

- [J]. 中国兽药杂志, 2006, 40(1): 40-44.
- [2] 高伟祺, 栾淑伟, 王锐利, 等. 青蒿素在不同溶剂中平衡溶解度和表观油水分配系数的测定[J]. 药物评价研究, 2013, 01: 35-38.
- [3] Liu Y, Lu H, Pang F. Solubility of artemisinin in seven different pure solvents from(283.15 to 323.15)K[J]. Chem Eng Data, 2009, 54(3): 762-764.
- [4] Nti-Gyabaah J, Gbewonyo K, Chiew YC. Solubility of artemisinin in different single and binary solvent mixtures between (284.15 and 323.15) K and NRTL interaction parameters[J]. J. Chem. Eng. Data, 2010, 55(9): 3356-3363.
- [5] 胡向荣, 余风华. HPLC-ELSD 测定不同产地青蒿中青蒿素的含量[J]. 现代食品与药品杂志, 2006, 03: 34-36.
- [6] 向文, 李琳, 刘吉华, 等. UPLC-UV 法测定不同产地青蒿中青蒿素的含量[J]. 中国野生植物资源, 2012, 04: 28-31.
- [7] 马玉樊, 陈涛, 卢婷利, 等. RP-HPLC 法测定 O/W 型青蒿素脂肪乳剂中青蒿素的含量[J]. 药物分析杂志, 2007, 12: 1976-1979.
- [8] 刘丽芳, 王茜, 李海燕, 等. 柱前衍生-RP-HPLC 法测定青蒿中青蒿素的含量[J]. 中国野生植物资源, 2004, 06: 60-62.
- [9] 申薇薇, 王锐利, 胡爽, 等. 高效液相-柱后衍生化法测定青蒿素含量[J]. 中国药物与临床, 2007, 09: 657-659.
- [10] 冯怡, 刘奕明, 谈博, 等. 液相色谱-串联质谱法测定人血中的青蒿素和哌嗪浓度[C]// 中国药理学会临床药理专业委员会. 第十三次全国临床药理学学术大会论文汇编. 成都: 中国药理学会, 2012: 242-246.
- [11] 李超, 王锐利, 张丽锋, 等. 液相色谱-质谱联用法测定犬血浆中青蒿素浓度[J]. 中国药物与临床, 2011, 07: 748-749.
- [12] 杨小明, 梁健, 王驰芳, 等. 银杏酸平衡溶解度和表观油水分配系数的测定[J]. 时珍国医国药, 2010, 10: 2586-2587.

(编辑: 修春)

## HPLC 法测定小柴胡颗粒中柴胡皂苷 b<sub>2</sub> 的含量

李婷婷, 林丽蓉, 林丽华, 王术玲, 刘树强, 高晓玲(广州中医药大学中药学院, 广东 广州 510006)

**摘要:** 目的 建立小柴胡颗粒中柴胡皂苷 b<sub>2</sub> 含量的测定方法。方法 采用 HPLC 法, phenomenex<sup>®</sup> Luna 色谱柱, 以乙腈-0.2%二乙胺(35:65)为流动相, 流速为 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 柱温 30 ℃, 检测波长 254 nm。结果 柴胡皂苷 b<sub>2</sub> 线性范围 0.3632~3.6320 μg, R<sup>2</sup>=1.00; 平均加样回收率为 102.2%, RSD 为 2.5%。结论 该方法准确、稳定, 重现性好, 可用于小柴胡颗粒的质量控制。

**关键词:** HPLC; 小柴胡颗粒; 柴胡皂苷 b<sub>2</sub>; 含量测定

**中图分类号:** R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2014)03-0356-04

**doi:** 10.3969/j.issn.1003-9783.2014.03.030

### Determination of Saikosaponin b<sub>2</sub> in Xiaochaihu Granules by HPLC

LI Pingting, LIN Lirong, LIN Lihua, WANG Shuling, LIU Shuqiang, GAO Xiaoling (School of Chinese Herbal Medicine, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006 Guangdong, China)

**Abstract: Objective** To establish a high performance liquid chromatography (HPLC) method for the determination of saikosaponin b<sub>2</sub> in Xiaochaihu Granules. **Methods** HPLC was performed on Phenomenex Luna column. The mobile phase was a mixture of acetonitrile-0.2% diethylamine (35:65). The detection wavelength was set at 254 nm. The flow rate was 1.0 mL·min<sup>-1</sup> and column temperature was 30 ℃. **Results** The linear range of saikosaponin b<sub>2</sub> was within 0.3632~3.6320 μg, R<sup>2</sup>=1.00. The average recovery was 102.2%, and RSD=2.5%. **Conclusion** The established method is simple, stable and reproducible. It can be used for the quality control of Xiaochaihu Granules.

