

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

胡 杰^{1,2}, 刘晓节^{1,2}, 秦雪梅^{2*}, 马致洁², 邢 婕², 张丽增², 郭小青²

1. 山西大学化学化工学院 药理学系, 山西 太原 030006

2. 山西大学中医药现代研究中心, 山西 太原 030006

摘 要: 目的 优选 HPLC 柱前酸化法测定柴胡中柴胡皂苷 a、d 的酸化条件, 通过对相关分析方法的评价, 筛选优化的测定方法。方法 采用单因素及正交试验优选柴胡皂苷 a、d 前处理的酸化条件和最佳提取条件, 并对相关分析方法进行比较。结果 优选柴胡皂苷 a、d 的前处理酸化条件为: 8% 盐酸, 30 °C 反应 18 h, 反应结束用 8% KOH 溶液调 pH 至中性; 样品最佳提取条件为: 取药材粉末 0.5 g, 加 8% 氨甲醇溶液 25 mL, 超声提取 3 次, 每次 45 min; 与相关文献方法比较表明本方法灵敏度高、分离度好、色谱图杂质峰较小、目标峰面积较大。结论 本实验建立的定量测定方法优于相关文献报道的其他方法, 可作为柴胡质量控制的方法。

关键词: 柴胡; HPLC 柱前酸化法; 柴胡皂苷 a; 柴胡皂苷 d; 正交试验

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2012)02-0288-05

Optimization of pre-column acidification conditions for HPLC determination of saikosaponins a and d

HU Jie^{1,2}, LIU Xiao-jie^{1,2}, QIN Xue-mei², MA Zhi-jie², XING Jie², ZHANG Li-zeng², GUO Xiao-qing²

1. Department of Pharmacy, School of Chemistry and Chemical Engineering, Shanxi University, Taiyuan 030006, China

2. Modern Research Center for Traditional Chinese Medicine of Shanxi University, Taiyuan 030006, China

Key words: *Bupleuri Radix*; pre-column acidification of HPLC; saikosaponin a; saikosaponin d; orthogonal test

柴胡为伞形科柴胡属植物北柴胡 *Bupleurum chinense* DC. 和狭叶柴胡 *B. scозonerifolium* Willd. 的干燥根, 具解表和里、疏肝解郁、升举阳气之功效^[1]。柴胡皂苷为其主要有效成分之一, 其中以柴胡皂苷 a、d (saikosaponins a and d, 简称 SSa、SSd) 的药理活性较强, 具抗炎、保肝、降低血中胆固醇等作用^[2]。虽有较多文献报道 HPLC 法测定 SSa、SSd 的量^[3-5], 但因其分子中只含一个双键, 处于紫外末端吸收, 采用 HPLC-UV 法检测波长大多在 210 nm 下, 杂质峰干扰严重, 检测灵敏度低, 方法不稳定; 而 HPLC-ELSD 法检测限高且仪器费用昂贵, 不宜普及; 另有报道^[6]SSa、SSd 在酸性条件下易水解开环成共轭体系, 一定温度下可定向转化为柴胡皂苷 b₁、b₂ (saikosaponin b₁ and b₂, 简称 SSb₁、SSb₂), 检测波长红移至 254 nm, 紫外吸收增强, 检测灵敏度提高, 而 SSb₁、SSb₂ 并不存在于柴胡植物体内,

因此可通过测定酸化后 SSb₁、SSb₂ 的量来反映柴胡药材中 SSa、SSd 的量, 但目前该方法样品提取条件及酸化条件不一致^[7-10], 尤其酸化条件在酸的浓度、酸化反应时间及酸化反应温度等方面都存在很大差异, 对测定结果影响较大。因此, SSa、SSd 的定量测定方法至今尚不完善, 历版《中国药典》均未收载定量测定项。本实验拟采用单因素与正交试验优选柴胡中 SSa、SSd 的前处理酸化条件和最佳提取条件, 并与文献分析方法进行比较评价, 旨在得出稳定、可靠的 SSa、SSd 定量测定方法, 为柴胡的质量控制提供科学依据。

