

•质量分析研究•

柴胡水煎过程中皂苷成分的变化规律

刘树强, 王术玲, 高晓玲, 曾元儿(广州中医药大学中药学院, 广东 广州 510006)

摘要: **目的** 研究柴胡煎煮前后及其水煎液在酸碱环境中皂苷成分的变化。**方法** 以柴胡皂苷 a、d、b₂ 为指标, 采用高效液相色谱法。色谱柱为 LUBEX Ecosil C₁₈(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-水, 梯度洗脱, 流速为 1.0 mL·min⁻¹; 柱温 30 ℃; 检测波长为 204 nm(检测柴胡皂苷 a、d)和 254 nm(检测柴胡皂苷 b₂)。**结果** 水煎后, 柴胡皂苷 b₂ 大幅增加, 柴胡皂苷 a、d 逐渐减少; 水煎过程中 3 种柴胡皂苷含量随煎煮时间、温度、pH 值有不同程度的变化, 柴胡水煎液经人工肠液、人工胃液不同时间孵育后, 3 种皂苷的含量呈动态变化。**结论** 柴胡中的皂苷类成分在柴胡煎煮前后会发生变化, 并且其水煎液中的皂苷类成份在不同酸碱环境中亦呈动态变化。

关键词: 柴胡; 水煎液; 皂苷成分; 变化规律

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2013)06-0602-05

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2013.06.019

Variation of Saponins in Radix Bupleuri During Decoction Process

LIU Shuqiang, WANG Shuling, GAO Xiaoling, ZENG Yuan'er (School of Chinese Materia Medica, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006 Guangdong, China)

Abstract: **Objective** To study and analyze the changes of saponins in Radix Bupleuri before and after decoction and in Radix Bupleuri decoction under various pH values. **Methods** Saikosaponin a, d, b₂ were used the evaluation indexes. High performance liquid chromatography was performed on LUBEX Ecosil C₁₈ column(4.6 mm × 250 mm, 5 μm) with mobile phase of acetonitrile-water at gradient elution. The volume flow rate was 1.0 mL·min⁻¹, column temperature was 30 ℃, and detection wavelength was set at 204 nm for saikosaponin a, d and 254 nm for saikosaponin b₂. **Results** After decocting with water, saikosaponin b₂ content was significantly increased and saikosaponins a, d were significantly reduced. In decoction process, the contents of three kinds of saikosaponins changed with decocting time, temperature and pH value. After Radix Bupleuri decoction was incubated with artificial intestinal juice and artificial gastric juice for different time, a dynamic change of the contents of three kinds of saponins was shown. **Conclusion** The contents of saponins in Radix Bupleuri vary before and after decoction and in Radix Bupleuri decoction under various pH values.

Keywords: Radix Bupleuri; Decoction; Saponins ; Variation

柴胡为伞形科植物柴胡 *Bupleurum chinense* DC. 或狭叶柴胡 *Bupleurum scorzonerifolium* Wild. 的干燥根, 味辛、苦, 微寒, 归肝、胆、肺经, 具有疏散退热、舒肝解郁、升举阳气等作用^[1]。柴胡为临床常用

中药, 历代本草和现代中医的肝病用药中多以柴胡为君药。已有报道指出柴胡皂苷结构不稳定, 在煎煮过程中易发生结构改变^[2], 其原生柴胡皂苷 a、c、d 等转化为次生皂苷 b₁、b₂ 等, 但目前对于水煎过程中柴

收稿日期: 2013-07-26

作者简介: 刘树强, 男, 硕士研究生, 研究方向: 中药质量标准研究。Email: lshq120@163.com。通讯作者: 王术玲, 副教授, 研究方向: 中医药防治动脉粥样硬化。Email: jinggelwang@gzucm.edu.cn。

