

HPLC 法测定柴胡地上部分的黄酮苷元

赵晓辉^{1,2}, 蒋福全^{1,2}, 周剑波^{1,2}, 文怀秀^{1,2}, 邵 赟¹, 陶燕铎^{*1}

(1. 中国科学院西北高原生物研究所, 西宁 810008; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘 要:运用 HPLC 法测定青海不同产地 4 种柴胡地上部分的黄酮, 为柴胡药材的综合有效利用提供依据。采用 C₁₈ 色谱柱以 V(甲醇) V(0.1% H₃PO₄) = 1:1 为流动相, 流速 1 mL/min, 检测波长 360 nm。青海产柴胡地上部分均含丰富的黄酮, 其中以秦岭柴胡黄酮质量分数最高, 槲皮素质量分数达到 2.27%, 总黄酮质量分数大于 6.50%。本方法简便, 对黄酮的定量准确, 改变以往柴胡只使用地下部分而弃去地上部分的局面, 提高柴胡药材的有效利用率。

关键词: HPLC; 黄酮; 柴胡

中图分类号: O657.7 文献标识码: A 文章编号: 1000-0720(2007)01-046-04

柴胡是伞形科(Umbelliferae)柴胡属(Bupleurum)植物。根入药, 其性微寒, 味苦, 辛, 具有和解表里、疏肝、升阳之功效。用于感冒发热, 寒热往来, 胸胁胀痛月经不调等症。但传统的中药材中只利用柴胡根作为有效药用部位。柴胡根中的有效成分柴胡皂甙成分也成为研究者关注的焦点^[1,2], 柴胡地上部分往往被弃用。利用 HPLC 法测定青海产柴胡地上部的黄酮含量, 表明青海产柴胡黄酮含量丰富, 其中秦岭柴胡(Bupleurum longgicaule)槲皮素质量分数达到 2.27%, 总黄酮质量分数 > 6.50%。黄酮类化合物具有消炎、强心、降压、扩张冠状动脉、降低胆固醇、利尿、止咳祛痰、保肝等作用^[3-5]。实验中采用萃取法粗提得到柴胡地上部分中总黄酮, 再用高效液相色谱法测定了其 3 种黄酮苷元。该方法在原有药典方法的基础上增加了萃取纯化, 总黄酮水解彻底, 色谱图谱峰单一纯净基本无其它杂峰, 对黄酮苷元及总黄酮定量准确。为柴胡的有效利用及在新的药用领域的运用提供理论依据。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

L10-P 高效液相泵, JS-3050 色谱工作站(大

连江申); Waters2487 检测器; PH-230 柱温箱; METTLER 分析天平。甲醇为色谱纯, 自制重蒸水, 氯仿, 25% HCl 均为分析纯。黄酮对照品(槲皮素、山奈酚、异鼠李素): 纯度大于 99%, 购自中国药品生物制品检定所。柴胡样品由本所潘锦堂研究员鉴定分别为伞形科柴胡属紫花鸭跖柴胡(Bupleurum commelynoideum), 小叶黑柴胡(Bupleurum smithii) 秦岭柴胡(Bupleurum longgicaule), 簇生柴胡(Bupleurum condensatum)。

1.2 色谱条件

Thermo C₁₈ 反相色谱柱(ODS, 250 mm × 4.6 mm i. d.), 柱温: 30 °C; UV 检测波长: 360 nm; 灵敏度: 1.5AUFS; 流动相: V(甲醇) V(0.1% H₃PO₄) = 1:1。

2 结果与讨论

2.1 线性关系

分别准确称取槲皮素 16 mg、山奈酚 10 mg、异鼠李素 12 mg 置 100 mL 容量瓶中, 用甲醇定容, 摇匀按 2.1 项色谱条件进行 HPLC 分析, 结果见图 1。分别进样 2、4、6、8、10 和 12 μL。分别进样 6 次各 10 μL 以峰面积 Y 对进样量进行回归处理, 得线性回归方程: $Y = 1360674 X - 62069$, $r =$

