

HPLC 法同时测定“中柴 2 号”中 7 种成分

温爽¹, 索志荣^{1*}, 秦海燕¹, 杨兴旺²

(1. 西南科技大学, 四川 绵阳 621010; 2. 四川德培源中药科技开发有限公司, 四川 绵阳 621010)

摘要: 目的 建立 HPLC 法同时测定“中柴 2 号”(川产北柴胡 *Bupleurum chinense* DC.) 地上、地下部分中柴胡皂苷 a、柴胡皂苷 c、柴胡皂苷 d、芦丁、槲皮素、异鼠李素、山柰素的含有量。方法 “中柴 2 号”甲醇提取液的分析采用 Hypersil GOLD 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5.0 μm); 以乙腈-0.1% 磷酸为流动相, 梯度洗脱; 体积流量 0.8 mL/min; 柱温 30 °C; 检测波长 210 nm。结果 7 种成分在各自范围内线性关系良好 ($r \geq 0.9991$), 平均加样回收率 96.30% ~ 102.7%, RSD 0.95% ~ 3.8%。样品地上部分含有大量黄酮, 而地下部分含有大量皂苷, 但几乎不含黄酮。结论 “中柴 2 号”地上部分(茎、叶)也具有药用价值, 应引起重视。

关键词: “中柴 2 号”; 化学成分; HPLC

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 1001-1528(2017)06-1207-05

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2017.06.021

Simultaneous determination of seven constituents in “Zhongchai No. 2” by HPLC

WEN Shuang¹, SUO Zhi-rong^{1*}, QIN Hai-yan¹, YANG Xing-wang²

(1. Southwest University of Science and Technology, Mianyang 621010, China; 2. Sichuan De Pei Yuan Traditional Chinese Medicine Science and Technology Development Co., Ltd., Mianyang 621010, China)

ABSTRACT: AIM To establish an HPLC method for the simultaneous content determination of saikosaponin a, saikosaponin c, saikosaponin d, rutin, quercetin, isorhamnetin and kaempferol in the aerial and underground parts of “Zhongchai No. 2” (*Bupleurum chinense* DC. from Sichuan Province). **METHODS** The analysis of “Zhongchai No. 2” methanol extract was performed on a 30 °C thermostatic Hypersil GOLD column (250 mm × 4.6 mm, 5.0 μm), with the mobile phase comprising of acetonitrile-0.1% phosphoric acid flowing at 0.8 mL/min in a gradient elution manner, and the detection wavelength was set at 210 nm. **RESULTS** Seven constituents showed good linear relationships within their own ranges ($r \geq 0.9991$), whose average recoveries were 96.30% – 102.7% with the RSDs of 0.95% – 3.8%. There were a lot of flavonoids in the aerial parts of samples, while a large number of saponins existed in the underground parts, but almost no flavonoids were found. **CONCLUSION**

The aerial parts (stems and leaves) of “Zhongchai No. 2” also have medicinal value, to which we should pay attention.

KEY WORDS: “Zhongchai No. 2”; chemical constituents; HPLC

柴胡为我国传统大宗常用中药, 药用历史悠久, 在 2015 年版《中国药典》中收录的原植物有 2 种, 即北柴胡 *Bupleurum chinense* DC. 和狭叶柴

胡 *Bupleurum scorzonerifolium* Willd.^[1], 具有透表泄热、疏肝解郁、升举阳气之功, 其中柴胡皂苷是柴胡的主要化学成分, 具有抗炎、抗病毒、保肝等药

收稿日期: 2016-08-01

基金项目: 国家 2013 年度中药材扶持资金重点项目子项目 (14zg0101); 四川省科技成果转化项目 (2014SC0027)

作者简介: 温爽 (1991—), 女, 硕士生, 研究方向为中药材活性成分及质量评价。Tel: 15982962791, E-mail: wenshuang116@163.com

*通信作者: 索志荣 (1973—), 男, 博士, 副教授, 研究方向为色谱-质谱分析及药物分析。Tel: 18011143730, E-mail: suozhirong@163.com

理活性^[2-3]；黄酮具有改善血液循环、提高免疫力、抑菌、杀菌的作用^[4]。目前，对柴胡中以上2类成分的分析方法主要有分光光度法^[5-6]、HPLC法^[7-8]、毛细管电泳法^[9]、近红外光谱法^[10]等。