基金项目: 国家自然科学基金项目(81102530)。

胡皂苷的动态变化规律及影响因素未见报道。本研究通过系统分析柴胡煎煮过程中皂苷含量的动态变化,初步揭示了柴胡煎煮过程中皂苷转化的规律,为阐释柴胡功效的物质基础提供科学参考。

1 仪器与试药

1.1 仪器 LC-20A 高效液相色谱仪(SIL-20A 自动进样器、LC-20AT 泵、CTO-10AS VP 柱温箱、SPD-M20A 检测器、LC Solution 处理软件),日本岛津公司; MODEL HN1006 超声清洗器,中国华南超声设备厂; Sartious BP211D 电子天平,德国赛得利斯公司; PHS-25 数显 pH 计,上海精密科学仪器有限公司。

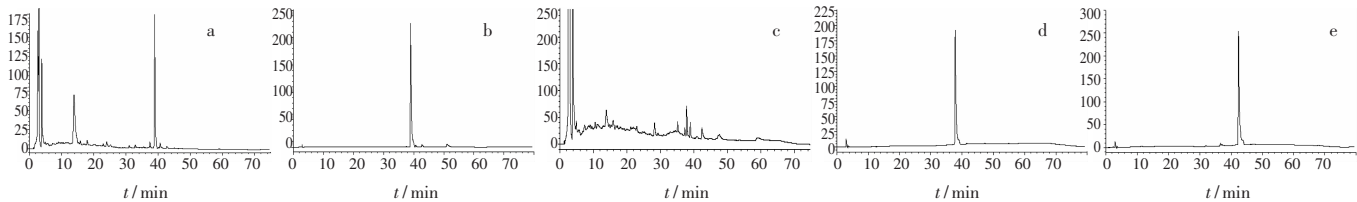
1.2 试药 柴胡由广州市药材公司中药饮片厂提供(批号: YPA2L0003),经广州中医药大学药用植物学教研室黄海波教授鉴定为伞形科植物柴胡 *Bupleurum chinense* DC.的干燥根;柴胡皂苷 a 对照品(批号: 110777-200507)、柴胡皂苷 d 对照品(批号: 110778-

200506),中国药品生物制品检定所;柴胡皂苷 b₂ 对照品,上海源叶生物科技有限公司,批号: 20120810;胰酶(批号: 120705)、胃蛋白酶(批号: 130218),上海蓝季科技发展有限公司。乙腈、甲醇,色谱纯,德国 Merck 公司;水为纯净水,华润食品饮料有限公司;其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 以 LUBEX Ecosil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm),乙腈-水为流动相进行梯度洗脱,乙腈(C)-水(A),0~15 min, 15 % C~30 % C; 15~25 min, 30 % C~35 % C; 25~40 min, 35 % C~60 % C; 40~60 min, 60 % C; 60~70 min, 60 % C~15 % C;进样量 20 μL,流速为 1.0 mL/min,柱温 30 ℃,检测波长 204 nm(检测柴胡皂苷 a、d)和 254 nm(检测柴胡皂苷 b₂)。对照品及供试品色谱图分离度良好(R>1.5),如图 1 所示。

2.2 对照品及供试品的配制



a. 柴胡水煎液(254 nm); b. 柴胡皂苷 b₂ 对照品(254 nm); c. 柴胡水煎液(204 nm); d. 柴胡皂苷 a(204 nm); e. 柴胡皂苷 d(204 nm)

图 1 对照品及样品色谱图

Figure 1 HPLC chromatograms of Saikosapins a, d and b₂

2.2.1 对照品储备液的制备 精密称取各对照品适量,置于 25 mL 量瓶中,加甲醇定容至刻度,摇匀,即得含柴胡皂苷 a 浓度为 0.7288 mg·mL⁻¹、柴胡皂苷 d 浓度为 0.7056 mg·mL⁻¹、柴胡皂苷 b₂ 浓度为 0.3632 mg·mL⁻¹ 的对照品储备液。

