

HPLC 法测定不同产地贯叶连翘中黄酮类成分的含量

宋东杰, 阮鸣, 张李阳* (南京晓庄学院生命科学系, 江苏南京 211171)

摘要 采用 HPLC 法测定不同产地贯叶连翘中芦丁、金丝桃苷和槲皮素的含量。结果表明, 芦丁的线性检测范围为 0.052 9~0.529 0 μg ($r=0.999 7$), 平均回收率为 99.4%, $RSD=1.471\%$; 金丝桃苷的线性检测范围为 0.049 3~0.493 0 μg ($r=0.999 6$), 平均回收率为 100.2%, $RSD=1.407\%$; 槲皮素的线性检测范围为 0.001 66~0.053 00 μg ($r=0.999 8$), 平均回收率为 98.5%, $RSD=1.295\%$ 。

关键词 HPLC; 贯叶连翘; 黄酮类物质

中图分类号 O657.7 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2009)25-12017-02

Determination on Flavone Ingredients in *Hypericum perforatum* L. from Different Producing Areas by HPLC Method

SONG Dong-jie et al (Life Science Department of Nanjing Xiaozhuang College, Nanjing, Jiangsu 211171)

Abstract The contents of rutin, hyperin and quercetin in *Hypericum perforatum* L. from different producing areas were determined by HPLC method. The results showed that the linear detection range of rutin was 0.052 9~0.529 0 μg ($r=0.999 7$) with average recovery of 99.4% and RSD of 1.471%. The linear detection range of hyperin was 0.049 3~0.493 0 μg ($r=0.999 6$) with average recovery of 100.2% and RSD of 1.407%. The linear detection range of quercetin was 0.001 66~0.053 00 μg ($r=0.999 8$) with average recovery of 98.5% and RSD of 1.295%.

Key words HPLC; *Hypericum perforatum* L.; Flavonoids

贯叶连翘又名贯叶金丝桃, 为藤黄科植物贯叶金丝桃 *Hypericum perforatum* L. 的干燥地上部分^[1]。贯叶连翘作为传统中草药, 具有清热解毒、抗菌消炎、促进伤口愈合等功效, 而在欧美等国主要用于治疗抑郁症, 德国 40% 左右治疗抑郁症的药物含贯叶连翘。随着现代药理活性研究的深入, 贯叶连翘在抗病毒、抗肿瘤等方面的作用越来越受到人们的关注。一般认为, 贯叶连翘主要活性成分包括黄酮类化合物如芦丁(Rutin)、金丝桃苷(Hyperoside)和槲皮素(Quercetin)等, 苯骈双萘酮类化合物如金丝桃素(Hypericin)、伪金丝桃素(Pseudohypericin)等, 间苯三酚类衍生物如贯叶金

桃素(Hyperforin)、加贯叶金丝桃素(Adhyperforin)等。黄酮类成分在贯叶连翘中的含量相当丰富, 此类化合物具有抗炎、抗病毒、抗癌、抗衰老等生理活性, 已引起了国内外学者的广泛重视。国外最新研究表明, 金丝桃苷具有抗抑郁活性^[2]。笔者以贯叶连翘中黄酮类化合物芦丁、金丝桃苷和槲皮素为质量指标, 参考钱秋霞等^[3]和张丽静等^[4]的方法建立了贯叶连翘中黄酮类物质的 HPLC 测定方法, 以期为贯叶连翘质量评价及开发利用提供理论依据。

1 材料与与方法

1.1 原料 来自 6 个产地的贯叶连翘(表 1)。

表 1 贯叶连翘各居群产地

Table 1 Different producing area of *Hypericum perforatum*

样本产地 Producing areas of samples	海拔高度//m Altitude	年平均气温// $^{\circ}\text{C}$ Temperature	年平均降水量//mm Annual average rainfall	年平均日照//h Annual average sunlight	土壤类型 Soil types
1 陕西安康	1 000	12.0~15.0	750~1 100	1 495.6~1 836.2	黄棕壤
2 四川达州	1 100	14.7~17.6	1 076~1 270	1 400~1 800	黄壤
3 四川万源	1 200	14.7	1 246	1 300~1 700	黄壤
4 贵州德江	1 000	13.0~17.0	1 200	1 400~1 700	黄红壤或黄壤
5 贵州遵义	900	12.6~13.1	1 000~1 300	1 400~1 700	黄壤
6 贵州思南	1 000	16.8	1 200	2 000	黄红壤或黄壤

1.2 仪器与试剂 Agilent 1100 高效液相色谱仪, 紫外可见分光光度计, 四元泵, 自动进样器; 芦丁、金丝桃苷和槲皮素对照品(批号分别为 100080-200306、111521-200303、100081-200406)均购自江苏省药品检验所; 试验用甲醇、乙腈均为色谱纯, 磷酸为分析纯, 水为重蒸馏水。

