

技术与方法

刺五加叶中金丝桃苷含量的测定^①

曹建国 赵则海 杨逢建 李庆勇 祖元刚^②

(东北林业大学森林植物生态学教育部重点实验室 哈尔滨 150040)

摘要 用高效液相色谱法测定了刺五加(*Acanthopanax senticosus* (Rupr. & Maxin) Harms)叶中金丝桃苷(hyperin)的含量。色谱柱为C₁₈柱,流动相为甲醇和0.025 mol·L⁻¹磷酸,比例为V_{甲醇}:V_{0.025 mol·L⁻¹磷酸}=55:45 (混合后用三乙胺调pH3.0~3.2),检测波长360 nm。样品用甲醇超声提取。结果表明,金丝桃苷峰形良好,与其他组分的色谱峰达到基线分离。加样回收率为104%,相对标准偏差RSD为5.38%。本研究为刺五加叶中金丝桃苷含量的测定建立了一种可靠的方法。

关键词 刺五加, 金丝桃苷, 高效液相色谱法

Determination of Hyperin in the Leaves of *Acanthopanax senticosus*

CAO Jian-Guo ZHAO Ze-Hai YANG Feng-Jian LI Qing-Yong ZU Yuan-Gang^②

(Key Laboratory of Forest Plant Ecology of Ministry of Education, Northeast Forestry University, Harbin 150040)

Abstract This paper describes the use of high performance liquid chromatography (HPLC) to determine the hyperin in the leaves of *Acanthopanax senticosus* on a C₁₈ chromatogram column. Methanol:0.025 mol·L⁻¹ phosphoric acid solution (V/V, 55:45) was used as the mobile phase (the mixture was adjusted with triethylamine to pH 3.0-3.2), and the detection wavelength was 360 nm. The sample was extracted with methanol by the ultrasonic extraction method. Hyperin content showed a symmetrical peak shape and reached the baseline separation with the peak content of other chemicals. The average recovery was 104% and the relative standard deviation (RSD) 5.38%. This study provided evidence of an accurate and credible method of determining the content of hyperin in the leaves of *A. senticosus*.

Key words *Acanthopanax senticosus*, Hyperin, High performance liquid chromatography

刺五加(*Acanthopanax senticosus* (Rupr. & Maxin) Harms)的全株均含有多种药用成分。它的根和根茎以及地上部分的茎和枝中含多种刺五加甙,其中丁香甙含量最高(许正斌和王明禹, 1984)。果实中含刺五加多糖,具有明显的增强免疫的作用(徐任生等, 1983)。而刺五加叶中黄酮类物质含量较高(许正斌和王明禹, 1984; 许正斌等, 1984)。

①教育部重点实验室开放基金和教育部重点项目(104191)资助。

②通讯作者。Author for correspondence. E-mail: zygorl@public.hr.hl.cn

收稿日期: 2003-12-31 接受日期: 2004-06-25 责任编辑: 白羽红

黄酮类化合物种类多,通常具有较高的药用价值(黄河胜等, 2000)。史九良等(1981)从刺五加的叶中分离到一种黄酮苷,经鉴定为金丝桃苷(hyperin),药理试验表明其具有提高动物耐低压缺氧的能力和镇静效果,并对垂体后叶素引起的急性心肌缺血有保护作用。另外,金丝桃苷还对缺血性脑损伤有很好的保护作用(陈志武等, 1998)。这说明刺五加的叶具有很大的开发价值。目前,在刺五加叶的利用方面,山区的人们把刺五加嫩茎叶当山野菜,已经开发出了五加参茶,具有调节心脑血管的作用。由此可见,刺五加叶既可食用又具有一定的药用价值。但到目前为止,还没有对刺五加叶中金丝桃苷含量测定的报道。本文首次采用高效液相色谱法测定刺五加叶中金丝桃苷含量,结果表明本方法操作简便、准确且重现性好。

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

主要仪器有LC-6A高效液相色谱仪(日本岛津)、C-R3A 色谱数据处理机和 SIL-6A 自动进样器。

金丝桃苷标准品购于美国 sigma 公司。甲醇为色谱纯,磷酸和三乙胺为分析纯。刺五加(经东北林业大学聂绍荃教授鉴定)叶于 2003 年 7 月采自东北林业大学帽儿山试验林场,生长于天然次生林林下。