1 仪器与材料

Waters 高效液相色谱仪 (1525 泵, 2487 检测器), Breeze 色谱工作站; 电子分析天平; 数控超声仪 (KQ5200E 型); 恒温金属浴 (CHB-100)。

SSa、SSd 对照品 (购于中国药品生物制品检定

收稿日期: 2011-07-26

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31070295); 山西省教育厅创新人才支持计划

作者简介: 胡 杰 (1983—), 男, 山西运城人, 硕士, 主要从事中药质量标准研究。Tel: (0351)7011202 E-mail: 200822905004@mail.sxu.cn

*通讯作者 秦雪梅 Tel: (0351)7011202 E-mail: qinxm@sxu.edu.cn

所), 乙腈 (色谱纯), 磷酸 (优级纯), 其余试剂均为分析纯。柴胡药材由山西大学中医药现代研究中心秦雪梅教授鉴定为柴胡 *Bupleurum chinense* DC. 的干燥根。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 Hypersil ODS- C_{18} 柱 (200 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m); 柱温 25 $^{\circ}$ C; 检测波长 254 nm; 流动相为乙腈-0.05% H_3PO_4 (38:62); 体积流量 1.0 mL/min。

2.2 溶液的制备

2.2.1 样品溶液的制备 称取柴胡药材粉末 0.5 g, 加 8% 氨甲醇溶液 50 mL, 超声提取 45 min, 滤过, 蒸干, 甲醇溶解并定容至 50 mL 量瓶中, 摇匀, 备用。

2.2.2 对照品溶液的制备 分别精密称取 SSa、SSd 对照品 11.9、15.7 mg, 置 100 mL 棕色量瓶中, 甲醇稀释至刻度, 摇匀, 得 SSa、SSd 分别为 0.119、0.157 mg/mL 的混合对照品溶液。

2.3 酸化条件的优选

2.3.1 酸化条件单因素考察 根据影响酸化反应的因素, 参考相关文献报道的反应条件^[6-10], 分别单因素考察不同体积分数的盐酸、酸化反应温度和酸化反应时间对测定结果的影响, 以筛选各因素的最佳范围。

(1) 盐酸体积分数的考察 量取“2.2.1”项下样品溶液 1 mL 置 5 mL 量瓶中共 5 份, 分别加 4%、6%、8%、10%、12% 盐酸 1 mL, 在 25 $^{\circ}$ C 下恒温反应 14 h, 反应结束加 8% KOH 溶液调节 pH 至中性, 以甲醇定容, 摇匀, 过 0.45 μ m 微孔滤膜, 取 20 μ L 进样, 按“2.1”项下色谱条件测定, 记录色谱峰面积, 并计算不同体积分数盐酸酸化反应中 SSa、SSd 的量, 测定结果 (表 1) 表明盐酸为 8% 时测定结果最大, 因此选择盐酸体积分数的最佳范围为 6%~10%。

表 1 盐酸体积分数对酸化反应的影响

Table 1 Influence of hydrochloric acid volume fraction on acidification reaction

盐酸	SSa / %	SSd / %	盐酸	SSa / %	SSd / %
4%	0.271 9	0.322 5	10%	0.463 9	0.533 6
6%	0.502 7	0.598 2	12%	0.305 0	0.381 5
8%	0.526 6	0.684 7			

(2) 酸化反应温度的考察 量取“2.2.1”项下样品溶液 1 mL 置 5 mL 量瓶中共 5 份, 各加 8% 盐酸 1 mL, 分别在 20、25、30、35、40 $^{\circ}$ C 下恒温反应 14 h, 反应结束加 8% KOH 溶液调节 pH 至中性, 以甲醇定容, 摇匀, 过 0.45 μ m 微孔滤膜, 取 20 μ L 进样, 按“2.1”项下色谱条件测定, 记录色谱峰面积, 并计算不同酸化反应温度下 SSa、SSd 的量, 测定结果 (表 2) 表明 30 $^{\circ}$ C 时测定结果最大, 因此选择酸化反应温度的最佳范围为 25~35 $^{\circ}$ C。

