

不同炮制方法对北柴胡中柴胡皂苷 a、d 的含量影响

邱云¹, 苏健¹, 庞雪², 石继连², 廖念², 周逸群^{2*}

(1.湖南省中医药研究院附属医院, 湖南长沙 410006; 2.湖南中医药大学药学院, 湖南长沙 410208)

[摘要] 目的 研究北柴胡不同炮制方法(净制、醋炙、酒炙、麸炒、鳖血炙)与有效成分柴胡皂苷 a、d 的相关性, 为阐明炮制机理和炮制品的不同功效奠定基础。方法 采用高效液相色谱法进行测定, Hypersil ODS C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm×200 mm, 5 μm), 乙腈-水为流动相梯度洗脱, 流速 1.0 mL/min, 柱温 30 ℃, 测定波长 210 nm, 进样量 20 μL。结果 不同柴胡炮制品之间柴胡皂苷 a 和 d 的含量差异较大, 柴胡皂苷 a 的含量依次为: 麸炒柴胡>生柴胡>醋柴胡>酒柴胡>鳖血柴胡, 柴胡皂苷 d 的含量依次为: 生柴胡>麸炒柴胡>醋柴胡>酒柴胡>鳖血柴胡。结论 不同炮制方法对柴胡有效成分柴胡皂苷 a、d 有一定影响。

[关键词] 柴胡; 炮制; 柴胡皂苷 a; 柴胡皂苷 d; 含量测定; 影响

[中图分类号] R284.1; R283 **[文献标识码]** A **[文章编号]** doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2016.02.014

Influence of Different Processing Methods on Content of Saikosaponin a and Saikosaponin d from *Bupleurum chinense*

QIU Yun¹, SU Jian¹, PANG Xue², SHI Jilian², LIAO Nian², ZHOU Yiqun^{2*}

(1.The Affiliated Hospital of Hunan Academy of Chinese Medical Sciences, Changsha, Hunan 410006, China;

2.Department of Pharmaceutics, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China)

[Abstract] **Objective** To study the correlation of different processing methods (cleansing, vinegar-stir-fried, wine-stir-fried, bran-stir-fried, turtle blood-stir-fried) of *Bupleurum chinense* and the constituents saikosaponin a and saikosaponin d and lay the foundation for different effects of processed products. **Methods** HPLC method was used with Hypersil ODS C₁₈ column (4.6 mm×200 mm, 5 μm), water and methanol as solvent system with gradient elution. The flow rate was 1.0 mL/min, column temperature was 30 ℃, detection wavelength was set at 210 nm, and injection volume was 20 μL. **Results** The contents of total saponins in different processed products of *Bupleurum chinense* were different. The content of saikosaponin a was as follows: bran-stir-fried > cleansing > vinegar-stir-fried > wine-stir-fried > turtle blood-stir-fried. The content of saikosaponin d was as follows: cleansing > bran-stir-fried > vinegar-stir-fried > wine-stir-fried > turtle blood-stir-fried. **Conclusion** The method was simple and reliable, and used to determine the main contents of *Bupleurum chinense* and its four processed products.

[Keywords] *Bupleurum Radix*; processed products; saikosaponin a; saikosaponin d; constituents; effect

柴胡为伞形科植物柴胡 (*Bupleurum chinense* DC)或狭叶柴胡 (*Bupleurum scozonerifolium* Willd.) 的干燥根,前者习称“北柴胡”,后者习称“南柴胡”,其中北柴胡为临床常用品种。具有和解退热、疏肝解郁、升举阳气的作用,主要用于感冒发热、寒热往来、疟疾、肝郁气滞、胸肋胀痛、脱肛、子宫脱落、月经不调^[1]。柴胡皂苷 a、d 等皂苷类成分是其主要生

物活性成分^[2]。除生品外,临床上常用其醋炙品等不同炮制品入药^[3]。由于在炮制过程中不同炮制品的加热程度、加热辅料等不同,其所含化学成分的量也不同^[4]。为了考察不同炮制方法对其主要活性成分的含量影响,本研究采用 HPLC 测定了柴胡生品、醋炙品、酒炙品、麸炒品及鳖血炙品中柴胡皂苷 a、d 的含量。

[收稿日期] 2015-06-03

[基金项目] 湖南省中医药研究院院级课题(201312);湖南省教育厅一般项目(15C1039),国家中医药管理局中药炮制学重点学科(国中医药人教发[2012]32号);湖南省“十二五”重点学科中药学专业资助(湘教发[2011]76号)。