1.2 色谱条件

色谱柱为 C_{18} 柱(6.0 mm i.d. $\times$ 150 mm, 5 μ m),流动相为 $V_{\text{甲醇}}:V_{0.025\text{mol/L 磷酸}}=55:45$ (混合后用三乙胺调 pH3.0~3.2),检测波长 360 nm,流速 1.0 mL $\cdot$ min $^{-1}$,柱温 25 $^{\circ}\text{C}$ 。

1.3 对照品溶液的配制

精确称取金丝桃苷对照品 1 mg 置于 1.5 mL 微量离心管中,用移液器精确吸取甲醇 1 mL 加入微量离心管中,摇匀,作为对照品溶液,浓度为 1 mg $\cdot$ mL $^{-1}$ 。

1.4 标准曲线建立

精密吸取金丝桃苷对照品溶液 5、10、20、30、40、50 和 60 μ L,分别置于 1.5 mL 的微量离心管中,精确定容至 1 mL。在选定的条件下,将以上各对照品溶液分别用 HPLC 重复测定 3 次,对峰面积积分,并取峰面积平均值,以峰面积为纵坐标,以金丝桃苷浓度为横坐标,进行线性关系分析,得到峰面积与金丝桃苷浓度回归方程 $Y = 39764x + 2304.9$, $R^2 = 0.9966$ 。

根据该方程可以得到金丝桃苷含量的计算公式如下:

样品中金丝桃苷的百分含量 =

$$\left(\frac{Y - 2304.9}{39764} \times V \right) / M$$

Y 代表峰面积, V 代表提取液体积(mL), M 代表样品重量(μ g)

1.5 样品的制备和测定

将刺五加叶干燥并粉碎,过 100 目筛。精确称定刺五加叶粉末 0.5 g 左右,置于 25 mL 量瓶中,加甲醇约 20 mL,在超声波发生器内提取 60 分钟,静置冷却,加甲醇至刻度,摇匀。进样前经 15 000 转/分钟高速离心处理。

吸取样品溶液 20 μ L 左右注入液相色谱仪中,实际进样为 10 μ L,测定其中金丝桃苷色谱峰峰面积,根据线性关系方程计算出样品中金丝桃苷的浓度或含量。

2 实验结果

2.1 样品色谱图分析

通过多次试验发现,以 C_{18} 柱(6.0 mm i.d. $\times$ 150 mm, 5 μ m) 为色谱柱,流动相为 $V_{\text{甲醇}}:V_{0.025\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{磷酸}}=55:45$,检测波长 360 nm,流速 1.0 mL $\cdot$ min $^{-1}$,柱温 25 $^{\circ}\text{C}$ 的条件下,可使样品中金丝桃苷与其他组分的色谱峰达到基线分离(图 1, 图 2)。

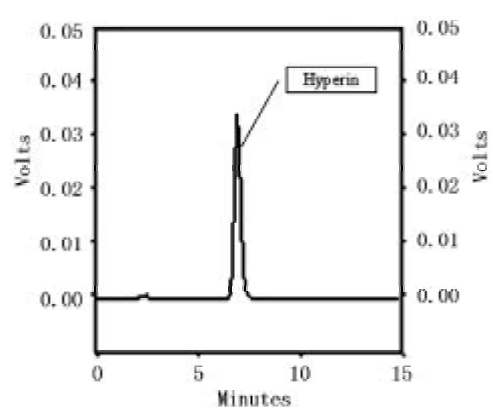


图1 金丝桃苷标准品色谱图
Fig.1 Chromatograms of hyperin of standard (7.017 min) (Time: 15.000 minutes; Amp: 0.000373 volts)

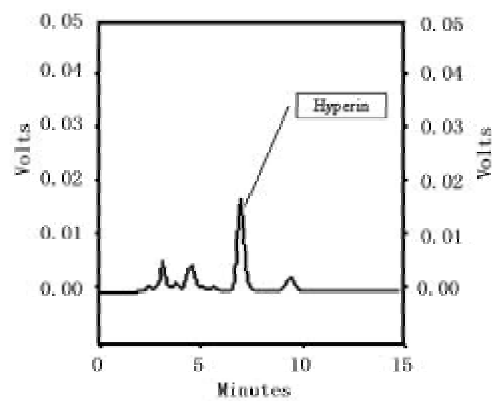


图2 刺五加叶样品 HPLC 色谱图
Fig.2 Chromatograms of leaf sample of *Acanthopanax senticosus* (7.067 min) (Time: 15.000 minutes; Amp: 0.000373 volts)