2.2.2 对照品溶液的制备 分别精密吸取上述对照品储备液 0.3 mL,置于 1 mL 量瓶中,甲醇定容至刻度,摇匀,使柴胡皂苷 a 浓度为 0.2186 mg·mL⁻¹、柴胡皂苷 d 浓度为 0.2117 mg·mL⁻¹、柴胡皂苷 b₂ 浓度为 0.1090 mg·mL⁻¹。

2.2.3 柴胡水煎液的制备 取柴胡粉末 5 g,精密称定,加蒸馏水 100 mL 浸泡 30 min,微沸回流提取 1 h,过滤,用少量水洗涤残渣及滤器,并定容至 100 mL 量瓶中,摇匀,即得柴胡水煎液。

2.2.4 供试品溶液的制备 精密移取 2.2.3 项下柴胡水煎液 20.0 mL,先用稀 NaOH 溶液调节 pH 至 11.0,后用水饱和过的正丁醇 20.0 mL 萃取 5 次,合并萃取

液,回收溶剂,蒸干,残渣加甲醇溶解,转移至 5 mL 量瓶中,加甲醇定容至刻度,摇匀,滤过,取续滤液即得。

2.3 含量测定方法学验证

2.3.1 标准曲线及线性范围 将 2.2.1 项下制备的对照品储备液由高至低逐级稀释制得系列质量浓度的对照品溶液。精密吸取不同质量浓度的对照品溶液 20 μL,注入液相色谱仪,按 2.1 项下测定峰面积值,以峰面积平均值和对照品质量进行回归处理,计算线性回归方程、线性范围和相关系数(r),结果见表 1。

表 1 对照品的标准曲线、线性范围及相关系数

Table 1 Standard curve, linearity range and correlation coefficient of reference substances

对照品	标准曲线	线性范围/μg	r
柴胡皂苷 a	$Y=2\times10^{-6}X+0.084$	0.22~10.93	0.9999
柴胡皂苷 d	$Y=1\times10^{-6}X+0.1491$	0.21~10.58	0.9991
柴胡皂苷 b ₂	$Y=9\times10^{-7}X+0.0761$	0.11~5.45	0.9993

2.3.2 精密度试验 取 2.2.2 项下对照品溶液,连续进样 5 次,进样量 20 μL ,测定柴胡皂苷 a、柴胡皂苷 d、柴胡皂苷 b_2 的峰面积值,计算得其 RSD 分别为 0.53 %、0.37 %、0.22 %。结果表明仪器精密度良好。

2.3.3 重复性试验 精密移取 20.0 mL 柴胡煎液 5 份,按照 2.2.4 项下方法制备各供试品溶液,精密吸取各供试品溶液 10 μL 进样,分别按照 2.1 项所述色谱条件进行测定,计算得柴胡皂苷 a、柴胡皂苷 d、柴胡皂苷 b_2 的 RSD 分别为 2.9 %、2.7 %、1.3 %。结果表明该方法重复性良好。

2.3.4 稳定性试验 精密移取 20.0 mL 柴胡煎液 5 份,按照 2.2.4 项下方法制备各供试品溶液,精密吸取各供试品溶液 10 μL 分别于制备后 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 h 进样,进行测定,计算峰面积,结果柴胡皂苷 a、柴胡皂苷 d、柴胡皂苷 b_2 的 RSD 分别为 2.1 %、2.9 %、0.20 %,表明供试品溶液在 12 h 内稳定。

2.3.5 回收率试验 精密移取 10.0 mL 柴胡煎液 5 份,每份按样品中柴胡皂苷 a、柴胡皂苷 d、柴胡皂苷 b_2 各自含有量的 100 % 分别精密加入对照品,按 2.2.4 项方法制备供试品溶液,按照 2.1 项所述色谱条件进行测定,计算加样回收率。结果柴胡皂苷 a、柴胡皂苷 d、柴胡皂苷 b_2 平均加样回收率分别为 102.9 %、98.2 %、97.1 %,RSD 分别为 0.17 %、0.96 %、1.35 %,方法准确性良好。