表 2 温度对酸化反应的影响

Table 2 Influence of temperature on acidification reaction

温度	SSa / %	SSd / %	温度	SSa / %	SSd / %
20 $^{\circ}$ C	0.108 5	0.190 4	35 $^{\circ}$ C	0.483 0	0.592 8
25 $^{\circ}$ C	0.514 5	0.621 8	40 $^{\circ}$ C	0.391 1	0.446 3
30 $^{\circ}$ C	0.534 8	0.592 4			

(3) 酸化反应时间的考察 量取“2.2.1”项下样品溶液 1 mL 置 5 mL 量瓶中共 12 份, 各加 8% 盐酸 1 mL, 分别在 30 $^{\circ}$ C 下恒温反应 4、6、8、10、12、14、16、18、21、24、27、32 h, 反应结束加 8% KOH 溶液调节 pH 至中性, 以甲醇定容, 摇匀, 过 0.45 μ m 微孔滤膜, 取 20 μ L 进样, 按“2.1”项下色谱条件测定, 记录色谱峰面积, 并计算不同酸化反应时间 SSa、SSd 的量, 测定结果 (表 3) 表明酸化反应 21 h 时测定结果最大, 因此选择酸化反应时间的最佳范围为 18~24 h。

表 3 酸化反应时间对酸化反应的影响

Table 3 Influence of acidizing reaction time on acidification reaction

时间	SSa / %	SSd / %	时间	SSa / %	SSd / %
4 h	0.255 3	0.407 2	16 h	0.482 6	0.620 4
6 h	0.270 8	0.421 5	18 h	0.507 3	0.647 2
8 h	0.317 8	0.488 3	21 h	0.512 7	0.697 3
10 h	0.352 7	0.509 2	24 h	0.507 3	0.657 1
12 h	0.400 4	0.553 2	27 h	0.483 6	0.603 3
14 h	0.432 8	0.604 3	32 h	0.432 9	0.562 6

2.3.2 正交试验优选酸化条件 在单因素考察的基础上, 选择反应温度 (A)、盐酸体积分数 (B) 和反应时间 (C) 为考察因素, SSa 和 SSd 收率的综合评分 (两者收率之和) 为指标优选酸化条件。按 $L_9(3^4)$ 正交试验设计安排试验, 因素与水平见表 4。

取“2.2.1”项下样品溶液 1 mL 置 5 mL 量瓶中,

共 9 份, 按正交试验设计加 1 mL 相应体积分数的盐酸, 并在相应的温度及时间下进行反应, 反应结束加 8% KOH 溶液调节 pH 至中性, 甲醇定容, 摇匀, 过 0.45 μm 滤膜, 取 20 μL 进样, 按“2.1”项

下色谱条件测定, 结果见表 4。方差分析见表 5。

直观分析结果表明, 影响柴胡皂苷 a、d 酸化反应因素的顺序为 $B > A > C$, 即酸度 $>$ 反应温度 $>$ 反应时间, 所得最佳酸化反应条件为 $A_2B_2C_3$ 。