* 收稿日期: 2006-03-22; 修订日期: 2006-06-18

基金项目: 中国科学院知识创新工程(CXLY-2002-9)项目资助

作者简介: 赵晓辉(1979-), 男, 硕士研究生

0.9993, 槲皮素在 0.032 ~ 0.192 mg/mL 范围内成良好的线性关系; $Y = 1450442 - 67867$, $r = 0.9991$, 山奈酚在 0.02 ~ 0.12 mg/mL 范围内成良好的线性关系; $Y = 819325 - 32134$, $r = 0.9999$, 异鼠李素 0.024 ~ 0.144 mg/mL 范围内成良好的线性关系。

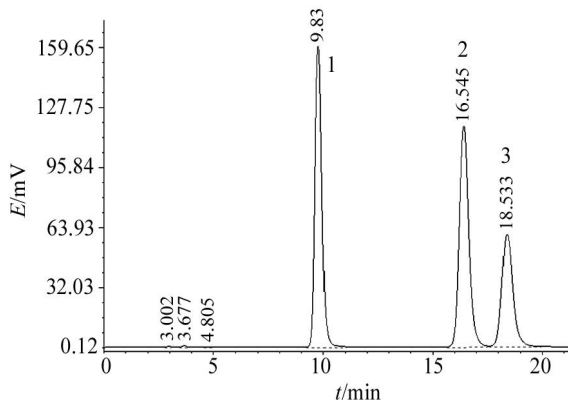


图 1 黄酮混标图谱

Fig. 1 Chromatograms of three flavones 1 Quercetin, 2 Kaempferol, 3 Isorhamnetin

1 - 峰槲皮素; 2 - 山奈酚; 3 - 异鼠李素

2.2 重复性实验

准确称取 1 号样品粉末 5 份各 1 g, 按照 2.5 的方法制备样品溶液, 按 1.2 色谱条件分别进样 10 μ L, 结果中以槲皮素、山奈酚、异鼠李素的峰面积得的 RSD 分别为 3.1%、2.1%、2.3%。

2.3 精密度

将黄酮混合对照品溶液按上述色谱方法, 连续进样 5 次, 每次 10 μ L, 槲皮素、山奈酚、异鼠李素的峰面积 RSD 分别为 2.1%、1.1%、1.5%。

2.4 加标回收率

准确称取样品粗粉 0.5 g 共 5 份, 分别加入标准品混合液各 1 mL (分别含槲皮素、山奈酚、异鼠李素 0.16、0.10、0.12 mg), 按照 2.5 节方法制备样品溶液, 在上述色谱条件下分别进样 10 μ L, 槲皮素、山奈酚、异鼠李素的平均加标回收率分别为 98.1% (RSD 3.1%)、95.6% (RSD 2.1%)、98.8% (RSD 3.3%)。

2.5 样品测定

取已干燥的柴胡地上部分, 粉碎过孔径为 0.833 mm 筛。准确称取该粉末 5g, 用 10 倍量体积分数 75% 的乙醇浸泡过夜, 加热回流, 过滤, 残渣再反复提取两次, 合并滤液。用 $V(\text{乙酸乙酯}) : V(\text{正丁醇}) = 1 : 1$ 萃取至无色, 萃取液减压浓缩得黄酮粗提物, 粗提物加 $V(\text{甲醇}) : V(25\% \text{ HCl}) = 4 : 1$ 混合液 25 mL, 回流 30 min 酸解, 放冷, 转移至 100 mL 容量瓶中加甲醇至刻度, 摇匀^[6], 临用前稀释 5 倍过 0.45 μ m 的微孔滤膜作为样品溶液。取样品溶液及对照品溶液各进样 10 μ L。各样品分析图谱结果见图 2(a~f), 分析结果见表 1。总黄酮计算按照 2000 年药典: $w(\text{总黄酮}) = w(\text{槲皮素}) + w(\text{山奈酚}) + w(\text{异鼠李素}) \times 2.51$ 。