2.3.6 样品含量测定 精密移取 20.0 mL 柴胡各水煎液,按照 2.2.4 项下方法制备各供试品溶液,精密吸取各供试品溶液 20 μL 进样,按照 2.1 项下所述色谱条件进行测定,计算柴胡水煎液中各皂苷的量,结果见表 2。

表 2 柴胡皂苷含量的测定
Table 2 Content determination results of saikosaponins

样品	含量/ $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$		
	柴胡皂苷 a	柴胡皂苷 d	柴胡皂苷 b_2
柴胡水煎液供试品	0.15	0.051	0.12
柴胡甲醇提取	0.28	0.22	0.015

2.4 柴胡原药材中皂苷类成分 取柴胡粉末 1 g,置具塞锥形瓶中,加 5 % 浓氨试液的甲醇溶液 25 mL 密塞,超声提取 30 min,滤过,用甲醇 20 mL 分 2 次洗涤容器及药渣,洗液与滤液合并,回收溶剂至蒸干,残渣加甲醇溶解,转移至 5 mL 量瓶中,加甲醇定容至刻度,摇匀,微孔滤膜滤过,取续滤液即得^[1]。按照 2.1 项所述色谱条件进行测定,计算柴胡

水煎液中各皂苷的量,结果见表 2。

2.5 柴胡水煎液皂苷成分变化单因素考察

2.5.1 煎煮时间考察 按 2.2.4 项下制备方法制得 5 份供试品溶液,2.2.3 项水煎煮时间分别为 15min, 1, 2, 3, 5 h。按照 2.1 项所述色谱条件进行测定,计算柴胡水煎液中各皂苷的量,结果见图 2。图 2 显示柴胡水煎煮过程中,柴胡皂苷 b_2 含量随煎煮时间逐渐增加,3 h 后趋于稳定,而柴胡皂苷 a、柴胡皂苷 d 随煎煮时间逐渐减少,3h 后趋于稳定。

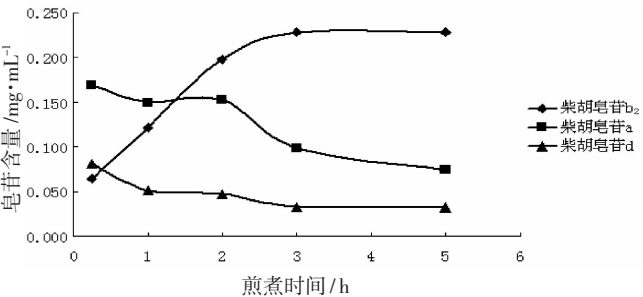


图 2 随煎煮时间变化的柴胡皂苷含量变化曲线图
Figure 2 Saikosapoin content vary with boiling time

2.5.2 煎煮温度考察 按 2.2.4 项下制备方法制得 4 份供试品溶液,2.2.3 项下煎煮温度分别为 60, 70, 90, 100 $^{\circ}\text{C}$ 。按照 2.1 项下所述色谱条件进行测定,计算柴胡水煎液中各皂苷的量,结果见图 3。图 3 显示柴胡水煎煮过程中,柴胡皂苷 a、 b_2 含量随煎煮温度的上升逐渐增加,柴胡皂苷 d 随煎煮温度升高逐渐减少,提示柴胡水煎煮过程中存在皂苷间的转化现象。

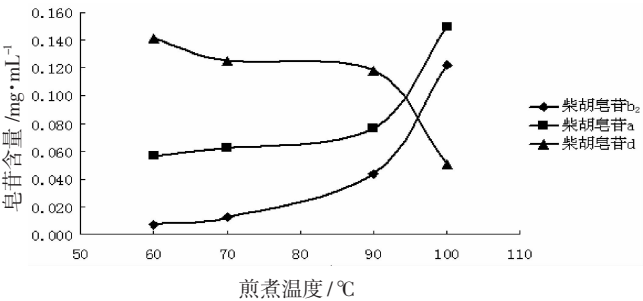


图 3 随煎煮温度变化的柴胡皂苷含量变化曲线图
Figure 3 Saikosapoin content vary with boiling temperature

