

文章编号: 1004-4353(2014)02-0182-04

# 延边地区长柱金丝桃中4种酮类成分的含量测定

姜英子<sup>1</sup>, 王科斯<sup>1</sup>, 金慧颖<sup>2</sup>, 安仁波<sup>1,3\*</sup>

(1. 延边大学药学院, 吉林 延吉 133002; 2. 延边第二人民医院, 吉林 延吉 133001;  
3. 延边大学长白山生物资源与功能分子教育部重点实验室, 吉林 延吉 133002)

**摘要:** 为长柱金丝桃(*Hypericum ascyron* L.)质量标准的研究提供参考,在色谱柱为 Diamonsil C<sub>18</sub> (250 mm×4.6 mm, 5 μm)、流动相为甲醇-乙腈-0.6%磷酸水溶液、线性度( $R^2$ )高于0.999 0、回收率为92.15%~108.37%、相对标准偏差为1.57%~1.91%的条件下,使用高效液相色谱法同时测定了延边地区长柱金丝桃中芦丁、金丝桃苷、槲皮素和山奈酚4种成分的含量.实验结果表明:长柱金丝桃中芦丁、金丝桃苷、槲皮素和山奈酚的含量随区域有较大差异;本文方法准确、灵敏、可靠.

**关键词:** 延边地区; 长柱金丝桃; 芦丁; 金丝桃苷; 槲皮素; 山奈酚; 高效液相色谱法

**中图分类号:** R927.2      **文献标识码:** A

## Determination of Four flavonoids in *Hypericum ascyron* L. of Yanbian area

JIANG Yingzi<sup>1</sup>, WANG Kesi<sup>1</sup>, JIN Huiying<sup>2</sup>, AN Renbo<sup>1,3\*</sup>

(1. College of Pharmacy, Yanbian University, Yanji 133002, China;  
2. Yanbian Second People's Hospital, Yanji 133001, China;  
3. Key Laboratory of Natural Resources of Changbai Mountain & Functional Molecules  
(Yanbian University), Ministry of Education, Yanji 133002, China)

**Abstract:** To provide references for quality standard of *Hypericum ascyron* L., HPLC method was established for simultaneous determination of rutin, hyperoside, quercetin and kaempferol in *Hypericum ascyron* L. of Yanbian area. Chromatographic separation was employed on Diamonsil C<sub>18</sub> column (250 mm×4.6 mm, 5 μm) with gradient elution of methanol-acetonitrile-0.6% phosphoric acid as mobile phase. Calibration curves of standard components show excellent linearity with  $R^2 > 0.999 0$  and the recovery tests are found to range from 92.15% to 108.37% with relative standard deviation values 1.57%~1.91%. The contents of flavonoids were different obviously in samples from different regions. This method is accurate, sensitive and reliable.

**Key words:** Yanbian area; *Hypericum ascyron* L.; rutin; hyperin; quercetin; kaempferol; HPLC

### 0 引言

中草药随产地的不同其化学成分的含量也有不同,同时制药企业应用不同的制药工艺,也会导

致同种中草药产生不同的疗效;因此,研究中草药中的生物活性成分和测定标志性成分的含量具有非常重要的意义.

长柱金丝桃(*Hypericum ascyron* L.)为藤黄

收稿日期: 2014-03-20      \* 通信作者: 安仁波(1965—),男,博士,教授,研究方向为天然药物活性成分.  
基金项目: 教育部留学回国人员科研启动基金资助项目(2008890);吉林省科技发展计划项目(200705427)

科(*Guttiferae*)金丝桃属植物,广泛分布于我国东北、内蒙古和黄河、长江流域以及朝鲜、日本、俄罗斯(西伯利亚)等地.研究<sup>[1-2]</sup>表明,长柱金丝桃味苦、性寒,具有平肝、凉血、止血、败毒、消肿、泻火解毒等功效,民间常用于外伤止血、去除黄疸、治疗肝炎及疮疖肿毒等症.文献<sup>[3]</sup>研究表明:长柱金丝桃中所含金丝桃苷具有镇静解痉、抗炎、止咳等作用,虽能够减少肺通气量但并不抑制呼吸中枢节律活动;槲皮素可治支气管炎、解痉降压;山奈酚可抗菌、抗炎、止咳祛痰.文献<sup>[4-12]</sup>显示,长柱金丝桃还含有二萜酮类衍生物、黄酮类化合物、五环三萜类化合物、口山酮类和间苯三酚衍生物及甾醇混合物和甾醇苷类化合物.本文利用高效液相色谱(HPLC)法对延边地区长柱金丝桃中的芦丁、金丝桃苷、槲皮素、山奈酚进行了含量测定,为合理开发利用长柱金丝桃资源和长柱金丝桃质量标准的研究提供参考.

