

HPLC 法测定滇柴胡中槲皮素和异鼠李素的含量

马跃新¹, 刘 黔², 吴永康³

- (1. 昆明市食品药品检验所 药品检验中心, 云南 昆明 650032;
2. 云南华测检测认证集团股份有限公司, 云南 昆明 650214; 3. 昆明医科大学 海源学院, 云南 昆明 650106)

摘要: 为建立滇柴胡中槲皮素和异鼠李素含量测定方法. 采用高效液相色谱法测定其含量, 检测波长 360 nm, 流动相为 $V(\text{甲醇}):V(0.4\% \text{磷酸})=45:55$, 流速 1.0 mL/min. 结果表明: 槲皮素在 5.18~207.20 $\mu\text{g/mL}$ ($r=0.9998$) 有良好线性关系, 检出限 0.1260 $\mu\text{g/mL}$, 定量限 0.4201 $\mu\text{g/mL}$, 加标回收率 92.4%, RSD 为 0.51%; 异鼠李素在 1.026~20.520 $\mu\text{g/mL}$ ($r=0.9997$) 有良好线性关系, 检出限 0.1654 $\mu\text{g/mL}$, 定量限 0.5516 $\mu\text{g/mL}$, 加标回收率 94.2%, RSD 为 1.38%. 由此说明, HPLC 法能快速、准确地测定滇柴胡中槲皮素和异鼠李素的含量.

关键词: 滇柴胡; 槲皮素; 异鼠李素; 高效液相色谱法; 含量测定

中图分类号: R284.1; R927.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674-5639 (2019) 03-0088-05

DOI: 10.14091/j.cnki.kmxyxb.2019.03.019

Content Determination of Quercetin and Isorhamnetin in the Dianchihu by HPLC

MA Yuexin¹, LIU Qian², WU Yongkang³

- (1. Center for Drug Control, Kunming Institute for Food and Drug Control, Kunming, Yunnan, China 650032;
2. Yunnan Centre Testing International Group Co., Ltd., Kunming, Yunnan, China 650214;
3. Haiyuan College, Kunming Medical University, Kunming, Yunnan, China 650106)

Abstract: To establish a method for determining the content of quercetin and isorhamnetin in the Dianchihu. HPLC was used with the detection wavelength 360 nm, the flow phase $V(\text{methanol}):V(0.4\% \text{phosphoric acid})=45:55$ and the flow speed 1.0 mL/min. The result showed that Quercetin in 5.18—207.20 $\mu\text{g/mL}$ ($r=0.9998$) has a good linear relationship within the scope of detection limit of 0.1260 $\mu\text{g/mL}$, quantitative limit of 0.4201 $\mu\text{g/mL}$ and the average recovery rate of quercetin 92.4%. Isorhamnetin at 1.026—20.520 $\mu\text{g/mL}$ ($r=0.9997$) has a good linear relationship within the scope of a detection limit of 0.1654 $\mu\text{g/mL}$, quantitative limit of 0.5516 $\mu\text{g/mL}$ and the average recovery rate of isorhamnetin 94.2% with RSD of 0.51% and 1.38% ($n=6$) respectively. HPLC method can quickly and accurately determine the content of quercetin and isorhamnetin in the Dianchihu.

Key words: Dianchihu; quercetin; isorhamnetin; HPLC; content determination

滇柴胡为伞形科植物竹叶柴胡 (*Bupleurum marginatum* Wall. ex DC.) 和小柴胡 (*B. hamiltonii* N. P. Balak.) 的干燥全草. 夏、秋两季花初开时采收. 前者习称“竹叶柴胡”, 后者称为“小柴胡”, 现收载于 2005 年版《云南省中药饮片标准》(第 1 册)^[1], 系云南省地方常用习用品种之一, 但 2015 年版《中国药典》^[2] 未收载该品种. 为与国家标准药材名称相区别, 将“竹叶柴胡”和“小柴胡”统一命名为“滇柴胡”. 其主要用于治疗少阳

病、寒热往来、口苦咽干、胸肋胀满、头痛目眩、月经不调、中气下陷等症. 滇柴胡产于云南的德钦、丽江、鹤庆、宾川、大理、砚山、宜良、昆明等地.