2.5.3 煎煮pH 考察 按 2.2.4 项下制备方法制得 5 份供试品溶液,2.2.3 项下水煎液 PH 值分别为 5.0、7.0、9.0、11.0。按照 2.1 项下所述色谱条件进行测定,计算柴胡水煎液中各皂苷的量,结果见图 4。图 4 显示柴胡水煎煮过程中,柴胡皂苷 a、柴胡皂苷 d、柴胡皂苷 b_2 在酸性环境及碱性环境中溶出量均低于

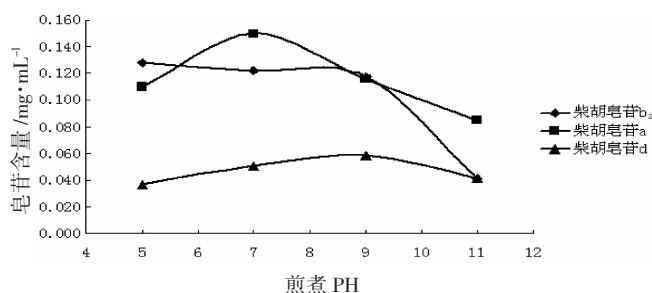


图 4 随煎煮 pH 变化的柴胡皂苷含量变化曲线图

Figure 4 Saikosapins content vary with boiling pH

中性环境, 提示其在酸、碱环境中不稳定。

2.6 柴胡水煎液在人工胃液中的成分变化

2.6.1 人工胃液的配制 取稀盐酸(取盐酸 2.34 mL, 加水稀释至 10 mL 即得)1.64 mL, 加水 80 mL, 胃蛋白酶 1 g, 摇匀后, 加水稀释成 100 mL 即得^[3]。

2.6.2 人工胃液与水煎液混合时间考察 按 2.2.4 项下制备方法制得 3 份供试品溶液, 加入等体积的人工胃液, 将回流瓶置于 37 ℃ 水浴锅中孵育, 孵育时间分别为 3, 4, 5 h, 混合液水浴蒸干, 残渣加甲醇溶解, 转移至 5 mL 量瓶中, 加甲醇定容至刻度, 摇匀, 微孔滤膜滤过, 取续滤液即得。按照 2.1 项所述色谱条件进行测定, 计算柴胡水煎液中各皂苷的量, 结果见图 5。由图 5 显示, 柴胡水煎液在人工胃液中随孵育时间的延长, 原生的柴胡皂苷 a、d 含量减少, 而次生的柴胡皂苷 b₂ 含量逐渐增加, 提示柴胡皂苷在人工胃液中存在转化现象。

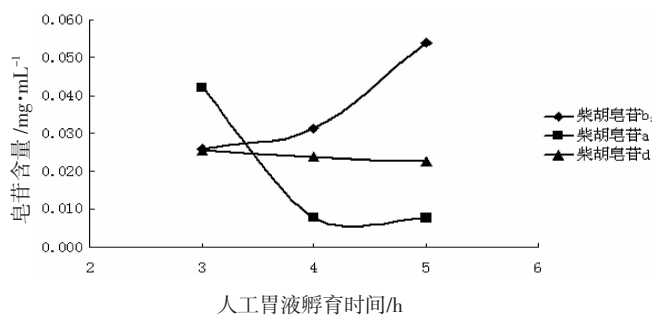


图 5 柴胡水煎液在人工胃液中随时间变化的皂苷含量变化曲线图

Figure 5 Saikosapins content vary with time in Radix Bupleari decoction incubated with artificial gastric juice

