

UPLC 法测定小柴胡颗粒中柴胡皂苷 b₁、b₂

王培¹, 许保海¹, 孙逸轩², 刘长利^{2*}

1. 首都医科大学附属北京积水潭医院 中药房, 北京 100035

2. 首都医科大学 中医药学院, 北京 100069

摘要: 目的 建立 UPLC 法测定小柴胡颗粒中柴胡皂苷 b₁、b₂。方法 使用 Acquity UPLC BHE C₁₈ 色谱柱 (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm); 流动相: 水-乙腈, 梯度洗脱; 检测波长: 254 nm; 体积流量: 0.3 mL/min; 柱温: 30 ℃; 进样量 3 μL。结果 柴胡皂苷 b₁、b₂ 线性范围分别为 0.006~0.374 mg、0.003~0.214 mg, 平均回收率分别为 98.97%、99.35%, RSD 值分别为 1.82%、1.16%。结论 所建立方法准确、稳定, 重现性好, 可用于小柴胡颗粒的质量控制和评价。

关键词: 小柴胡颗粒; 柴胡皂苷 b₁; 柴胡皂苷 b₂; 超高效液相色谱

中图分类号: R284 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2024)08-2001-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2024.08.009

Determination of saikosaponin b₁ and saikosaponin b₂ in Xiaochaihu Granules by UPLC

WANG Pei¹, XU Baohai¹, SUN Yixuan², LIU Changli²

1. Department of Chinese Pharmacy, Beijing Jishuitan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100035, China

2. College of Traditional Chinese Medicine, Capital Medical University, Beijing 100069, China

Abstract: Objective To develop an UPLC method for determination the saikosaponin b₁ and saikosaponin b₂ in Xiaochaihu Granules. **Methods** The analysis was applied on Acquity UPLC BHE C₁₈ column (100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm). The mobile phase consisted of water and acetonitrile with gradient elution. The detection wavelength was set at 254 nm, flow rate was 0.3 mL/min, column temperature was 30 ℃, and volume of injection was 3 μL. **Results** Saikosaponin b₁ and saikosaponin b₂ showed good linear relationships of 0.006 — 0.374 mg and 0.003 — 0.214 mg, whose average recoveries were 98.97% and 99.35% with RSD values of 1.82% and 1.16%. **Conclusion** The established method is accurate, stable, and has good reproducibility, and can be used for quality control and evaluation for Xiaochaihu Granules.

Key words: Xiaochaihu Granules; saikosaponin b₁; saikosaponin b₂; UPLC

小柴胡颗粒源自《伤寒论》中的小柴胡汤, 方中以柴胡为君药, 配伍黄芩、甘草等 7 味中药, 具有解表散热、疏肝和胃、和解少阳之功, 收载于《中国药典》2020 年版一部。小柴胡颗粒在《中国药典》2020 年版一部测定项下仅规定了黄芩苷的含量。柴胡皂苷具有抗炎、解热、保肝等作用^[1-3], 是君药柴胡发挥疗效的重要成分。《中国药典》2020 年版一部规定了柴胡饮片中柴胡皂苷 a、d, 但在制剂生产过程中, 其分子内环氧结构不稳定, 导致部分转化为次生皂苷柴胡皂苷 b₁、b₂^[4-5]。柴胡皂苷 b₁、b₂ 具

有保护急性肝损伤、减轻脓毒性肺损伤炎症、减少细胞凋亡等作用^[6-7]。由于小柴胡颗粒在制剂过程中需经过煎煮、浓缩、制粒、干燥等过程, 柴胡皂苷 a、d 将在一定程度上转化成为柴胡皂苷 b₁、b₂, 且柴胡皂苷 a、d 仅在 204 nm 存在末端吸收, 色谱峰易受干扰, 因此测定柴胡皂苷 b₁、b₂ 可反映出小柴胡颗粒中柴胡的质量和厂家制剂工艺的稳定性。本研究建立了 UPLC 法测定小柴胡颗粒中柴胡皂苷 b₁、b₂ 的方法, 方法准确、稳定, 重现性好, 可用于小柴胡颗粒的质量控制和评价。

收稿日期: 2024-04-30

基金项目: 北京市中医药管理局第三批中药骨干人才培养项目 (京中医科学[2022]59 号)

作者简介: 王培 (1987—), 女, 主管药师, 硕士, 从事药物质量控制、中药临床药学研究。E-mail: rebecca19871022@sina.com