滇柴胡的地上部分主要含有槲皮素、异鼠李素、槲皮素-3-O- β -D-葡萄糖苷、芦丁等黄酮类、皂苷类以及其他甾体类成分^[3], 而黄酮类和皂苷类是滇柴胡的主要化学成分. 因此, 本研究拟采用 HPLC 法测定滇柴胡中槲皮素和异鼠李素的含量, 以期为进一步控制滇柴胡的内在质量, 以及开发利

收稿日期: 2019-01-08

作者简介: 马跃新 (1979—), 男, 云南江川人, 副主任药师, 主要从事药品、保健食品和化妆品检验检测研究.

用滇柴胡的药用价值提供参考.

1 材料与方法

1.1 试剂

实验用的5批市售不同批次的柴胡药材品种, 经检验均为滇柴胡. 异鼠李素对照品(中国食品药品检定研究院, 批号: 100081-200907); 槲皮素对照品(中国食品药品检定研究院, 批号: 110860-200406); 甲醇、磷酸、乙醇、三氯甲烷、石油醚、正丁醇、甲苯、甲酸乙酯、甲酸等均为分析纯或以上规格; 硅胶G板(青岛海洋化工厂分厂, 100 mm × 200 mm, 批号: 20170518); 水为超纯水.

1.2 仪器

高效液相色谱仪(美国安捷伦科技公司, Agilent1260), 高效液相色谱仪(美国赛默飞世尔科技公司, UltiMate3000), 高效液相色谱仪(美国沃特世科技公司, e2695); 电子分析天平(梅特勒公司, AL204); 恒温水浴锅(北京市永光明医疗仪器有限公司, DZKW-D-6); 高速万能粉碎机(温岭市林大机械有限公司, DFY-200); 薄层成像系统(CAMAG公司, TLC Visualizer); 半自动点样仪(GAMAG公司, Linomat 5); 数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司, KQ5200DB); 自动标准溶液配制仪(睿科仪器有限公司, Auto Prep 200).

1.3 方法

1.3.1 混合对照品溶液制备

1) 精密称取槲皮素、异鼠李素对照品适量, 分别用甲醇溶解制成每1 mL含500 μg的槲皮素母液和每1 mL含50 μg的异鼠李素母液, 然后用自动标准

溶液配制仪分别吸取槲皮素和异鼠李素母液适量, 制成每1 mL含槲皮素5 μg、异鼠李素1 μg的混合对照品溶液1. 2) 同发制备每1 mL含槲皮素10 μg、异鼠李素3 μg的混合对照品溶液2; 每1 mL含槲皮素50 μg、异鼠李素5 μg的混合对照品溶液3; 每1 mL含槲皮素100 μg、异鼠李素7 μg的混合对照品溶液4; 每1 mL含槲皮素200 μg、异鼠李素10 μg的混合对照品溶液5.

1.3.2 供试品溶液的制备

分别精密称取5批次滇柴胡药材粉末各2.5 g, 每批次平均制备3份平行样品, 各精密加入95%乙醇50 mL, 加热回流60 min, 滤过, 滤液蒸干, 残渣加水25 mL溶解, 用正丁醇提取3次(20, 15, 15 mL), 取正丁醇层蒸干, 残渣加甲醇溶解, 定容至25 mL容量瓶中, 作为供试品溶液.

1.3.3 色谱条件

色谱柱: Agilent C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), Waters C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), Synchronis C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm); UVW检测器, 检测波长360 nm, 流动相为V(甲醇): V(0.4%磷酸) = 45:55, 流速为1.0 mL/min, 柱温40℃, 进样量10 μL.

