

葡萄属低聚芪含量的 HPLC 测定[△]

中国科学院成都生物研究所(610041) 李文武* 李宇飞 丁立生 李朝奎 李伯刚

摘 要 采用 HPLC 法测定 11 种葡萄属植物低聚芪的含量,方法简便,快速准确,为合理利用和评价本属药用植物提供依据。

关键词 葡萄属 白藜芦醇 低聚芪 HPLC

葡萄科葡萄属全世界有 60 余种,分布于温带或亚热带,我国有 37 种,其中葡萄 *Vitis vinifera* L. 是著名的水果和酿酒原料^[1],也作为药用植物被药典收载^[2],该属其它多种植物在民间也广为药用,收载入《中药大辞典》中。葡萄属植物的植物化学研究表明它们富含低聚芪(oligostilbenes)^[3~6]。低聚芪是以白藜芦醇(resveratrol)为单体聚合而成的一类化合物,其结构独特复杂,且具有抗菌、抗炎、抗癌、抗血栓、降脂和保肝等多方面的活性^[7,8],吸引了国外学者的关注和研究,而国内这方面研究极少。我们首先对毛葡萄 *V. heyneana* Roem. & Schult 茎的化学成分作了研究,该植物的根皮具有舒筋活血,清热解暑的作用,其全株及叶具有止血,祛风湿等作用^[9],从其茎的乙醇提取物中分离得到 1 个新的白藜芦醇四聚体—heyneanol A 和单体白藜芦醇,2 个二聚体 ϵ -viniferin, ampelopsin A 和 1 个三聚体 ampelopsin C^[6];为进一步寻找和扩大药用资源,了解化学成分与物种之间的关系,我们收集了不同产地的 11 种葡萄属植物,对它们所含的 5 种芪类化合物的含量做了 HPLC 的测定,对合理利用、评价本属药用植物资源,探讨化学成分与属种之间的关系及物种的鉴定具有重要意义。

1 仪器与试剂

高效液相色谱仪 Waters 990 HPLC 系统,检测器为 UV-Waters 990 型检测器。色谱柱 C_{18} (4 mm $\times$ 250 mm, 10 μ) 不锈钢柱,所用水为超纯水,乙腈为色谱纯,其余试剂为分析纯。resveratrol, ϵ -viniferin, ampelopsin A、C, heyneanol A, 均为从毛葡萄中分离得到。

2 实验条件

固定相: C_{18} 柱;流动相: CH_3CN-H_2O 从 1:9 $\rightarrow$ 9:1 梯度洗脱,流速:1 mL/min;检测波长 280 nm (ampelopsin A 和 C) 和 320 nm (resveratrol, ϵ -viniferin 和 heyneanol A),定量方法采用外标法。

3 实验方法

3.1 标准曲线

3.1.1 准确称取 ampelopsin A 5.4 mg,定容于 50 mL 容量瓶中,分别吸取 0.1、0.5、1.0、2.0 mL 上述溶液,蒸干,加入 1.0 mL 甲醇,每次进样 10 μ L。

以峰面积(Y)为纵坐标,对照品量(X)为横坐标,以 μ g 表示,测得回归方程为 $Y = 1.163 \times 10^{-2}X - 1.163 \times 10^{-4}$,相关系数 $r = 0.9999$ 。

3.1.2 准确称取 ampelopsin C 6.4 mg,定容于 50 mL 容量瓶中,分别配制成 0.0128、

* Address: Li Wenwu, Chengdu Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences, Chengdu

李文武 男,助理研究员。1992-07 毕业于吉林大学分子生物学系(本科),1995-07 在中国科学院成都生物研究所获植物化学专业硕士学位,1998-02 在浙江大学化学系获理学博士学位,现在中国科学院成都生物研究所天然药物研究室工作。主要从事天然药物的化学与生物活性研究,已在国内外刊物发表 10 余篇论文。

