

春柴胡总黄酮含量及 HPLC 指纹图谱研究

李 静, 王 博, 张 磊, 潘璐琳, 赵 明, 欧阳臻

(江苏大学药学院, 江苏 镇江 212013)

[摘 要] 目的: 建立春柴胡总黄酮含量分析方法及黄酮类成分的高效液相色谱指纹图谱。方法: 采用可见分光光度法测定总黄酮的含量, 采用高效液相色谱法对不同采收期及不同部位春柴胡中黄酮类成分进行分析, 建立春柴胡的指纹图谱。结果: 4 月到 5 月采收的春柴胡黄酮含量较高; 总黄酮含量为叶 > 全草 > 茎 > 根。应用“中药色谱指纹图谱相似度评价软件”生成了春柴胡药材的共有模式图, 共有 12 个共有峰, 各共有峰之间分离度较好, 精密性、重复性和稳定性试验中各共有峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均小于 3%, 符合指纹图谱要求。结论: 不同采收期和不同药用部位春柴胡的黄酮类成分差异显著, 本研究为春柴胡资源的综合利用开发提供了科学依据。

[关键词] 高效液相色谱; 指纹图谱; 总黄酮; 春柴胡

[中图分类号] R284 [文献标志码] A [文章编号] 1671-7783(2009)02-0139-04

Study of the content of flavonoids and HPLC fingerprint in *Bupleurum scorzonerifolium* Willd.

LI Jing, WANG Bo, ZHANG Lei, PAN Lu lin, ZHAO Ming, OUYANG Zhen

(School of Pharmacy, Jiangsu University, Zhenjiang Jiangsu 212013 China)

[Abstract] **Objective** To establish the method of total flavonoids and HPLC fingerprint in *Bupleurum scorzonerifolium* Willd. **Methods** The content of flavonoids was determined with ultraviolet-visible spectrophotometry. The HPLC was used to study of chromatogram of different collection period and parts. The fingerprint of *Bupleurum scorzonerifolium* Willd. was established. **Results** The better harvest time of *Bupleurum scorzonerifolium* Willd. was from April to May and flavonoids content was that leaf > whole plant > stem > root. The standard fingerprint of *Bupleurum scorzonerifolium* Willd. was originated from “The similarity evaluation system for chromatographic fingerprint of TCM” software. 12 common peaks existed in the fingerprint and each peak was separated well. The RSD of precision, repeatability and stability of all measurement were less than 3%. **Conclusion** There were significant differences among different collection period and different parts of *Bupleurum scorzonerifolium* Willd. for their content of flavonoids and this study will provide a scientific basis for the development of comprehensive utilization of the Radix Bupleuri.

[Key words] HPLC; fingerprint; flavonoids; *Bupleurum scorzonerifolium* Willd.

柴胡为常用的发散风热药, 有和解表里, 疏肝解郁, 升阳的功能。

在我国已有 2 000 多年的应用历史。中国药典 2005 年版收载的柴胡为伞形科植物柴胡 *Bupleurum chinense* DC. 或狭叶柴胡 *Bupleurum scorzonerifolium* Willd. 的干燥根^[1]。柴胡主要以根入药, 也有以全草为药用部位, 如江苏的大部分地区和安徽的东部

习用狭叶柴胡春季采收的带根全草(俗称“春柴胡”)入药^[2-4]。

江苏地区春柴胡资源丰富, 但目前尚无统一的质量控制指标, 为开发利用其资源, 完善其质量标准, 我们对春柴胡不同采收期、不同药用部位进行了总黄酮含量测定和 HPLC 指纹图谱研究, 以期为春柴胡资源综合利用和质量评价提供依据。

[基金项目] 江苏省中医药科技研究专项科研项目(H05007)

[作者简介] 李 静(1977-), 女, 硕士, 山西太原人; 欧阳臻(通讯作者), 教授, 博士生导师, E-mail: zhenouyang@ujs.edu.cn

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

UV22102PCS型紫外分光光度计[尤尼柯(上海)仪器有限公司]; SHB-III循环水式多用真空泵(郑州长城科工贸有限公司); HH-S数显恒温水浴锅。JASCO LC1500高效液相色谱系统(日本分光公司); N2000色谱工作站(浙江大学信息智能研究所); METTLER AE240分析天平(上海梅特勒-托利多仪器有限公司); 台式冷冻高速离心机 TGLL-18K(江苏太仓华美生化仪器有限公司)。甲醇为色谱纯(江苏汉邦科技有限公司), 水为娃哈哈纯净水, 其余试剂均为分析纯。芦丁(批号: 100080-200306)、槲皮素(批号: 0861-9901)、绿原酸(批号: 0753-9708)、山柰素(批号: 081-9003)、异鼠李素(批号: 0860-0107)购自中国药品生物制品检定所, 供含量测定用。

1.2 春柴胡药材来源

春柴胡药材采集于当地, 见表 1, 均由镇江市药品检验所张林松主任中药师鉴定, 药材均为 *Bupleurum scorzonnerfolium* Willd.

