

# HPLC法同时测定黑柴胡药材中柴胡皂苷a和d的含量<sup>Δ</sup>

刘来正\*, 冀小君, 捱榜琴\*(山西药科职业学院, 太原 030031)

中图分类号 R284.1;R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)23-2147-03  
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.23.14

**摘要** 目的:建立同时测定黑柴胡药材中柴胡皂苷a和d含量的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为Inertsil C<sub>18</sub>(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为乙腈-水(38:62, V/V),流速为1.0 ml/min,检测波长为210 nm。结果:柴胡皂苷a和d的进样量分别在0.425~6.375 μg和0.130~3.250 μg范围内与各自峰面积积分值呈良好线性关系(*r*均为0.999 9);精密性、稳定性和重复性试验的RSD<2%;平均加样回收率分别为96.66%(RSD=1.11%, *n*=6)和96.20%(RSD=0.78%, *n*=6)。结论:该方法简便、重复性好,结果稳定、可靠,可用于黑柴胡药材的质量控制。

**关键词** 高效液相色谱法;柴胡皂苷a;柴胡皂苷d;黑柴胡;含量测定

## Simultaneous Determination of Saikosaponin a and d in *Bupleurum smithii* by HPLC

LIU Lai-zheng, JI Xiao-jun, YA Bang-qin(Shanxi Pharmaceutical Occupational College, Taiyuan 030031, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To develop a method for the simultaneous determination of saikosaponin a and d in *Bupleurum smithii*. METHODS: HPLC method was adopted. Inertsil C<sub>18</sub>(250 mm×4.6 mm, 5 μm) column was used with mobile phase consisted of acetonitrile-water (38:62, V/V) at flow rate of 1.0 ml/min. The detection wavelength was set at 210 nm. RESULTS: The linear range of saikosaponin a and d were 0.425-6.375 μg(*r*=0.999 9) and 0.130-3.250 μg(*r*=0.999 9). RSD of precision, stability and reproducibility tests were all lower than 2%. The average recoveries were 96.66% (RSD=1.11%, *n*=6) and 96.20% (RSD=0.78%, *n*=6) for saikosaponin a and d, respectively. CONCLUSIONS: The method is simple, reproducible, stable and reliable. It can be used for the quality control of *B. smithii*.

**KEYWORDS** HPLC; Saikosaponin a; Saikosaponin d; *Bupleurum smithii*; Content determination

黑柴胡药材为伞形科(Umbelliferae)柴胡属(*Bupleurum*)植物黑柴胡*B. smithii* Wolff或小叶黑柴胡*Bupleurum smithii* Wolff var. *parvifolium* Shan et Y. Li的干燥根,具有“疏散退热、升阳疏肝”之功效,主要用于感冒发热、寒热往来、疟疾、胸胁

胀痛、月经不调、子宫脱垂、脱肛等<sup>[1]</sup>病症。黑柴胡植物分布于山西、河北、陕西、河南、青海、甘肃、内蒙古、宁夏等省区,主产于山西(宁武、五台、浑源、灵丘、神池、广灵、代县、娄烦等县)<sup>[2]</sup>、河北(小五台山、杨家坪、东陵)<sup>[3]</sup>、甘肃(张掖、白银、兰州、定西、

统洗脱后,木蝴蝶苷B的分离度能达到测定要求,且色谱图基线平稳、色谱峰对称性好,故选其作为流动相。

本研究对广东、广西、云南、海南等不同产地的木蝴蝶药材中木蝴蝶苷B的含量进行测定,结果显示,不同产地木蝴蝶药材中木蝴蝶苷B的含量存在差异。造成这种差异的主要原因在于药材在生长过程中受产地气候、环境、栽培方法等因素的影响。

综上,本研究所建方法可用于木蝴蝶药材的质量控制。

### 参考文献

- [1] 罗献瑞.实用中草药彩色图集:第1册[M].广州:广东科学技术出版社,1992:338-339.
- [2] 王强,徐国钧.道地药材图典:西南卷[M].1版.福州:福建科学技术出版社,2003:119-120.
- [3] 郑虎占,董泽宏,余靖.中药现代研究与应用:第1卷

Δ 基金项目:山西省中药材、中药饮片地方标准研究项目(No.2011019A)

\* 副教授。研究方向:资源开发与品质鉴定。电话:0351-7820668。E-mail:laizhengliu@163.com

# 通信作者:教授。研究方向:中药鉴定和药用植物栽培。电话:0351-7820668。E-mail:shanxi\_xf@163.com

[M].1版.北京:学苑出版社,1997:924-925.