[△] 本课题受中科院成都地奥科学基金资助。

0.064、0.128、0.256、0.640 mg/mL 的 5 个不同浓度的溶液,每次进样 10 μ L。

回归方程为 $Y = 9.1941 \times 10^{-3} X - 8.996 \times 10^{-5}$, $r = 1.0000$ 。

3.1.3 准确称取 resveratrol 5.8 mg 定容于 50 mL 容量瓶中,分别配制成 0.0232、0.058、0.116、0.232、0.580 mg/mL 的 5 个不同浓度的溶液,每次进样 10 μ L。

回归方程为 $Y = 0.1222X - 1.049 \times 10^{-2}$, $r = 0.9978$ 。

3.1.4 准确称取 ϵ -viniferin 5.0 mg,按前法配制成 0.01、0.05、0.10、0.20、0.50 mg/mL 的溶液,每次进样 10 μ L。

回归方程为 $Y = 3.602 \times 10^{-2} X - 5.685 \times 10^{-3}$, $r = 0.9988$ 。

3.1.5 准确称取 heyneanol A 4.0 mg,按前法配成 0.008、0.04、0.08、0.16、0.40 mg/

mL 的对照品液,每次进样 10 μ L。

回归方程为 $Y = 1.561 \times 10^{-2} X - 7.314 \times 10^{-4}$, $r = 0.9665$ 。

3.2 回收率:称取粒度为 45 目秋葡萄粉末 1.0 g,加入准确量的 0.3 mg resveratrol,精确加入甲醇-丙酮(1:1)混合溶液 10.0 mL,密封,冷浸过夜,超声振荡 40 min,取溶液进样,进样量为 5 μ L。同时另外称量生药粉末 1.0 g,平行操作,为空白对照,测量峰面积,计算回收率,计算结果表明 resveratrol 的回收率为 107.1%。

3.3 芪类化合物的测定:精密称取粒度为 45 目生药粉末 1.0 g,定量加入甲醇和丙酮的混合液(1:1)10.0 mL,密封,冷浸过夜,超声振荡 40 min。取溶液进样,每次 5 μ L,测峰面积,计算各芪类化合物的含量。结果见表 1。

表 1 葡萄属 11 种植物芪类化合物的含量(%)

种	采收地点	resveratrol	ampelopsin C	ampelopsin A	ϵ -viniferin	heyneanol A
庐山葡萄 <i>Vitis hui</i> Cheng	江西庐山	微量	0.1170	0.03243	1.070	0.4906
变叶葡萄 <i>V. peasekii</i> Maxin	河北霸县	微量	0.2276	0.04742	0.4354	0.4718
葡萄 <i>V. uinifera</i> L.	栽培	微量		0.3551	0.3340	0.1621
东南葡萄 <i>V. chunganensis</i> Hu	江西井冈山	微量	0.006808	0.0607	0.07471	
龙泉葡萄 <i>V. longquanensis</i> P. L. Qin	浙江龙泉	微量	0.07178	0.3744	0.7351	0.01230
秋葡萄 <i>V. romanetii</i> Roman du cail ex Planch. Var	湖南凤凰	微量	0.0657	0.1104	0.9339	0.04801
桑叶葡萄 <i>V. heyneana</i> Roem. & Schult subsp.	陕西华山	微量		0.0963	0.1197	
湖北葡萄 <i>V. silvestrii</i> Pamp	湖北白河	微量	微量	0.1515	0.2089	
毛葡萄 <i>V. heyneana</i> Roem & Schult	湖北兴山	微量		0.07277	0.05451	
刺葡萄 <i>V. davidii</i> (Roem. du Cail.) Foëx	四川南川	微量		0.008972	0.007927	
狭叶葡萄 <i>V. tsoi</i> Merr.	江西井冈山	微量	0.02782	0.04052	0.1086	微量

4 结果与讨论

低聚芪独特的化学结构和广泛的生理活性日益受到重视。葡萄属植物在我国资源丰富,且富含低聚芪,是研究该类活性化合物的理想材料。我们对毛葡萄进行了化学成分的研究,分离得到 5 个芪类化合物,然后利用高

效液相色谱法,建立了以乙腈-水的体系,较好地分离了芪类化合物,该方法能快速方便地定性定量测定它们在植物中的含量,实验结果表明所有的葡萄属植物都含有白藜芦醇,含量都明显低于其聚合物的含量,这可能是植物体内白藜芦醇的氧化偶合产生了丰富

