

· 检验检测 ·

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2018.07.005

解郁安神颗粒中柴胡皂苷含量测定方法研究*

林 华¹, 黄兴振²

(1. 广西壮族自治区柳州食品药品检验所, 广西 柳州 545006; 2. 广西医科大学, 广西 南宁 530000)

摘要:目的 建立测定解郁安神颗粒中柴胡皂苷含量的高效液相色谱(HPLC)法。方法 色谱柱为 Thermo Hypersil BDS C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为水-乙腈, 梯度洗脱, 检测波长为 210 nm, 流速为 1.0 mL/min, 柱温为 25 ℃。结果 柴胡皂苷 a 的质量浓度线性范围为 20.25 ~ 311.46 μg/mL, $r=0.999\ 7$ ($n=7$), 平均回收率为 95.31%, RSD 为 1.29% ($n=6$); 柴胡皂苷 d 的质量浓度线性范围为 23.12 ~ 308.56 μg/mL, $r=0.999\ 6$ ($n=7$); 平均回收率为 96.35%, RSD 为 1.38% ($n=6$)。结论 该法能同时测定解郁安神颗粒中柴胡皂苷 a 和柴胡皂苷 d 的含量, 结果准确、重复性好、可操作性强, 为加强以柴胡皂苷作为有效成分的中成药质量控制提供了参考。

关键词: 解郁安神颗粒; 柴胡皂苷 a; 柴胡皂苷 d; 高效液相色谱法

中图分类号: R284.2; R286.0

文献标识码: A

文章编号: 1006-4931(2018)07-0014-04

Study on Methods of Content Determination of Saikosaponin in Jieyu'an Shen Granules

Lin Hua¹, Huang Xingzhen²

(1. Guangxi Liuzhou Food and Drug Inspection Institute, Liuzhou, Guangxi, China 545006; 2. Guangxi Medical University, Nanning, Guangxi, China 530000)

Abstract: Objective To establish an HPLC method for content determination of saikosaponin in Jieyu'an Shen Granules. **Methods** The column was Thermo Hypersil BDS C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was water-acetonitrile with gradient elution, the detection wavelength was 210 nm, the flow rate was 1.0 mL/min, and the column temperature was 25 ℃. **Results** The linearity of saikosaponin a within the range of 20.25 ~ 311.46 μg/mL ($r=0.999\ 7$, $n=7$), the average recovery was 95.31%, the RSD was 1.29% ($n=6$). The linearity of saikosaponin d within the range of 23.12 ~ 308.56 μg/mL ($r=0.999\ 6$, $n=7$), the average recovery was 96.35%, the RSD was 1.38% ($n=6$). **Conclusion** The method can simultaneously determine the content of saikosaponin a and saikosaponin d in Jieyu'an Shen Granules. The method is accurate, reproducible and operable, which can provide reference for quality control of saikosaponin as an effective component of Chinese patent medicine.

Key words: Jieyu'an Shen Granules; saikosaponin a; saikosaponin d; HPLC

柴胡 *Bupleurum marginatum* Wall. ex DC. 别名山柴胡、山菜、柴草, 是中国传统的药用植物, 具有两千多年的药用历史。具有疏肝解郁、解表退热和升举阳气等功效^[1-2], 经现代药理学与临床试验证实, 具有保肝、抗菌、抗病毒、抗肿瘤等作用。研究发现, 柴胡中含五环三萜类皂苷多达 100 多种, 其中含量较多的为柴胡皂苷 a, c, d^[3-8], 主要药理活性的物质为柴胡皂苷 a, d^[9-13]。目前, 以柴胡皂苷为主的单味及复方制剂, 如解郁安神颗粒、柴胡口服液、逍遥丸等, 临床应用比较广泛, 疗效显著。柴胡药材中柴胡皂苷 a 和柴胡皂苷 d 的含量已成为检验其质量的标准。