**Keywords:** HPLC; Xiaochaihu Granules; Saikosaponin b<sub>2</sub>; Content determination

收稿日期: 2013-12-14

作者简介: 李婷婷, 女, 硕士研究生, 研究方向: 心血管疾病中医药防治机制及新产品开发。Email: mydearpainting@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)。

柴胡是常用中药，以柴胡为君药制备的复方制剂常称为柴胡剂，现多达几十种，小柴胡颗粒便是其中之一。柴胡皂苷作为柴胡的主要活性成分之一，以其作为评价指标进行定量研究对于柴胡的质量控制尤为重要。然而，在小柴胡颗粒的质量控制方面，2010 年版《中华人民共和国药典》仅对臣药黄芩的含量进行监控，并未对柴胡进行含量测定<sup>[1]</sup>。

小柴胡颗粒的制剂工艺是采用水煎煮的提取工艺，无刻意保留挥发油，这与《伤寒论》中小柴胡汤的制法相吻合，符合遵古制作指导思想，因而，制剂中柴胡挥发油类成分保留较少，成品中可以不予考虑。但柴胡皂苷类成分在制剂工艺中得到了充分提取，成品中应得到充分体现。因此，制剂中以柴胡皂苷类成分作为柴胡的质量控制指标具有一定的合理性。然而，在柴胡皂苷类成分中，其主要成分柴胡皂苷 a 和 d 因其分子中环氧结构的不稳定性导致在制剂工艺过程中大量转化为柴胡皂苷 b<sub>1</sub> 和 b<sub>2</sub><sup>[2-6]</sup>，同时，柴胡皂苷 b<sub>2</sub> 具有较好的生理活性，如造成绝大部分人普通感冒的冠状病毒 HCoV-229E 具有良好的抑制作用<sup>[7]</sup>。因此，本研究建立了小柴胡颗粒中柴胡皂苷 b<sub>2</sub> 的含量测定方法，为完善此制剂的质量标准提供参考。

## 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，德国赛多利斯公司。

**1.2 试药** 白云山小柴胡颗粒无糖型，广州白云山光华制药股份有限公司，批号：K13022，K13037；龙马小柴胡颗粒有糖型，益州华葆药业有限公司，批号：130308；云南白药小柴胡颗粒有糖型，云南白药集团股份有限公司，批号：ZF12013；柴胡皂苷 b<sub>2</sub>

对照品，上海源叶生物科技有限公司，批号：20120810；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** 色谱柱：phenomenex<sup>®</sup> Luna 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm)，流动相：乙腈 -0.2 % 二乙胺 (35 : 65)；进样量：20 μL，流速：1.0 mL·min<sup>-1</sup>，柱温：30 °C，检测波长：254 nm。

### 2.2 对照品及供试品配制

**2.2.1 对照品储备液的制备** 精密称取柴胡皂苷 b<sub>2</sub> 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 b<sub>2</sub> 浓度为 0.3632 mg·mL<sup>-1</sup> 的对照品储备液。

**2.2.2 供试品溶液的制备** 取小柴胡颗粒无糖型 2.0 g 或有糖型 5.0 g，精密称定，置具塞锥形瓶中，加入含 8 % 浓氨试液的甲醇溶液 30 mL，密塞，超声 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，加至碱性氧化铝柱 (10 g，湿法装，20 mL 甲醇预洗)，用甲醇、80 % 甲醇各 50 mL 洗脱，收集上样流出液以及洗脱液，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，滤过，取续滤液即得。