的低聚芪的缘故,结合我们对葡萄属其它植物,桦叶葡萄 *V. betulifolia* Diel & Gilg、网脉葡萄 *V. wilsonae* Veitch 和葛藟 *V. flexuosa* Thunb 化学成分的研究^[10],进一步说明低聚芪是该属植物主要和特征的化学成分,也是葡萄属药用植物的活性成分,这对葡萄科的植物化学分类具有重要意义。Oshima 从葡萄科蛇葡萄属蛇葡萄 *Ampelopsis brevipedunculata* var. *hancei* Rehd. 的根中分离得到多种低聚芪^[11,12]以及我们从羽叶蛇葡萄 *A. chaffanjonii* (Levl.) Rehd. 分离到白藜芦醇^[13]表明,从化学分类角度看,蛇葡萄属植物在亲缘关系上更靠近葡萄属植物;同时我们对葡萄科地锦属的地锦 *Parthenocissus tricuspidata* (Sieb. & Zucc.) Planch.、川鄂爬山虎 *P. henryana* (Hesml.) Diels、美国地锦 *P. quinquefolia* Planch.、三叶地锦 *P. semicordata* (wall) Planch 和长梗地锦 *P. feddei* C. L. Le; 俞藤属的大果俞藤 *Yuastr-orientalis* Metcalf、绿牙俞藤 *Y. chinensis* C. L. Li 和崖爬藤属的三叶崖爬藤 *Tetrastigma hemsleyanum* Diels et Gilg 的甲醇-丙酮提取物做了 HPLC 分析,表明这 8 种植物不含或者含极微量的低聚芪,这说明该科的地锦属、俞藤属和崖爬藤属在亲缘

关系上离葡萄属和蛇葡萄属植物更远,这对于我们寻找活性芪类化合物资源具有指导意义。我们相信,随着葡萄科植物的化学成分和药理研究的深入,将发现更多的活性低聚芪类化合物并促进该科的植物化学分类的深入和完善,从而指导我们寻找新药。

参考文献

- 1 李朝奎,等. 应用与环境生物学报,1996,2(3):234
- 2 中华人民共和国卫生部药典委员会编. 中华人民共和国药典,北京:人民卫生出版社,1990(第一部)附录. 22
- 3 Langcake P, et al. Experientia, 1977, 13(2):151
- 4 Pryce R J, et al. Phytochemistry, 1977, 16:1452
- 5 Oshima Y, et al. J Org Chem, 1993, 58:850
- 6 Li Wenwu(李文武), et al. Phytochemistry, 1996, 42(4):1163
- 7 冯永红,等. 国外医药·植物药分册, 1996, 11(4):155
- 8 斯建勇. 国外医药·植物药分册, 1991, 6(4):155
- 9 江苏新医学院. 中药大辞典. 上海:上海科技出版社, 1985. 396; 2158
- 10 Li Wenwu(李文武), et al. 合成化学, 1997, (5)增刊: 280
- 11 Oshima Y, et al. Tetrahedron, 1990, 46(15):5121
- 12 Oshima Y, et al. Phytochemistry, 1993, 33(1):179
- 13 李文武,等. 化学研究与应用(有机分析论文专辑), 1994:144

(1997-12-03 收稿)

Quantitative Determination of Oligostilbenes in Grape(*Vitis* L.) Species by HPLC

Li Wenwu, Li Yufei, Ding Lisheng, et al (Chengdu Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences, Chengdu 610041)

Abstract A rapid, simple and sensitive method was established for the quantitative determination of five stilbenes in eleven species of *Vitis* L. by HPLC. The new method was reliable for the evaluation of the medicinal resources of *Vitis* L. plants.

Key Words *Vitis* L. Stilbenes HPLC

· 会讯 ·

全国针灸临床与文献研讨会拟于 1998 年 10 月在江西庐山召开, 现开始征文。征文内容: 临床各科针灸治疗经验、针药结合治疗疑难急重病的经验、医案医话、文献研究等。来稿请寄南昌市阳明路 20 号《江西中医药》编辑部王庆伦收, 信封标明“会议征文”字样。截稿日期: 1998 年 9 月底。