*通信作者: 刘长利 (1974—), 男, 教授, 博士, 从事药用植物学和中药资源学研究。E-mail: chaihzy666@ccmu.edu.cn

1 仪器与试药

Agilent 1290 Infinity II 超高效液相色谱仪, 配有 G7114B VWD 检测器; Sartorius SECURA125-1CN 分析天平; Eppendorf Centrifuge 5424R 离心机; DT 1028H 超声仪 (Bandelin Electronic)。

柴胡皂苷 b_1 、 b_2 对照品均购自上海源叶生物科技有限公司, 批号 A23IB222142、A18HB191732, 经 HPLC 检测质量分数均大于 98%。乙腈、甲醇为色谱纯 (Fisher Chemical), 无水乙醇为分析纯 (京纯试剂)。

小柴胡颗粒购自零售药店, 生产厂家分别为广州王老吉药业股份有限公司 (批号 2212045, 规格 10 g/袋)、四川逢春制药有限公司 (批号 221238, 规格 10 g/袋)、安徽张恒春药业股份有限公司 (批号分别为 2301142、2301084, 规格 10 g/袋)、江西汪氏药业有限公司 (批号分别为 20230132、20221256, 规格 10 g/袋)、云南白药集团股份有限公司 (批号分别为 ZAA2363、ZAA2364, 规格 10 g/袋)、江西南昌桑海制药有限责任公司 (批号 230125, 规格 10 g/袋)、广西吉民堂药业有限公司 (批号 220701, 规格 10 g/袋)、恒拓集团南宁仁盛制药有限公司 (批号 221235, 规格 10 g/袋)、九寨沟天然药业股份有限公司 (批号 2212005, 规格 10 g/袋)、广西嘉进药业股份有限公司 (批号 2212061, 规格 2.5 g/袋, 无蔗糖)、一力制药 (罗定) 有限公司 (批号 2212019L, 规格 10 g/袋)、江西德上制药股份有限公司 (批号 23010272, 规格 10 g/袋)、广州白云山光华制药有限公司 (批号 K20637, 规格

10 g/袋)、北京九龙制药有限公司 (批号 221106, 规格 4 g/袋, 无蔗糖)、四川彩虹制药有限公司 (批号 221101, 规格 10 g/袋)、甘肃岷海制药有限责任公司 (批号 221032, 规格 10 g/袋)。随机编号 S1~S16, 其中 S3~S5 厂家购入 2 种批次。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Acquity UPLC BHE C_{18} 色谱柱 (100 mm×2.1 mm, 1.7 μ m); 流动相: 水 (A) - 乙腈 (B), 梯度洗脱 (0~25 min, 25%~37% B; 25~33 min, 37% B; 33~53 min, 37%~65% B); 检测波长: 254 nm; 体积流量: 0.3 mL/min; 柱温: 30 $^{\circ}$ C; 进样量 3 μ L。

2.2 对照品溶液的制备

分别称量柴胡皂苷 b_1 、 b_2 对照品适量, 用甲醇定容至 5 mL, 摇匀, 即得含柴胡皂苷 b_1 、 b_2 分别为 0.374、0.214 mg/mL 的对照品储备液。

2.3 供试品溶液的制备

精密称定小柴胡颗粒样品 1 g, 吸取 10 mL 蒸馏水加入其中, 涡旋 1 min 后超声处理 1 h, 4 000 r/min 离心后将上清转移至圆底烧瓶中, 减压旋蒸至完全旋干, 分 3 次分别加入 400、400、200 μ L 色谱甲醇复溶, 将全部甲醇转移至量瓶, 加入色谱甲醇定容至 1 mL, 即得。

2.4 专属性试验

吸取对照品溶液和小柴胡颗粒供试品溶液各 3 μ L, 进样分析, 色谱图见图 1。结果表明, 柴胡皂苷 b_1 、 b_2 与其他组分均能达到较好分离, 分离度大于 1.5。

