃,提取时间 50 min 作为供试品的最佳提取条件。考察 YMC-ODS C<sub>18</sub>、Agilent HC-C<sub>18</sub> 2 种型号色谱柱对各待测成分的分离效能,结果表明 Agilent HC-C<sub>18</sub> 色谱柱可以获得较为平稳的基线,且各待测成分峰形和分离度较好,保留时间较稳定。比较了甲醇-0.2% 磷酸水溶液、乙腈-0.2% 磷酸水溶液、0.2% 磷酸乙腈-0.2% 磷酸水溶液系统的分离效果,结果表明,以 0.2% 磷酸乙腈-0.2% 磷酸水溶液为流动相进行梯度洗脱,在流速 1.0 mL/min 的情况下,10 种化学成分出峰时间在 50 min 以内,并与相邻峰的分离度良好。比较了各待测成分在 280、320、328 nm 处吸收情况,结果表明 10 种成分在 320 nm 处有较大吸收,且色谱图的基线较为平稳,故选择 320 nm 作为检测波长。

通过建立的该方法对不同产地、不同采收期的 23 批大叶冬青样品中 10 种多酚类成分的含量进行测定,结果显示,10 种多酚类成分总含量主要以新绿原酸、绿原酸和隐绿原酸为主,不同产地、不同采收时间大叶冬青叶中 10 种多酚类成分的含量总和存在一定差异。同时采自 10 月份的 5 个不同产地样品比较发现,采自安徽石台和广西南宁的样品中总多酚含量较高,其次是安徽芜湖、安徽祁门和安徽



南陵。比较了采自安徽芜湖不同采收时期的 10 批大叶冬青样品,其中 6 批样品(采收时间:8、9、10、11、12、1 月)总多酚含量高于其他月份采集样品,说明大叶冬青叶适合秋冬季节采收,此时有效成分累积达到高峰。

对大叶冬青叶抗氧化活性与 10 种多酚类成分总含量相关性分析发现,大叶冬青 50% 甲醇提取液抗氧化活性与 10 种多酚类成分总含量基本呈正相关,其中新绿原酸、绿原酸和隐绿原酸三者与抗氧化活性成正相关,可能是大叶冬青抗氧化活性的主要有效成分。

综上所述,单独从多酚类化合物的含量不能准确评价大叶冬青药材的质量情况。将抗氧化活性测定与总多酚含量测定结果两方面相结合,可更加全面反映大叶冬青药材的质量。此外,目前对大叶冬青药材质量标准的研究很少,缺乏相关的质量控制标准,影响到大叶冬青药材临床应用的安全性和可靠性。因此,本实验的研究可为大叶冬青药材质量标准的制定提供科学依据。

#### 参考文献

- 1 Chen JX. Characteristics, uses and main propagation and cultivation techniques of *Ilex latifolia* [J]. Shanghai Agric Sci Tech(上海农业科技), 2014, 3: 99.
- 2 Wang CQ, Wang L, Fan CL, et al. Ilelic acids A and B, two unusual triterpenes with a seven-membered ring from *Ilex latifolia* [J]. Organic Letters, 2012, 14: 4102-4105.
- 3 Wang CQ, Li MM, Zhang W, et al. Four new triterpenes and triterpene glycosides from the leaves of *Ilex latifolia*, and their inhibitory activity on triglyceride accumulation [J]. Fitterapia, 2015, 106: 141-146.
- 4 Wang CQ, Wang HT, Xu H, et al. Triterpenoids from leaves of *Ilex latifolia* [J]. Chin Med Mat(中药材), 2015, 38: 1654-1656.
- 5 Wang CQ, Wang L, Li BJ, et al. Study on flavonoids from *Ilex latifolia* [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2014, 39: 258-261.
- 6 Wang CQ, Wang HT, Chen J, et al. Research progress on three terpenoids and pharmacological effects of *Ilex Kudingcha* [J]. Chin J Clin Pharmacol Ther(中国临床药理学与治疗学), 2016, 21: 703-709.
- 7 Wang CQ, Zhang YH. Advances in research on chemical components and pharmacological activities of *Ilex latifolia* [J]. China Pharm(中国药房), 2014, 25: 1052-1054.
- 8 Fan CL, Fan L, Zhang XQ, et al. Triterpenoid saponins from the leaves of *Ilex latifolia* [J]. Chin Pharm J(中国药学杂志), 2010, 45: 1228-1232.
- 9 State Administration of Traditional Chinese Medicine Chinese Materia Medica Editorial Board. Chinese herbal medicine; Vol 13(中华本草:第 13 卷) [M]. Shanghai: Shanghai Scientific & Technical Publishers, 1999: 4032.
- 10 Jiangsu New Medical College. Dictionary of Chinese medicine; Vol 1(中药大辞典:上册) [M]. Shanghai: Shanghai Scientific & Technical Publishers, 1977, 1288.
- 11 Wang HT, Wang CQ. 27-O-(E)-p-coumaric acyl ursolic acid via JNK/SAPK signal pathway regulates apoptosis of human breast cancer MDA-MB-231 cell line [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2015, 40: 722-726.
- 12 Fan J, Wu Z, Zhao T, et al. Characterization, antioxidant and hepatoprotective activities of polysaccharides from *Ilex latifolia* Thunb [J]. Carbohydrate Polymers, 2014, 101: 990-997.
- 13 Zheng W, Michaeln C, Paul S. Analysis of chlorogenic acids in beverages prepared from chinese health foods and investigation, in vitro, of effects on glucose absorption in cultured Caco-2 cells [J]. Food Chem, 2008, 108: 369-373.
- 14 Chen JL. Studies on the extraction and bioactivity of *kuding tea* polyphenols [D]. Guangzhou: South China Agricultural University, 2016.
- 15 Hu T. Study on isolation and identification of *Ilex latifolia* Thunb and its bioactivities [D]. Guangzhou: South China University of Technology(华南理工大学), 2013.
- 16 Sun Y. Extraction, purification, structure and antioxidant activities of polyphenols and polysaccharides in *Ilex kudingcha* [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University(南京农业大学), 2010.
- 17 Guo Y. Study on the antioxidant activity of six *Kudingcha* species in aquifoliaceae [D]. Haikou: Hainan University(海南大学), 2013.
- 18 Chen W, Wang HS, Deng YX, et al. Study on the extraction and antioxidant activity of the components of *Ilex kudingcha* [J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2002, 14: 24-28.
- 19 Sharma OP, Bhat TK. DPPH antioxidant assay revisited [J]. Food Chem, 2009, 113: 1202-1205.
- 20 Feng YH, Li C, Xin WM, et al. Exploration on feasibility of introducing bioassay method into quality evaluation of chinese herbal medicines by studying on the correlation between antioxidant activity of *prunella vulgaris* and its total phenolic acids content for example [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2016, 41: 2660-2668.