

HPLC 测定糙枝金丝桃中绿原酸、芦丁、 金丝桃苷、槲皮素和山奈酚

郭炬亮*, 李新霞, 支玲

(新疆医科大学药学院, 乌鲁木齐 830054)

[摘要] 目的:建立高效液相色谱法同时测定糙枝金丝桃药材中绿原酸、芦丁、金丝桃苷、槲皮素、山奈酚的分析方法。方法:用 Sunfire C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱分离;乙腈-0.1% 磷酸进行梯度洗脱;流速 1.0 mL·min⁻¹;检测波长 360 nm。结果:绿原酸、芦丁、金丝桃苷、槲皮素、山奈酚分别在 0.01 ~ 0.61 μg ($r = 0.9996$), 0.10 ~ 2.02 μg ($r = 0.9997$), 0.10 ~ 1.01 μg ($r = 0.9999$), 0.10 ~ 1.24 μg ($r = 0.9997$), 0.0057 ~ 0.17 μg ($r = 0.9997$) 线性关系良好;平均加样回收率分别为 98.87% (RSD 1.43%), 99.81% (RSD 0.86%), 99.98% (RSD 0.82%), 98.8% (RSD 1.73%), 99.85% (1.79%)。结论:该方法简便、准确,重复性好,可用于糙枝金丝桃药材的质量控制。

[关键词] 糙枝金丝桃; 绿原酸; 芦丁; 金丝桃苷; 槲皮素; 山奈酚; 高效液相色谱

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)11-0075-04

[doi] 10.11653/syfyj2013110075

Simultaneous Determination of Chlorogenic Acid, Rutin, Hyperoside, Quercetin and Kaempferol in *Hypericum scabrum* by HPLC

GUO Ju-liang*, LI Xin-xia, ZHI Ling

(Pharmacy College of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, China)

[Abstract] **Objective:** To establish an HPLC method for the simultaneous determination of chlorogenic acid, rutin, hyperoside, quercetin and kaempferol in *Hypericum scabrum*. **Method:** A high-performance liquid chromatography equipped a Sunfire C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) column with UV detector used. The mobile

[收稿日期] 20120920(019)

[基金项目] 新疆医科大学科研创新基金项目(XJC201114)

[通讯作者] * 郭炬亮, 硕士, 副教授, 从事新疆地产资源的开发应用研究, Tel:0991-4362470, 13709916797, E-mail: gjl7145@163.com

- [11] Akhmedzhanova V I, Batsurén D, Shakirov R S. *Oxytropis alkaloids* II. Structure of oxytriphine [J]. Khim Prir Soedin, 1993, 6 (4): 873.
- [12] Pelter A, Ward R, Gray T L. The carbon-13 nuclear magnetic resonance spectra of flavonoids and related compounds [J]. J S Perk I, 1976, 12: 2475.
- [13] Hsin K H, Tai H L, Jih P W, et al. Synthesis and anti-inflammatory effect of chalcones and related compounds [J]. Pharm Res, 1998, 15 (1): 39.
- [14] Wollenweber E, Seigler D S. Flavonoids from the exudate of *Acacia neovernicosa* [J]. Phytochemistry, 1982, 21 (5): 1063.
- [15] Achenbach H, Stoecher M, Constenla M A. Constituents of tropical medicinal plants. Part 31. Flavonoid and other constituents of *Bauhinia manca* [J]. Phytochemistry, 1988, 27 (6): 1835.
- [16] Borges D, Vazquez P, Secundino M, et al. The *N*-2-phenylethylcinnamamide from *Spilanthes ocymifolia* [J]. Phytochemistry, 1984, 23 (11): 2672.
- [17] Vistica D T, Skehan P, Scudiero D, et al. Tetrazolium-based assays for cellular viability: a critical examination of selected parameters affecting formazan production [J]. Cancer Res, 1991, 51 (16): 2515.

