

广西金丝桃属植物有效成分金丝桃素的含量测定研究

李典鹏, 梁小燕, 文永新, 陈海珊, 方宏

(广西壮族自治区广西植物研究所, 广西桂林 541006)
中国科学院

摘要: 采用 UV-VIS 法和 HPLC 法检测了广西产金丝桃属植物及其提取物中有效成分金丝桃素的含量, 建立了 HPLC 测定金丝桃素的新方法, 该法有良好的重现性及精密度。

关键词: 金丝桃属植物; 金丝桃素; 含量测定

中图分类号: Q946.88 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2001)04-0367-04

Determination of effective constituents hypericin of *Hypericum* from Guangxi

LI Dian-peng, LIANG Xiao-yan, WEN yong-xin,
CHEN Hai-shan, FANG Hong

(*Guangxi Institute of Botany, Guangxi Zhuangzu Autonomous Region and
The Chinese Academy of Sciences, Guilin 541006, China*)

Abstract: The UV-VIS method and HPLC method were applied to determine *Hypericum* plants which is native to Guangxi and the effective constituent from its extract, from which we have established a new HPLC method to determine hypericin. This method has a good reproducibility and sensitivity.

Key words: *Hypericum* L.; hypericin; determination

金丝桃属 (*Hypericum* L.) 植物属于金丝桃科 (Guttiferae)。该属植物全世界约有 400 余种, 分布极为广泛。国产金丝桃属植物共有 55 种, 8 亚种^[1], 且大部分为特有种, 全国各地均有分布, 但主要集中在西南地区^[2]。该属植物的模式种为贯叶连翘 (*Hypericum perforatum* L.), 贯叶连翘提取物在欧美用作抗抑郁药^[3], 俗称 St. John's wort extract, 其抗抑郁的主要成分为金丝桃素 (Hypericin) 和假金丝桃素 (Pseudohypericin)。近年来还报道它们具有抗

逆转录病毒及抑制 HIV 活性的作用^[4-6], 可用于艾滋病的治疗, 从而引起医药界的重视。金丝桃素 (Hypericin) 的含量测定方法国外有 TLC 法, HPLC 法, UV/VIS 法^[7,8], 国内也有采用 HPLC 法测定贯叶连翘制剂及其提取物中金丝桃素含量的报道^[9,10], 但采用 HPLC 法测定金丝桃属 (*Hypericum* L.) 原植物的金丝桃素含量, 特别是测定广西金丝桃属原植物的金丝桃素含量未见相关研究与报道。研究中我们发现分布在广西的金丝桃属植物约为 9

收稿日期: 2001-02-06

作者简介: 李典鹏 (1969-), 男, 广西资源人, 助理研究员, 从事植物化学研究与开发工作。

基金项目: 广西科学院基金 (桂科院研 9801); 桂林市科委 (编号 980135) 资助项目。

种,我们采集了其中的6种,对其中的活性成分金丝桃素进行了含量测定与筛选研究,筛选结果我们将另文报道,本文仅报道对广西金丝桃属植物的金丝桃素含量的UV/VIS和HPLC测定方法及测定结果,特别是关于HPLC测定的方法学研究,该方法分离效果好、方法准确、灵敏度高、重现性好。

1 仪器与试剂

Waters 高效液相色谱仪,并配有两台510泵、U6K型手动进样器、柱恒温仪、紫外486检测器;岛津-210A紫外分光光度计。

金丝桃素(Hypericin)对照品(纯度85%,sigma公司);贯叶连翘(*Hypericum perforatum* L.),野金丝桃(*H. attenuatum* Choisy),田基黄(*H. japonicum* Thb.),小连翘(*H. erectum* Thumb),金丝桃(*H. chinese* L.),采自广西不同地区,经分类室韦发南、毛宗铮教授鉴定。贯叶连翘提取物I号由灵川海洋天然植物制品厂提供,贯叶连翘提取物I号和野金丝桃提取物由课题组在实验室制备。

2 UV-VIS测定方法

本方法参照草药学家Roy Upton主编的《美国草药St. John's wort monograph》一书中UV-VIS法测定总金丝桃素的含量。

2.1 样品制备与测定

原植物样品的制备:原料样品经60℃左右烘干,研碎过20目筛,精确称取样品2.000g于小滤纸筒,在索氏提取器底瓶中加入150mL乙醚,索氏抽提5h,移去乙醚,换95%乙醇150mL再抽提6h,乙醇相转移至250mL容量瓶中,定容至刻度,以95%乙醇为空白于岛津-210A紫外分光光度计在590nm波长下测定A值。