2 结果与分析

2.1 系统适用性及色谱柱耐用性实验

分别用与上述品牌不同的高效液相色谱仪对对照品溶液和供试品溶液进行测定, 其分离度均大于5, 理论板数均大于6 000, 峰对称性良好. 如图1~图3所示.

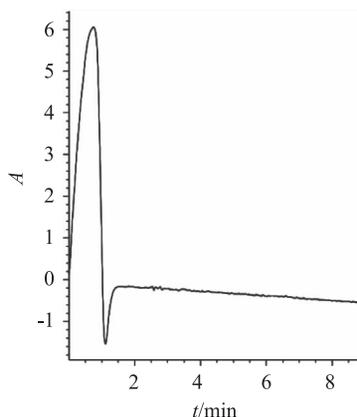


图1 样品空白色谱图

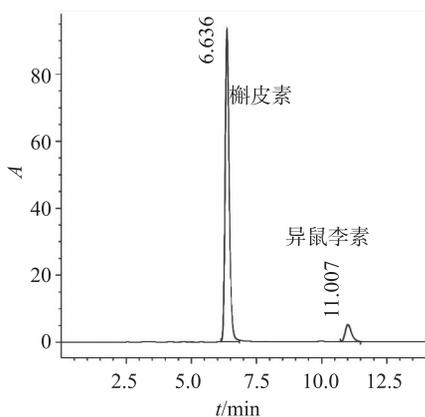


图2 对照品溶液色谱图

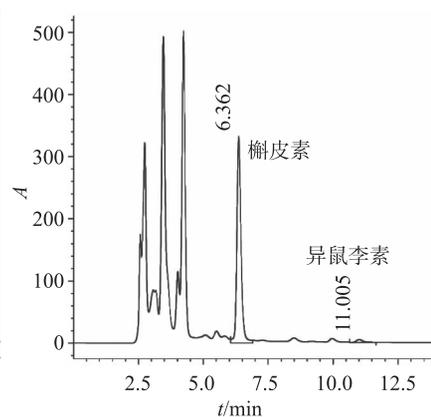


图3 供试品溶液色谱图

2.2 绘制标准曲线

将“1.3.1”项下制成的系列混合对照品溶液依次进样,测定峰面积.以表1中的峰面积为纵坐标,混合对照品质量浓度($\mu\text{g}/\text{mL}$)为横坐标,绘制标

准曲线并进行回归计算,得槲皮素的标准曲线方程: $A_1 = 20.59483C_1 - 28.07389$, $r = 0.9998$;异鼠李素的标准曲线方程: $A_2 = 18.51947C_2 - 3.78654$, $r = 0.9997$.两者均呈现良好的线性关系.

表1 槲皮素和异鼠李素标准曲线峰面积

槲皮素	质量浓度/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	5.180	10.360	51.800	103.600	207.200
	峰面积	63.1342	170.0264	1012.0210	2148.6490	4225.4540
异鼠李素	质量浓度/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	1.026	3.078	5.130	7.182	20.520
	峰面积	14.6160	50.2532	87.3281	132.6332	376.4855

2.2.1 检出限

将已知质量浓度样品的信号与噪声信号进行比较,以信噪比为3:1时的质量浓度确定检出限.经实验测得槲皮素的检出限为 $0.1260 \mu\text{g}/\text{mL}$,异鼠李素的检出限为 $0.1654 \mu\text{g}/\text{mL}$.

2.2.2 定量限

以信噪比为10:1时的质量浓度确定定量限.经实验测得槲皮素的定量限为 $0.4201 \mu\text{g}/\text{mL}$,异鼠李素定量限为 $0.5516 \mu\text{g}/\text{mL}$.

2.3 重复性实验

取同一批样品,按“1.3.2”项下制备成供试品溶液,供试品溶液进样6次,按色谱条件测定峰面积,结果见表2.