[责任编辑 邹晓翠]

phase consisted of acetonitrile and 0.1% aqueous phosphoric acid with gradient elution. The detection wavelength was set at 360 nm and the flow rate was 1.0 mL·min⁻¹. **Result:** The linear ranges of chlorogenic acid, rutin, hyperoside, quercetin and kaempferol were 0.01-0.61 μg ($r = 0.999\ 6$), 0.10-2.02 μg ($r = 0.999\ 7$), 0.10-1.01 μg ($r = 0.999\ 9$), 0.10-1.24 μg ($r = 0.999\ 7$), 0.005 7-0.17 μg ($r = 0.999\ 7$), the average recoveries were 98.87% (RSD 1.43%), 99.81% (RSD 0.86%), 99.98% (RSD 0.82%), 98.8% (RSD 1.73%), 99.85 (RSD 1.79%). **Conclusion:** The method is simple, accurate and repeatable, which can be used for quality control of *H. scabrum*.

[**Key words**] *Hypericum scabrum* L; chlorogenic acid; rutin; hyperoside; quercetin; kaempferol; HPLC

糙枝金丝桃是藤黄科金丝桃属植物,又名腺点金丝桃,仅分布于阿勒泰地区全草入药,收载于《哈萨克药志》(第一卷);其性辛、凉,具有清热解毒、消肿散瘀、收敛止血等功效,哈萨克医生用于治疗风湿性腰痛、疖肿、肝炎、蛇咬伤等^[1]。含有多种活性化学成分,主要有二萜酮类的金丝桃素和伪金丝桃素、黄酮类的金丝桃苷和芦丁、间苯三酚类化合物 hyperibone A~I、挥发油 α-蒎烯等。近年研究表明,芦丁、金丝桃苷、槲皮素、山奈酚分别具有抗病毒、镇痛、抗氧化、抗肿瘤和抗癌等多种药效^[2-5],绿原酸具有抗氧化、抑菌、利胆、保肝、降压、抗癌等作用^[6]。文献报道用 HPLC 同时测定夏枯草中芦丁、金丝桃苷、槲皮素、山奈酚^[7],用 HPLC 同时测定宣木瓜中绿原酸、芦丁、金丝桃苷、槲皮素^[8],但未有文献报道同时测定糙枝金丝桃中绿原酸、芦丁、金丝桃苷、槲皮素、山奈酚。本实验建立了用 HPLC 同时测定芦丁、金丝桃苷、槲皮素、山奈酚 4 种黄酮成分及绿原酸的方法,为糙枝金丝桃药材的质量控制提供依据。

1 材料

高效液相色谱仪(日本岛津,LC-20AB 泵,SPD-20A),AB135-S 电子分析天平(METTLER,瑞士),HH-S2 数显恒温水浴锅。

对照品绿原酸(批号 110753-200413)、芦丁(批号 100080-200707)、金丝桃苷(批号 111521-200303)、槲皮素(批号 100081-200406)、山奈酚(批号 110861-200808)均购自中国药品生物制品检定所;糙枝金丝桃药材购自阿勒泰市哈医院(批号 20120325),甲醇(Chromadex,美国),乙腈(Fisher Scientific,美国),无水乙醇(天津市登科化学试剂有限公司,批号 20120430),磷酸(优级纯天津市光复精细化工研究所,批号 20110226)。

2 方法与结果

2.1 溶液的配制

2.1.1 对照品溶液的制备 分别精密称取对照品

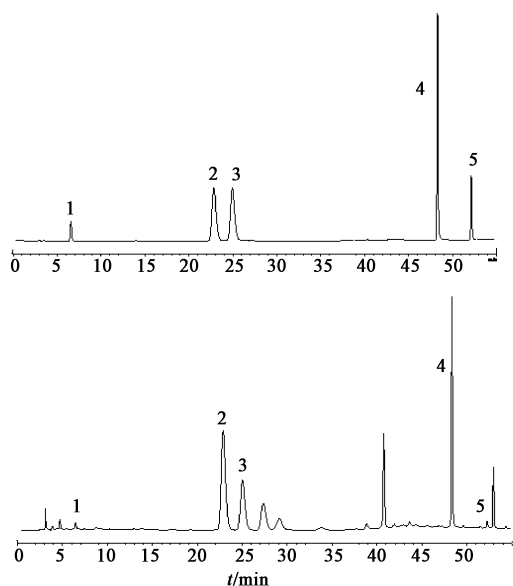
芦丁 20.23 mg、金丝桃苷 20.17 mg、槲皮素 20.62 mg、绿原酸 10.20 mg、山奈酚 5.667 mg,置于 100 mL 量瓶中,加甲醇溶解并定容至刻度,摇匀,配成质量浓度分别为 202.3, 201.7, 206.2, 102.0, 56.67 mg·L⁻¹的对照品储备液。精密吸取上述对照品储备液各 2.5, 4.0, 1.5, 1.2, 1.2 mL,置于 10 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度摇匀,制成混合对照品溶液。