“中柴2号”为四川德培源中药科技开发有限公司、中国医学科学院药用植物研究所、西南科技大学等单位通过多年努力，选育出通过专业主管权威机构鉴定认证、符合2015版《中国药典》要求的北柴胡品种，并在四川省广元市进行了大面积栽培，但尚无对其中皂苷与黄酮类成分分析的报道。本研究采用HPLC-UV法对“中柴2号”地上、地下部分中柴胡皂苷a、柴胡皂苷c、柴胡皂苷d、芦丁、槲皮素、异鼠李素、山柰素的含有量同时进行测定，该方法简便准确，可为柴胡不同部位入药及其综合利用提供科学依据，避免资源浪费，同时也能够为完善柴胡的质量评价体系提供理论基础。

1 仪器与试药

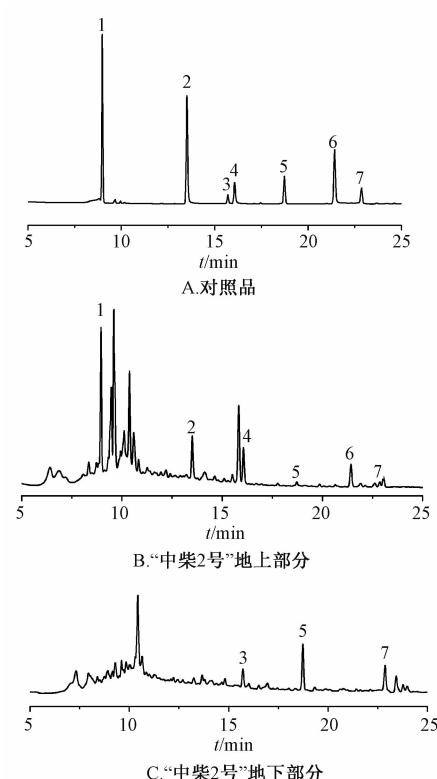
1.1 仪器 UltiMate 3000 DGLG 双三元、二维液相色谱仪（赛默飞世尔科技有限公司）；KQ2200B型超声波清洗仪（昆山市超声仪器有限公司）；R-301旋转蒸发器（上海申顺生物科技有限公司）；电子天平（北京赛多利斯仪器系统有限公司，精度0.01 mg）；101A-2数显电热鼓风干燥箱（上海浦东荣丰科学仪器有限公司）；Milli-Q超纯水机（美国默克密理博有限公司）。

1.2 试药 柴胡皂苷a、柴胡皂苷c、柴胡皂苷d、异鼠李素、山柰素对照品（成都普菲德生物技术有限公司，批号141128、140820、141220、151010、150924，含有量均≥98%）；芦丁、槲皮素对照品（中国食品药品检定研究院，批号100080-201407、100081-201406，含有量分别为92.5%、97.3%）。乙腈、甲醇为色谱纯（美国Fisher公司）；磷酸、甲酸为分析纯（成都市科龙化工试剂厂）；水为超纯水（自制）。“中柴2号”（地上、地下部分）购自四川德培源中药科技开发有限公司，产地绵阳安县花荄镇、广元青川县竹园镇、马鹿乡（2013~2015年3月、2014年11月播种，2016年11月统一采收），经中国医学科学院药用植物研究所魏建和研究员鉴定为正品。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Hypesil GOLD色谱柱（4.6 mm×250 mm, 5 μm）；流动相乙腈（A）-0.1%磷酸（B），梯度洗脱（0~5 min, 10%~30% A；5~25 min, 70% A）；体积流量0.8 mL/min；柱温

30 °C；检测波长210 nm；进样量10 μL。HPLC色谱图见图1。



1. 芦丁 2. 槲皮素 3. 柴胡皂苷c 4. 异鼠李素 5. 柴胡皂苷a 6. 山柰素 7. 柴胡皂苷d
1. rutin 2. quercetin 3. saikosaponin c 4. isorhamnetin 5. saikosaponin a 6. kaempferol 7. saikosaponin d