- [4] 曹阳阳,晏仁义,杨滨,等.HPLC测定广西木蝴蝶中木蝴蝶苷B和黄芩苷的含量[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(4):82.
- [5] 张爱玲,文毅,傅国强,等.RP-HPLC法测定木蝴蝶中黄芩苷的含量[J].江西中医学院学报,2006,18(5):31.
- [6] 仝会娟,张强,康琛.木蝴蝶药材中黄芩素和白杨素的含量测定[J].中国中医药信息杂志,2009,16(12):52.
- [7] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2010年版.北京:中国医药科技出版社,2010:附录47,附录53.
- [8] 姚丽红.浅谈中药材的灰分含量[J].基层中药杂志,1996,10(3):24.
- [9] 傅泉炎.中药含水量与中药仓储质量的关系[J].中国药业,2002,11(5):70.
- [10] 杨增,张君,张福,等.中药饮片中水分、总灰分、酸不溶性灰分的连续测定[J].中国卫生检验杂志,2009,5(5):68.
- [11] 黄楚权,熊斌.RP-HPLC法测定罗布麻叶饮片中金丝桃苷的含量[J].中国药房,2013,24(23):2180.

(收稿日期:2014-02-08 修回日期:2014-03-31)

临夏、甘南等市、州)<sup>[1]</sup>和青海(湟源、湟中、大通、泽库、玉树、循化、乐都、民和、互助、班玛等县)等省区<sup>[5]</sup>。据考证,自古以来,柴胡属植物绝大多数种类在产地均作柴胡药用<sup>[6]</sup>,黑柴胡亦在山西、甘肃、宁夏、青海等地习惯作柴胡收购、销售和供临床入药使用<sup>[7-8]</sup>。近年来,针对黑柴胡的变种,小叶黑柴胡在质量控制方面研究报道较多<sup>[9-14]</sup>,《甘肃省中药材标准》2009年版黑柴胡项下也主要针对小叶黑柴胡制定了含量测定标准,但未见针对黑柴胡植物和药材质量控制和含量测定的文献。参考文献<sup>[15-16]</sup>和《甘肃省中药材标准》2009年版黑柴胡项下含量测定项,均用高效液相色谱(HPLC)法,以柴胡皂苷a和柴胡皂苷d的总量来控制药材内在质量。且柴胡总皂苷和柴胡皂苷a、d已被证实具有解热、镇痛、抗炎、免疫调节、抗肝损伤、抗肝纤维化等药理活性<sup>[17]</sup>。因此,本研究亦采用HPLC法,对黑柴胡药材根的柴胡皂苷a和柴胡皂苷d的总量进行测定,以期在黑柴胡内在质量控制提供科学方法和依据。

## 1 材料

### 1.1 仪器

LC-2010 HPLC仪(日本岛津公司);KQ500-B超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);十万分之一电子天平(瑞士PRECISA公司);QE-100粉碎机(浙江武义屹立工具公司)。

### 1.2 试剂

甲醇(批号:20110901,分析纯,天津市大茂化学试剂厂);乙腈(批号:70227,色谱纯,北京迪马科技公司);氨水(批号:20080421,分析纯,天津市大茂化学试剂厂);正丁醇(批号:20110106,分析纯,天津市北辰方正试剂厂);蒸馏水(哇哈哈饮用纯净水);柴胡皂苷a和柴胡皂苷d对照品购自中国食品药品检定研究院(批号分别为110777-200406、110778-200505)。

### 1.3 药材

黑柴胡药材共10批,详细情况见表1。对号蜡叶标本和样品经樵榜琴教授鉴定,编号Hch01、Hch03-Hch09(来自山西省山阴、宁武、五台、灵丘县)的8批为黑柴胡*B. smithii* Wolff植物;编号为Hch02、Hch10(来自山西省岢岚、垣曲)的2批,为小叶黑柴胡*B. smithii* Wolff var. *parvifolium* Shan et Y. Li植物;全部样品干燥根均符合《山西省中药材标准》(1987年版)黑柴胡[性状]规定,为药材黑柴胡。