近年来, 以柴胡为主药的中成药多采用薄层色谱法, 以柴胡原药材作为对照品对其进行定性鉴别。在含有柴胡的诸多中成药中, 对于柴胡皂苷 a, d 的含量测定研究并不多见, 这是由于柴胡皂苷中的双键数目较少, 且柴胡皂苷 a, d 十分不稳定, 在高温或酸性条件下很容易发生开环反应而降解^[14-15]。因此, 传统的检测手段较

复杂, 在生产过程中, 更倾向于选择芍药苷、黄芩苷、甘草次酸等组分的含量作为测定指标。此外, 还有利用大孔树脂柱对中成药进行处理, 从而间接地测定其中柴胡皂苷的含量, 但这些方法均存在方法繁复、耗时耗材等缺陷。对于含柴胡的中成药, 尚未建立以柴胡皂苷含量为指标的标准测定方法。

中成药解郁安神颗粒由柴胡、丹皮、大枣、石菖蒲等多种药材制成, 有舒肝解郁、燥湿化痰、安神定志等功效, 是一种典型的以柴胡皂苷 a, d 为主要药用成分的中成药^[16-18]。因此, 本研究中采用高效液相色谱(HPLC)法检测解郁安神颗粒中柴胡皂苷 a, d 的含量, 具有柱效高、灵敏度高、分离时间短等优点^[19-22]。同时, 本研究中测定柴胡皂苷的 HPLC 法进行了方法学验证, 旨在建立一个重复性好、可操作性强的检测柴胡皂苷的方法, 不仅为解郁安神颗粒中柴胡皂苷含量的测定提供了可靠的方法, 同时对加强以柴胡皂苷作为有效成分的中成药的质量控制提供了参考。

*基金项目: 广西自然科学基金[2013GXNSFBA019129]。

第一作者: 林华(1982-), 男, 在职硕士研究生, 主管药师, 研究方向为食品药品检验分析, (电子信箱)lili810@126.com。

1 仪器与试药

1.1 仪器

岛津 2010 高效液相色谱仪, 紫外可见检测器(日本岛津公司); Milli-Q direct 超纯水(美国 Millipore 公司); RE52CS 型旋转蒸发仪, B-220 型恒温水浴锅(上海亚荣生化仪器厂); AB 256-S 型梅特勒电子天平(Mettler Toledo)。

1.2 试药

解郁安神颗粒(神威药业集团有限公司, 批号为 14060717, 14061412, 14070415); 柴胡皂苷 a 对照品(批号为 110777-201206)、柴胡皂苷 d 对照品(批号为 110777-201206), 均由中国食品药品检定研究院提供; 甲醇、乙腈均为色谱纯, 水为纯化水, 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Thermo Hypersil BDS C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 水(A 相), 乙腈(B 相), 梯度洗脱(见表 1); 检测波长: 210 nm; 流速: 1.0 mL/min; 进样量: 20 μL; 柱温: 25 °C; 进样室温度: 15 °C。