**2.2.3 阴性对照液的制备** 按照处方工艺制备缺柴胡药材的阴性样品，按照 2.2.2 项下方法制备阴性对照液。

### 2.3 含量测定方法学验证

**2.3.1 专属性实验** 精密吸取对照品溶液、供试品溶液、阴性样品溶液各 20 μL，按照 2.1 项下色谱条件进样分析，柴胡皂苷 b<sub>2</sub> 的峰形良好，阴性样品无干扰，色谱图见图 1。

**2.3.2 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

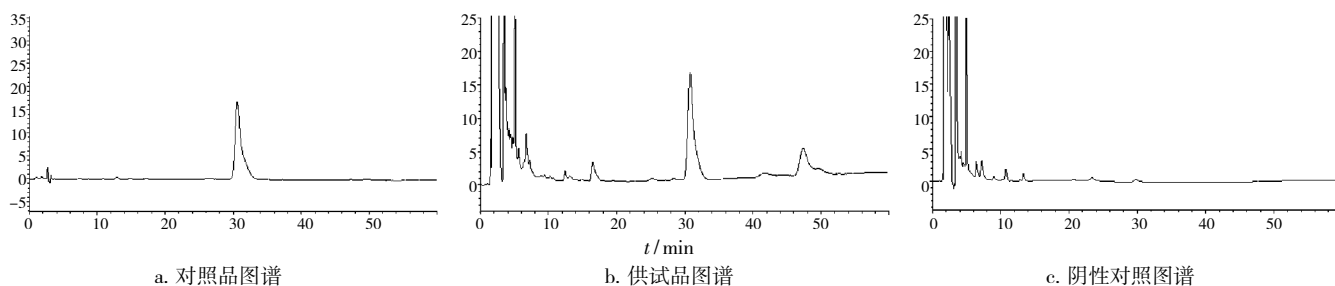


图 1 小柴胡颗粒 HPLC 图谱

Figure 1 HPLC graphs of Xiaochaihu Granules

20  $\mu\text{L}$ , 注入液相色谱仪, 按照 2.1 项下色谱条件进样分析, 以进样量  $X(\mu\text{g})$  为横坐标, 峰面积  $Y$  为纵坐标, 进行线性回归, 得线性回归方程为  $Y=1,588,875.05X-12,418.68$ ,  $r^2=1.00$ , 柴胡皂苷  $b_2$  在进样量 0.3632~3.6320  $\mu\text{g}$  范围内与峰面积呈良好的线性关系。

**2.3.3 精密度试验** 取 2.3.2 项下中间浓度的对照品溶液, 连续进样 5 次, 进样量 20  $\mu\text{L}$ , 测定柴胡皂苷  $b_2$  的峰面积值, 计算得其 RSD 为 0.3 %。结果表明仪器的精密度良好。

**2.3.4 重复性试验** 精密称取小柴胡颗粒 5 份, 按照 2.2.2 项下方法制备各供试品溶液, 精密吸取各供试品溶液 20  $\mu\text{L}$  进样, 分别按照 2.1 项下所述色谱条件进行测定, 计算得柴胡皂苷  $b_2$  的含量和 RSD 分别为 0.10  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$  和 2.6 %。结果表明该方法重复性良好。

**2.3.5 稳定性试验** 取供试品溶液分别在 0, 2, 4, 6, 8 h 按上述色谱条件进行分析, 结果柴胡皂苷  $b_2$  的 RSD 为 0.4 %, 表明柴胡皂苷  $b_2$  在供试品溶液中 8 h 内基本稳定。

**2.3.6 加样回收率试验** 精密称取小柴胡颗粒无糖型 1.0 g 或有糖型 2.5 g (7 份), 加入对照品 0.275 mL, 按照 2.2.2 项下方法制备, 精密吸取 20  $\mu\text{L}$  进样, 按照 2.1 项下色谱条件进行分析, 计算加样回收率。结果柴胡皂苷  $b_2$  平均加样回收率为 102.2 %, RSD 为 2.5 %, 结果见表 1。

表 1 柴胡皂苷  $b_2$  加样回收率试验结果

Table 1 The results of recovery test for saikosaponin  $b_2$

取样量/g	样品量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
1.0060	0.1006	0.0999	0.2026	102.2	102.2	2.5
1.0013	0.1001	0.0999	0.1995	99.5		
1.0110	0.1011	0.0999	0.2064	105.4		
1.0098	0.1010	0.0999	0.2061	105.3		
1.0003	0.1000	0.0999	0.1990	99.1		
1.0098	0.1010	0.0999	0.2026	101.7		
1.0110	0.1011	0.0999	0.2033	102.3		