2.1.2 供试品溶液的制备 称取过 60 目筛的糙枝金丝桃粉末约 0.2 g,精密称定,置于锥形瓶中,精密加入 10 mL 70% 乙醇,称定质量,水浴中(95 ℃)回流 30 min,取出,放冷,再称定质量,用 70% 乙醇补足减失的质量,摇匀,0.22 μm 微孔滤膜过滤,取续滤液作为供试品溶液。

2.2 色谱条件 Sunfire C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈(A)-0.1% 磷酸水溶液(B),梯度洗脱(0~30 min, 15% A; 30~55 min, 15%~55% A),流速 1.0 mL·min⁻¹,柱温 35 ℃,检测波长 360 nm,进样量 10 μL。

2.3 系统适应性试验 分别吸取混合对照品溶液和供试品溶液,按 2.2 项下色谱条件,分别进样 10 μL,记录色谱图,结果表明再次色谱条件下,绿原酸、芦丁、金丝桃苷、槲皮素、山奈酚分离良好,分离度均 > 1.5,且理论塔板数均不低于 4 000,结果见图 1。

2.4 线性关系考察 分别精密吸取绿原酸对照品储备液 0.1, 0.8, 0.5, 1.0, 3.0, 6.0 mL,芦丁对照品储备液 0.5, 1.5, 2.0, 2.5, 5.0, 10.0 mL,金丝桃苷对照品储备液 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 mL,槲皮素对照品储备液 0.5, 0.8, 1.0, 1.5, 3.0, 6.0 mL,山奈酚对照品储备液 0.1, 0.5, 0.8, 1.0, 1.2, 3.0 mL 于 10 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度摇匀,配成系列质量浓度的对照品溶液。取 10 μL 进样后记录峰面积,以峰面积为纵坐标(Y),对照品质量浓度为横坐标(X),绘制标准曲线,得到绿原酸、芦丁、金丝桃



1. 绿原酸;2. 芦丁;3. 金丝桃苷;4. 槲皮素;5. 山奈酚

图1 混合对照品(A)和供试品(B)的HPLC

苷、槲皮素、山奈酚的回归方程。

$$Y_{\text{绿原酸}} = 13\ 959X + 1\ 731.8 (r = 0.999\ 6)$$

$$Y_{\text{芦丁}} = 7\ 052X + 68\ 748 (r = 0.999\ 7)$$

$$Y_{\text{金丝桃苷}} = 20\ 871X + 2\ 510.6 (r = 0.999\ 9)$$

$$Y_{\text{槲皮素}} = 11\ 387X + 16\ 498 (r = 0.999\ 9)$$

$$Y_{\text{山奈酚}} = 17\ 160X + 6\ 223.2 (r = 0.999\ 6)$$

结果表明,绿原酸、芦丁、金丝桃苷、槲皮素、山奈酚分别在 0.01 ~ 0.61, 0.10 ~ 2.02, 0.10 ~ 1.01, 0.10 ~ 1.24, 0.005 7 ~ 0.17 μg 与峰面积线性关系良好。

2.5 精密度试验 精密吸取同一供试品溶液 10 μL ,按 2.2 项下色谱条件,重复进样 6 次,测定 5 种成分的峰面积,计算含量。样品中绿原酸、芦丁、金丝桃苷、槲皮素、山奈酚含量的 RSD 分别为 1.29%, 1.47%, 1.43%, 1.24%, 1.42%,表明该方法的精密度良好。