表 1 流动相梯度洗脱程序

时间(min)	流动相 A(%)	流动相 B(%)
0→25	80	20
25→30	40	60
30	40	60

2.2 溶液制备

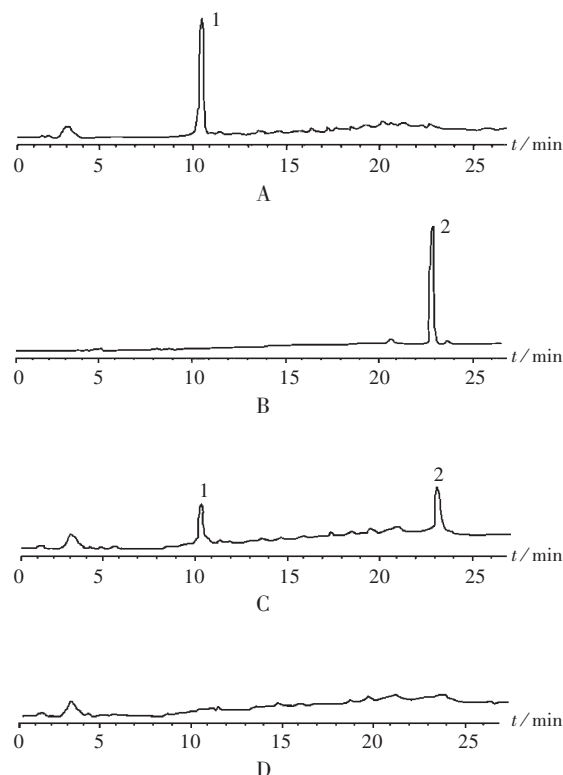
对照品溶液: 取柴胡皂苷 a 对照品约 2.88 mg, 精密称定, 置 5 mL 容量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 即得质量浓度为 576 μg/mL 的柴胡皂苷 a 对照品溶液。取柴胡皂苷 d 对照品约 3.24 mg, 精密称定, 置 5 mL 容量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 即得质量浓度为 648 μg/mL 的柴胡皂苷 d 对照品溶液。

供试品溶液: 取待测样品约 1.24 g, 精密称定, 置 100 mL 锥形瓶中, 加 30 mL 10% 氨水-甲醇溶液, 超声提取 30 min, 离心 10 min, 速率为 3 000 r/min。收集上清液, 继续提取 2 次。将 3 次提取所得上清液合并, 用旋转蒸发仪真空浓缩、干燥, 得浓缩物。将得到的浓缩物置烧杯中, 加 10 mL 水使其溶解, 移入分液漏斗, 加 30 mL 饱和正丁醇, 混匀, 静置分层, 收集醇层至另一锥形瓶, 连续萃取 2 次。将萃取液合并, 继续加 30 mL 氨水, 静置分层, 取醇层, 重复 3 次。将醇萃取液经旋蒸仪浓缩, 干燥, 加适量甲醇溶解, 转至 10 mL 容量瓶, 加甲醇定容, 摇匀备用。

阴性对照品溶液: 按处方比例自制不含柴胡的颗粒, 作为阴性对照品, 再按供试品溶液的配制方法制成阴性对照品溶液。

2.3 方法学考察

干扰试验: 精密吸取 2.2 项下 3 种溶液各 20 μL, 按 2.1 项下色谱条件测定。结果, 供试品溶液中其他成分不干扰测定。色谱图见图 1。



1. 柴胡皂苷 a 2. 柴胡皂苷 d
A. 柴胡皂苷 a 对照品溶液 B. 柴胡皂苷 d 对照品溶液
C. 供试品溶液 D. 阴性对照样品溶液

图 1 高效液相色谱图

线性关系考察: 取配制好的 2.2 项下柴胡皂苷 a 对照品溶液, 用甲醇稀释成质量浓度分别为 10, 20, 40, 80, 160, 240, 320 μg/mL 的对照品溶液。同样取适量 2.2 项下柴胡皂苷 d 对照品溶液, 稀释成质量浓度分别为 10, 20, 40, 80, 160, 240, 320 μg/mL 的对照品溶液。HPLC 分析, 记录峰面积。以对照品质量浓度(X)为横坐标, 峰面积(Y)为纵坐标计算回归方程。柴胡皂苷 a 质量浓度在 20.25 ~ 311.46 μg/mL 范围内与峰面积线性关系良好, 回归方程为 $Y = 2.31 \times 10^6 X + 1.86 \times 10^3$, $r = 0.9997 (n = 7)$; 柴胡皂苷 d 质量浓度在 23.12 ~ 308.56 μg/mL 范围内与峰面积线性关系良好, 回归方程为 $Y = 4.18 \times 10^6 X + 2.13 \times 10^3$, $r = 0.9996 (n = 7)$ 。

精密度试验: 取柴胡皂苷 a 对照品溶液与柴胡皂苷 d

表 2 柴胡皂苷 a 及柴胡皂苷 d 加样回收试验结果 ($n=6$)