2.4 稳定性试验

2.4.1 溶液时间稳定性实验

精密称取同一批供试品适量,按“1.3.2”项下制备成供试品溶液,并按照色谱条件进样2次,分别在制备后24,48,72h内测定峰面积,计算其质量浓度及RSD值,见表3.

表2 重复性实验结果

序号	$w/(\text{mg} \cdot \text{g}^{-1})$		RSD/%	
	槲皮素	异鼠李素	槲皮素	异鼠李素
1	1.9894	0.0348		
2	1.9890	0.0351		
3	2.0020	0.0352		
4	1.9930	0.0356	0.26	0.91
5	1.9944	0.0355		
6	2.0005	0.0350		

表3 稳定性实验结果

t/h	质量浓度/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$		平均质量浓度/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$		RSD/%	
	槲皮素	异鼠李素	槲皮素	异鼠李素	槲皮素	异鼠李素
24	186.5082	4.1101	187.0011	4.1205	1.25	1.72
	187.4941	4.1310				
48	184.5878	3.9450	183.4644	4.0000	1.25	1.72
	182.3410	4.0549				
72	183.1889	3.9326	182.6610	3.9589	1.25	1.72
	182.1330	3.9854				

通过计算得到槲皮素的RSD为1.25%,异鼠李素的RSD为1.72%,二者均小于2%,表明槲皮素和异鼠李素在72h内稳定.

2.4.2 注温稳定性实验

精密量取同一批次供试品溶液适量,按照色谱条件分别在 20°C , 30°C , 40°C 的柱温条件下测定

样品峰面积,并计算质量浓度及RSD值,见表4.

计算得到温度稳定性实验槲皮素的RSD为1.24%,异鼠李素的RSD为1.01%,二者均小于2%,表明在 $20 \sim 40^\circ\text{C}$ 范围内温度对槲皮素和异鼠李素质量浓度影响不大.由于温度越高,出峰快,则分离度越好,因此选取 40°C 作为柱温.

表4 柱温稳定性实验结果

温度/°C	质量浓度/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)		平均质量浓度/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)		RSD/%	
	槲皮素	异鼠李素	槲皮素	异鼠李素	槲皮素	异鼠李素
20	196.110 0	3.485 0	196.084 5	3.466 5	1.24	1.01
	196.059 0	3.448 0				
30	191.169 0	3.432 0	191.297 0	3.425 5		
	191.425 0	3.419 0				
40	193.855 2	3.396 0	194.076 7	3.397 4		
	194.298 2	3.398 8				

2.5 加标回收率实验

精密称取已知质量浓度的样品 0.5 g, 按“1.3.2”项下制备成供试品溶液, 分别加入槲皮素及异鼠李素对照品适量, 按照样品制备方法制备

成质量浓度为 35 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 槲皮素对照品溶液及质量浓度为 3.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 异鼠李素溶液. 同条件进样分析, 结果带入标准曲线计算质量浓度, 依次计算回收率, 结果见表 5.

表5 加标回收率实验结果

成分	序号	样品量/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	理论加入量/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	实测值/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
槲皮素	1	138.850 0	34.950 0	171.157 9	0.928 4	92.40	0.51
	2	138.850 0	34.950 0	170.943 7	0.922 1		
	3	138.850 0	34.950 0	170.884 6	0.920 3		
	4	138.850 0	34.950 0	171.113 8	0.927 1		
	5	138.850 0	34.950 0	171.276 9	0.932 0		
	6	138.850 0	34.950 0	171.574 0	0.940 8		
异鼠李素	1	3.402 0	3.430 0	6.689 1	0.957 4	94.20	1.38
	2	3.402 0	3.430 0	6.590 9	0.928 8		
	3	3.402 0	3.430 0	6.621 3	0.937 6		
	4	3.402 0	3.430 0	6.688 3	0.957 2		
	5	3.402 0	3.430 0	6.619 4	0.937 1		
	6	3.402 0	3.430 0	6.615 6	0.936 0		

2.6 样品含量测定

精密称取每批次样品 2.5 g, 每批次样品平行取 2 份, 按“1.3.2”项下制备成供试品溶液. 按照色谱条件每份进样 2 次, 测定峰面积并计算含量, 结果见表 6.