[作者简介] 邱云,女,硕士,中药师,主要从事中药炮制、制剂与质量标准研究。

[通讯作者] *周逸群,女,硕士,助教, E-mail:zhouyiqun123@sina.com。

1 材料

1.1 药材与试剂

柴胡药材购自于长沙市高桥药材市场,经湖南中医药大学周日宝教授鉴定为伞形科植物柴胡(*Bupleurum chinense* DC.)的干燥根。柴胡皂苷 a 对照品(质量分数>98%,上海源叶生物科技有限责任公司,批号 PN1113SA13)、柴胡皂苷 d 对照品(质量分数>98%,上海源叶生物科技有限责任公司,批号 HJ0604XB13)。米醋(酿造食醋,山西六味齐新源醋业有限公司,批号 20140919),黄酒(镇江恒顺酒业有限公司,批号 20141129),新鲜鳖血(鳖科动物中华鳖的新鲜血液),甲醇、浓氨水均为分析纯,乙腈为色谱纯,流动相用水为双重蒸馏水。

1.2 主要仪器

D2F-6050 型恒温干燥箱(上海精宏实验设备有限公司);MA110 型电子分析天平(上海天平仪器厂);Waters1525 型高效液相色谱仪,检测器:Waters 2487。

2 方法与结果

2.1 不同炮制品的制备

2.1.1 生柴胡^[5] 取柴胡干燥药材,除去杂质和残茎,洗净,润透,切段,干燥,即得。

2.1.2 醋柴胡^[5] 取净生柴胡 300 g,加米醋 60 g 拌匀,闷透,置锅内用文火炒干时,出锅,放凉,即得。

2.1.3 酒柴胡^[5] 取净生柴胡 300 g,加入黄酒 30 g 拌匀,闷透,置锅内用文火炒干时,出锅,放凉,即得。

2.1.4 麸炒柴胡^[6] 取麦麸 30 g 撒在热锅中,待麦麸起烟时,投入净生柴胡 300 g,用文火翻炒至表面呈微黄色,出锅,筛去麦麸,放凉,即得。

2.1.5 鳖血柴胡^[6] 取净生柴胡 460 g,加入新鲜鳖血 60 g 及适量冷开水拌匀,闷润至鳖血液被柴胡吸尽,置炒制容器内,用文火加热炒干,出锅,放凉,即得。

2.2 指标成分的含量测定^[7]

2.2.1 对照品溶液的制备 精密称取柴胡皂苷 a 0.010 1 g、柴胡皂苷 d 0.010 1 g 分别置于 10 mL 棕色量瓶中,用甲醇稀释至刻度,摇匀,分别得到浓度为 1.01 mg/mL 的柴胡皂苷 a 对照品溶液和浓度为 1.01 mg/mL 的柴胡皂苷 d 对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备 取“2.1”项下制备的柴胡不同炮制品粉末(过四号筛)约 0.5 g,精密称定,分别置于具塞锥形瓶中,分别加入含 5%浓氨试液的甲醇溶液 25 mL,密塞,30 ℃水温超声处理(功率 200 W,频率 40 kHz)30 min,滤过,用甲醇 20 mL 分 2 次洗涤容器及药渣,洗液与滤液合并,旋转蒸发器回收溶剂至干。残渣加甲醇溶解,转移至 5 mL 量瓶中,加甲醇定容至刻度,摇匀,用 0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,作为供试品溶液。

2.2.3 色谱条件 色谱柱:Hypersil ODS C18 (4.6 mm×200 mm,5 μm);柱温:30 ℃;测定波长:210 nm;流动相:乙腈-水,采用梯度洗脱:当时间为 0、5、10、15、20、25、35、40、45、50 min 时,乙腈比例分别为 10%、20%、35%、40%、45%、50%、75%、85%、95%、100%;流速:1.0 mg/mL;进样量:20 μL。

2.2.4 线性关系试验 分别配置 1.00、0.50、0.10、0.05、0.01 mg/mL 的柴胡皂苷 a 和柴胡皂苷 d 对照品溶液,进样量为 20 μL,注入液相色谱仪,记录色谱图(见图 1)。以峰面积 Y、对照品浓度 X 计算线性回归方程:柴胡皂苷 a:Y=5 900 000X-1 511.3(r=0.999 8);柴胡皂苷 d:Y=7 600 000X-110 000(r=0.999 9),表明柴胡皂苷 a 和柴胡皂苷 d 在 0.01~1.00 mg/mL 范围内均呈良好的线性关系。

