

HPLC法测定三岛柴胡不同部位柴胡皂苷 a c d的含量

刘政波¹, 孙印石², 王建华^{2*}, 李圣惠², 黄会明²

(1. 泰安市农业科学研究院, 泰安 271000; 2. 山东农业大学农学院, 泰安 271018)

摘要 目的: 建立 HPLC法测定三岛柴胡各部位的柴胡皂苷 a c d的含量。方法: 采用 Symmetry C₁₈ (4.6 mm × 150 mm, 5 μm) 色谱柱, 流动相为乙腈-水, 梯度洗脱, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 200 nm, 柱温 25 ℃。结果: 1年生三岛柴胡中各部位柴胡皂苷 a c d的含量均比 2年生三岛柴胡的含量高。在 1年生样品中种子含有的有效成分最多, 根次之, 茎最少; 2年生样品中根含有的有效成分最多, 种子次之, 茎最少。结论: 该方法为三岛柴胡不同药用部位的质量控制提供实验依据, 该方法具有简便、快速、准确、重复性较好的特点。

关键词: 三岛柴胡; 柴胡皂苷 a c d 含量测定; 高效液相色谱法

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2011)02-0225-03

HPLC determination of saikosaponins a c d in different parts of *Bupleurum falcatum*

LU Zheng-bo¹, SUN Yin-shi², WANG Jian-hua², LI Sheng-hui², HUANG Hui-ming²

(1. Agricultural Science Research Institute of Shandong Taian Taian 271000 China)

2. College of Agronomy, Shandong Agricultural University, Taian 271018 China)

Abstract Objective To establish an HPLC for determination of saikosaponins a c d in different parts of *Bupleurum falcatum*. **Methods** Symmetry C₁₈ (4.6 mm × 150 mm, 5 μm) column was adopted. The mobile phase was acetonitrile-water with gradient elution at the flow rate of 1.0 mL·min⁻¹; The detection wavelength was 200 nm, and the column temperature was 25 ℃. **Results** The contents of saikosaponins a c d in different parts of annual *B. falcatum* were higher than that of biennial *B. falcatum*, and the contents of three saikosaponins in the seeds of annual level *B. falcatum* were the highest, then followed by root and stem. **Conclusion** The quantitative method for determination of saikosaponins a c d in different parts of *B. falcatum* by HPLC provided the basis for quality control of *B. falcatum*, this method is simple, rapid and accurate with good reproducibility.

Key words *Bupleurum falcatum*; saikosaponins a c d; assay; HPLC

三岛柴胡为伞形科植物三岛柴胡 *Bupleurum falcatum* L. 的干燥根, 为日本药典收载的日本汉方药材柴胡的基源植物, 与我国药用柴胡为同属植物, 主要栽培于日本。近年, 我国许多地区亦有引种栽培。三岛柴胡适应性强, 易于栽培, 产量高, 若通过科学的评价, 有可能作为正品柴胡的一个品种在我国传统医药中应用, 这对于解决柴胡的资源缺乏, 品种混乱, 质量不稳定等问题以及规划柴胡的药材生产, 均会有积极的作用。已有研究报道表明三岛柴胡的有效成分为皂苷类成分, 其中柴胡皂苷 a c d (saikosaponins a c d) 是主要的 3 种皂苷^[1, 2]。目前

我国虽已引种成功, 但是在定量分析方面国内未见报道。为建立三岛柴胡的质量标准, 本实验参考有关文献报道^[3~5], 以超声波法提取柴胡皂苷, 以氨水-甲醇 (5:95) 为提取剂, 用 HPLC 法同时测定三岛柴胡中柴胡皂苷 a c d 的含量, 并比较了不同生长年限不同部位的 3 种皂苷含量, 从而为三岛柴胡的品质评价提供科学依据。

1 仪器与试剂

Waters 600E 高效液相色谱仪, 包括 600E 四元梯度泵、2996 二极管阵列检测器、中文 Empower 色谱管理系统、真 32 位色谱管理软件、BusLAC/E 数