图1 样品HPLC色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of samples

2.2 对照品溶液制备 精密称取对照品柴胡皂苷a 7.02 mg、柴胡皂苷c 5.60 mg、柴胡皂苷d 8.21 mg、芦丁 10.03 mg、槲皮素 6.30 mg、异鼠李素 1.52 mg、山柰素 6.62 mg，置于10 mL量瓶中，甲醇溶解并稀释至刻度，摇匀，制成质量浓度分别为0.702、0.560、0.821、1.003、0.630、0.152、0.662 mg/mL的对照品贮备液。再分别取7.01、2.82、4.11、2.02、7.90、4.53、4.42 mg，置于10 mL量瓶中，甲醇溶解并稀释至刻度，摇匀，制成质量浓度分别为0.701、0.282、0.411、0.202、0.790、0.453、0.442 mg/mL的对照品溶液。

2.3 供试品溶液制备 精密称取样品1.0 g，加入甲醇50 mL，密塞，超声（200 W、40 kHz）30 min，过滤，20 mL甲醇分2次洗涤容器和药渣，合并洗液与滤液，减压旋蒸，残渣加甲醇溶解并转移至10 mL量瓶中，加甲醇稀释至刻度，摇

匀, 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

2.4 线性关系考察 吸取对照品贮备液, 稀释至初始质量浓度的 1/250、1/100、1/50、1/20、1/5、1/1, 取 10 μL 注入色谱仪, 在“2.1”项色

谱条件下测定。以进样量为横坐标 (X), 峰面积为纵坐标 (Y) 进行回归, 计算检出限 (S/N = 3) 和定量限 (S/N = 10)。结果见表 1。

表 1 各成分线性关系

Tab. 1 Linear relationships of various constituents

成分	回归方程	线性范围/(μg·mL⁻¹)	r	LOD/(μg·L⁻¹)	LOQ/(μg·L⁻¹)
柴胡皂苷 a	$Y = 0.0611X + 0.7911$	2.8 ~ 700.0	0.9997	8.8	29.0
柴胡皂苷 c	$Y = 0.0497X - 0.0358$	2.2 ~ 560.0	0.9996	220.0	740.0
柴胡皂苷 d	$Y = 0.0511X - 0.2801$	3.3 ~ 820.0	0.9991	490.0	1620.0
芦丁	$Y = 0.4816X - 0.2757$	4.0 ~ 1000.0	0.9996	33.0	110.0
槲皮素	$Y = 1.5561X - 1.051$	2.5 ~ 630.0	0.9999	94.0	310.0
异鼠李素	$Y = 1.0413X - 2.1704$	2.0 ~ 150.0	0.9994	500.0	1650.0
山柰素	$Y = 0.8391X - 0.7086$	2.6 ~ 660.0	0.9994	6.7	22.0

2.5 精密度试验 取“2.2”项下对照品溶液进样 6 次, 每次 10 μL, 测得柴胡皂苷 a、柴胡皂苷 c、柴胡皂苷 d、芦丁、槲皮素、异鼠李素、山柰素峰面积 RSD 分别为 0.81%、0.53%、0.44%、0.71%、0.73%、0.89%、0.64%, 表明仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验 将“2.3”项下供试品溶液在“2.1”项色谱条件下于 0、2、4、6、8、10 h 进样 10 μL, 测得地上部分柴胡皂苷 a、柴胡皂苷 d、芦丁、槲皮素、异鼠李素、山柰素峰面积 RSD 分别为 1.5%、1.3%、0.88%、1.1%、1.7%、0.91%, 地下部分柴胡皂苷 a、柴胡皂苷 c、柴胡皂苷 d 分别为 0.96%、1.2%、0.73%, 表明供试品溶液在 10 h 内稳定性良好。

2.7 重复性试验 取“2.3”项下供试品溶液 6 份, 进样 10 μL, 测得地上部分柴胡皂苷 a、柴胡皂苷 d、芦丁、槲皮素、异鼠李素、山柰素峰面积 RSD 分别为 1.3%、1.6%、0.99%、1.2%、0.91%、0.78%, 地下部分柴胡皂苷 a、柴胡皂苷 c、柴胡皂苷 d 分别为 1.1%、1.5%、0.84%, 表明该方法重复性良好。

2.8 加样回收率试验 精密称取样品地上、地下部分细粉各 3 份, 每份 0.5 g, 置于锥形瓶中, 精密加入 0.701 mg/mL 柴胡皂苷 a、0.282 mg/mL 柴胡皂苷 c、0.411 mg/mL 柴胡皂苷 d、0.202 mg/mL 芦丁、0.790 mg/mL 槲皮素、0.453 mg/mL 异鼠李素、0.442 mg/mL 山柰素对照品溶液。按“2.3”项下方法制备供试品溶液 6 份, 吸取 10 μL 测定回收率, 结果见表 2~3。