2.6 稳定性试验 分别精密吸取同一供试品溶液 10 μL ,在 0, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 48 h 进样,记录供试品溶液中绿原酸、芦丁、金丝桃苷、槲皮素、山奈酚的峰面积,计算各成分含量。样品中绿原酸、芦丁、金丝桃苷、槲皮素、山奈酚含量的 RSD 分别为 1.81%, 1.44%, 1.86%, 1.1%, 1.34%,表明样品溶液在 48 h 内稳定。

2.7 重复性试验 按 2.1.2 项下供试品溶液处理方法平行处理 6 份样品,测定 5 种成分的峰面积,计算含量。结果样品中绿原酸、芦丁、金丝桃苷、槲皮素、山奈酚含量的 RSD 分别为 1.76%, 1.84%, 1.5%, 1.58%, 0.72%,表明该方法重复性良好。

2.8 回收率试验 称取已知含量的糙枝金丝桃药材粉末 9 份,每份约 0.1 g,精密称定,置于锥形瓶中,分别加入绿原酸、芦丁、金丝桃苷、槲皮素、山奈酚对照品溶液适量,按 2.1.2 项下供试品制备方法制备,进样 10 μL ,计算各对照品的平均加样回收率和 RSD 值,结果见表 1。

表1 糙枝金丝桃药材加样回收率测定(n=9)

成分	样品含量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均回 收率/%	RSD /%
绿原酸	0.217 9	0.102	0.319 0	99.07	98.87	1.43
	0.215 3	0.102	0.315 4	98.10		
	0.215 8	0.102	0.313 3	95.59		
	0.216 9	0.204	0.421 2	100.16		
	0.216 2	0.204	0.417 4	98.64		
	0.215 7	0.204	0.419 6	99.96		
	0.215 6	0.306	0.517 3	98.62		
	0.215 1	0.306	0.519 9	99.58		
	0.215 5	0.306	0.521 8	100.12		
	0.215 6	0.306	0.517 3	98.62		
芦丁	0.734 9	0.404 6	1.139 0	99.89	99.81	0.86
	0.726 2	0.404 6	1.125 1	98.60		
	0.727 6	0.404 6	1.132 1	99.97		
	0.731 3	0.606 9	1.339 7	100.26		
	0.729 1	0.606 9	1.336 6	100.10		
	0.727 3	0.606 9	1.341 7	101.25		
	0.726 9	1.011 5	1.736 5	99.81		
	0.725 5	1.011 5	1.737 2	100.03		
	0.726 5	1.011 5	1.721 4	98.35		
	0.726 5	1.011 5	1.721 4	98.35		
金丝桃苷	0.314 1	0.201 7	0.513 2	98.70	99.98	0.82
	0.310 4	0.201 7	0.512 4	100.18		
	0.311 0	0.201 7	0.511 9	99.59		
	0.312 5	0.302 6	0.614 4	99.76		
	0.311 6	0.302 6	0.619 4	101.70		
	0.310 8	0.302 6	0.612 9	99.82		
	0.310 7	0.403 4	0.712 3	99.57		
	0.310 1	0.403 4	0.713 0	99.89		
	0.310 5	0.403 4	0.716 3	100.58		
	0.310 5	0.403 4	0.716 3	100.58		

续表 1

成分	样品含量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均回 收率/%	RSD /%
槲皮素	0.380 1	0.206 2	0.583 7	98.70	98.8	1.73
	0.375 6	0.206 2	0.585 2	101.62		
	0.376 4	0.206 2	0.585 5	101.40		
	0.378 3	0.309 3	0.678 4	97.03		
	0.377 1	0.309 3	0.677 8	97.19		
	0.376 2	0.309 3	0.677 5	97.40		
	0.376 0	0.412 4	0.780 5	98.09		
	0.375 3	0.412 4	0.780 1	98.16		
	0.375 8	0.412 4	0.786 6	99.60		
	0.375 8	0.412 4	0.786 6	99.60		
山奈酚	0.013 4	0.008 5	0.021 8	99.14	99.85	1.79
	0.013 2	0.008 5	0.021 8	100.54		
	0.013 2	0.008 5	0.021 3	95.41		
	0.013 2	0.017 0	0.030 3	100.24		
	0.013 2	0.017 0	0.030 3	100.68		
	0.013 2	0.017 0	0.030 3	100.36		
	0.013 3	0.028 3	0.041 8	100.88		
	0.013 3	0.028 3	0.041 6	99.87		
	0.013 2	0.028 3	0.042 0	101.52		
	0.013 2	0.028 3	0.042 0	101.52		