表 1 样品测定结果

Tab. 1 Determination results of samples

样品编号	样品名	采集地	时间	槲皮素 w/%	山奈酚 w/%	异鼠李素 w/%	总黄酮 w/%
1	簇生柴胡	兴海	2005.6	0.040	0.0078	0.56	1.52
2	秦岭柴胡	平安	2005.6	1.88	0.012	0.37	5.76
3	秦岭柴胡	大通	2005.6	2.27	0.021	0.33	6.58
4	小叶黑柴胡	大通	2005.6	1.82	0.012	0.47	5.77
5	紫花鸭跖	大通	2005.6	0.97	0.0063	0.16	2.59
6	紫花鸭跖	循化	2005.6	1.01	0.031	0.21	3.15

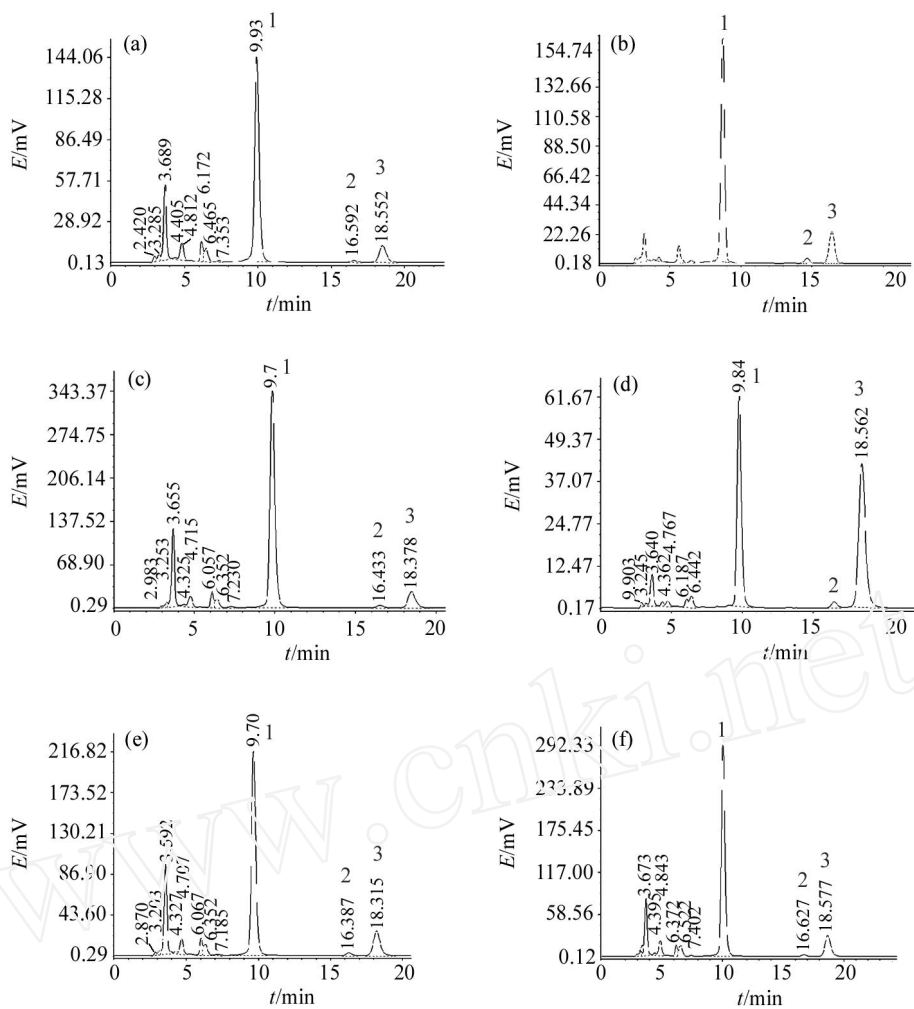


图 2 柴胡地上部分样品图谱

Fig. 2 Chromatograms of the samples from the aerial parts of umbelliferae

1、2、3 号峰分别是槲皮素、山奈酚、和异鼠李素

(a) 紫花鸭跖 ; (b) 紫花鸭跖 ; (c) 小叶黑柴胡; (d) 簇生柴胡; (e) 秦岭柴胡 ; (f) 秦岭柴胡

3 结论

由于黄酮甙相对分子质量较大, 组成复杂, 直接测定比较困难, 本实验采用萃取法得到了总黄酮粗品, 然后将粗品水解为苷元再进行 HPLC 分析, 该方法干扰较少, 操作简便、易行, 重现性和线性关系良好, 回收率较高, 是测定黄酮类物质的比较好的方法。由于较高浓度的 H_3PO_4 如处理不当在色谱柱中易结晶成盐造成柱堵塞降低柱效, 因此对药典中流动相中磷酸比例作了调整。筛选出较好的分离条件如下: 色谱柱 C_{18} 柱 (250 mm \times 4.6 mm i. d., 10 μ m); 流动相为 V (甲醇) V(0.1% 磷酸水溶液) = 1 : 1 体系, 流速 1.0 mL/min; 紫外检测器检测波长 360 nm。试验得到较

满意的分离效果, 结果准确可靠。

试验发现, 青海产 4 种柴胡 7 个产地地上部分黄酮量都很丰富, 总黄酮最高含量超过 6.50%。而且本文所研究的柴胡地上部分都有非常大的生物量, 其中紫花鸭跖柴胡、秦岭柴胡地上部分大约是地下部分的 8~10 倍。而柴胡作为药用植物一般只将根作为有效药用部位, 而将地上部弃去, 造成了柴胡地上部分药材的大量浪费。由于黄酮类化合物的特殊药用价值, 本研究结果为柴胡的综合利用开发提供了有利依据。对于目前柴胡的开发现状也将有一个大的改进。

参考文献

- [1] 林东昊, 茅仁刚, 王智华等. 药物分析杂志, 2004, 24(5): 479
- [2] 尚明远, 袁本香, 王英华等. 西北药学杂志, 1998, 13(4): 153
- [3] 黄雄, 李萍等. 中国药学杂志,
- [4] 吴惠勤, 程青, 张桂英等. 分析测试学报, 2001, 20(6): 53
- [5] Lee S J, Son K H, Chang H W *et al.* Phytother Res, 1998, 12(6): 445