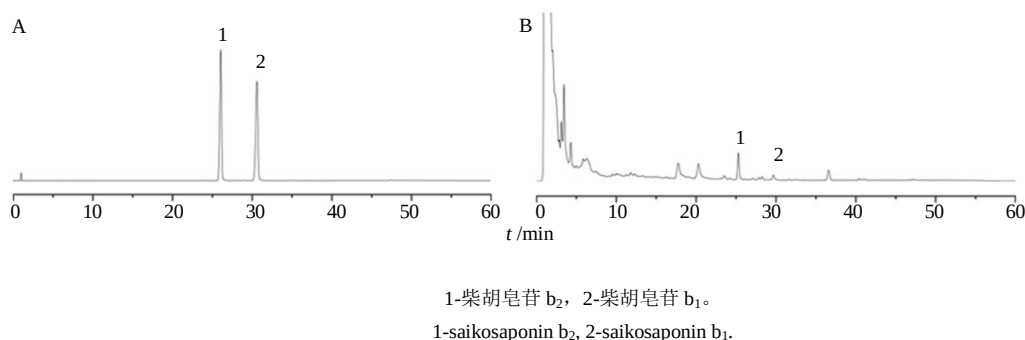


图 1 混合对照品 (A) 和小柴胡颗粒 (B) 的 UPLC 色谱图

Fig. 1 UPLC chromatograms of mixed reference substances (A) and Xiaochaihu Granules (B)

2.5 标准曲线的制备

将柴胡皂苷 b_1 、 b_2 对照品储备液由高到低逐级稀释, 得 0.187、0.094、0.062、0.047、0.037、0.023、

0.012、0.006 mg/mL 柴胡皂苷 b_1 对照品溶液和 0.107、0.054、0.036、0.027、0.021、0.013、0.007、0.003 mg/mL 柴胡皂苷 b_2 对照品溶液。精密吸取各对照品溶液进

样测定峰面积,以质量浓度为横坐标,峰面积为纵坐标进行线性回归,得到标准曲线方程。柴胡皂苷 b₁: $Y=19\,772X+5.858\,7(r=0.999\,3)$,线性范围:0.006~0.374 mg。柴胡皂苷 b₂: $Y=14\,714X+2.577\,5(r=0.999\,3)$,线性范围:0.003~0.214 mg。

2.6 检测限和定量限

以色谱峰信噪比(S/N)=3 的对照品质量浓度为检测限,S/N=10 的对照品质量浓度为定量限。结果柴胡皂苷 b₁ 的检测限为 21.181 ng/mL,定量限为 35.303 ng/mL;柴胡皂苷 b₂ 的检测限为 16.655 ng/mL,定量限为 27.758 ng/mL。

2.7 精密度试验

取 2.4 项下稀释后中间质量浓度的对照品溶液(含柴胡皂苷 b₁ 0.047 mg/mL、柴胡皂苷 b₂ 0.027 mg/mL),连续进样 6 次,进样量 3 μL,测定柴胡皂苷 b₁、b₂ 峰面积,计算得峰面积的 RSD 值分别为 0.23%、0.17%。

2.8 稳定性试验

取批号 2212045 小柴胡颗粒样品,制备供试品

溶液,分别在 0、2、4、6、8、10 h 进样测定柴胡皂苷 b₁、b₂ 峰面积,结果其峰面积的 RSD 值分别为 1.48%、0.93%。表明供试品溶液在 10 h 内稳定。

2.9 重复性试验

取批号 2212045 小柴胡颗粒样品 6 份,制备供试品溶液,进行测定柴胡皂苷 b₁、b₂ 峰面积,结果柴胡皂苷 b₁、b₂ 平均质量分数分别为 0.030、0.109 mg/g,RSD 值分别为 1.91%、2.03%。

2.10 回收率试验

精密称取批号 2212045 小柴胡颗粒样品 0.5 g,共 6 份,分别加入柴胡皂苷 b₁、b₂ 对照品 0.014 3、0.062 3 mg,制备供试品溶液,进样测定峰面积,计算回收率,结果柴胡皂苷 b₁、b₂ 的平均回收率分别为 98.97%、99.35%,RSD 值分别为 1.82%、1.16%。

2.11 样品测定

取 16 个厂家和其中 3 个厂家不同批次的小柴胡颗粒,平行制备 3 份供试品溶液,进样测定柴胡皂苷 b₁、b₂ 峰面积,经标准曲线方程计算柴胡皂苷 b₁、b₂ 的质量分数,结果见表 1。

表 1 小柴胡颗粒中柴胡皂苷 b₁、b₂ 的测定结果 (n=3)

Table 1 Determination of saikosaponin b₁ and b₂ in Xiaochaihu Granules (n=3)