2.9 样品含有量测定 按“2.3”项下方法制备

表 2 各成分加样回收率试验 (地上部分, n=3)

Tab. 2 Results of recovery tests for various constituents (aerial parts, n=3)

成分	原有量/加入量/测得量/			回收率/平均回收率/%		RSD/%
	mg	mg	mg	%	%	
柴胡皂苷 a	0.0789	0.0700	0.147	97.29	98.14	2.6
	0.0813	0.0700	0.152	101.0		
	0.0717	0.0700	0.139	96.14		
柴胡皂苷 c	-	0.0280	0.0271	96.79	99.05	2.6
	-	0.0280	0.0285	101.8		
	-	0.0280	0.0276	98.57		
柴胡皂苷 d	0.141	0.164	0.302	98.17	97.97	0.95
	0.138	0.164	0.300	98.78		
	0.140	0.164	0.299	96.95		
芦丁	0.783	0.800	1.57	98.38	99.98	3.8
	0.776	0.800	1.61	104.3		
	0.812	0.800	1.59	97.25		
槲皮素	0.159	0.158	0.313	97.47	96.41	2.5
	0.162	0.158	0.310	93.67		
	0.160	0.158	0.315	98.10		
异鼠李素	0.251	0.225	0.478	100.9	100.0	1.2
	0.253	0.225	0.475	98.67		
	0.250	0.225	0.476	100.4		
山柰素	0.138	0.132	0.271	100.8	98.99	1.9
	0.135	0.132	0.263	96.97		
	0.135	0.132	0.266	99.24		

注: - 表示该成分含有量低于检出限, 故计算加样回收率时忽略不计

供试品溶液, 平行 3 份, 在“2.1”项色谱条件下测定, 结果见表 4~5。

3 讨论

3.1 指标成分选择 虽然《中国药典》只规定了柴胡药用成分为柴胡皂苷 a 和柴胡皂苷 d, 但经过

表3 各成分加样回收率试验结果(地下部分, n=3)

Tab. 3 Results of recovery tests for various constituents (underground parts, n=3)

成分	原有量/ mg		加入量/ mg		测得量/ mg	回收率/ %	平均回收率/ %	RSD/ %
	mg	mg	mg	%				
柴胡皂苷 a	1.74	1.40	3.18	102.9	101.2	1.8	101.2	1.8
	1.76	1.40	3.18	101.4				
	1.81	1.40	3.20	99.29				
柴胡皂苷 c	0.771	0.560	1.35	103.4	102.7	0.95	102.7	0.95
	0.802	0.560	1.38	103.2				
	0.781	0.560	1.35	101.6				
柴胡皂苷 d	0.140	0.164	0.303	99.39	99.39	1.2	99.39	1.2
	0.139	0.164	0.304	100.6				
	0.140	0.164	0.301	98.17				
芦丁	-	0.100	0.103	103.0	100.0	2.6	100.0	2.6
	-	0.100	0.0990	99.00				
	-	0.100	0.0980	98.00				
槲皮素	-	0.0790	0.0762	96.46	99.16	3.2	99.16	3.2
	-	0.0790	0.0811	102.7				
	-	0.0790	0.0777	98.35				
异鼠李素	-	0.0225	0.0218	96.89	96.30	2.4	96.30	2.4
	-	0.0225	0.0211	93.78				
	-	0.0225	0.0221	98.22				
山柰素	-	0.0264	0.0253	95.83	98.99	3.3	98.99	3.3
	-	0.0264	0.0261	98.86				
	-	0.0264	0.0270	102.3				

注: -表示该成分含有量低于检出限, 故计算加样回收率时忽略不计

多年研究发现, 柴胡中还存在其他药用成分, 如黄酮^[11]、多糖^[12]等, 其中黄酮类成分芦丁具有抗

表4 各成分含有量测定结果(地上部分, mg/g, n=3)

Tab. 4 Results of content determination of various constituents (aerial parts, mg/g, n=3)