## 1 仪器和材料

仪器有 L-2400 型高效液相色谱仪(含 L-2400 型紫外检测器)(日本 Hitach 公司),FA2004 型万分之一电子天平(上海良平仪器仪表有限公司),SK1200H 型超声波清洗脱气器(上海科岛超声仪器有限公司),RRH-100 型万能高速粉碎机(香港欧凯莱芙实业公司),Diamonsil C<sub>18</sub> 色谱柱(北京迪马科技有限公司).芦丁、金丝桃苷、槲皮素、山奈酚购买于上海融禾医药科技发展有限公司,甲醇和乙腈均为色谱纯,超纯水和其他试剂均为分析纯.长柱金丝桃于 2011 年 5—8 月间采自延边朝鲜族自治州内 10 个县市,由延边大学药学院吕慧子副教授鉴定为藤黄科金丝桃属植物长柱金丝桃的全草,凭证标本存放于延边大学药学院.

## 2 方法与结果

### 2.1 溶液的制备

**2.1.1 供试样品溶液** 精密称取长柱金丝桃粉末 0.5 g(过 40 目筛)置于圆底烧瓶中,加入甲醇 50 mL 后超声提取 40 min;提取液置 50 mL 容量瓶中定容,用 0.45 μm 微孔滤膜过滤后作为供试品试样.

**2.1.2 对照品溶液** 分别精密称取芦丁、金丝桃苷、槲皮素、山奈酚对照品,置 50 mL 容量瓶中后加甲醇稀释至刻度,摇匀,定容.制成浓度分别为 6.0,30.0,12.0,18.0 μg/mL 的溶液,经 0.45 μm 微孔滤膜滤过,备用.

### 2.2 色谱条件<sup>[13-15]</sup>

色谱柱为 Diamonsil C<sub>18</sub>(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流速为 1.0 mL/min,柱温为 35 ℃,检测波长为 360 nm,进样量为 20 μL,流动相为甲醇-乙腈-0.6%磷酸水溶液.梯度洗脱条件见表 1.

表 1 色谱分离中流动相的洗脱条件

时间/min	甲醇/%	乙腈/%	0.6%磷酸水溶液/%
0	0	5	95
5	0	10	90
30	5	15	80
70	10	30	60
80	20	40	40
82	0	10	90

对照品及供试样品色谱图见图 1,按保留时间,出峰顺序分别为芦丁、金丝桃苷、槲皮素、山奈酚.

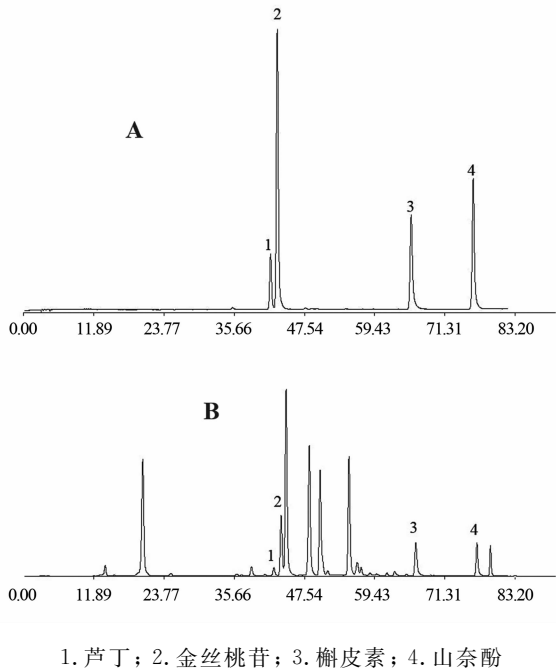


图 1 对照品(A)和供试品(B)溶液的 HPLC 色谱图

### 2.3 线性

混合对照品溶液,稀释制备成系列浓度的混合标准品溶液,以峰面积值为纵坐标(Y),浓度

( $\mu\text{g/mL}$ )为横坐标( $X$ ),通过绘制标准曲线求出 4 种成分的线性回归方程及线性范围(见表 2)。

表 2 4 种酮类成分的回归方程及线性范围

成分	回归方程	线性范围/ ( $\mu\text{g/mL}$ )	$R^2$
芦丁	$Y=46\,632X+408.81$	0.4~6.0	0.999 5
金丝桃苷	$Y=51\,252X-27\,209$	2.0~30.0	0.999 2
槲皮素	$Y=89\,271X-40\,830$	0.8~12.0	0.999 1
山奈酚	$Y=64\,227X-26\,370$	1.2~18.0	0.999 0

2.4 精密度

将对照品溶液按 2.2 的色谱条件重复进样 6 次,分别测定芦丁、金丝桃苷、槲皮素、山奈酚的峰面积,结果显示 RSD 值分别为 1.79%、1.63%、1.85%、1.71%,这表明精密度良好。