批号	质量分数/(mg g ⁻¹)		批号	质量分数/(mg g ⁻¹)	
	柴胡皂苷 b ₁	柴胡皂苷 b ₂		柴胡皂苷 b ₁	柴胡皂苷 b ₂
S1	0.030	0.109	S8	0.017	0.014
S2	0.013	0.021	S9	0.013	0.028
S3-1	0.014	0.036	S10	0.042	0.098
S3-2	0.014	0.037	S11	0.046	0.105
S4-1	0.026	0.066	S12	0.011	0.034
S4-2	0.028	0.066	S13	0.057	0.117
S5-1	0	0.049	S14	0.167	0.391
S5-2	0.012	0.063	S15	0.017	0.019
S6	0.030	0.061	S16	0	0.037
S7	0.020	0.020			

结果显示,柴胡皂苷 b₁ 质量分数最低值为 0 (S5-1、S16),质量分数最高值为 0.167 mg/g (S14);柴胡皂苷 b₂ 质量分数最低值为 0.014 mg/g (S8),质量分数最高值为 0.391 mg/g (S14)。S3、S4、S5 两种批次样品的检测结果显示,S4 的柴胡皂苷 b₁、b₂ 质量分数最高,两者之和的平均值为 0.093 mg/g;S3 的柴胡皂苷 b₁、b₂ 之和的平均值最低,为 0.050 mg/g。S5-1 号样品未检测出柴胡皂苷 b₁。

3 讨论

3.1 色谱条件的选择

分别考察了体积流量 0.25、0.3 mL/min,柱温 25、30 ℃,结果表明最佳体积流量为 0.3 mL/min,最佳柱温为 30 ℃。依次考察了 203、210、254 nm 波长对图谱的影响,结果在 254 nm 波长下,色谱峰较多,各峰分离度良好,基线平稳,且柴胡皂苷 b₂ 存在最大吸收峰,因此选择 254 nm 为检测波长。同

时进行了水 (A)-乙腈 (B) 3 种梯度洗脱试验, 第一种: 0~5 min, 25%~37% B; 5~10 min, 37% B; 10~25 min, 37%~57% B; 第二种: 0~5 min, 25%~37% B; 5~10 min, 37% B; 10~30 min, 37%~57% B; 第三种: 0~25 min, 25%~37% B; 25~33 min, 37% B; 33~53 min, 37%~65% B。结果表明第 3 种梯度洗脱程序峰形较好, 色谱峰最多, 分离效果最好。

3.2 测定指标的选择

小柴胡颗粒中柴胡皂苷的测定报道多见于柴胡皂苷 a, 柴胡皂苷 a 和柴胡皂苷 d, 或柴胡皂苷 b₂^[8-10]。柴胡皂苷 a、d 是柴胡中原生皂苷, 在制剂过程中发生转化, 生成次生皂苷柴胡皂苷 b₁、b₂, 其转化程度受温度、煎煮时间, pH 值等影响^[11], 现有的制剂工艺无法控制其转化速度和程度, 因此单独检测其中一种皂苷意义不大。柴胡皂苷 a、d 的结构不稳定, 测定时有紫外末端吸收的影响, 而柴胡皂苷 b₁、b₂ 在制剂过程中能稳定存在, 有良好的生理活性, 且均有较好的吸收峰, 因此本实验选择柴胡皂苷 b₁、b₂ 作为质量控制指标更科学合理, 易于操作。由于柴胡皂苷 b₁、b₂ 为次生皂苷, 即生产制剂的过程直接影响其转化程度, 因此测定不同批次样品中柴胡皂苷 b₁、b₂ 也能从侧面反映出工厂制剂工艺的稳定性。

3.3 测定指标的差异分析

16 家厂家生产的小柴胡颗粒检测结果显示, 不同厂家样品中柴胡皂苷 b₁、b₂ 含量差异极大, 高低差异达 10 倍以上, 有些样品甚至未能检测出柴胡皂苷 b₁。由于缺少《中国药典》规范, 各厂家对柴胡饮片质量的监测标准各不相同。同时, 《中国药典》对小柴胡颗粒的制法描述的也较为笼统, 如煎液浓缩的时间和方式、制颗粒时的温度和时间控制等都未做具体规定, 导致各厂家的制剂方法也略有差异, 而柴胡皂苷的溶出和转化恰恰受温度、加热时间等影响极大, 导致柴胡皂苷 b₁、b₂ 含量在不同厂家生产的样品中存在较大差异。