产地	播种时间	柴胡皂苷 a	柴胡皂苷 d	皂苷总量	芦丁	槲皮素	异鼠李素	黄酮总量
绵阳安县花荄镇	2014年3月	0.344	0.115	0.459	1.11	0.281	0.336	2.01
绵阳安县花荄镇	2015年3月	0.144	0.275	0.419	1.54	0.314	0.271	2.59
广元青川县竹园镇	2013年3月	0.142	0.167	0.309	4.23	0.274	0.406	5.19
广元青川县竹园镇	2014年3月	0.254	0.875	0.342	2.77	0.301	0.218	3.62
广元青川县马鹿乡	2014年11月	0.068	0.035	0.103	7.25	0.339	0.559	8.75

表5 各成分含有量测定结果(地下部分, mg/g, n=3)

Tab. 5 Results of content determination of various constituents (underground parts, mg/g, n=3)

产地	播种时间	柴胡皂苷 a	柴胡皂苷 c	柴胡皂苷 d	皂苷总量
绵阳安县花荄镇	2014年3月	4.39	1.04	3.80	9.23
绵阳安县花荄镇	2015年3月	3.46	1.60	2.79	7.85
广元青川县竹园镇	2013年3月	4.86	0.873	3.58	9.31
广元青川县竹园镇	2014年3月	4.19	1.56	2.27	8.02
广元青川县马鹿乡	2014年11月	5.83	0.929	3.26	10.0

3.3.2 流动相 有机相考察了甲醇、乙腈, 水相考察了水、0.1% 磷酸。由于甲醇在210 nm 波长处紫外吸收较大, 基线漂移严重, 对测定结果影响较大, 故有机相选择乙腈; 乙腈-0.1% 磷酸与乙腈-

炎、抗病毒、保持、恢复毛细血管正常等作用, 槲皮素具有止咳祛痰、平喘、降压、增强毛细血管抵抗力、增加冠脉血流量等作用, 山柰素对金黄色葡萄球菌及伤寒杆菌、绿脓杆菌、痢疾杆菌等均有抑制作用, 异鼠李素具有抗炎、止咳祛痰、消食化滞, 活血散瘀等功效。“中柴2号”地上部分含有大量黄酮和少量皂苷, 而地下部分含有大量皂苷, 但几乎不含黄酮, 从柴胡入药方面来看, 不同治疗需求可采用不同药用部位, 有利于该药材综合利用, 避免资源浪费, 也为全草用药提供了科学依据。

3.2 提取方法优化 本实验考察了70%、80%、90%、100% 甲醇4种提取溶剂, 以及回流、索氏、超声3种提取方法对提取率的影响, 发现80% 甲醇超声提取时提取效率最高。同时在考察超声时间时发现, 超声30 min以上时提取效率基本不变。因此, 确定提取方法为80% 甲醇超声提取30 min。

3.3 色谱条件优化

3.3.1 检测波长 将各成分进行全波长扫描, 发现黄酮类成分在200、250、360 nm 左右有较大吸收, 柴胡皂苷 a、柴胡皂苷 c、柴胡皂苷 d 仅在190~220 nm 处存在末端吸收, 有机流动相在190~200 nm 吸收较大, 影响有效成分的测定。综合考虑, 选择210 nm 作为检测波长。

水比较, 分离度更高, 峰形更好。因此, 最终选择乙腈-0.1% 磷酸作为流动相。

3.3.3 色谱柱 考察了ZORBAX SB-C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm)、ZORBAX Extend-C₁₈ (250 mm ×

4.6 mm, 5 μm)、Hypersil GOLD(250 mm \times 4.6 mm, 5.0 μm)，发现 ZORBAX Extend-C₁₈ 和 ZORBAX SB-C₁₈ 色谱柱分离效果不如 Hypersil GOLD 色谱柱，故选择 Hypersil GOLD 色谱柱。

3.4 含有量分析 “中柴2号”地下部分皂苷含有量为 0.785% ~ 1.02%，其中柴胡皂苷 a 和柴胡皂苷 d 总含有量远高于《中国药典》规定的 0.30%，课题组前期研究也表明，两者含有量高于湖北、甘肃、陕西等地样品；其地上部分含有大量黄酮和少量皂苷，前者含有量 2.01 ~ 8.75 mg/g，后者 0.010% ~ 0.046%。目前，柴胡的药用部分为根部，而茎、叶等地上部分被舍弃，造成了药用资源浪费，故建议应重视这一部分，以更合理地开发柴胡药材。