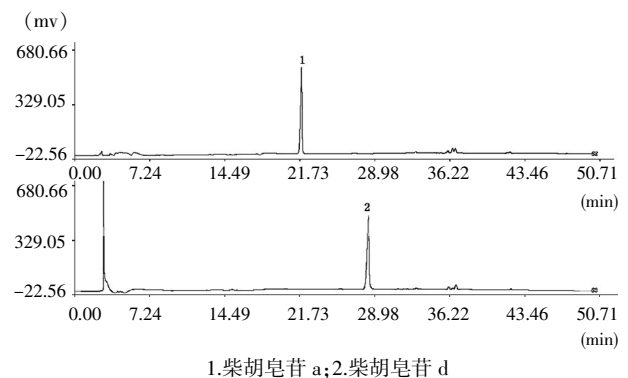


图 1 柴胡皂苷对照品色谱图

2.2.5 精密度试验 精密吸取“2.2.2”项下制备的同一批供试品溶液,按“2.2.3”项下条件进样 20 μL,连续进样 6 次,测定柴胡皂苷 a 色谱峰面积的 RSD 为 0.83%,柴胡皂苷 d 色谱峰面积的 RSD 为 0.64%,结果表明仪器精密度良好。

2.2.6 稳定性试验 精密吸取“2.2.2”项下制备的同一批供试品溶液,室温放置,分别于 0、1、4、8、12、24 h 按“2.2.3”项下条件进样 20 μL,测定柴胡皂苷 a 色谱峰面积的 RSD 为 1.02%,柴胡皂苷 d 色谱峰面积的 RSD 为 0.57%,结果表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.2.7 重复性试验 取同一批柴胡炮制品按“2.2.2”项下方法平行制备 6 份供试品溶液,按“2.2.3”项下条件进样 20 μL,测定柴胡皂苷 a 含量的 RSD 为 1.21%,柴胡皂苷 d 含量的 RSD 为 0.79%,表明本法重复性良好。

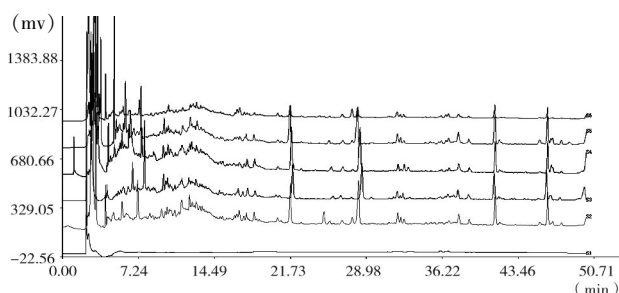
2.2.8 加样回收率试验 取柴胡同一炮制品粉末 6 份,每份约 0.25 g,已知该粉末中柴胡皂苷 a 和柴胡皂苷 d 含量分别为 8.285 mg/g 和 6.518 mg/g,精密称定后分别加入柴胡皂苷 a 对照品和柴胡皂苷 d 对照品适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.2.3”项下条件进样测定,结果见表 1。由表 1 可知,柴胡皂苷 a 的平均加样回收率为 98.63%,RSD 为 1.29%,柴胡皂苷 d 的平均加样回收率为

98.47%,RSD 为 1.23%,表明柴胡皂苷 a 和柴胡皂苷 d 的回收率好。

表 1 柴胡皂苷 a 和柴胡皂苷 d 加样回收试验测定结果

成分	取样量(g)	药材中含量(mg)	加入量(mg)	测得量(mg)	加样回收率(%)	平均加样回收率(%)	RSD(%)
柴胡皂苷 a	0.2502	2.07	2.07	4.10	98.07	98.63	1.29
	0.2507	2.08	2.07	4.14	99.52		
	0.2510	2.08	2.07	4.15	100.00		
	0.2501	2.07	2.07	4.07	96.62		
	0.2505	2.08	2.07	4.11	98.08		
	0.2508	2.08	2.07	4.14	99.52		
柴胡皂苷 d	0.2502	1.63	1.63	3.21	96.93	98.47	1.23
	0.2507	1.63	1.63	3.25	99.39		
	0.2510	1.64	1.63	3.26	99.39		
	0.2501	1.63	1.63	3.21	96.93		
	0.2505	1.63	1.63	3.24	98.77		
	0.2508	1.63	1.63	3.25	99.39		