* 通讯作者 Tel: (0538) 8242226 E-mail: slauwangj@163.com

据采集板、集成的 oracle 关系型图文数据库、四通道脱气机; FW 177 型中草药粉碎机 (天津泰斯特仪器有限公司); KQ250DE 数控超声波清洗器 (250 W, 40 kHz 昆山市超声仪器有限公司); BD-25 十万分之一电子天平 (北京赛多利斯仪器系统有限公司)。

甲醇 (分析纯, 天津市凯通化学试剂有限公司), 氨水 (分析纯, 天津永大试剂厂), 乙腈 (色谱纯, 天津市凯通化学试剂有限公司), 水为二次蒸馏水; 柴胡皂苷 a、c、d 对照品购置于北京紫云德馨科技有限公司, 经 HPLC 面积归一化法测定, 纯度为 > 98%。

三岛柴胡药材采自山东农业大学中药园, 经吉林农业大学中药材学院郑毅男教授鉴定, 确认为三岛柴胡 (*Bupleurum falcatum* L.)。其中茎、叶和花分别采自 9 月中旬, 根采自 10 月下旬。各部位分别阴干, 粉碎, 过 40 目筛, 待用。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 对照品储备液 分别精密称取对照品柴胡

皂苷 a、c、d 各 2.0 mg 置 10 mL 量瓶中, 用氨水-甲醇 (5:95) 定容至刻度, 摇匀, 即得。

2.1.2 供试品溶液 分别精密称取 1 年生三岛柴胡药材的根 1.0 g 茎 2.0 g 叶 1.0 g 花 0.33 g 及种子 6.0 g 2 年生三岛柴胡药材根 1.0 g 茎 10.0 g 叶 4.0 g 花 1.0 g 及种子 1.0 g 采用液固比 50:1 (mL/g) 加氨水-甲醇 (5:95) 适量, 超声提取 3 次 (每次 30 min), 提取温度 25 ℃。提取液过滤、合并, 浓缩至 20 mL 并用吸管转移至 50 mL 量瓶中, 用氨水-甲醇 (5:95) 定容至刻度。

2.2 色谱条件 在参考文献^[3-5]基础上并做了简单的修改, 采用 Symmetry C₁₈ (4.6 mm × 150 mm, 5 μm) 色谱柱, 流动相为乙腈 (A)-水 (B), 梯度洗脱 (0~5 min 30% A; 5~10 min 30% A → 35% A; 10~20 min 35% A → 50% A; 20~25 min 50% A → 52% A)。流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 200 nm, 柱温 25 ℃, 进样量 20 μL。在上述色谱条件下对照品及典型样品色谱图见图 1。