取样量(g)		样品含量($\mu\text{g/mL}$)		加入量($\mu\text{g/mL}$)		测得量($\mu\text{g/mL}$)		回收率(%)		$\bar{X}$ (%)		RSD(%)	
A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
1.502 6	1.502 7	4 581.427	4 599.32	3 554.200	3 554.200	7 944.556	8 093.15	94.62	98.30				
1.504 3	1.504 4	4 586.611	4 587.56	3 554.200	3 554.200	7 959.638	8 047.52	94.90	97.35				
1.513 4	1.509 8	4 614.357	4 598.94	3 554.200	3 554.200	7 985.255	8 001.73	94.84	95.75				
1.514 5	1.512 6	4 617.711	4 611.32	3 554.120	3 554.120	7 967.248	7 974.57	94.24	94.63	95.31	96.35	1.29	1.38
1.518 6	1.516 3	4 630.211	4 613.45	3 554.120	3 554.120	8 100.524	8 045.76	97.64	96.57				
1.502 3	1.517 4	4 580.513	4 619.85	3 554.120	3 554.120	7 979.138	8 014.83	95.62	95.52				

注:A 为柴胡皂苷 a,B 为柴胡皂苷 d。

对照品溶液,分别进样 20 μL ,依法连续测定 6 次,记录色谱峰面积,结果柴胡皂苷 a 的 RSD 为 1.46% ($n=6$),柴胡皂苷 d 的 RSD 为 2.67% ($n=6$),表明仪器精密密度较好。

稳定性试验:取适量 2.2 项下供试品溶液,室温条件下静置 1 d,分别于 0,4,8,12,24 h 时进样分析,记录峰面积。结果柴胡皂苷 a 的 RSD 为 3.38% ($n=5$),柴胡皂苷 d 的 RSD 为 4.86% ($n=5$),表明供试品溶液室温放置 24 h 内稳定性良好。

重复性试验:称取同一批(批号为 14060717)样品 5 份,按 2.2 项下方法操作,进样分析,记录峰面积。结果柴胡皂苷 a,d 的 RSD 分别为 1.63% 和 3.05% ($n=5$),表明该方法重复性良好。

加样回收试验:称取同一批(批号为 14060717)样品 6 份置锥形瓶中,分别加适量柴胡皂苷 a,d 对照品溶液,依 2.2 项下方法制备供试品溶液,进样分析,检测柴胡皂苷 a,d 的含量。结果见表 2。

2.4 样品含量测定

取样品(批号分别为 14060717,14061412,14070415),按 2.2 项下方法制备溶液,测得 3 批样品中柴胡皂苷 a 的含量分别为 0.77,0.74,0.81 mg/g,柴胡皂苷 d 的含量分别为 1.54,1.47,1.68 mg/g。

3 讨论

3.1 提取溶剂选择

由柴胡皂苷 a,d 的结构可知,柴胡皂苷 a,d 很容易受到酚类及酸性组分的干扰而使环氧醚键断裂,降解生成柴胡皂苷 b_1, b_2 。因此,本研究中对解郁安神颗粒中的柴胡皂苷 a,d 的提取过程中以甲醇作为提取溶剂,既保证了柴胡皂苷 a,d 在溶剂中有足够的溶解度,又利用了氨水的碱性,中和了解郁安神颗粒中其他酸性成分,避免了柴胡皂苷 a,d 在提取过程中的降解。同时,本研究采用超声的方法对柴胡皂苷 a,d 进行提取,超声提取法具有提取效率高、提取溶剂用量少且提取时间短等优点,达到了提取高效、迅速的目的。

3.2 萃取溶剂选择

分析柴胡皂苷 a,d 的理化性质可知,两者在水或水饱和的正丁醇溶液中的溶解度较大,难溶于或不溶于苯、乙醚、氯仿等溶剂。因此,本研究中对柴胡皂苷 a,d 进行粗提取后,又进一步通过液-液萃取的方式进行除杂。试验发现,通过正丁醇对胡皂苷 a,d 进行萃取后,能除去粗提物中的酸性干扰成分,分离效果良好。