2.2.9 含量测定 取柴胡不同炮制品粉末约 0.5 g,精密称定,按“2.2.2”项下的方法制备供试品溶液,平行 3 份,在“2.2.3”项下条件下分别进样 20 μ L,得到 HPLC 图谱(图 2),分别计算柴胡不同炮制品中柴胡皂苷 a 及柴胡皂苷 d 的百分含量。结果见表 2。



S1 空白试剂;S2 生柴胡;S3 酒柴胡;S4 麸炒柴胡;S5 醋柴胡;S6 鳖血柴胡

1.柴胡皂苷 a;2.柴胡皂苷 d

图 2 柴胡不同炮制品 HPLC 色谱图

表 2 柴胡皂苷百分含量测定结果 (n=3,%)

序号	炮制品	柴胡皂苷 a	柴胡皂苷 d
1	生柴胡	0.828 5 \pm 0.001 5	0.651 8 \pm 0.001 2
2	酒柴胡	0.540 2 \pm 0.001 1	0.495 7 \pm 0.001 1
3	麸炒柴胡	0.873 6 \pm 0.001 3	0.626 4 \pm 0.001 2
4	醋柴胡	0.648 4 \pm 0.001 1	0.527 1 \pm 0.001 3
5	鳖血柴胡	0.243 3 \pm 0.001 2	0.183 7 \pm 0.001 2

3 讨论

3.1 洗脱梯度的确定

《中华人民共和国药典》一部柴胡项下记载的 HPLC 梯度洗脱条件适用于生柴胡饮片,对本实验中的柴胡不同炮制品分离效果不佳,故在此基础上以乙腈、水作二元混合溶剂,通过预实验得到新的洗脱梯度,可以提高分离度和峰的对称性,降低最低检测量,提高检测灵敏度,为柴胡炮制品的研究提供方法。

3.2 炮制方法对柴胡皂苷的影响

从表 2 的实验结果可知,柴胡皂苷 a 含量:麸炒>生品>醋炙>酒炙>鳖血炙。柴胡皂苷 d 含量:生品>麸炒>醋炙>酒炙>鳖血炙。即除麸炒可增加柴胡中柴胡皂苷 a 的含量之外,其他炮制方法均可降低柴胡中柴胡皂苷 a、d 的含量。由此可知,不同的炮制方法对柴胡中柴胡皂苷 a、d 的含量确有不同影响。柴胡经不同方法炮制后,其所含的主要有效成分发生变化,导致不同炮制品的临床功效不尽相同且各有所长,故临床上将不同柴胡炮制品分别入药应用具有一定科学道理。

麸炒柴胡为湖南地区惯用品种,仅收载于《湖南省中药饮片炮制规范》2010 年版,目前已有文献研究醋炙、酒炙、鳖血炙等炮制方法对柴胡有效成分的影响,而麸炒对柴胡有效成分影响的研究迄今未见报道。本试验结果显示,麸炒可增加柴胡中柴胡皂苷 a 的含量,原因可能是炮制过程中化学变化或者炮制辅料麦麸的残留引起,为湖南地区常用麸炒柴胡提供了一定的依据。为了阐明其炮制机制,建立柴胡麸炒炮制品的质量标准,应进步研究麦麸浓烟熏炒的炮制方式对柴胡皂苷及挥发性成分的影响。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典[S].北京:中国医药科技出版社,2015:280.
- [2] 史青,聂淑琴,黄璐琦,等.柴胡属植物化学成分及药理研究新进展[J].中国实验方剂学杂志,2002,8(5):53-56.
- [3] 龚千锋.中药炮制学[M].北京:中国中医药出版社,2012:236.
- [4] 邓颖,雷鹏,朱诗塔,等.大黄不同炮制品的 HPLC 指纹图谱比较研究[J].湖南中医药大学学报,2011,31(3):39-41.68.
- [5] 国家药典委员会.中华人民共和国药典(四部)[S].北京:中国医药科技出版社,2015:31.
- [6] 湖南省食品药品监督管理局.湖南省中药饮片炮制规范[S].长沙:湖南科学技术出版社,2010:16.
- [7] 李腾,高展,孙玉侠,等.柴胡及其制剂中皂苷类成分的研究[J].中成药,2011,33(11):1 840-1 843.

(本文编辑 苏维)