1.3 方法

1.3.1 色谱条件。芦丁、金丝桃苷 色谱柱: Eclipse XDB-C18 色谱柱(4.6 mm \times 250 mm, 5 μm), 流动相: 水-乙腈-磷酸(825:175:1); 流速 1.0 ml/min; 检测波长 365 nm; 柱温:

27 $^{\circ}\text{C}$, 进样量 5 μl ; 槲皮素 色谱柱: Eclipse XDB-C18 色谱柱(4.6 mm \times 250 mm, 5 μm), 流动相: 甲醇-0.5% 磷酸水溶液(50:50); 流速 1.0 ml/min; 检测波长 360 nm; 柱温 27 $^{\circ}\text{C}$, 进样量 5 μl 。

1.3.2 线性关系考察。精密称取芦丁对照品 5.29 mg 和金丝桃苷对照品 4.93 mg, 用甲醇溶解, 并定容于 100 ml 量瓶中, 摇匀后即得对照品溶液。精密吸取对照品溶液 1, 2, 4, 6, 8, 10 μl , 分别进样, 测定其峰面积, 以进样量(μg)为横坐标, 峰面积为纵坐标进行线性回归, 得回归方程: $Y_{\text{芦丁}} = 1 132x + 7.629 6$ ($r=0.999 7$), 在 0.052 9~0.529 0 μg 范围内进样量与峰面积呈良好线性关系; $Y_{\text{金丝桃苷}} = 2 870.7x + 5.355 6$ ($r=0.999 6$), 在 0.049 3~0.493 0 μg 范围内进样量与峰面积呈良好线性关系。

精密称取槲皮素对照品 5.30 mg 用甲醇溶解, 并定容于

基金项目 南京市科技局农业科技基金(Xh2000-17); 南京晓庄学院“生态学”校级重点建设学科项目。

作者简介 宋东杰(1951-), 男, 江苏南京人, 副教授, 从事植物生物学、生态学与野生经济植物应用开发教学与研究工作。*通讯作者。

收稿日期 2009-05-04

100 ml 量瓶中, 摇匀, 得 0.530 mg/ml 的对照品溶液。精密吸取该对照品溶液 5 ml, 用甲醇定容于 10 ml 量瓶中, 得浓度为 0.026 5 mg/ml 的对照品溶液, 再精密量取该对照品溶液 5 ml, 用甲醇定容于 10 ml 量瓶中, 得浓度为 0.013 25 mg/ml 的对照品溶液, 依此类推, 得浓度为 0.006 625、0.033 13、0.016 56 mg/ml 的系列对照品溶液。各对照品溶液分别进样 5 μl, 测定其峰面积, 以进样浓度 (mg/ml) 为横坐标, 峰面积为纵坐标进行线性回归, 得回归方程: $Y_{\text{槲皮素}} = 22\ 709x + 4.016\ 9$ ($r = 0.999\ 8$), 在 0.001 66 ~ 0.053 0 mg/ml 范围内进样浓度与峰面积呈良好线性关系。

1.3.3 样品溶液的制备。取贯叶连翘药材室温下阴干, 粉碎后过 40 目筛, 精密称取 0.6 g 粉末, 加 15 ml 甲醇超声提取 20 min, 过滤, 滤液转移至 25 ml 量瓶中, 加甲醇定容, 摇匀, 用 0.45 μm 滤膜过滤, 收集滤液, 即为供试品溶液, 取样, 进样 5 μl。

1.3.4 精密度试验。取芦丁 (0.052 9 mg/ml) 和金丝桃苷 (0.049 3 mg/ml) 的混标溶液, 以及槲皮素对照品溶液 (0.006 625 mg/ml), 连续进样 5 次, 测定其峰面积, 检验测定结果的精确性。

1.3.5 稳定性试验。取芦丁 (0.052 9 mg/ml) 和金丝桃苷 (0.049 3 mg/ml) 的混标溶液, 以及槲皮素对照品溶液 (0.006 625 mg/ml), 分别于 2、4、6、8、10 h 进样测定, 比较不同进样时间的测定结果。

1.3.6 重复性试验。同一批样品, 重复进样 5 次, 比较各次测定结果。

1.3.7 回收率试验。精密称取已知含量的样品 0.6 g, 精密加入芦丁、金丝桃苷对照品各约 2、1 mg, 重复进样 5 次, 测定其回收率 ($n = 5$); 精密称取已知含量的样品 0.6 g, 精密加入