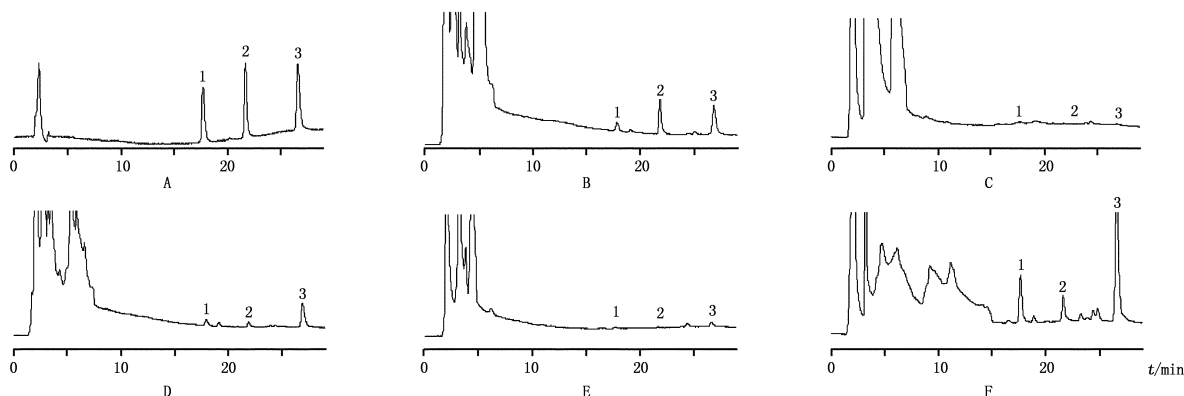


图 1 对照品 (A) 及 1 年生三岛柴胡根 (B)、茎 (C)、叶 (D)、花 (E) 和种子 (F) 色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms of reference substances (A) and root (B), shoot (C), leaf (D), flower (E) and seed (F) in annual *Bupleurum falcatum*

1 柴胡皂苷 c (sikosaponin c) 2 柴胡皂苷 a (sikosaponin a) 3 柴胡皂苷 d (sikosaponin d)

2.3 线性关系考察 精密吸取“2.1.1”项下对照品储备液 0.1 0.2 0.3 0.4 0.5 0.6 0.7 0.8 0.9 1.0 mL, 分别置于 1 mL 量瓶中, 用氨水-甲醇 (5:95) 定容至刻度, 摇匀, 进样。以浓度 (X , mg·mL⁻¹) 为横坐标, 以峰面积 (Y) 为纵坐标建立标准曲线, 得柴胡皂苷 a、c、d 的线性回归方程分别为:

$$Y = 8.478 \times 10^4 X - 378.1 \quad r = 0.9991$$

$$Y = 1.062 \times 10^5 X - 527.3 \quad r = 0.9994$$

$$Y = 1.197 \times 10^5 X - 407.0 \quad r = 0.9995$$

线性范围均为 0.02~0.2 mg·mL⁻¹。

2.4 稳定性试验 精密称取 2 年生三岛柴胡根 1.0 g 按“2.1.2”项下方法制成供试品溶液, 按照“2.2”项条件, 分别在 0 h 2 h 4 h 6 h 8 h 10 h 测

定, 结果表明柴胡皂苷 a、c、d 的峰面积无明显变化, RSD 分别为 0.5%, 1.8%, 0.7%。表明供试品溶液的稳定性好。

2.5 精密度试验 精密吸取柴胡皂苷 a、c、d 的对照品溶液 20 μL, 连续进样 6 次, 测定峰面积, 无明显变化, 柴胡皂苷 a、c、d 峰面积的 RSD 分别为 0.3%, 0.5%, 0.4%, 表明仪器精密度好。

2.6 重复性试验 精密称取 2 年生三岛柴胡根样品 6 份各 1.0 g 按“2.1.2”项下方法操作, 制备供试品溶液, 精密吸取 20 μL 进样测定。结果样品中柴胡皂苷 a、c、d 含量平均值 ($n = 6$) 分别为 6.37, 1.80, 4.31 mg·g⁻¹; RSD 分别为 3.5%, 4.7%, 3.4%。表明方法的重复性好。

2.7 回收率试验 精密称取 2 年生三岛柴胡根粉末 0.5 g 5 份, 分别加入对照品柴胡皂苷 a 3.0 mg, 柴胡皂苷 c 0.9 mg, 柴胡皂苷 d 2.1 mg, 按“2.1.2”项下方法制成供试溶液, 按“2.2”项条件测定。柴胡皂苷 a、c、d 平均回收率 ($n=5$) 分别为 98.0%, 96.1%, 98.4%; RSD 分别为 1.3%, 2.0%, 2.9%。

表 1 样品的含量测定结果 ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)

Tab 1 Results of contents determination of samples

部位 (part)	1 年生 (annual)				2 年生 (biennial)			
	柴胡皂苷 a	柴胡皂苷 c	柴胡皂苷 d	总量	柴胡皂苷 a	柴胡皂苷 c	柴胡皂苷 d	总量
	(sikosaponin a)	(sikosaponin c)	(sikosaponin d)	(total content)	(sikosaponin a)	(sikosaponin c)	(sikosaponin d)	(total content)
根 (root)	7.75	1.82	6.17	15.74	6.38	1.83	4.30	12.51
茎 (stem)	0.18	0.19	0.23	0.60	0.08	0.21	0.10	0.39
叶 (leaf)	1.73	1.41	5.34	8.48	0.58	0.84	1.39	2.81
花 (flower)	0.98	1.93	2.16	5.07	0.66	0.62	0.98	2.26
种子 (seed)	2.31	3.53	10.36	16.20	0.62	1.04	2.14	3.80