3.3 检测波长选择

在柴胡皂苷的结构中,双键的个数很少或无双键,故本试验制备柴胡皂苷 a 的标准溶液,采用紫外分光光度计于 200~400 nm 波长范围进行扫描,溶液在 210 nm 波长附近有最大吸收。因此,检测时,选择末端吸收 210 nm 对柴胡皂苷进行检测。

3.4 流动相选择

首先,由于柴胡皂苷 a,d 均为紫外末端吸收,当选择甲醇作为流动相时,此时甲醇的本底与试验中所采用的检测波长相近,会对柴胡皂苷的测定造成较明显的干扰。因此,本试验选择乙腈-水作为流动相进行洗脱。其次,由于柴胡皂苷 a,c,d 3 种成分的极性差异较大,同时,在解郁安神颗粒中还含有其他化学组分,故利用等度流动相进行洗脱时不能使全部样品的柴胡皂苷 a,d 得到良好分离,故采取梯度洗脱。

3.5 样品含量测定方法选择

由对柴胡皂苷 a,d 含量测定的结果可见,在梯度洗脱过程中,柴胡皂苷 a 首先被洗脱出来,随着流动相中乙腈比例的不断增加,柴胡皂苷 d 被洗脱出来,两者在此液相条件下可以完全分离。究其原因,可能与柴胡皂苷 a,d 的理化性质有关,虽然从所含有的官能团的种类与数量看,柴胡皂苷 a,d 均相同,但是比较两者的结构可以发现,柴胡皂苷 a,d 是一对立体异构体,16 位的一OH 的立体构型。因此,立体结构的不同可能导致了两者出峰时间的差异。

解郁安神颗粒是以柴胡作为君药,丹皮、大枣等作为佐药,柴胡的有效物质成分中柴胡皂苷 a,d 含量最

多,药理活性更明显,柴胡皂苷 a,d 的含量成为中成药解郁安神颗粒的质控标准。柴胡皂苷 a,d 的结构中均存在氧环,而且不饱和双键极少,故柴胡皂苷 a,d 的氧环极易在酸性条件下开环降解,两者的提取需在弱碱性条件下操作,并于 210 nm 紫外波长下检测。

3.6 研究价值

本研究中建立了同时测定解郁安神颗粒中柴胡皂苷 a,d 含量的 HPLC 法,可用于解郁安神颗粒中柴胡部分的质量控制。由于含有柴胡的中成药成分较为复杂,决定了这类药物在质量控制过程中存在一定的缺陷,如果中成药的质量检验标准不具有专属性与代表性,那就无法从根本上控制中成药的质量。因此,本研究中为实现含有柴胡的中药制剂的质控奠定了试验基础,为建立以柴胡皂苷含量为指标的标准提供了重要参考,具有十分重要的现实意义。

参考文献:

- [1] 肖功胜,杨云,刘富岗,等. 柴胡皂苷提取和含量测定方法研究[J]. 中成药,2009,31(4): 595 - 598.
- [2] 杨瑶琨,阎玉凝,杨洋,等. 阿尔泰柴胡中柴胡皂苷 a,c,d 的含量测定[J]. 北京中医药大学学报,2008,31(11): 777 - 780.
- [3] 章佳赞. 含柴胡的常用中成药中柴胡皂苷含量的测定及研究[D]. 上海:复旦大学,2010.
- [4] 王健,王博,滕利荣,等. 高效液相色谱测定克郁舒神颗粒中柴胡皂苷 a 含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2006,12(5): 7 - 9.
- [5] 高红梅,张啸环. 高效液相色谱法测定解郁安神颗粒中栀子苷的含量[J]. 长春中医药大学学报,2011,27(1): 13 - 14.
- [6] Zhang GS, Hu PY, Li DX, et al. Formulations, hemolytic and pharmacokinetic studies on saikosaponin a and saikosaponin d compound liposomes[J]. Molecules, 2015, 20(4): 5889 - 5907.
- [7] Lee TH, Park SH, You MH, et al. A potential therapeutic effect of Saikosaponin C as a novel dual - target anti - Alzheimer agent[J]. Journal of Neurochemistry, 2015, 12(8): 23 - 27.
- [8] Cui BS, Qiao YQ, Yuan Y, et al. Hepatoprotective saikosaponin homologs from *Comastoma pedunculatum*[J]. Planta Medica, 2014, 80(17): 1647 - 1656.
- [9] Zhao H, Li S, Zhang H, et al. Saikosaponin A protects against experimental sepsis via inhibition of NOD2 - mediated NF - κ B activation[J]. Experimental and Therapeutic Medicine, 2015, 10(2): 823 - 827.
- [10] Chen J, Duan M, Ling F, et al. Saikosaponin A inhibits influenza A virus replication and lung immunopathology[J]. Oncotarget, 2015, 6(40): 42541 - 42556.
- [11] Ma X, Dang C, Kang H, et al. Saikosaponin - D reduces cisplatin - induced nephrotoxicity by repressing ROS - mediated activation of MAPK and NF - κ B signalling pathways[J]. International Immunopharmacology, 2015, 28(1): 399 - 408.
- [12] Chen X, Yu T, Chen Z, et al. Effect of saikosaponins and extracts of vinegar - baked *Bupleuri Radix* on the activity of β - glucuronidase[J]. Xenobiotica, 2014, 44(9): 785 - 791.
- [13] Oko OOK, Agiang EA. Phytochemical activities of *Aspilula africana* leaf using different extractants[J]. Indian Journal of Animal Sciences, 2011, 81(8): 30 - 34.
- [14] 刘香玉,田民强,冯丽莉,等. 复方解郁颗粒的质量标准研究[J]. 中国药师,2014,17(5): 763 - 766.
- [15] 吴敏. 解郁颗粒的制备工艺及质量标准研究[D]. 成都: 成都中医药大学,2004.
- [16] 熊梦晓,黄必胜,白杨,等. RP - HPLC 法测定保康北柴胡中柴胡皂苷 a,d 的含量[J]. 现代中药研究与实践,2007,21(2): 42 - 44.
- [17] 赵白云,朱臻宇,王彬,等. HPLC - DAD - TOF/MS 法测定小柴胡汤中柴胡皂苷 a、黄芩苷和甘草酸的含量[J]. 第二军医大学学报,2007,28(5): 527 - 530.
- [18] 张宏娜,赵玉英,梁鸿,等. HPLC - ELSD 法同时测定柴胡中柴胡皂苷 a,c,d,f 的含量[J]. 药物分析杂志,2007,27(8): 1150 - 1153.
- [19] 李军,姜华,张延萍,等. HPLC 测定柴黄片中柴胡皂苷 b1,b2 的含量[J]. 中国药学杂志,2011,46(1): 61 - 63.
- [20] 王嘉林,王斯坦. HPLC - MSMS 测定小柴胡颗粒中柴胡皂苷 a 与柴胡皂苷 d[J]. 安徽医药,2015,19(3): 453 - 456.
- [21] 塔娜,李常胜,松林,等. HPLC 法测定不同产地北柴胡中柴胡皂苷 a,c,d 的含量[J]. 中医药导报,2013,19(6): 79 - 80.
- [22] 浦锦宝,梁卫青,郑军献,等. HPLC - ELSD 测定柴胡总皂苷中柴胡皂苷 a,d 的含量[J]. 中国中医药科技,2010,17(5): 430 - 431.

(收稿日期:2017 - 12 - 28;修回日期:2018 - 01 - 12)

中国科技核心期刊 中国科技论文统计源期刊

《中国药业》杂志 欢迎投稿! 欢迎订阅!

邮发代号:78 - 130,各地邮局均可订阅;补订、破月订可向本刊办理。电话兼传真:(023) 86592565

网上投稿: <http://www.zhongguoyaoye023.com> 或 中国药业在线投稿系统