3 讨论与结论

3.1 讨论

3.1.1 提取方法的确定

根据《云南省中药饮片标准》^[1], 供试品溶液有 10 种提取方法. 分别将这 10 种方法提取出来的 10 个供试品及对照品溶液各取 2 μL , 用半自动点

样仪点于同一硅胶 G 板, 并置于展开缸中, 展开系统为 $V(\text{甲苯}):V(\text{甲酸乙酯}):V(\text{甲酸}) = 10:8:1$, 饱和 10 min, 展开, 取出晾干, 喷以 10% 硫酸乙醇显色剂, 在 105 $^{\circ}\text{C}$ 加热板上加热至斑点显色清晰, 然后分别置于日光和紫外灯光 (365 nm) 下视检, 薄层色谱图见图 4 (日光) 和图 5 (365 nm 荧光). 图 4 和图 5 中斑点从左往右看, 斑点 1, 8, 15 为槲皮素对照品, 斑点 2, 9, 16 为异鼠李素对照品, 斑点 3~7 和 10~14 分别为方法 1~方法 10 提取的供试品.

由图 4 和图 5 可见, 10 种提取方法中的“方法 9”提取简便、分离效果好、杂质干扰少、专属性强,

因此,采用“方法9”作为供试品溶液的提取方法.

表6 样品含量测定结果

批号	$w/(mg \cdot g^{-1})$		$w_{平均}/(mg \cdot g^{-1})$	
	槲皮素	异鼠李素	槲皮素	异鼠李素
A-1-1	2.000 2	0.037 2		
A-1-2	2.034 6	0.037 7		
A-2-1	1.864 5	0.041 1	1.943 4	0.039 3
A-2-2	1.874 3	0.041 3		
B-1-1	1.940 8	0.058 7		
B-1-2	1.994 2	0.058 7		
B-2-1	1.796 8	0.053 1	1.889 0	0.056 2
B-2-2	1.824 4	0.054 4		
C-1-1	1.180 4	0.016 3		
C-1-2	1.162 6	0.015 7		
C-2-1	1.349 9	0.037 2	1.263 0	0.026 4
C-2-2	1.359 0	0.036 4		
D-1-1	1.627 8	0.039 4		
D-1-2	1.631 1	0.040 0		
D-2-1	1.807 5	0.047 9	1.720 6	0.040 0
D-2-2	1.815 9	0.048 6		
E-1-1	4.028 6	0.146 6		
E-1-2	4.048 4	0.146 5		
E-2-1	3.671 9	0.141 1	3.855 2	0.143 8
E-2-2	3.671 8	0.140 9		

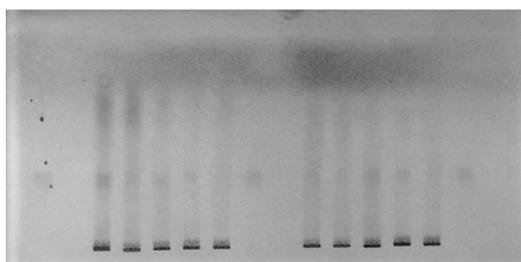


图4 10种提取方法的薄层色谱图(日光)

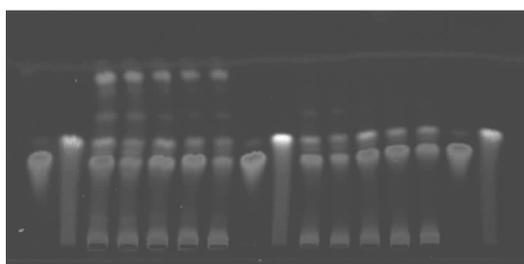


图5 10种提取方法的薄层色谱图(荧光)