提取物样品制备:室温条件下,准确称取提取物70~100mg,用20mL 95%乙醇在超声波上溶解5~10min,冷却定容至25mL容量瓶。于光照条件下放置2.5~3h,用滤纸过滤,取5mL滤液用95%乙醇稀释至25mL容量瓶,以95%乙醇为空白,在590nm下测定A值。

2.2 样品含量的计算方法

$$\text{总金丝桃素含量}\% = \frac{125 \times A_{590}}{870 \times W}$$

A-590nm波长下的吸光度值;W-样品的准确

重量(g);870-Hypericin在590nm下的特定吸收系数。

原料植物样品及部分提取物样品的UV-VIS测定结果见表2。

2.3 金丝桃素(Hypericin)对照品的UV扫描图见图1。

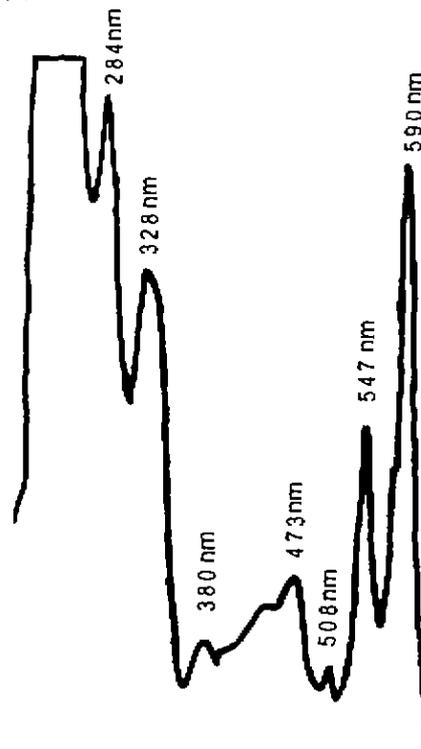


图1 金丝桃素的紫外扫描图谱
Fig. 1 UV absorption spectrum of hypericin

3 HPLC测定法

3.1 色谱条件

色谱柱:Spherisorb C₁₈(4.6×250nm,5μm);流动相:甲醇-乙酸乙酯-0.1M磷酸二氢钠(267:208:525);流速:1.0mL/min;检测波长:590nm;柱温:40℃;进样量:10μL。色谱图见图2。

3.2 线性关系

精确称取金丝桃素对照品1.0mg于5mL容量瓶,用甲醇超声波溶解,稀释至刻度,摇匀,精密吸取此溶液100μL稀释至1mL,C=0.02mg/mL,分别进样2、4、8、12、16、20μL,测定峰面积以进样量(μg)为纵坐标,峰面积为横坐标,求得回归方程为:

$$Y = -1.92 \times 10^{-4} + 3.13 \times 10^{-7} X \quad r = 0.99995$$

说明金丝桃素的进样量在0.04~0.5μg范围

内线性良好。

3.3 最低检测限

将金丝桃素对照品母液 $C=0.02 \text{ mg/mL}$ 稀释 100 倍, 进样 $5 \mu\text{L}$, 以信噪比 3:1 为指标, 确定该方法的最低检测限为 $0.001 \mu\text{g}$, 说明该方法的灵敏度

非常好。

3.4 加标回收率, 重现性试验

精密称取提取物样品 50 mg 于 5 mL 容量瓶, 加入 $0.16 \mu\text{g}$ 金丝桃素对照品, 进样 $20 \mu\text{L}$, 测定回收率如表 1。