2.6.3 人工肠液的配制 取磷酸二氢钾 0.68 g, 加水 50 mL 使溶解, 用 0.1 mol·L⁻¹ NaOH 溶液调节 pH 至 6.8, 取胰酶 1 g, 加适量水溶解, 将两液混合后, 加水稀释至 100 mL 即得^[3]。

2.6.4 人工肠液与水煎液混合时间考察 按 2.2.4 项下制备方法制得 5 份供试品溶液, 加入等体积的人工肠

液, 将回流瓶置于 37 ℃ 水浴锅中孵育 5, 7, 8 h, 混合液水浴蒸干, 残渣加甲醇溶解, 转移至 5 mL 量瓶中, 加甲醇定容至刻度, 摇匀, 微孔滤膜滤过, 取续滤液即得。按照 2.1 项下所述色谱条件进行测定, 计算柴胡水煎液中各皂苷的量, 结果见图 6。由图 6 显示, 柴胡水煎液在人工肠液中随孵育时间的延长, 原生的柴胡皂苷 a、d 含量略微减少, 而次生的柴胡皂苷 b₂ 含量逐渐减少。

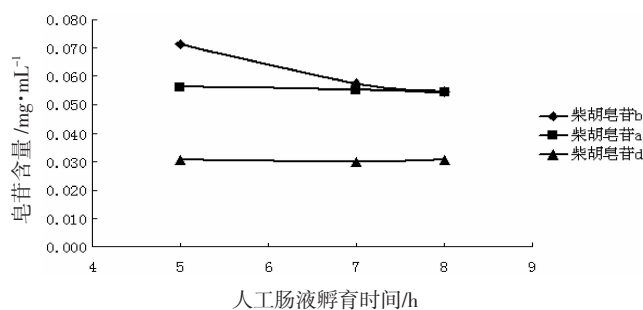


图 6 柴胡水煎液在人工肠液中随时间变化的皂苷含量变化曲线图

Figure 6 Saikosapins content vary with time in Radix Bupleari decoction incubated by artificial intestinal fluid

3 讨论

3.1 供试品处理方法考察 因柴胡水煎液中成分复杂, 对柴胡皂苷的含量测定造成干扰。本实验采用正丁醇萃取的方法富集柴胡皂苷, 通过考察除杂萃取次数, 每次 20 mL, 结果显示经过 5 次反复萃取可有效除去杂质干扰, 同时能够保证柴胡皂苷的回收率达到标准。柴胡原生皂苷在酸性条件下不稳定, 本实验除杂过程尽量简化, 以保证柴胡水煎液的成分组成及含量的稳定。

3.2 检测波长的选择 对照品柴胡皂苷 a、d、b₂ 进行全波长扫描, 结果显示柴胡皂苷 a、d 无最大吸收峰, 仅在 204 nm 存在末端吸收, 而柴胡皂苷 b₂ 在 254 nm 存在最大吸收峰。因此采用双波长进行含量测定, 分别为 204 nm(测定柴胡皂苷 a、d)、254 nm(测定柴胡皂苷 b₂)。

3.3 综合分析 由表 2 可知, 柴胡甲醇提取原生皂苷 a、d 含量高于柴胡水煎提取, 而次生皂苷含量却明显低于柴胡水煎提取。实验结果证实了柴胡在水煎煮过程中原生皂苷转化为次生皂苷。汤剂及中成药为中医临床用药的主要形式, 含有柴胡的汤剂及中成药均经过了汤剂的制备过程^[4], 而汤剂的化学成分是其发挥功效的物质基础, 柴胡煎煮过程中原生