槲皮素对照品约 1 mg, 重复进样 5 次, 测定其回收率。

2 结果与分析

2.1 样品测定结果 由表 2 可知, 陕西安康产贯叶连翘中芦丁、槲皮素、芦丁 + 金丝桃苷 + 槲皮素含量最高, 贵州德江产贯叶连翘中金丝桃苷含量最高。

表 2 贯叶连翘中芦丁、金丝桃苷和槲皮素的含量

Table 2 Contents of rutin, hyperin and quercertin in *Hypericum perforatum*

编号 No.	产地 Producing area	芦丁含量 Content of rutin	金丝桃苷含量 Content of hyperin	槲皮素含量 Content of quercertin	总含量 Total content
1	陕西安康	0.396	0.255	0.032 5	0.684
2	四川达州	0.161	0.217	0.009 8	0.388
3	四川万源	0.129	0.233	0.013 0	0.375
4	贵州德江	0.182	0.260	0.010 6	0.452
5	贵州遵义	0.094	0.145	0.010 7	0.250
6	贵州思南	0.129	0.177	0.012 6	0.319

2.2 精密度试验结果 5 次测定芦丁、金丝桃苷和槲皮素含量的 RSD 分别为 0.521%、0.713% 和 1.048%, 说明仪器精密度良好, 符合检测要求。

2.3 稳定性试验结果 不同时间测定芦丁、金丝桃苷和槲皮素含量的 RSD 分别为 0.465%、0.638% 和 1.127%, 说明芦丁、金丝桃苷和槲皮素在 10 h 内较稳定。

2.4 重复性试验结果 5 次进样测得芦丁、金丝桃苷和槲皮素的平均含量分别为 0.399%、0.254% 和 0.032 5, RSD 分别为 1.307%、1.425% 和 2.204%, 说明测定结果的重现性较好。

2.5 回收率试验结果 由表 2 可知, 样品中芦丁、金丝桃苷和槲皮素的平均回收率分别为 99.4%、100.2% 和 98.5%。

表 3 贯叶连翘中芦丁、金丝桃苷和槲皮素的加样回收率

Table 3 Addition recovery rate of rutin, hyperin and quercertin in *Hypericum perforatum*

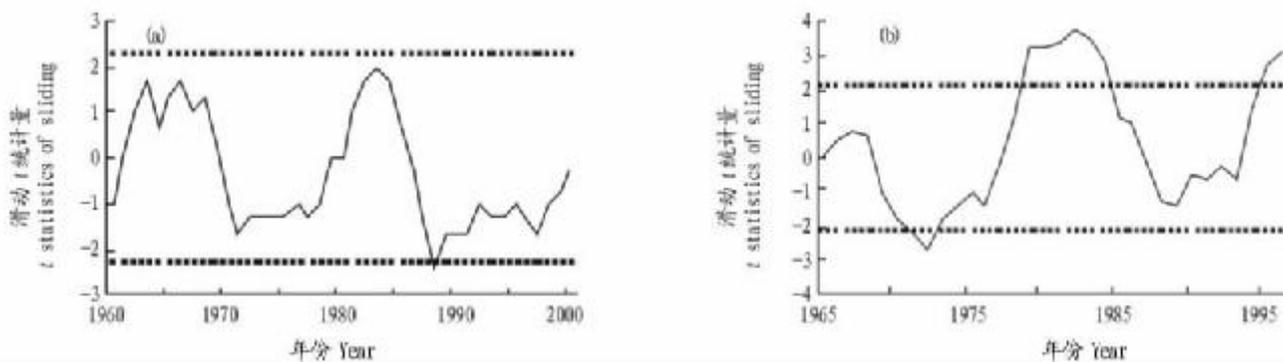
成分 Components	样品中含量//mg Content in samples	标品加入量//mg Ad Addition of standard substance	测得量//mg Detected amount	回收率//% Recovery rate	平均回收率//% Average recovery rate	相对标准偏差//% RSD
芦丁 Rutin	2.414	2.02	4.426	99.6	99.4	1.471
	2.402	2.14	4.486	97.4		
	2.398	2.09	4.511	101.1		
	2.410	2.11	4.526	100.3		
	2.402	2.07	4.441	98.5		
金丝桃苷 Hyperin	1.542	1.16	2.695	99.4	100.2	1.407
	1.539	1.09	2.639	100.9		
	1.542	1.07	2.598	98.7		
	1.534	1.12	2.652	99.8		
	1.529	1.13	2.685	102.3		
槲皮素 Quercertin	0.194	1.02	1.202	98.9	98.5	1.295
	0.193	1.07	1.260	99.7		
	0.195	1.10	1.257	96.6		
	0.193	1.16	1.346	99.4		
	0.194	1.09	1.260	97.8		

3 讨论

该试验结果表明, 不同产地贯叶连翘黄酮类成分的含量差别较大, 黄酮类成分含量最高为 0.684%, 最低为 0.250%, 说明贯叶连翘黄酮类成分的含量受产地、环境、气候和采集时间的影响较大。同时, 贯叶连翘有效活性成分的含量还与其遗传因素有关^[5]。数据显示, 陕西安康产的贯叶连翘黄酮

类成分含量较高。

该研究建立的贯叶连翘不同黄酮类成分含量的测定方法较药典中传统方法更能反映药材质量, 较薄层层析法、液相梯度洗脱等方法快速、简便, 可作为药材定性、定量鉴定的较好方法。



注:图中 a 为子序列长度为 5; b 为子序列长度为 10; 虚线为 $\alpha = 0.05$ 显著水平临界值。

Note: a, Sub-sequence length of 5; b, Sub-sequence length of 10. The broken line is the critical value at $\alpha = 0.05$ significant level.