3 个厂家 (S3、S4、S5) 两种批次小柴胡颗粒检测结果显示, S3、S4 供试品中柴胡皂苷 b₁、b₂ 的 RSD 值均小于 5.24%, 说明相同厂家不同批次的小柴胡颗粒中柴胡皂苷基本稳定。S5-1 样品未检测出柴胡皂苷 b₁, 而 S5-2 号样品的检测值为 0.012 mg/g, 其柴胡皂苷 b₂ 检测结果的 RSD 值亦大于 17%, 差异显著。由此可见, 即便是同一厂家在生产不同批

次的小柴胡颗粒时, 柴胡皂苷含量也可能会出现较大差异, 甚至出现检测不出的情况。究其原因可能与药厂对柴胡药材的投料规定不统一, 或生产过程中对温度、时间控制不稳定等有关。

本研究中, 有两家小柴胡颗粒中未检测出柴胡皂苷 b₁, 考虑原因可能首先是样品质量问题。因《中国药典》2020 年版一部小柴胡颗粒项下仅规定了黄芩苷的量, 对柴胡的质量检测并未提及, 且市面上存在柴胡掺假、非药用部位混入、药材基源混乱等问题^[12-13], 导致部分厂家在生产投料时忽略了柴胡的质量监管, 以致无法检测出相关成分。其次是柴胡皂苷 b₁ 发生转化。柴胡皂苷 a、d 在提取过程中受酸性环境影响, 其具有的环氧醚键易开环, 转化成具有异环双烯的柴胡皂苷 b₁、b₂, 如果同时有甲醇存在, 则醚环裂解, 产生柴胡皂苷 b₃、b₄^[14]。本实验中, 供试品溶液制备中使用甲醇复溶, 可能导致部分柴胡皂苷 b₁ 发生了裂解转化, 浓度低于检测限而未能检出。

综上所述, 本实验可检测出 16 家厂商生产的小柴胡颗粒中柴胡皂苷 b₁、b₂, 说明实验方法可行, 结果可信, 可为小柴胡颗粒的质量评价提供参考, 也可为其他含柴胡的复方制剂提供方法和思路。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 逯全东. 柴胡解热作用的物质基础及作用机制的实验研究 [D]. 济南: 山东中医药大学, 2013.
- [2] Chen R J, Guo X Y, Cheng B H, et al. Saikosaponin a inhibits cigarette smoke-induced oxidant stress and inflammatory responses by activation of Nrf2 [J]. *Inflammation*, 2018, 41(4): 1297-1303.
- [3] 常百金, 唐志书, 邱智东, 等. 基于“药效论质”评价柴胡质量及其等级预测插件开发 [J]. *中草药*, 2022, 53(2): 424-431.
- [4] 闵宇航, 王京辉, 范妙璇, 等. 柴胡饮片皂苷类成分变化及质量控制研究 [J]. *药物分析杂志*, 2014, 34(5): 836-843.
- [5] 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.
- [6] 陈雨婵, 彭东辉, 孙延平, 等. 柴胡皂苷 b₁ 缓解 CCL₄ 诱导急性肝损伤的作用机制研究 [J]. *中医药信息*, 2023, 40(4): 38-43.
- [7] 余莉萍, 余淑菁, 李旭成, 等. 柴胡皂苷 B₂ 对 LPS 诱导的脓毒症肺损伤氧化应激和炎症反应的影响研究 [J]. *中国中医急症*, 2022, 31(5): 773-776.
- [8] 张慧, 闫磊, 林龙飞, 等. HPLC 法测定小柴胡颗粒中 7

- 种指标成分 [J]. 现代药物与临床, 2014, 29(2): 162-165.
- [9] 李娉婷, 林丽蓉, 林丽华, 等. HPLC 法测定小柴胡颗粒中柴胡皂苷 b_2 的含量 [J]. 中药新药与临床药理, 2014, 25(3): 356-359.
- [10] 邵艳, 浦锦宝. HPLC 法测定小柴胡颗粒中柴胡皂苷 a、d 的含量 [J]. 中国中医药科技, 2010, 17(4): 334-335.
- [11] 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.
- [12] 刘潇潇, 陈馥, 林锦锋, 等. 含柴胡中成药的质量控制方法探讨 [J]. 中国药学杂志, 2019, 54(17): 1452-1456.
- [13] 梁镇标, 刘力, 晁志. 柴胡属植物资源及生产状况调查 [J]. 时珍国医国药, 2012, 23(8): 2011-2013.
- [14] 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.

【责任编辑 解学星】