表1 黑柴胡药材来源

Tab 1 The source of *B. smithii*

编号	产地或经销部门	收集时间、方式	编号	产地或经销部门	收集时间、方式
Hch01	山西省山阴县	2012.05.18收购	Hch06	山西省管岑山秋千沟大梁	2012.08.17采集
Hch02	山西省中条山舜王坪	2012.07.20采集	Hch07	山西省宁武县麻地沟	2012.08.18采集
Hch03	山西省芦芽山荷叶坪	2012.08.14采集	Hch08	山西省五台山鸿门岩	2012.08.20采集
Hch04	山西省芦芽山黄草梁界	2012.08.14采集	Hch09	山西省灵丘县刁村空中草原	2012.08.22采集
Hch05	山西省芦芽山冰口洼	2012.08.16采集	Hch010	岢岚县小涧村	2012.08.25采集

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱:Inertsil C<sub>18</sub>(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈-水(38:62, V/V),流速:1.0 ml/min,检测波长:210 nm;柱温:室温。在该色谱条件下,色谱峰分离度佳,柴胡皂苷a、d理论板数达10 000以上。色谱见图1。

### 2.2 对照品溶液的制备

分别取柴胡皂苷a对照品、柴胡皂苷d对照品适量,精密称定,加甲醇分别制成每1 ml含柴胡皂苷a 0.4 mg、柴胡皂苷d

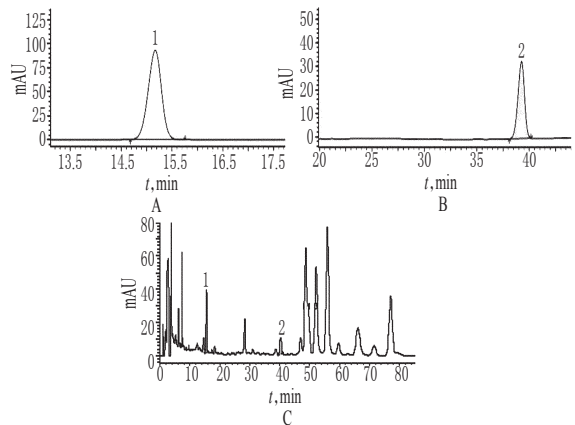


图1 高效液相色谱图

A. 柴胡皂苷a对照品;B. 柴胡皂苷d对照品;C. 供试品;1. 柴胡皂苷a;2. 柴胡皂苷d

Fig 1 HPLC chromatograms

A. saikosaponin a control; B. saikosaponin d control; C. test sample; 1. saikosaponin a; 2. saikosaponin d

0.3 mg的溶液,摇匀,即得。

### 2.3 供试品溶液的制备

取黑柴胡粉末(过四号筛)约1.0 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,加入含5%浓氨试液的甲醇溶液50 ml,密塞,称定质量。30℃水温超声处理(功率:200 W,频率:40 kHz)30 min,冷却至室温,称定质量,用甲醇补足减失的质量,滤过。精密量取续滤液25 ml,蒸干,残渣加水20 ml溶解,转移至分液漏斗中,用水饱和的正丁醇提取4次,每次20 ml。合并正丁醇溶液,再用氨试液充分洗涤3次,每次20 ml。将正丁醇溶液蒸干,残渣加甲醇使溶解,转移至5 ml量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

### 2.4 线性关系考察

取柴胡皂苷a对照品配制成质量浓度分别为0.042 5、0.127 5、0.212 5、0.297 5、0.425 0、0.637 5 mg/ml的系列对照品溶液;柴胡皂苷d对照品配制成质量浓度为0.013 0、0.019 5、0.032 5、0.065 0、0.162 5、0.325 0 mg/ml的系列对照品溶液。分别吸取10 μl,平行进样2次,取平均值。以进样量(x, μg)为横坐标,峰面积积分值(y)为纵坐标作图,根据数值计算回归曲线。柴胡皂苷a回归方程: $y=342\ 544x-4\ 443.5$ ,  $r=0.999\ 9$ ,表明进样量在0.425~6.375 μg的范围内呈良好线性关系;柴胡皂苷d回归方程: $y=402\ 338x-2\ 670.1$ ,  $r=0.999\ 9$ ,表明进样量在0.130~3.25 μg的范围内呈良好线性关系。