**2.3.7 样品含量测定** 取不同厂家不同批号的小柴胡颗粒, 按照 2.2.2 项下的方法平行制备 3 份, 按照 2.1 项下所述色谱条件进行测定, 结果见表 2。

### 3 讨论

**3.1 检测波长的选择** 对照品柴胡皂苷  $b_2$  进行全波长扫描, 结果显示柴胡皂苷  $b_2$  在 254 nm 存在最大吸收峰。因此, 选用 254 nm 作为检测波长<sup>[8]</sup>。

**3.2 含量测定指标的选择** 药味指标成分的选择既要

表 2 小柴胡颗粒中柴胡皂苷  $b_2$  的含量

Table 2 Determination of saikosaponin  $b_2$  in Xiaochaihu Granules

药品	批号	含量/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	平均含量/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$
龙马小柴胡颗粒	130308	0.01	0.01
		0.01	
		0.01	
云南白药小柴胡颗粒	ZF12013	0.06	0.06
		0.07	
		0.07	
白云山小柴胡颗粒	K13037	0.09	0.09
		0.10	
		0.08	

考虑指标成分的性质, 又要考虑是否能对药物的有效性、安全性、可控性进行评价及中医君臣佐使的关系。小柴胡颗粒是以柴胡作为君药的中成药, 柴胡皂苷则是柴胡中重要的有效成分。柴胡皂苷 a、d 仅在 204 nm 存在末端吸收, 且因其分子中环氧结构的不稳定性导致在制剂工艺过程中大量转化为柴胡皂苷  $b_1$  和  $b_2$ , 不宜作为成药的含量测定指标。柴胡皂苷  $b_2$  具有较好的生理活性, 且在 254 nm 存在最大吸收峰, 在制剂工艺过程中能稳定存在。因此, 选用柴胡皂苷  $b_2$  作为含量测定指标具有科学性。建议药典委员会对含柴胡为主要药味的中药新药建立质量标准时以柴胡皂苷  $b_2$  为测定对象。

**3.3 提取溶剂种类的选择** 由于柴胡皂苷 a 和 d 在酸性环境中容易向柴胡皂苷  $b_1$ 、 $b_2$  转化<sup>[9]</sup>, 因此, 选择提取溶剂为含 8 % 浓氨试液的甲醇溶液。

### 3.4 氧化铝柱洗脱考察

**3.4.1 洗脱剂浓度的选择** 取样品适量, 置具塞锥形瓶中, 加入含 8 % 浓氨试液的甲醇溶液 30 mL, 密塞, 超声 30 min, 滤过, 置蒸发皿中水浴浓缩至约 5 mL, 加至碱性氧化铝柱 (10 g, 湿法装, 20 mL 甲醇预洗), 依次用甲醇、80 % 甲醇、60 % 甲醇、40 % 甲醇各 50 mL 洗脱, 收集各洗脱液, 水浴蒸干, 残渣以 5 mL 甲醇溶解。过微孔滤膜, 进样分析。发现上样流出液、甲醇及 80 % 甲醇洗脱液中能检测到柴胡皂苷  $b_2$ , 而 60 % 甲醇、40 % 甲醇洗脱液中未能检出柴胡皂苷  $b_2$ 。说明甲醇与 80 % 甲醇已经能完全洗脱柴胡皂苷, 有效去除杂质。最终确定用甲醇和 80 % 甲醇进行洗脱。

**3.4.2 洗脱剂用量选择** 取样品适量, 置具塞锥形瓶中, 加入含 8 % 浓氨试液的甲醇溶液 30 mL, 密塞, 超声 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, 加至碱性氧化铝柱 (10 g,

湿法装, 20 mL 甲醇预洗), 依次用甲醇、80 % 甲醇各 50 mL 洗脱, 收集上样流出液和甲醇洗脱液合并收集, 80 % 甲醇每 10 mL 收集一份, 水浴蒸干, 残渣加甲醇溶解, 转移至 5 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 过微孔滤膜, 取续滤液 20  $\mu$ L 进样分析。结果发现甲醇、80 % 甲醇各 50 mL 已经能完全洗脱, 最终确定洗脱剂的用量为甲醇和 80 % 甲醇各 50 mL。

**3.5 结果分析** 不同厂家的小柴胡颗粒中柴胡皂苷的含量差异很大, 高低悬殊达近 10 倍, 可见质量差异之大, 有必要对其进行质量控制。本研究可为小柴胡颗粒中柴胡的质量控制提供实验依据和方法思路, 也可为其他含柴胡复方制剂的评价方法提供参考。

#### 参考文献:

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京: 中国医

药科技出版社, 2010: 51.