皂苷转化为次生皂苷,但目前研究却主要集中在原生皂苷,柴胡药材^[5]及制剂^[6]的质量标准也以原生皂苷为指标性成分。因此,系统地分析研究柴胡水煎前后皂苷的含量变化,揭示其转化规律及影响其转化的因素,对于中药材质量控制、阐释中药发挥功效的物质基础、制订中药制剂的质量标准具有重要的意义和参考价值。本实验对柴胡煎煮过程中皂苷含量的动态变化进行了分析,并根据实验过程中柴胡皂苷在酸、碱环境中不稳定的现象,设计了水煎液在人工胃液、人工肠液孵育的实验,实验结果显示柴胡皂苷不仅在煎煮过程中存在转化,而且在体内也存在转化。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(1部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 263.
- [2] 李军, 姜华, 张延萍, 等. 柴胡汤剂中次生柴胡皂苷结构研究[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(20): 3078-3082.
- [3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(2部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 附录 85, 附录 175.
- [4] 李军, 姜华, 张延萍, 等. 第十一届全国青年药理学工作者最新科研成果交流会论文集[C]. 杭州: 中国药学会学术工作委员会, 2012.
- [5] 胡杰, 刘晓节, 秦雪梅, 等. HPLC 柱前酸化法测定柴胡中柴胡皂苷 a 和 d 的条件优化研究[J]. 中草药, 2012, 43(2): 288-292.
- [6] 霍务贞, 卫世杰. HPLC 法测定感冒清口服液中的柴胡皂苷 a、d 的含量[J]. 中国药房, 2013, 24(8): 741-743.

(编辑: 修春)

HPLC 法测定不同产地续断中常春藤皂苷元的含量

黎菊凤¹, 陈锦富², 唐少丽¹, 马仁强²(1. 暨南大学附属第一医院, 广东 广州 510630; 2. 广州博济医药生物技术股份有限公司, 广东 广州 510006)

摘要: **目的** 建立续断药材中常春藤皂苷元的含量测定方法, 并分析不同产地续断中常春藤皂苷元的含量, 为全面评价续断药材质量提供参考。**方法** 采用高效液相色谱分析, Hypersil C₁₈ 色谱柱, 乙腈-0.05 %磷酸 (55 : 45) 为流动相, 检测波长为 210 nm。**结果** 常春藤皂苷元的保留时间为 19.22 min, 线性范围为 0.0122~1.6330 mg·mL⁻¹ ($r=0.9999$), 加样回收率为 100.2 %。所测样品中常春藤皂苷元的含量在 5.34~45.26 mg·g⁻¹ 之间。**结论** 本法能快捷、准确测定不同产地续断药材中常春藤皂苷元, 结果显示不同产地含量存在明显差异, 可为评价不同产地续断质量提供依据。

关键词: 续断; 常春藤皂苷元; 高效液相色谱法

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2013)06-0606-04

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2013.06.020

Determination of Hederagenin in Radix Dipsaci from Different Habitats by HPLC

LI Jufeng¹, CHEN Jinfu², TANG Shaoli¹, MA Renqiang² (1. The First Affiliated Hospital of Jinan University, Guangzhou 510630 Guangdong, China; 2. Guangzhou Boji Medical Biotechnological Co., Ltd, Guangzhou 510006 Guangdong, China)

Abstract: **Objective** To establish a HPLC method for the analysis of hederagenin in Radix Dipsaci from different habitats, thus to provide the foundation for the quality evaluation of Radix Dipsaci. **Methods** HPLC was performed on Hypersil C₁₈ column with acetonitrile-0.05 % phosphoric acid(55 : 45) as the mobile phase and detection wavelength was 210 nm. **Results** The relative retained time of hederagenin was 19.22 min, having a good recovery of 100.2 % and linear correlation in the range of 0.0122~1.6330 mg·mL⁻¹ ($r=0.9999$). The content of hederagenin in Radix Dipsaci from different habitats ranged from 5.34 to 45.26 mg·g⁻¹. **Conclusion** The method is simple and accurate for

收稿日期: 2013-06-26

作者简介: 黎菊凤, 女, 主管药师, 从事医院药学研究。Email: 18928903484@189.cn。通讯作者: 马仁强, 主管药师, 主要从事新药开发与药理学研究。Email: pony213@163.com。

基金项目: 广东省广州市生物产业示范工程发展专项资金投资项目(2012-243)。