2.9 样品含量测定 精密称取糙枝金丝桃药材粉末 0.2 g,按 2.1.2 项下方法制备供试品溶液,采用 2.2 项下色谱条件进行 5 种成分的含量测定,结果糙枝金丝桃药材中绿原酸、芦丁、金丝桃苷、槲皮素、山奈酚的含量分别是 2.206,7.238,3.326,3.292,0.296 1 mg·g⁻¹。

3 讨论

3.1 波长的选择 考察了 250,265,285,360 nm 不同吸收波长的图谱,发现在 285 nm 波长下绿原酸有较好吸收,但干扰多,而芦丁、金丝桃苷、槲皮素等的吸收峰比较矮,在 360 nm 波长下,芦丁等都有较好的吸收,绿原酸也有吸收,图谱特征性强,故选择 360 nm 为检测波长。

3.2 流动相的选择 不同比例的乙腈-0.1% 甲酸、乙腈-0.2% 醋酸、乙腈-0.6% 磷酸、甲醇-0.1% 磷酸等,分离效果均不理想,参考药典中贯叶金丝桃中金丝桃苷含量测定的方法,分离度达不到 1.5,采用梯度洗脱方法,各个峰的分度度和峰型均较好,拖尾因

子 <2,故选择乙腈-0.1% 磷酸水溶液为流动相,进行梯度洗脱。

3.3 提取条件的选择 考察甲醇和乙醇回流提取法和超声波提取法,发现乙醇回流提取法较好,又对 50%,60%,70%,80%,95% 的乙醇做了考察,结果发现 70% 乙醇提取出的量最高。

[参考文献]

- [1] 徐新,巴哈尔古丽·黄尔汗. 哈萨克药志. 第 1 卷 [M]. 北京:民族出版社,2009:57.
- [2] 臧志和,曹丽萍,钟玲. 芦丁药理作用及机制的研究进展[J]. 医药导报,2007,26(7): 758.
- [3] 黄凯,杨新波,黄正明. 金丝桃苷药理作用研究进展[J]. 医药导报,2009,28(8): 1046.
- [4] 舒毅,谭陶,张思宇,等. 槲皮素的药理学研究进展[J]. 华西药学杂志,2008,23(6): 689.
- [5] 陈育华,周克元,袁汉尧. 山奈酚药效的研究进展[J]. 广东医学,2010,31(8): 1064.
- [6] 董慧霞. 金银花主要成分绿原酸的研究进展[J]. 现代农村科技,2012,13:70.
- [7] 黄慈英,王继良,黄敏洁,等. HPLC 法同时测定夏枯草中芦丁、金丝桃苷、槲皮素和山奈酚[J]. 中成药,2012,34(3):520.
- [8] 丁姗姗,吕凌,张毅,等. HPLC 法同时测定宣木瓜中绿原酸、芦丁、金丝桃苷、槲皮素的含量[J]. 安徽医药,2012,16(4):450.
- [9] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:215.
- [10] 石芸,池玉梅,谈献和,等. 黄蜀葵花 HPLC 法指纹图谱及金丝桃苷、槲皮素含量测定研究[J]. 西北药学杂志,2011,26(6):399.
- [11] 朱晓勤,彭水梅,吴锦忠. HPLC 测定截叶铁扫帚不同药用部位中槲皮素、山奈酚的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(10):80.
- [12] 耿旦,马雯芳,甄汉深,等. RP-HPLC 测定桑椹中芦丁的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(14):63.
- [13] 何小珍,郭玉,徐小娜,等. 野菊不同部位绿原酸和 3,5-二咖啡酰奎尼酸的含量测定[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(11):72.

[责任编辑 顾雪竹]