表 1 药材来源

Tab 1 Sources of medical material

编号	产地	性状	来源说明
1	句容	全草	自采 060319
2	句容	全草	自采 060402
3	句容	全草	自采 060416
4	句容	全草	自采 060501
5	句容	全草	自采 060514
6	句容	全草	自采 060528
7	句容	全草	自采 060720
8	句容	全草	自采 060826
9	句容	全草	自采 080420
10	句容	根	从 9 分离得到
11	句容	茎	从 9 分离得到
12	句容	叶	从 9 分离得到

1.3 总黄酮含量测定

1.3.1 供试品溶液的制备 取各批干燥的春柴胡药材 1 g 粉碎, 过 40 目筛, 精密称定, 置 50 ml 锥形瓶中, 精密加入 70% 乙醇 15 ml 在 60℃ 条件下加热回流提取 3 次, 每次 1 h 放冷, 过滤, 合并滤液, 浓缩后用 70% 乙醇定容至 25 ml 量瓶中, 即得。

1.3.2 对照品溶液的制备 称取干燥的芦丁对照品 0.0140 g 精密称定, 置 50 ml 量瓶中, 加适量甲醇, 置水浴微热使溶解, 放冷, 加甲醇至刻度, 摇匀, 即得(每 1 ml 中含无水芦丁 0.28 mg)。

1.3.3 标准曲线绘制 分别取经显色后的对照品溶液、样品溶液, 在 400~800 nm 波长范围内进行扫描, 结果对照品溶液、样品溶液最大吸收波长均为 510 nm。

取芦丁对照品溶液 1, 2, 3, 4, 5, 6 ml (280 μg/ml), 分别置 25 ml 量瓶中, 加水至 6 ml, 加 5% 亚硝酸钠溶液 1 ml 混匀, 放置 6 min, 加 10% 硝酸铝溶液 1 ml 混匀, 放置 6 min, 加 NaOH 试液 10 ml 再加水至刻度, 摇匀, 放置 15 min, 在 510 nm 下测定光密度 D 。以浓度 C (μg/ml) 为横坐标, 光密度 D 为纵坐标, 绘制标准曲线 ($D = 0.0124 \times C - 0.0145$)。 $r = 0.9999$ ($n = 6$), 线性范围为 11.2~67.2 μg/ml。

1.3.4 精密度试验 按照“1.3.1”项下的方法制备同一批供试液, 按标准曲线制备方法显色, 连续测定 6 次, 测得光密度值的 RSD 为 0.89%, 说明仪器的精密度较好。

1.3.5 稳定性试验 按照“1.3.1”项下的方法制备同一批供试液, 按标准曲线制备方法显色, 分别在 0, 5, 10, 20, 30, 60 min 测定光密度, RSD 为 1.90%, 说明样品溶液在 60 min 内稳定。

1.3.6 重复性试验 按照“1.3.1”项下的方法平行制备 6 份供试液, 按标准曲线制备方法显色, 并测定光密度, RSD 为 2.07%, 说明方法的重复性较好。

1.3.7 加样回收率试验 取已知总黄酮含量的样品 6 份各 1 g 精密称定, 分别精密加入含芦丁 10 mg 的对照品溶液, 按照“1.3.1”项下的方法制备供试液并测定总黄酮含量, 结果平均回收率为 98.2%, RSD 为 1.25%。

1.3.8 样品测定 取制备好的供试品溶液, 按标准曲线制备方法显色, 于 510 nm 波长处测定光密度, 由标准曲线求得总黄酮含量, 结果见表 2。

表 2 样品中的总黄酮含量

Tab 2 Content of total flavonoids in sample

编号	称样量 (g)	总黄酮含量 (%)
1	1.0017	1.13
2	1.0009	2.91
3	1.0020	3.82
4	1.0011	2.31
5	1.0014	2.50
6	1.0006	2.64
7	1.0022	1.07
8	1.0015	2.74
9	1.0013	2.46
10	1.0014	0.51
11	1.0008	1.25
12	1.0018	4.31