参考文献：

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典：2015 年版一部 [S]. 北京：中国医药科技出版社，2015：280-281.
- [2] 陈慧慧，张敏，虞慧娟，等. 柴胡和黄芩配伍解热抗炎作用研究[J]. 中成药，2011，33(9)：1596-1598.
- [3] Wang Q W, Zheng X L, Yang L, et al. Reactive oxygen species-mediated apoptosis contributes to chemosensitization effect of saikosaponins on cisplatin-induced cytotoxicity in cancer cells

- [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2010, 29(35) : 159-166.
- [4] 冯煦，王鸣，赵友谊，等. 北柴胡茎叶总黄酮抗流感病毒的作用[J]. 植物资源与环境学报，2002，11(4)：15-18.
- [5] 周亚福，毛少利，李思锋，等. 柴胡属 5 种植物总皂苷和总黄酮含量的测定[J]. 时珍国医国药，2013，24(5)：1241-1243.
- [6] 曹爱农，范铭，吕铎，等. 不同产地商品柴胡性状及质量评价[J]. 中药材，2015，38(8)：1611-1614.
- [7] 林东昊，茅仁刚，王智华，等. HPLC 测定不同产地北柴胡中的柴胡皂苷 a、c、d [J]. 中成药，2002，24(5)：60-62.
- [8] 袁王俊，张维瑞，吴宏欣，等. HPLC 法测定柴胡不同部位 4 种黄酮类成分[J]. 中成药，2013，35(4)：797-800.
- [9] Lin X L, Xue L, Zhang H Y, et al. Determination of saikosaponins a, c and d in *Bupleurum Chinese DC.* from different areas by capillary zone electrophoresis [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2005, 382(7) : 1610-1615.
- [10] 唐进法，王星，曹占霞. 近红外光谱法测定柴胡药材中柴胡皂苷 A 含量[J]. 中国实验方剂学杂志，2012，18(17)：138-141.
- [11] 梁鸿，赵玉英，崔艳君. 北柴胡中黄酮类化合物的分离鉴定[J]. 北京医科大学学报，2000，32(3)：223-225.
- [12] 王鸣，刘培，冯煦，等. 北柴胡茎叶化学成分研究[J]. 中药材，2009，32(3)：367-369.

猴头菌丝固体培养物及胃乐宁片低聚糖部位的 HPLC-ELSD 指纹图谱

陈婷^{1,2}，杨军辉^{1,2}，李俊松^{1,2*}，陈坤³，狄留庆^{1,2}，郭青⁴

(1. 南京中医药大学药学院，江苏南京 210046；2. 江苏省中药高效给药系统工程技术研究中心，江苏南京 210046；3. 南京老山药业有限公司，江苏南京 210004；4. 江苏省食品药品检验所，江苏南京 210008)

摘要：目的 建立猴头菌 *Hericium erinaceus* 丝固体培养物及胃乐宁片低聚糖部位的 HPLC-ELSD 指纹图谱。方法 样品水提液的分析采用 Waters XBridge™ Amide 色谱柱 (4.6 mm \times 150 mm, 3.5 μm)；以乙腈-0.2% 醋酸铵为流动相，梯度洗脱；体积流量 1 mL/min；柱温 40 °C。结果 2 种 HPLC-ELSD 指纹图谱分别有 8 个和 9 个共有峰，相似度分别为 0.994 ~ 0.966 和 0.990 ~ 0.997，其中 3 个为甘露醇、乳糖和海藻糖，在各自范围内线性关系良好 ($r \geq 0.9990$)，平均加样回收率 95.08% ~ 104.82%，RSD 1.12% ~ 2.90%。结论 该方法简便、快速、准确，可用于猴头菌丝固体培养物及胃乐宁片的质量控制。

关键词：猴头菌丝；固体培养物；胃乐宁片；低聚糖；甘露醇；乳糖；海藻糖；HPLC-ELSD 指纹图谱

中图分类号：R284.1 **文献标志码：**A **文章编号：**1001-1528(2017)06-1211-06

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2017.06.022

收稿日期：2016-07-20

作者简介：陈婷（1991—），女，硕士生，研究方向为中药新剂型与新技术。E-mail：chenting920130@163.com

*通信作者：李俊松（1964—），男，教授，硕士生导师，研究方向为中药新剂型与新技术。Tel：(025) 85811230，E-mail：lijun-song1964@163.com