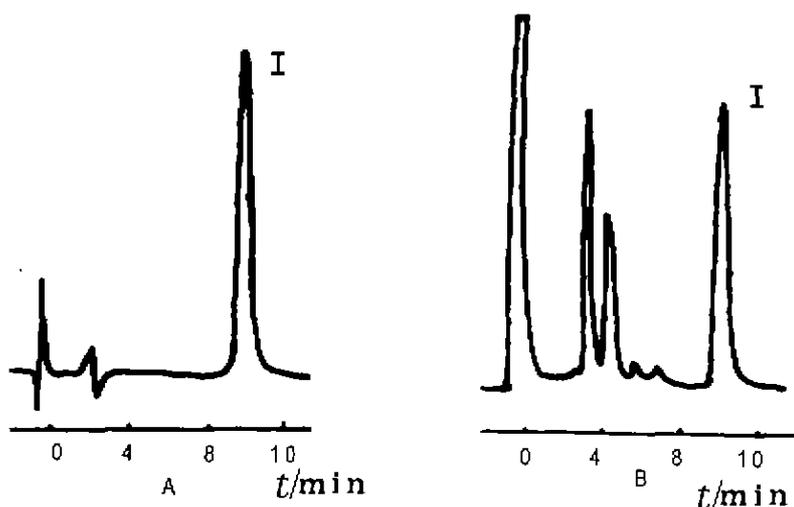


图 2 金丝桃素对照品(A)及样品(B)HPLC 色谱图 I. 金丝桃素(8.74 min)

Fig. 2 The HPLC chromatogram of Hypericin (A) and its sample (B) I. Hypericin (8.74 min)

表 1 金丝桃素的回收率实验

Table 1 Recoveries of Hypericin

项目 Items	贯叶连翘提取物 II 号 St. John's wort extract II	野金丝桃提取物 Extract of <i>H.</i> <i>attenuatum</i> Choisy
原提取物中金丝桃素量 The initial hypericin (μg)	0.580	0.204
标准加入量 The normal added (μg)	0.160	0.160
平均测得量 The average found (μg)	0.740	0.364
平均回收率 The average recovery (%)	95	98.2
RSD (%)	1.4	1.2

注: $n=4$

3.5 精密度试验

金丝桃素对照品溶液 ($C=0.02 \text{ mg/mL}$), 进样 $10 \mu\text{L}$, 连续进样 6 次, 测定峰面积, 计算值为: 0.205 6, 0.200 7, 0.205 5, 0.201 0, 0.199 7, 0.203 0 μg , $\text{RSD}=0.71\%$ 。

3.6 稳定性试验

将新配制的样品溶液分别置日光及室内自然光下放置 0、0.5、1.2、2.5、3、4 h 后再测定, 结果表明光照放置 2.5 h 后金丝桃素的峰面积基本稳定。试验中同时还考察了金丝桃素的热稳定性, 将样品

表 2 不同样品的金丝桃素含量测定结果

Table 2 Contents of Hypericin in different sample

样品名称 Sample name	UV/VIS 测定 结果、总金丝 桃素含量 (%) UV/VIS, Total Hypericin	HPLC 测定 结果, 金丝桃 素含量 (%) HPLC, Hypericin
贯叶连翘 (<i>Hypericum perforatum</i> L.)	0.051	0.012
野金丝桃 (<i>H. attenuatum</i> Choisy)	0.049	0.011
田基黄 (<i>H. japonicum</i> Thb.)	0.011	未检出
小连翘 (<i>H. erectum</i> Thunb.)	0.024	未检出
金丝桃 (<i>H. Chinese</i> L.)	0.016	未检出
贯叶连翘提取物 I 号 St. John's wort extract I	0.35	0.058
贯叶连翘提取物 II 号 St. John's wort extract II	0.47	0.068
野金丝桃提取物 Extract of <i>H. attenuatum</i> Choisy	0.34	0.059

室温下测定及置 30、50、70、90 $^{\circ}\text{C}$ 水浴加热 1 h, 2 h 后再测定, 试验过程中注意避光, 测定结果基本一致。

3.7 溶液制备与样品测定

标准液制备: 取对照品 1.0 mg , 用甲醇少量超声波溶解, 冷却后定容至 5 mL , 摇匀。精密吸取此溶液 $100 \mu\text{L}$ 稀释至 1 mL , 配成金丝桃素浓度为 $C=$

0.02 mg/mL 的甲醇溶液。

原植物样品溶液的制备:取植物样品于 60 °C 左右烘干,弃去茎杆,研碎,过 40 目筛,精密称取样品 1.000 g 于小滤纸筒内,于索氏提取器中先用乙醚脱脂,至乙醚层基本无色止,换 95% 乙醇提取 6 h,回收乙醇,浸膏用甲醇溶解,定容至 10 mL 容量瓶,过滤,进样 20 μ L 测定峰面积。

提取物样品制备:精密称取提取物粉末样品 100.0 mg 于 10 mL 容量瓶中,加入少量甲醇,超声波溶解,冷却后定容,过滤,滤液进样 10 μ L 测定峰面积。