2 HPLC 指纹图谱建立

2.1 色谱条件

色谱柱为 Kromasil C18(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 检测波长 365 nm, 柱温 40℃, 流速 0.4 mL/min, 流动相为甲醇-水(0.5%冰醋酸), 进样体积为 20 μL。梯度洗脱程序: 0~10 min 甲醇为 30%~35%, 10~15 min 甲醇为 35%, 15~30 min 甲醇为 35%~50%, 30~50 min 甲醇为 50%~60%, 50~70 min 甲醇为 100%, 记录 70 min。

2.2 对照品溶液的制备

取绿原酸、槲皮素、山柰素与异鼠李素各对照品适量, 置 10 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 配成混合对照品溶液, 备用。

2.3 方法学考察

2.3.1 精密性试验 取按“1.3.1”项制备的供试品溶液连续进样 5 次, 结果 5 次测定图谱中的 12 个主要色谱峰的相对保留时间 RSD 的平均值为 0.53%, 相对峰面积 RSD 的平均值为 1.93%。

2.3.2 稳定性试验 取按“1.3.1”项制备的供试品溶液分别在 0.4、8、12、24 h 测定, 结果 5 次测定图谱中的 12 个主要色谱峰的相对保留时间 RSD 平均值为 0.14%, 相对峰面积 RSD 平均值为 2.69%。

2.3.3 重复性试验 同一批样品取 5 份, 按“1.3.1”项制备供试品溶液并进行检测, 结果 5 次测定图谱中的 12 个主要色谱峰的相对保留时间 RSD 平均值为 0.21%, 相对峰面积 RSD 平均值为 2.26%。

2.3.4 春柴胡不同采收期指纹图谱 按上述方法检测 1~8 号春柴胡样品指纹图谱(图 1)。采用“中

(图 2)。通过与对照品图谱(图 3)对照, 指认其中的 1 号峰为绿原酸, 10 号峰为槲皮素, 11 号峰为山柰素, 12 号峰为异鼠李素。对照指纹图谱中各共有峰的相对保留时间分别为 0.379, 0.517, 0.870, 1.000, 1.060, 1.124, 1.166, 1.197, 1.282, 1.378, 1.641, 1.708。相对峰面积分别为 0.055, 0.050, 0.058, 1.000, 0.030, 0.018, 0.070, 0.176, 0.016, 0.056, 0.004, 0.019。8 批不同采收期春柴胡样品与共有模式对照指纹图谱的相似度分别为 0.975, 0.993, 0.997, 0.996, 0.991, 0.994, 0.979, 0.990。

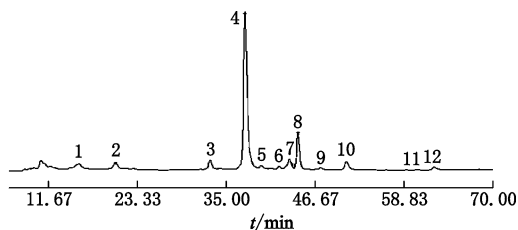
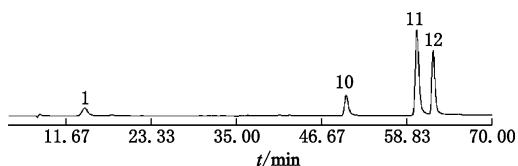


图 2 春柴胡共有指纹图谱

Fig 2 Common HPLC chromatogram of *Bupleurum scorzoniferifolium* W. Willd.

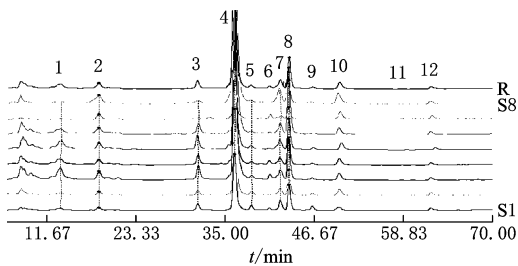


1: 绿原酸; 10 槲皮素; 11: 山柰素; 12 异鼠李素

图 3 对照品 HPLC 图谱

Fig 3 HPLC chromatogram of reference substance

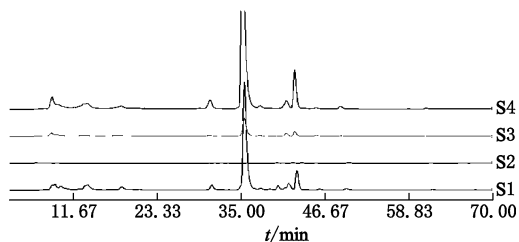
2.3.5 春柴胡不同药用部位的指纹图谱 将于 2008 年 4 月 20 号采集的春药材的根、茎、叶、全草 4 个部分进行指纹图谱分析, 结果见图 4。由图中可以看出, 春柴胡根、茎、叶 3 个部位的指纹图谱差异较大, 叶与全草指纹图谱的相似程度较高, 表明两者化学成分组成差别不大。