2.5 重复性

将同一份供试样品溶液按选定的色谱条件注入色谱仪,分别测定芦丁、金丝桃苷、槲皮素、山奈酚的含量,结果显示 RSD 值分别为 1.43%、1.66%、1.97%、1.78%( $n=5$ ),这表明本方法具有良好的

重复性。

2.6 稳定性

在不同时间(0,2,4,8,12,24 h)分别测定供试样品溶液中芦丁、金丝桃苷、槲皮素、山奈酚的峰面积,结果显示 RSD 值分别为 1.80%、1.77%、0.91%、1.93%( $n=6$ ),说明供试样品溶液在 24 h 内稳定。

2.7 加标回收率

在已知含量的延边地区长柱金丝桃药材(芦丁 0.149 mg/g、金丝桃苷 1.054 mg/g、槲皮素 0.449 mg/g、山奈酚 0.487 mg/g)中分别定量加入芦丁、金丝桃苷、槲皮素、山奈酚,按 2.1.1 制备成供试样品溶液,并按 2.2 的色谱条件分别测定芦丁、金丝桃苷、槲皮素、山奈酚的含量,其回收率和 RSD 值见表 3。

2.8 不同区域样品的含量测定

将延边地区不同区域的长柱金丝桃样品按 2.1.1 制备成供试样品溶液,在 2.2 的色谱条件下进样 20  $\mu\text{L}$ ,并同时测定芦丁、金丝桃苷、槲皮素、山奈酚的含量,结果见表 4。

表 3 加标回收率试验结果( $n=9$ )

成分	供试样品中 含量/ $\mu\text{g}$	标样加入 量/ $\mu\text{g}$	实测值/ $\mu\text{g}$	回收率/ %	RSD/ %	成分	供试样品中 含量/ $\mu\text{g}$	标样加入 量/ $\mu\text{g}$	实测值/ $\mu\text{g}$	回收率/ %	RSD/ %
芦丁	75.40	60.32	136.32	100.99	1.91	金丝桃苷	533.44	426.75	936.48	94.44	1.63
	75.28	60.22	135.89	100.65			532.60	426.08	918.06	90.46	
	75.32	60.26	135.82	100.39			532.92	426.33	934.78	94.25	
	75.47	75.48	150.93	99.98			533.97	533.69	1 023.21	91.66	
	75.43	75.39	149.64	98.39			533.66	533.77	1 028.24	92.65	
	75.35	75.32	147.32	95.51			533.13	533.23	1 033.61	93.85	
	75.05	90.06	165.09	99.96			531.02	637.22	1 132.39	94.37	
	75.16	90.19	165.80	100.49			531.76	638.11	1 139.25	95.20	
	75.25	90.90	167.53	102.19			532.39	638.87	1 125.99	92.91	
槲皮素	227.56	182.04	399.90	94.67	1.57	山奈酚	246.30	197.04	455.25	106.04	1.74
	227.20	181.76	395.33	92.50			245.91	196.73	466.23	111.99	
	227.33	181.86	391.99	90.54			246.06	196.84	457.21	107.26	
	227.78	227.78	438.05	92.31			246.54	246.58	513.57	108.29	
	227.65	227.71	438.78	92.71			246.40	246.41	517.84	110.15	
	227.42	227.36	440.50	93.71			246.15	246.23	512.04	107.98	
	226.52	271.83	472.31	90.42			245.18	294.22	558.63	106.53	
	226.84	272.21	473.99	90.79			245.52	294.62	568.38	109.58	
	227.11	272.53	477.09	91.72			245.81	294.98	563.02	107.53	

表 4 延边地区长柱金丝桃中 4 种酮类成分的含量  
mg/g

采集地	芦丁 RSD/%	金丝桃苷 RSD/%	槲皮素 RSD/%	山奈酚 RSD/%
图们	0.149±0.001	1.055±0.013	0.450±0.009	0.487±0.009
磨盘山	0.76	1.13	1.85	1.67
和龙长红林场	0.120±0.001	1.418±0.017	0.356±0.004	0.467±0.007
	0.72	1.21	0.86	1.26
延吉三道	—	0.489±0.005	0.179±0.002	0.294±0.007
	—	0.95	0.87	2.0
珲春哈达门	0.089±0.002	1.054±0.011	0.313±0.001	0.491±0.004
	1.80	0.88	0.52	0.76
和龙青山里	—	0.677±0.013	0.823±0.010	1.968±0.013
	—	1.71	1.03	0.67
汪清春阳	0.111±0.002	0.806±0.007	0.231±0.001	0.315±0.003
	1.24	0.82	1.81	0.77
延吉朝阳川	0.265±0.003	1.004±0.003	0.241±0.003	0.169±0.002
	1.04	0.33	1.26	1.01
龙井开山屯	0.109±0.001	1.270±0.022	0.258±0.005	0.302±0.003
	0.67	1.48	1.66	0.85
图们月哨	0.105±0.002	0.675±0.001	0.295±0.005	0.469±0.006
	1.71	0.13	1.41	1.15
安图万宝	—	0.863±0.004	0.190±0.001	0.299±0.004
	—	0.44	0.47	1.21