2.2 精密度试验

按 1.5 节的方法制备出样品，连续进样 5 次，测金丝桃苷的峰面积，计算出相对标

准偏差(RSD)，结果见表 1。

2.3 重复性试验

精确称定刺五加叶粉末 0.5 g 左右，按 1.5节的方法制备样品并测定其中金丝桃苷色谱峰峰面积，重复 5 次，计算出金丝桃苷在刺五加叶中的百分含量和相对标准偏差，结果见表 2。

2.4 加样回收率试验

精确称取上述已知金丝桃苷含量的样品 0.5 g 左右，计算金丝桃苷的含量。加入对照品溶液 100 μL，含金丝桃苷 100 μg。按 1.5节的方法制备样品并测定样品中金丝桃苷的峰面积，计算出加样后金丝桃苷的含量，用实测值减去原样品中金丝桃苷的含量再除以加入的纯品量，计算出回收率，结果见表 3。

3 讨论

金丝桃苷是刺五加叶中的一种重要成分(史久良等, 1981)。目前，还没有对刺五加叶中金丝桃苷含量测定的报道，本文首次采用高效液相色谱法测定其中金丝桃苷含量。

Table 1 Precision tests of determinations			
Number	Area	Average	Relative standard deviation (%)
1	225994	227387.2	2.73
2	226748		
3	227325		
4	219784		
5	237085		

Table 2 Reproducibility test on the content of hyperin in the leaves of <i>Acanthopanax senticosus</i>					
No.	Weight(g)	Area	Content (%)	Average (%)	Relative standard deviation (%)
1	0.5127	225994	0.02743	0.02603	5.12
2	0.5048	224543	0.02725		
3	0.4910	214177	0.02598		
4	0.4916	207031	0.02510		
5	0.5015	200932	0.02436		

表 3 金丝桃苷的加样回收率
Table 3 Recoveries of added standard hyperin

Sample (g)	Content of hyperin in the sample(μg)	Added hyperin(μg)	Content of determination (μg)	Recovery (%)	Average recovery (%)	Relative standard deviation (%)
0.4965	129.24	100	236.02	107	104	5.38
0.4946	128.74	100	238.19	109		
0.5019	130.64	100	226.81	96		
0.4891	127.31	100	235.31	108		
0.4778	124.37	100	225.03	101		

研究表明，刺五加的其他部位不含金丝桃苷或含量甚微，但在叶中金丝桃苷的含量很高。金丝桃苷在临床上对很多疾病有很好的疗效，金丝桃苷有提高动物耐低压缺氧的能力和镇静效果(宋必卫等，1995)，对急性心肌缺血有保护作用，具有镇痛、保护脑缺血损伤等作用，并对钙离子内流有影响(陶遵威，2002)。因此，用金丝桃苷作为衡量刺五加叶品质的指标是切实可行的。

的，这对开发和利用刺五加叶提供了科学的依据。

本试验采用甲醇作提取剂，固液比为50:1，在40℃下超声提取45分钟，一次性提取基本完全，二次提取很难测到有金丝桃苷的存在。而且金丝桃苷的峰形良好，与其他成分的色谱峰完全达到了基线分离。可见，用高效液相色谱法测定刺五加叶中金丝桃苷的含量，其结果准确、重现性好且灵敏度高。

参 考 文 献

陈志武, 马传庚, 赵维忠 (1998) 金丝桃甙对脑缺血再灌损伤保护作用的实验研究. 药学报, 33: 14-17

黄河胜, 马传庚, 陈志武 (2000) 黄酮类化合物药理作用研究进展. 中国中药杂志, 25: 589-592

史久良, 吴秉纯, 郭秀芳, 董天慧, 高凤兰 (1981) 刺五加叶金丝桃甙的分离、鉴定和药理作用. 见: 黑龙江省祖国医药研究所编著, 中国刺五加研究. 黑龙江科学技术出版社, 哈尔滨, 70-79

宋必卫, 陈志武, 马传庚 (1995) 金丝桃甙对中枢神经系统的一般药理作用. 安徽医科大学学报, 30: 253-255

陶遵威 (2002) 金丝桃甙 (hyperin) 药理作用研究进展. 天津药学, 14(2): 14-16

许正斌, 王明禹 (1984) 刺五加中丁香甙含量变化. 中医药学报, 1: 55-58

许正斌, 佟婉筠, 杨光 (1984) 刺五加各部位有效成分的含量. 中草药, 15(5): 32-34

徐任生, 冯胜初, 范芝云, 叶淳渠, 翟世康, 沈美龄 (1983) 刺五加多糖成分的研究. 科学通报, 3: 185-187