- [6] 中华人民共和国药典 (一部), 2000: 257

Quantitative analysis of flavones from aerial parts of umbelliferae in qinghai by HPLC

ZHAO Xiaohui^{1,2}, JIANG Furquan^{1,2}, ZHOU Jianbo^{1,2}, WEN Huai-xiu^{1,2}, SHAO Yun¹ and TAO Yaru²
(1. Northwest Institute of Plateau Biology, CAS, Xining 810008; 2. Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049), Fenxi Shiyanshi, 2007, 26(1): 46 ~ 49

Abstract: The contents of flavones from the aerial parts of 4 kinds different locations of Bupleurum in Qinghai by HPLC were determined. Flavones were separated on a C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm) with methanol 0.1% H₃PO₄ (1:1) as the mobile phase, and flow rate was 1.0 mL/min. Flavones were detected at UV 360 nm. There are abundant flavones in the aerial parts of Umbelliferae from Qinghai. The content of quercetin is 2.27% and the contents of flavones are more than 6.50%. The method is convenient and very precise for determining the contents of flavones. The results of the study provided effective evidence for better use of umbelliferae and change the present situation that only underground parts are used and the aerial parts are discarded. The abundant flavones of the aerial parts of umbelliferae can increase efficient use of this herb.

Key words: HPLC; Flavone; Umbelliferae