注:—表示在此条件下提取,不能满足本含量测定要求。

3 讨论

芦丁、金丝桃苷、槲皮素和山奈酚在 360 nm 与 270 nm 波长处有较强吸收,但在 360 nm 波长处杂质峰较少,故选定 360 nm 为检测波长。本色谱条件可满足同时测定长柱金丝桃中 4 种酮类成分含量的 HPLC 分析方法要求。

根据文献[14-15]选择不同的流动相进行了试验,结果显示:以甲醇-水为流动相时,洗脱能力和分离度均较差;以甲醇-0.6%磷酸水溶液为流动相时,峰型较好,但分离度差;以甲醇-乙腈-0.6%磷酸水溶液为流动相进行梯度洗脱时,芦丁、金丝桃苷、槲皮素、山奈酚 4 种成分都能得到很好的分离,并且峰形较好,所以本文选用了甲醇-乙腈-0.6%磷酸水溶液为流动相进行了梯度洗脱。我们还考查了不同流速(0.8,1.0 mL/min)的甲醇-乙腈-0.6%磷酸水溶液对分离结果的影响,结果表明当流速为 1.0 mL/min 时其效果最佳。

本文测定结果表明,延边各地区的长柱金丝桃中芦丁的平均含量在 0.089~0.265 mg/g,金丝桃苷的平均含量在 0.489~1.418 mg/g,槲皮素的平均含量在 0.179~0.450 mg/g,山奈酚的平均含量在 0.169~1.968 mg/g。这表明区域不

同,芦丁、金丝桃苷、槲皮素、山奈酚的含量也不同,而且具有显著性差异。

本文研究表明,利用 HPLC 对长柱金丝桃药材中的 4 种酮类(芦丁、金丝桃苷、槲皮素、山奈酚)成分的含量同时进行测定,方法灵敏、可靠、快捷,可为今后长柱金丝桃质量标准的研究提供参考。

参考文献:

[1] 中国科学院植物志编辑委员会. 中国植物志:第 50 卷,第 2 分册[M]. 北京:科学出版社,1990:2-71.

[2] 周繇,朱俊义,于俊林. 中国长白山观赏植物彩色图志[M]. 吉林:教育出版社,2005:256.

[3] 刘利军,李彦冰,张强,等. 长柱金丝桃的研究进展[J]. 绥化学院学报,2006,26(3):155-156.

[4] Zevakova V, Glyzin V, Shemeryankina T, et al. HPLC determination of hypericins in species of St. John's wort[J]. Khim Prir Soedin, 1991,1:138.

[5] 郑清明,秦路平,郑汉臣,等. 国产 11 种金丝桃属植物中化学成分的含量分析[J]. 第二军医大学学报,2003,24(4):457-459.

[6] 王兆金,王先荣. 红旱莲有效成分的研究[J]. 药学报,1980,15(6):365-367.

[7] 高颖,韩力,孙亮,等. 长柱金丝桃的化学成分[J]. 中国天然药物,2007,5(6):413-416.

[8] Hu L, Yip S, Sim K. Xanthones from *Hypericum ascyron*[J]. Phytochemistry, 1999,52(7):1371-1373.

[9] Hashida W, Tanaka N, Takaishi Y. Prenylated xanthones from *Hypericum ascyron* [J]. J Nat Med, 2007,61(4):371-374.

[10] Hashida W, Tanaka N, Takaishi Y. Tomoeones A-H, cytotoxic phloroglucinol derivatives from *Hypericum ascyron* [J]. Phytochemistry, 2008, 69(11):2225-2230.

[11] Chae Sungwook, Lee SoYoung, et al. Constituents from *Hypericum ascyron*[J]. Kor J Pharmacogn, 2006,37(3):162-168.

[12] Park Hee-Juhn, Kwon Sang-Hyuk, et al. Isolation of steroids and flavonoids from the herbs of *Hypericum ascyron* L. [J]. Kor J Pharmacogn, 2000,31(1):39-44.

[13] 许小红,廖丽云,陈龙江. 高效液相色谱法测定贯叶连翘提取物中 4 种成分的含量[J]. 时珍国医国药,2009,20(6):1317-1319.

[14] 叶菊,马敏,林鹏程,等. 大叶白麻中芦丁、金丝桃苷和槲皮素含量的测定[J]. 湖北农业科学,2010, 49(6):1454-1470.

[15] 王怀冲,范国荣,何莉. 贯叶连翘提取物中金丝桃苷的 HPLC 测定[J]. 中国医药工业杂志,2006,37 (2):119-121.