表 4 正交试验设计及结果

Table 4 Design and results of orthogonal test

试验号	A / $^{\circ}\text{C}$	B / %	C / h	D (误差)	SSa / %	SSd / %	综合评分
1	25 (1)	6 (1)	18 (1)	(1)	0.521 9	0.585 1	1.107 0
2	25 (1)	8 (2)	21 (2)	(2)	0.536 8	0.644 1	1.180 9
3	25 (1)	10 (3)	24 (3)	(3)	0.388 5	0.468 8	0.857 3
4	30 (2)	6 (1)	21 (2)	(3)	0.529 1	0.636 4	1.165 5
5	30 (2)	8 (2)	24 (3)	(1)	0.550 0	0.679 1	1.229 1
6	30 (2)	10 (3)	18 (1)	(2)	0.391 8	0.478 0	0.869 8
7	35 (3)	6 (1)	24 (3)	(2)	0.511 3	0.579 8	1.091 1
8	35 (3)	8 (2)	18 (1)	(3)	0.521 4	0.602 8	1.124 2
9	35 (3)	10 (3)	21 (2)	(1)	0.375 4	0.420 9	0.796 3
K_1	1.048 0	1.121 0	1.034 0	1.044 0			
K_2	1.088 0	1.178 0	1.048 0	1.047 0			
K_3	1.004 0	0.841 0	1.059 0	1.049 0			
R	0.084 0	0.337 0	0.025 0	0.005 0			

表 5 方差分析

Table 5 Analysis of variance

方差来源	离差平方和	自由度	F 值	显著性
A	0.010 66	2	76.47	$P < 0.05$
B	0.195 19	2	1 323.46	$P < 0.01$
C	0.000 98	2	5.87	
D (误差)	0.000 04	2	1.00	

$F_{0.05}(2, 2) = 19.00$; $F_{0.01}(2, 2) = 99.00$

由方差分析结果可知, B 因素对柴胡皂苷 a、d 酸化反应的影响具有极显著意义 ($P < 0.01$), A 因素的影响具有显著意义 ($P < 0.05$), C 因素的影响无显著意义, 各因素的影响大小次序为 $B > A > C$, 方差分析与直观分析结果具有一致性。

2.3.3 酸化反应时间的再优选 通过对正交试验结果的方差分析, 在 18~24 h 酸化反应时间对测定结果无显著影响, 因此有必要重新优选酸化反应时间, 使酸化反应时间尽可能缩短, 便于试验操作。通过对各酸化反应时间数据 (表 3) 进行显著性检验分析, 结果表明反应 24 h 与反应 16 h 的测定结果存在显著差异 ($P < 0.05$), 而与 18 h 的测定结果无显著差异。因此, 可将酸化反应时间从 24 h 缩短至 18 h, 即最佳酸化反应条件为: 8% 盐酸, 30 $^{\circ}\text{C}$ 反应 18 h。

2.3.4 正交试验的验证 量取上述样品溶液 1 mL 共 3 份进行重复性试验, 结果表明在所选条件下测得 SSa、SSd 收率高, 且重现性好, SSa、SSd 的平均收率分别为 0.56%、0.67%, RSD 值分别为 1.33%、1.12%。

2.4 方法学考察

按中药质量标准分析方法验证指导原则对上述方法进行验证。

2.4.1 线性关系考察 分别精密吸取 0.119 mg/mL SSa 和 0.157 mg/mL SSd 对照品溶液 10、20、40、80、100、150、200 μL 置 2 mL 量瓶中, 照“2.3.3”项下方法进行酸化处理, 定容, 得不同质量浓度的 SSa、SSd (分别转化为 SSb₁、SSb₂) 混合对照品溶液, 各取 20 μL 进行测定, 以 SSb₁、SSb₂ 的峰面积对 SSa、SSd 的进样量进行线性回归, 得回归方程: SSa $Y = 1.0 \times 10^6 X + 4 786.7$, $r = 0.999 8$; SSd $Y = 2.0 \times 10^6 X + 85 930$, $r = 0.999 4$; 结果表明 SSa、SSd 分别在 0.119~2.38、0.157~3.14 μg 线性关系良好。

2.4.2 精密度试验 分别精密量取 0.119 mg/mL SSa 和 0.157 mg/mL SSd 对照品溶液 200 μL , 置 5 mL 量瓶中, 照“2.3.3”项下方法进行酸化处理, 定容, 分别取 20 μL 进行测定, 连续进样 5 次, 测得 SSb₁、