图 2 1960~2000 年日照平均最高气温突变滑动检验统计值

Fig. 2 The test statistics of average maximum temperature sliding mutation in Rizhao from 1960 to 2000

2.2 高温日数变化特征 根据山东省气象台气象灾害预警信号发布规定,高温预警信号分 3 级,分别用黄、橙、红 3 色表示。当连续 3 日最高气温大于等于 35℃时要对外发布高温黄色预警信号;当日最高气温大于等于 37℃,要对外发布高温橙色预警信号;当日最高气温大于等于 40℃时要对外发布高温红色预警信号。依照上述标准,笔者将高温划分为 3 个等级:一般高温、橙色高温和红色高温。一般高温日最高气温大于等于 35℃而小于 37℃;橙色高温日最高气温大于等于 37℃而小于 40℃;红色高温日最高气温大于等于 40℃。根据以上 3 个等级统计日照市每月出现的高温次数。日照市 5~9 月都有高温日出现,其他月份没有高温日出现,其中 7 月出现的次数最多,占 32%;6 月、8 月份次之,均占 20%;其他月份共占 28%;红色高温只在 2002 年 7 月出现过。

经统计日照市各年代大于等于 35℃高温日数,发现 1956~1960 年、20 世纪 60、70、80、90 年代、2001~2005 年各年代(际)高温日数分别为 0、7、6、1、3、8 d,高温日数呈先增加后减少再增加趋势,在 20 世纪 80 年代到达最小值。大于

等于 35℃年高温日数的最高值出现在 2002 年,为 6 d;有 33 年大于等于 35℃日数为 0 d。从 4 次拟和曲线看出,日照市高温日数自 20 世纪 50 年代末期起到 60 年代中期呈上升趋势,20 世纪 60 年代中期到 80 年代呈下降趋势并达到最低点,而 90 年代至 2005 年则又呈现逐渐上升的趋势。

3 结论

(1)日照市 7 月平均最高气温最高,达 30.0℃,1 月平均最高气温最低,为 3.6℃;50 年来日照市平均最高气温在 20 世纪 70 年代和 80 年代发生了突变,呈“上升-下降-上升”的趋势。

(2)日照市 5~9 月都有高温日出现,其中 7 月出现的次数最多,6 月、8 月份次之。日照市高温日数呈现“增加-减少-增加”的趋势。

参考文献

[1] 王绍武,龚道溢,陈振华. 中国气候变化的研究[J]. 气候与环境研究, 2002,7(2):137-145.
 [2] 张建军,周后福,翟菁. 合肥气温和降水突变现象分析[J]. 安徽农业科学, 2007,35(9):2724-2926.
 [3] 何彬方,马妍,戴娟,等. 合肥市近 50 年最高气温变化特征[J]. 气象科技, 2008,36(6):764-765.

(上接第 12018 页)

芦丁、金丝桃苷和槲皮素对光较敏感,长时间光照易分解,因而试验中芦丁、金丝桃苷和槲皮素对照品与样品均应采用棕色量瓶于 10℃以下保存,同时,其稀释液最好现配现用。

参考文献

[1] 国家药典委员会. 中国药典. I 部[S]. 北京:化学工业出版社,2005:159.
 [2] BUTTERWECK V, HEGGER M, WINTERHOFF H. Flavonoids of St. John's wort reduce HPA axis function in the rat [J]. Plants Med, 2004,70(10):1008-1011.

[3] 钱秋霞,丛晓东. HPLC 法测定不同干燥方法的贯叶连翘中黄酮类化合物的含量[J]. 中草药, 2001,32(5):407-409.
 [4] 张丽静,易新萍,李革,等. HPLC 法测定新疆贯叶连翘中芦丁及槲皮素的含量[J]. 新疆大学学报:自然科学版, 2007,24(1):70-72.
 [5] BUTER B, ORLACCHIO C, SOLDATI A. Significance of genetic and environmental aspects in the field cultivation of *Hypericum perforatum* [J]. Planta Medica, 1998,64(5):431.
 [6] GUO X, CHENG F X, LIAO Z, et al. Preliminary research of the regular pattern between flavonoids content and the age of erect type *Ophiopogon japonicus* [J]. Agricultural Science & Technology, 2008,9(5):142-144.