样品的测定结果见表 2。

4 讨论

4.1 HPLC 检测波长的选择

从金丝桃素对照品的紫外扫描图谱(图 1)来看,金丝桃素在 284、328、380、473、508、547、590 nm 处均有吸收,其中 284、590 nm 两处峰形较尖,吸收值大,理论上这两个波长都可以作为 HPLC 的紫外检测波长,美国草药 St. John's wort monograph 推荐的 HPLC 检测方法所使用波长为 284 nm。本实验我们对 284、590 nm 这两个波长进行了检测,结果发现,采用 284 nm 作为检测波长,对金丝桃素类成分检测专一性差,许多其他类成分如黄酮类、黄酮甙类成分均有信号,且对金丝桃素的检测灵敏度偏低,基线难稳定,峰形对称性差,而采用 590 nm 作为检测波长,对样品和对照品来说,其峰的对称性、分离度、基线稳定性均大有改善,且检测灵敏度高,杂质干扰峰少。因此我们选择 590 nm 作为 HPLC 的紫外检测波长。

4.2 HPLC 流动相的选择

在流动相选择中我们发现在甲醇与水中加入一定量的乙酸乙酯可大大改善峰的对称性和峰检测信号,同时 pH 值对分离也有较大影响,我们以加入缓冲液磷酸二氢钠来调节 pH 值可达满意的分离效果,最后我们摸索出的流动相为甲醇—乙酸乙酯—0.1 M 磷酸二氢钠(267:208:525)。

4.3 稳定性试验

金丝桃素的光敏性较强,光照对样品溶液中金丝桃素含量有一定影响,但在 100 °C 以内,测定温度对金丝桃素的影响不是很大。

本文采用 UV-VIS 和 HPLC 两种方法对广西的金丝桃属植物及部分提取物进行了比较测定,发现两种方法的测定结果偏差较大,这是因为 UV-VIS 法测定的为总金丝桃素含量,该方法受色素等其它类在 590 nm 下有吸收的物质干扰严重;HPLC 检出的为金丝桃素单体物质的含量,相对准确可靠,因此为国际上认可的贯叶连翘提取物质量控制方法,但对生产厂家来说,UV-VIS 法简便,快速,成本低,也不失为一种好的质控方法。另外,从测试结果我们也看到:广西金丝桃属植物种类间金丝桃素含量差异大,这与植物的品种,产地,采收时间,提取工艺等有关,这方面,我们正进行进一步的研究。

参考文献:

- (1) 李锡文,李延辉,董绍全,等.《中国植物志》第五十卷第二分册[M].北京:科学出版社,1990.2-72.
- (2) 潘映红,郭宝林,彭勇.国产金丝桃属药用植物资源现状及利用前景[J].中药材,1993,16(3):14-18.
- (3) 刘一兵.贯叶金丝桃研究进展 I——原植物、采收、制剂和化学成分[J].国外医药——植物药分册,1998,13(3):99-104.
- (4) 朱晓薇.贯叶金丝桃研究进展 I——药代动力学、药效学和治疗应用(续)[J].国外医药——植物药分册,1998,13(5):210-214.
- (5) Veronika Butterweck, Frank Peterleit, Hilke Winterhoff, et al. Solubilized Hypericin and Pseudohypericin from *Hypericum perforatum* Exert Antidepressant Activity in the Forced swimming Test[J]. *Planta Med.*, 1998, 64: 291-294.
- (6) Peter M Bork, Susanne Bacher, M Lienhard Schmitz, et al. Hypericin as a Non-Antioxidant Inhibitor of NF- κ B [J]. *Planta Med.*, 1999, 65: 297-300.
- (7) Giuseppe M, Francesco L, Paoline C. High-performance liquid chromatographic determination of the biologically active principle hypericin in phytotherapeutic vegetable extracts and alcoholic beverages[J]. *Chromatography*, 1996, 731: 336-339.
- (8) Debska W, Zmndzinska L. Densitometric and spectrophotometric determination of hypericin in St. John's Wort (*Herba Hypericin*) [J]. *Chem. Abstracts*, 1983, 98: 132414w. *Herba Pol.* 1982, 28: 21-29.
- (9) 孙微,施肖峰,孙志浩.贯叶连翘提取物中金丝桃素的初步 HPLC 测定[J].中国医药工业杂志,2000,31(4):172-173.
- (10) 王峰,高天兵,田金改. RP-HPLC 法测定贯叶连翘片剂中有效成分金丝桃素和金丝桃苷的含量[J].药物分析杂志,2000,20(2):101-103.