SSb₂ 峰面积的 RSD 分别为 0.97%、1.65%，结果表明仪器精密度良好。

2.4.3 稳定性试验 精密称取药材粉末 0.5 g 共 6 份，照“2.2.1”项下方法制备样品溶液，并按“2.3.3”项条件进行酸化处理，在室温下，分别取 20 μL 于 0、2、4、8、16、24 h 进行测定，测得 SSb₁、SSb₂ 峰面积的 RSD 分别为 1.12%、1.78%，结果表明样品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.4.4 重现性试验 精密称取药材粉末 0.5 g 共 6 份，照“2.2.1”项下方法制备样品溶液，并按“2.3.3”项条件进行酸化处理，在室温下，分别取 20 μL 进行测定，记录 SSb₁、SSb₂ 峰面积，计算得 SSa、SSd 质量分数的 RSD 分别为 1.02%、0.96%，结果表明重现性良好。

2.4.5 加样回收率试验 精密称取 0.5 g 药材粉末 6 份，分别定量加入 SSa、SSd 对照品溶液，照“2.2.1”项下方法制备样品溶液，并按“2.3.3”项条件进行酸化处理，在室温下，分别取 20 μL 进行测定，计算回收率。测得 SSa、SSd 的平均回收率分别为 99.86%、98.73%，RSD 分别为 1.67%、1.28%，表明样品测定准确度良好，符合要求。

2.5 不同酸化方法比较

取 3 个不同产地的北柴胡样品，按不同酸化方法^[7-10]处理样品溶液，过 0.45 μm 微孔滤膜，取 20 μL 进样，按“2.1”项下色谱条件测定，所得测定结果见表 6。结果表明，3 个北柴胡样品中用本实验方法所测定的 SSa、SSd 量均较大，证明本实验方法更优，可行性更强。

表 6 不同酸化方法测定结果比较

Table 6 Comparison on determination results from different acidification methods

酸化方法	山西太谷		山西陵川		山西万荣	
	SSa / %	SSd / %	SSa / %	SSd / %	SSa / %	SSd / %
本实验方法	0.486 5	0.815 6	0.461 9	0.765 6	0.658 4	0.979 3
文献方法一 ^[7]	0.393 5	0.786 5	0.323 2	0.621 5	0.436 1	0.795 6
文献方法二 ^[8]	0.341 2	0.680 6	0.285 3	0.528 5	0.353 9	0.695 2
文献方法三 ^[9]	0.088 9	0.491 7	0.053 7	0.439 8	0.109 5	0.569 7
文献方法四 ^[10]	0.273 1	0.586 4	0.172 9	0.492 7	0.287 3	0.631 2

通过方法学验证及相关分析方法比较，最终确定样品测定方法为：称取柴胡药材粉末 0.5 g，加 8% 氨甲醇 25 mL，超声提取 3 次，每次 45 min，合并提取液，滤过，蒸干，甲醇溶解并定容至 25 mL；取此溶液 1 mL 置 5 mL 量瓶中，加 8% 盐酸 1 mL，30 °C 恒温反应 18 h，反应结束用 8% KOH 溶液调节 pH 至中性，甲醇定容，摇匀，照“2.1”项下色谱条件，进样量 20 μL 进行测定并记录色谱图，所得色谱图见图 1。

3 讨论

本实验对 HPLC 法测定 SSa、SSd 的前处理酸化条件及提取条件进行优化，结果表明所选取的方法杂质峰较小，目标峰较大，分离度好，灵敏度高，为 SSa、SSd 的定量测定提供科学依据。

SSa、SSd 易受高温、光线、酚类或酸性成分的影响而发生变化，本研究通过加速试验，对其稳定性进行考察。结果表明，SSa、SSd 受温度和酸度的影响较大，受光线影响较小，在中性和碱性条件下其稳定性无显著性差异，对照品用甲醇溶解后，在