3.1.2 色谱条件的优化

1) 流动相的选择. 本实验比较了 $V(\text{甲醇})$:

$V(\text{水})$ 、 $V(\text{甲醇})$: $V(0.4\% \text{磷酸溶液})$ 、 $V(\text{乙腈})$: $V(0.4\% \text{磷酸溶液})$ 几种不同比例的流动相, 结果发现 $V(\text{甲醇})$: $V(0.4\% \text{磷酸}) = 45:55$ 作为流动相时, 系统对待测组分的保留时间短, 且分离效果好, 因此选用 $V(\text{甲醇})$: $V(0.4\% \text{磷酸}) = 45:55$ 作为流动相.

2) 检测波长的确定. 由文献 [3~11] 可知, 槲皮素和异鼠李素在 360 nm 处均有最大吸收波长, 因此选用 360 nm 作为检测波长.

3.1.3 系统适应性

本实验分别使用 Agilent1260, Thermo U3000 和 Waters e2695 高效液相色谱仪进行实验, 结果发现, 槲皮素和异鼠李素的色谱柱理论塔板数均在 8 000 以上, 说明该色谱系统分离效能良好. 此外, 待测物质色谱峰与相邻色谱峰之间的分离度均大于 5, 分离度良好.

3.2 结论

采用高效液相色谱法测定滇柴胡中槲皮素和异鼠李素的含量, 以 360 nm 为检测波长, 在流动相 $V(\text{甲醇})$: $V(0.4\% \text{磷酸}) = 45:55$ 条件下, 槲皮素的标准曲线 $A_1 = 20.59483C_1 - 28.07389$, $r = 0.9998$, 呈现良好线性关系, 检出限为 $0.1260 \mu\text{g/mL}$, 定量限为 $0.4201 \mu\text{g/mL}$, 重复性为 0.26%, 时间稳定性为 1.25%, 温度稳定性为 1.24%, 加标回收率为 92.4%; 异鼠李素的标准曲线为 $A_2 = 18.51947C_2 - 3.78654$, $r = 0.9997$, 呈现良好线性关系, 检出限为 $0.1654 \mu\text{g/mL}$, 定量限为 $0.5516 \mu\text{g/mL}$, 重复性为 0.91%, 时间稳定性为 1.72%, 温度稳定性为 1.01%, 加标回收率为 94.2%. 由上述可知, 实验达到了预期的验证目的. 因此, HPLC 法能够快速、准确地测定滇柴胡中槲皮素和异鼠李素的含量, 可为滇柴胡的进一步开发利用提供可靠的质量控制依据.

[参考文献]

- [1] 云南省食品药品监督管理局. 云南省中药饮片标准: 第1册 [M]. 昆明: 云南美术出版社, 2005.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 四部 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015.
- [3] 刘志海, 范红梅, 金昭, 等. 兴仁金线莲中槲皮素、异鼠李素的薄层鉴别及不同部位的含量测定 [J]. 中国民族民间医药, 2016, 25 (24): 25-27.

(下转第98页)

式压缩性,支持数据的顺序传输、使用和存储,所以可以适用于多线程、低内存、序列式的数据传输与使用需求的场合,比如手机、PDA等,也可以用于网络多媒体的快速传递与播放,以及图书馆的海量电子图书的压缩存放。

5.2 小结

通过对图像压缩算法与哈夫曼编码的分析,提出一种基于标识的变位对折无损压缩算法,该算法结合了两种算法的各自最优环境,并构建适合的策略,实现两种算法的优化组合,解决了实际环境中遇到的数据大量顺序传输、使用和存储问题。

[参考文献]