- [2] 李军, 姜华, 尹卫平. 柴胡及其煎剂中皂苷类成分的高效液相指纹图谱研究[J]. 时珍国医国药, 2009, 20(9): 2205-2206.
- [3] 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.
- [4] 李腾, 高展, 孙玉侠, 等. 柴胡及其制剂中皂苷类成分的研究[J]. 中成药, 2011, 33(11): 1840-1843.
- [5] 李军, 姜华, 张延萍, 等. 单味柴胡煎煮过程中皂苷煎出量的变化[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(22): 155-158.
- [6] 姜华, 李军, 石任兵, 等. 炮制对柴胡药材中 4 种柴胡皂苷的影响[J]. 中国药理学杂志, 2009, 40(21): 618-621.
- [7] Liu C, Feng YJ, Gao F, et al. Characterization of HCoV-229E fusion core: implications for structure basis of coronavirus membrane fusion[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2006, 345(3): 1108.
- [8] 刘树强, 王术玲, 高晓玲, 等. 柴胡水煎过程中皂苷成分的变化规律[J]. 中药新药与临床药理, 2013, 24(6): 602-606.
- [9] 李军, 姜华, 张延萍, 等. HPLC 测定柴黄片中柴胡皂苷  $b_1$ 、 $b_2$  的含量[J]. 中国药理学杂志, 2011, 46(1): 61-63.

(编辑: 宋威)

## 不同益生菌对莱菔子水提取液的发酵研究

朱立俏<sup>1</sup>, 周洪雷<sup>1</sup>, 孙筱林<sup>2</sup>(1. 山东中医药大学, 山东 济南 250355; 2. 济南三株医药生物研究所, 山东 济南 250100)

**摘要:** 目的 比较莱菔子水提取液经不同益生菌及发酵条件发酵前后的变化。方法 采用反相 HPLC 法, 比较莱菔子水提取液经短双歧杆菌、植物乳杆菌、嗜酸乳杆菌、混合菌和是否加营养发酵前后芥子碱硫氰酸盐和芥子酸的含量变化及指纹图谱。结果 发酵可使芥子碱硫氰酸盐的含量降低, 使芥子酸的含量增加, 并建立了有 15 个共有峰的指纹图谱, 且相对峰面积变化较大。结论 莱菔子水提取液经发酵后, 在含量上会有较大的变化, 但并未出现新的化学成分。

**关键词:** 莱菔子; 益生菌发酵; 芥子碱硫氰酸盐; 芥子酸; 指纹图谱

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 1003-9783(2014)03-0359-05

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2014.03.031

### Fermentation of Semen Raphani Water Extract by Different Probiotics

ZHU Liqiao<sup>1</sup>, ZHOU Honglei<sup>1</sup>, SUN Xiaolin<sup>2</sup>(1. Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355 Shandong, China; 2. Jinan Sanzhu Biomedical Institute, Jinan 250100 Shandong, China)

**Abstract: Objective** To observe the changes of components of Semen Raphani water extract before and after fermentation by different probiotics and under various fermentation conditions. **Methods** By using reversed-phase HPLC, we compared the contents of sinapine thiocyanate and erucic acid, and observed the HPLC fingerprints of

收稿日期: 2013-11-22

作者简介: 朱立俏, 女, 讲师, 研究方向: 中药化学成分及质量控制研究。Email: zliqiao@163.com。通讯作者: 周洪雷, 教授, 博士生导师, 研究方向: 中药化学成分及质量控制。Email: zhouhonglei@163.com。

基金项目: 国家科技重大新药创制专项(2009ZX09301-013); 山东省自然科学基金项目(ZR2010HM017); 山东省教育厅科技计划项目(J105LL05); 山东省科技计划项目(2013GSF11903)。