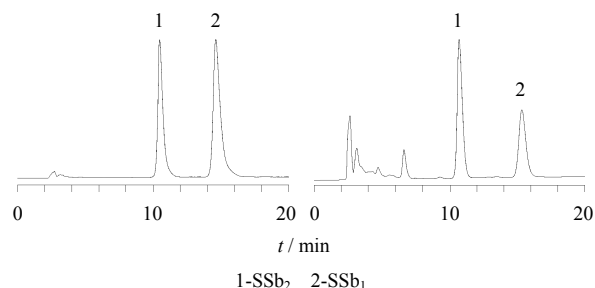


图 1 SSa、SSd 对照品 (A) 和柴胡药材 (B) 经酸化处理后的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of SSa and SSd reference substances (A) and *Bupleuri Radix* (B) after acidification reaction

低温避光的条件下稳定性良好。

采用单因素试验，分别比较了提取方法（超声、回流、温浸）、提取溶剂（甲醇，2% KOH 甲醇溶液，5% 吡啶甲醇溶液，3%、5%、8%、10% 氨甲醇溶液）、提取时间（30、45、60、75 min）、提取次数（1、2、3、4 次）对测定结果的影响，结果表明药材经 8% 氨甲醇溶液超声提取 3 次，每次 45 min，提取效果

最佳。

酸化反应时,本研究通过比较相同浓度的盐酸-水、盐酸-甲醇、盐酸-50%甲醇溶液对测定结果的影响,结果表明3种结果并无显著差异。因此,本实验选择盐酸-水溶液进行酸化反应。

酸性条件下,SSa、SSd在一定温度范围内可转化为SSb₁、SSb₂,但关于酸化的温度界限并未见报道,本研究通过对酸化反应的温度进行考察,结果表明SSa、SSd在低于20℃时,酸化反应非常缓慢;当反应温度超过40℃时,SSa除生成SSb₁外,还生成另一种副产物,而SSd只生成单一产物SSb₂;当反应温度达到80℃时,SSa、SSd完全水解为柴胡皂苷元。因此,酸化反应的温度应该在20~40℃进行选择,但关于SSa酸化反应在40~80℃生成副产物的指认,还需进一步研究。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [2] 肖培根. 新编中药志 [S]. 北京: 化学工业出版社, 2006.
- [3] 潘瑞乐, 陈迪华, 陈建民, 等. RP-HPLC 法测定中柴 1 号及其他产地柴胡中柴胡皂苷 a、d 的含量 [J]. 中南药学, 2004, 2(4): 198-200.
- [4] 王光忠, 李秋怡, 李焱文, 等. 高效液相色谱-蒸发光散射检测法测定柴胡药材中柴胡皂苷 a 及柴胡皂苷 d 的含量 [J]. 时珍国医国药, 2006, 17(9): 1721-1722.
- [5] 陈妍. HPLC-ELSD 法测定柴胡中柴胡皂苷 a、d 的含量 [J]. 天津药学, 2002, 14(3): 73-75.
- [6] 原田正敏, 姜顺善. 日本常用生药的定量方法: 柴胡 [J]. 国外医药: 植物药分册, 1992, 7(2): 68-69.
- [7] Li X Q, Gao Q T, Chen X H, *et al.* High performance liquid chromatographic assay of saikosaponins from *Radix Bupleuri* in China [J]. *Biol Pharm Bull*, 2005, 28(9): 1736-1742.
- [8] 王兰霞, 杨玲霞, 张伯崇. 甘肃省庆阳地区栽培柴胡质量的考察 [J]. 中国中药杂志, 1994, 19(10): 596-597.
- [9] 孔伶俐, 崔青娟, 史德盛, 等. HPLC 法测定柴胡中柴胡皂苷 a 的含量 [J]. 中草药, 2004, 35(6): 643-644.
- [10] 李媛媛, 秦雪梅, 王玉庆, 等. 柱前衍生化法评价不同品种和产地柴胡药材和饮片的质量 [J]. 中国中药杂志, 2008, 33(3): 237-240.