# 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 ℃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-mei[2], MA Zhi-jie[2], XING Jie[2], ZHANG Li-zeng[2], GUO Xiao-qing[2]

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. scozonerifolium* 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 $b_1$、$b_2$（saikosaponin $b_1$ and $b_2$，简称 $SSb_1$、$SSb_2$），检测波长红移至 254 nm，紫外吸收增强，检测灵敏度提高，而 $SSb_1$、$SSb_2$ 并不存在于柴胡植物体内，因此可通过测定酸化后 $SSb_1$、$SSb_2$ 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×4.6 mm，5 μm）；柱温 25 ℃；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 ℃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 μm 微孔滤膜，取 20 μL 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 ℃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 μm 微孔滤膜，取 20 μL 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 ℃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 ℃。

**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 ℃ | 0.108 5 | 0.190 4 | 35 ℃ | 0.483 0 | 0.592 8 |
| 25 ℃ | 0.514 5 | 0.621 8 | 40 ℃ | 0.391 1 | 0.446 3 |
| 30 ℃ | 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 ℃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 μm 微孔滤膜，取 20 μL 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 / ℃ | 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 ℃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 $SSb_1$、$SSb_2$）混合对照品溶液，各取 20 μL 进行测定，以 $SSb_1$、$SSb_2$ 的峰面积对 SSa、SSd 的进样量进行线性回归，得回归方程：SSa $Y=1.0\times10^6 X+4\,786.7$，$r=0.999\,8$；SSd $Y=2.0\times10^6 X+85\,930$，$r=0.999\,4$；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 $SSb_1$、

$SSb_2$ 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 $SSb_1$、$SSb_2$ 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 $SSb_1$、$SSb_2$ 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 ℃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。

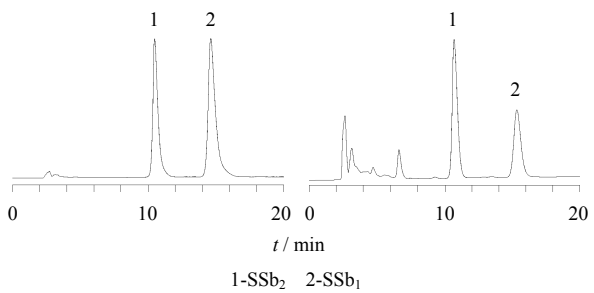


**图 1 SSa、SSd 对照品 (A) 和柴胡药材 (B) 经酸化处理后的 HPLC 色谱图**

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

## 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 $SSb_1$、$SSb_2$，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 $SSb_1$ 外，还生成另一种副产物，而 SSd 只生成单一产物 $SSb_2$；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.