- [1] 陈昌主. 数据压缩算法研究与设计 [D]. 长沙: 中南大学, 2010.
- [2] 曹雪虹. 信息论与编码 [M]. 北京: 清华大学出版社, 2009.
- [3] 田宝玉, 杨洁, 贺志强. 信息论基础 [M]. 北京: 人民邮电出版社, 2008.
- [4] 吴乐南. 数据压缩 [M]. 2版. 北京: 电子工业出版社, 2005.
- [5] 姜磊, 黄广君. 自适应的无损数据压缩算法 [J]. 计算机工程, 2008 (1): 102 - 104.
- [6] 孔祥魁. 运动图像序列中关键关节点的跟踪优化仿真 [J]. 计算机仿真, 2016 (2): 423 - 426
- [7] 蔡明, 乔文孝, 鞠晓东, 等. 一种新的数据无损压缩编码方法 [J]. 电子与信息学报, 2014, 36 (4): 1008 - 1012.
- [8] 关雪梅. 基于 Matlab 的小波变换图像压缩算法研究 [J]. 赤峰学院学报 (自然科学版), 2018, 34 (9): 58 - 59.
- [9] 蔡楠, 李萍. 基于 KPCA 的图像压缩方法 [J]. 无线电工程, 2018, 48 (12): 1061 - 1064.
- [10] 王慧, 宋淑蕴. 基于 KCPA 提取特征和 RVM 的图像分类 [J]. 吉林大学学报 (理学版), 2017, 55 (2): 357 - 362.
- [11] 无家安. 数据压缩技术及应用 [M]. 北京: 科学出版社, 2009.
- [12] 王盼盼, 姚旭日, 刘雪峰, 等. 基于行扫描测量的运动目标压缩成像 [J]. 物理学报, 2017, 66 (1): 4201 - 4209.
- [13] 王晓东. 算法设计与分析 [M]. 北京: 清华大学出版社, 2010.
- [14] 方炫苏, 黄樟灿, 陈亚雄. 基于主成分分析和分层树集合划分的 Huffman 算法图像压缩研究 [J]. 浙江大学学报 (理学版), 2018, 45 (1): 55 - 58.
- [15] 谢龙汉. SPSS 统计分析与数据挖掘 [M]. 北京: 电子工业出版社, 2012.
- [4] 周伟, 蔡光明, 黄鹤慧, 等. 高效液相色谱法测定小叶黑柴胡中槲皮素与异鼠李素的含量 [J]. 中国药房, 2017, 18 (9): 693 - 694.
- [5] 宋海龙, 赵璐, 杨海燕. HPLC 法测定沙枣中槲皮素和异鼠李素的含量 [J]. 新疆医科大学学报, 2015, 38 (12): 1510 - 1516.
- [6] 郭毅新, 唐超, 高文分. HPLC 法测定滇柴胡中柴胡皂苷 d 的含量 [J]. 云南中医中药杂志, 2014, 35 (8): 67 - 68.
- [7] 吕飞, 翁德会, 吴士筠, 等. HPLC 法测定凹叶景天中槲皮素和异鼠李素含量 [J]. 化学与生物工程, 2009, 26 (8): 91 - 94.
- [8] 范刚, 普元柱, 杜娟, 等. HPLC 测定印楝叶中的槲皮素和异鼠李素 [J]. 华西药学杂志, 2010, 25 (3): 367 - 368.
- [9] 杨龙辉, 伍丕娥, 王天志. HPLC 测定沙棘膏中槲皮素和异鼠李素的含量 [J]. 华西药学杂志, 2002, 17 (2): 130 - 131.
- [10] 王利胜, 朱盛华, 许晓峰. HPLC 法测定水芹中槲皮素和异鼠李素 [J]. 中草药, 2004, 35 (9): 1061 - 1062.
- [11] 全国认证认可标准化技术委员会. 合格评定 化学分析方法确认和验证指南: GB/T 27417—2017 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2017.

(上接第 92 页)