3 讨论

3.1 分别用水、乙醇、甲醇、氨水-甲醇 (5:95) 4 种溶剂作为提取溶剂, 考察不同提取溶剂对 2 年生三岛柴胡根中柴胡皂苷 a、c、d 提取效果的影响。结果表明, 氨水-甲醇 (5:95) 的提取效果较其他溶剂好, 总皂苷达到了 $12.48 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 其次是甲醇和乙醇, 总皂苷提取率分别是 $5.54 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 和 $5.02 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。而水作为提取溶剂时提取率最低为 $1.89 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。因此本实验选取氨水-甲醇 (5:95) 作为柴胡皂苷的提取溶剂。

3.2 经观察 2 年生的三岛柴胡木质化程度很高, 而 1 年生三岛柴胡的生长周期短, 木质化程度低, 这也许 是 1 年生三岛柴胡比 2 年生三岛柴胡总皂苷含量高的原因之一。另外三岛柴胡不同部位中柴胡皂苷 a、c、d 的含量存在较大差异, 1 年生样品种子含有的有效成分最多, 根次之, 茎最少; 2 年生样品根含有的有效成分最多, 种子次之, 茎最少。但由于药材中种子所占比例较少, 因此在制备以柴胡皂苷 a、c、d 为主的生物产品时首选 1 年生三岛柴胡根作为原料。

3.3 本实验建立 HPLC 法测定三岛柴胡不同药用部位中柴胡皂苷 a、c、d 的含量, 方法简便, 测定结果准确可靠, 为三岛柴胡药材的质量控制和不同药用

2.8 含量测定 取三岛柴胡不同部位样品, 分别作 3 个平行处理, 按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.2”项下色谱条件进样测定。以外标法计算, 按干燥品计各样品中柴胡皂苷 a、c、d 的含量, 结果见表 1。HPLC 色谱图见图 1-B、C、D、E、F。

部位的合理利用提供了科学依据。

参考文献

- LIP ing(李萍), FU Chun-hua(傅春华). Study on herbs and chemistry of *Bupleurum chinense* and *Bupleurum falcatum* (北柴胡与三岛柴胡药材及成分研究). *J Chengdu Univ Tradit Chin Med* (成都中医药大学学报), 1997, 6(2): 46
- SHI Q ing(史青), NIE Shu-qin(聂淑琴), HUANG Lu-qi(黄璐琦). New Progression of Chemical Component and Pharmacological Studies of Radix Bupleuri (柴胡属植物化学成分及药理研究新进展). *Chin J Exp Tradit Med Form* (中国实验方剂学杂志), 2002, 10(5): 53
- Zhao Shun Kwok Kin-Chor, Liang Hanhua. Investigation on ultrasound assisted extraction of sikosaponins from Radix Bupleuri *Sap Purif Technol* 2007, 55(3): 307
- MAO Ren-gang(茅仁刚), LIN Dong-hao(林东昊), WANG Zhi-hua(王智华), et al Quantitative analysis of sikosaponin a, c, d in different species of Radix Bupleuri by HPLC (HPLC 法测定不同品种柴胡中的柴胡皂苷 a、c、d 的含量). *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2002, 33(5): 412
- XIAO Gong-sheng(肖功胜), YANG Yun(杨云), SUN Wei-ying(孙维英), et al Study on extraction technology of active ingredients from *Bupleurum chinense* DC. (柴胡有效成分提取工艺的研究). *Lishizhen Med Mater Med Res* (时珍国医国药), 2008, 19(8): 1829

(本文于 2010 年 4 月 19 日收到)