### 2.5 精密度的试验

取同一供试品溶液适量,以相同体积(10 μl)重复进样6次,依法分别测定。结果,柴胡皂苷a色谱峰峰面积平均值为778 516, RSD=0.69%;柴胡皂苷d色谱峰峰面积平均值为431 464, RSD=1.20%。以上结果表明本方法精密度的良好。

### 2.6 稳定性试验

取同一供试品溶液适量,分别在制备后0、1.5、3.0、4.5、6.0、7.5、24.0 h依法测定柴胡皂苷a和d的峰面积。结果, RSD分别为0.64%和1.11%,表明供试品溶液在24 h内稳定性良好。

### 2.7 重复性试验

精密称取同一批样品适量,共6份,依法制备成供试品溶液,分别测定柴胡皂苷a和d的色谱峰峰面积。结果, RSD分别为1.40%和1.48%,表明本方法重复性良好。

## 2.8 加样回收率试验

称取已知含量的样品6份,每份0.5 g,精密称定,分别精密加入柴胡皂苷a、柴胡皂苷d对照溶液适量,按照供试液制备方法制备,依照样品测定色谱条件测定并计算回收率。结果,柴胡皂苷a平均回收率为96.66%,RSD=1.11%;柴胡皂苷d平均回收率为96.20%,RSD=0.78%,详见表2、3。以上结果表明本方法准确度良好。

表2 柴胡皂苷a的加样回收率试验结果(n=6)

Tab 2 Results of recovery tests of saikosaponin a(n=6)

序号	取样量,g	柴胡皂苷a加入量,mg	样品中柴胡皂苷a含量,mg	柴胡皂苷a测得量,mg	回收率,%	$\bar{x}$ ,%	RSD,%
1	0.501 1	1.15	1.147 5	2.210 7	96.22		
2	0.500 8	1.15	1.146 8	2.190 97	95.39		
3	0.500 9	1.15	1.147 0	2.201 57	95.84	96.66	1.11
4	0.501 0	1.15	1.147 3	2.238 5	97.44		
5	0.500 8	1.15	1.146 8	2.223 35	96.80		
6	0.500 7	1.15	1.146 6	2.257 35	98.29		

表3 柴胡皂苷d的加样回收率试验结果(n=6)

Tab 3 Results of recovery tests of saikosaponin d(n=6)

序号	取样量,g	柴胡皂苷d加入量,mg	样品中柴胡皂苷d含量,mg	柴胡皂苷d测得量,mg	回收率,%	$\bar{x}$ ,%	RSD,%
1	0.501 1	0.55	0.551 2	1.101	96.64	96.20	0.78
2	0.500 8	0.55	0.550 9	1.101	95.28		
3	0.500 9	0.55	0.551 0	1.101	96.18		
4	0.501 0	0.55	0.551 1	1.101	96.81		
5	0.500 8	0.55	0.550 9	1.101	95.29		
6	0.500 7	0.55	0.550 8	1.101	96.99		

## 2.9 样品含量测定

分别称取8批次黑柴胡样品适量,按2.3项下方法制备供试品溶液,依法测定含量,结果见表4。

表4 8批样品含量测定结果(n=3)

Tab 4 Results of content determination of 8 batches of samples(n=3)

编号	平均取样品量,g	柴胡皂苷a质量分数平均值,%	柴胡皂苷d质量分数平均值,%	总质量分数平均值,%
Hch01	1.001 2	0.156 1	0.129 6	0.285 7
Hch03	1.001 2	0.205 7	0.102 8	0.308 5
Hch04	1.003 5	0.239 3	0.095 0	0.334 3
Hch05	1.001 7	0.165 9	0.063 5	0.229 4
Hch06	1.001 5	0.206 9	0.056 1	0.263 0
Hch07	1.001 6	0.253 9	0.089 0	0.342 9
Hch08	1.001 0	0.098 6	0.017 1	0.115 7
Hch09	1.000 9	0.143 5	0.134 2	0.277 7