编号见表 1, R 为对照指纹图

图 1 不同采收期春柴胡样品匹配色谱图

Fig 1 Matched chromatograms of different collection period



S1-S4 为 9-12 号药材

图 4 春柴胡不同药用部位的 HPLC 图谱

Fig 4 HPLC chromatogram of different parts of *Bupleurum scorzoniferifolium* W. Willd.

药色谱指纹图谱相似度评价系统”软件生成春柴胡样品共有模式的对照指纹图谱, 得到 12 个共有峰

3 讨论

3.1 色谱条件的选择

3.1.1 检测波长的选择 比较了 256 270 325 365 nm 各波长下的色谱图,在 365 nm 波长下色谱图基线稳定,包含的信息量较大,峰信号强。

3.1.2 柱温、流速和流动相比比例的选择 试验中考察了甲醇-水、甲醇-0.1% 冰醋酸水和甲醇-0.5% 冰醋酸水,结果甲醇-0.5% 冰醋酸水峰形好。春柴胡药材所含化学成分较多且结构相近,采用等度洗脱方式很难将色谱峰分开,故本试验采用梯度洗脱以实现其良好分离。同时考察了不同流速(0.3 0.4 0.5 ml/min),在 0.4 ml/min 时峰形及分离度较好;对不同柱温(25℃, 30℃, 35℃, 40℃)进行了比较,在 40℃柱温条件下峰分离度较好。在此色谱条件下考察了洗脱时间为 120 min 的图谱,所有的指纹峰在 70 min 内出现,故确定记录时间为 70 min。

3.2 提取条件的选择

以总黄酮含量、出峰数目、峰强度为指标,实验中对不同浓度的提取溶剂(甲醇、乙醇),提取方法(超声、回流、热浸、冷浸),提取温度(50℃, 60℃, 70℃, 80℃),料液比(1:8 1:10 1:15 1:20),提取时间(0.5 1 1.5 2 h)和提取次数(1 2 3)进行了考察,并通过正交试验最后确定提取条件:70% 乙醇,料液比为 1:15 60℃回流提取 3 次,每次 1 h 的效果最好。

3.3 春柴胡总黄酮含量及 HPLC 指纹图谱结果分析

由表 2 可以看出,8 月 26 号采收的春柴胡总黄酮含量较高,因为此时期采收样品含有柴胡果实,而

柴胡果实中总黄酮含量更高^[5],除此样品外,4 月 16 号总黄酮含量最高,在 4 5 月份采收的春柴胡均比其他采收期样品总黄酮含量高,明确春柴胡最佳采收季节应为 4 5 月。由表 2 和图 4 可以看出春柴胡叶样品峰强度最高,峰数目最多,总黄酮含量为春柴胡叶 > 全草 > 茎 > 根。由 HPLC 图谱可以看出 4 号峰为春柴胡黄酮类成分的特征成分,占总共有峰面积的 50% 以上,有必要对其进行分离纯化研究,明确其结构及其在春柴胡药效中所起的作用。

3.4 小结与展望

我们仅初步研究了不同采收期和不同部位的春柴胡药材总黄酮含量测定及 HPLC 指纹图谱分析。柴胡药材中还含有皂苷、挥发油、木脂素等化学成分,且中药的药效是多成分的协同作用,因此还需要对皂苷类、挥发油类等成分进行研究,才能达到对春柴胡最佳采收期的确定和全面质量控制,从而为春柴胡资源的综合利用开发提供依据。

[参考文献]

- [1] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中国药典[M]. 北京:人民卫生出版社, 2005: 198.
- [2] 中国医学科学院. 中药志[M]. 北京:人民卫生出版社, 1959: 366-374.
- [3] 徐国钧. 常用中药材品种整理和质量研究[M]. 福州:福建科学技术出版社, 1997: 1.
- [4] 潘胜利, 柏巧明, 包雪声, 等. 中国药用柴胡原色图志[M]. 上海:上海科学技术文献出版社, 2002: 3.
- [5] 刘玉法. 柴胡果实化学成分及其质量标准研究[D]. 北京:北京中医药大学, 2005.

[收稿日期] 2008-11-20 [本文编辑] 郭欣