## 3 讨论

本研究首次建立了山西产黑柴胡的含量测定方法,结果表明本方法简便,重复性好,结果稳定、可靠,可以作为黑柴胡药材质量控制的方法。黑柴胡植物的药材中柴胡皂苷a和柴胡皂苷d的总质量分数在0.115 7%~0.342 9%范围内,平均为0.266 1%。

本研究对对照品溶液和供试品溶液在200~400 nm各波长下的色谱图进行了分析比较,综合考虑基线、色谱峰数目、峰信号强弱,确定210 nm作为检测波长。参照《中国药典》中柴胡供试品溶液的制备方法进行了提取,并在此基础上进行了纯化处理。结果显示,在保证提取完全的基础上,纯化后更有利于分析。比较了多种不同的梯度和等度的流动相比比例

后,本研究最终选择乙腈-水(38:62,V/V)等度作为含量测定流动相。

有研究认为,黑柴胡中不含抗炎活性成分柴胡皂苷a和柴胡皂苷d<sup>[18-19]</sup>,但陈喜奎等<sup>[20]</sup>对黑柴胡中皂苷成分的研究,以及本研究结果均表明,黑柴胡中含有这两种成分,这也为今后黑柴胡质量标准的制订奠定了基础。

## 参考文献

- [1] 山西省卫生厅.山西省中药材标准[S].太原:山西省卫生厅,1987:59.
- [2] 《山西植物志》编委会.山西植物志:第3卷[M].北京:中国科学技术出版社,2000:337.
- [3] 中国科学院《中国植物志》编辑委员会.中国植物志:第55卷第1分册[M].北京:科学出版社,1979:215.
- [4] 甘肃省食品药品监督管理局.甘肃省中药材标准[S].兰州:甘肃文化出版社,2009:129.
- [5] 李广民.陕、甘、宁、青、新西北五省(区)柴胡的原植物[J].中国中药杂志,1989,14(5):262.
- [6] 潘胜利,顺庆生,柏巧明,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,2002:25.
- [7] 王有志,张亚云.中药柴胡的物种调查和鉴定[J].中国药理学杂志,1994,29(1):16.
- [8] 潘胜利.中药柴胡的药源调查及商品鉴定[J].中药材,1996,19(5):231.
- [9] 黄鹤慧,蔡光明,金光洙,等.高效液相色谱法测定青海小叶黑柴胡茎叶中芦丁的含量[J].解放军药学学报,2006,22(6):439.
- [10] 刘鄂湖,蔡光明,朱海升,等.小叶黑柴胡药材的HPLC指纹图谱研究[J].中草药,2008,39(10):1560.
- [11] 汤芳玲,蔡光明,袁波,等.UPLC测定不同产地、不同部位小叶黑柴胡中黄酮含量[J].中国中药杂志,2010,35(21):2874.
- [12] 汤芳玲,蔡光明,袁波,等.小叶黑柴胡超高效液相色谱指纹图谱研究[J].中草药,2010,8(3):230.
- [13] 汤芳玲,付珣,朱珍真,等.UPLC法测定小叶黑柴胡的根中柴胡皂苷a、d含量[J].药物分析杂志,2011,31(9):1654.
- [14] 曹纬国,陶燕铎,张有金,等.青海产小叶黑柴胡中皂苷类成分的含量分析[J].中国现代应用药学,2012,29(4):323.
- [15] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2010年版.北京:中国医药科技出版社,2010:263.
- [16] 霍务贞,卫世杰.HPLC法测定感冒清口服液柴胡皂苷a、d的含量[J].中国药房,2013,24(8):741.
- [17] 朱兰香,刘世增,顾振纶.柴胡皂苷的药理作用及抗肝纤维化的应用[J].中草药,2002,33(10):附5.
- [18] 赵玉英,梁鸿,王邠,等.北柴胡等四种柴胡属植物化学成分及生物活性[J].医学研究通讯,2001,30(8):23.
- [19] 雷岚芬,孟祥龙.黑柴胡与柴胡的生药学比较研究[J].山西中医学院学报,2011,12(5):21.
- [20] 陈喜奎,张如意,张志亮,等.黑柴胡中皂苷成分的研究[J].北京医科大学学报,1992,24(3):222.

(收稿日期:2013-07-26 修回日期:2014-04-07)