

竹叶柴胡根中皂苷类成分的薄层鉴别及含量测定

李旻^{1,2}, 王砚^{1,3}, 余弦^{1,2}, 赵磊^{1,2}, 王书林^{1,2*}

(1. 成都中医药大学药学院, 成都 611137; 2. 成都中医药大学峨眉学院, 四川 峨眉山 614201;
3. 四川省食品药品检验所, 成都 611731)

[摘要] **目的:**研究竹叶柴胡根中的皂苷类成分,为其入药提供科学依据。**方法:**采用薄层色谱法对皂苷类成分进行定性鉴别,并采用高效液相色谱法首次对竹叶柴胡根中皂苷类成分进行含量测定,用 C_{18} (4.60 mm × 150 mm, 5 μ m)柱,以乙腈-水为流动相梯度洗脱,检测波长210 nm,流速0.8 mL·min⁻¹,柱温35 $^{\circ}$ C,进样量10 μ L。**结果:**竹叶柴胡根中含有皂苷类成分。柴胡皂苷a和柴胡皂苷d的线性范围分别为440~8 800 ng($r=0.9997$),488~9 760 ng($r=0.9992$)线性关系良好,平均加样回收率($n=6$)分别为99.88% (RSD 0.41%),100.23% (RSD 0.46%)。样品中柴胡皂苷a和柴胡皂苷d的总量在0.48%~1.08%。**结论:**竹叶柴胡全草入药具有其科学性。

[关键词] 竹叶柴胡; 柴胡皂苷a; 柴胡皂苷d; 高效液相色谱

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)04-0074-04

[doi] 10.11653/syfyj2014040074

TLC Identification and Content Determination of Saponins from the Roots of *Bupleurum marginatum*

LI Min^{1,2}, WANG Yan^{1,3}, YU Xian^{1,2}, ZHAO Lei^{1,2}, WANG Shu-lin^{1,2*}

(1. Department of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine (TCM),
Chengdu 611137, China; 2. Institute of E'mei, Chengdu University of TCM, E'meishan 614201, China;
3. Sichuan Institute for Food and Drug Control, Chengdu 611731, China)

[Abstract] **Objective:** Studies on the saponins from the roots of *Bupleurum marginatum*. **Method:** The thin layer chromatography (TLC) was performed to identify saponins qualitatively, and a HPLC method was used for the determination of saponins in the roots of *B. marginatum*. The RP-HPLC system consisting of C_{18} (4.60 mm × 150 mm, 5 μ m) column and a solution system of acetonitrile-water with gradient elution, the detection wavelength was at 210 nm, the flow rate was 0.8 mL·min⁻¹, the column temperature was set at 35 $^{\circ}$ C and the injection volume was 10 μ L. **Result:** The linear ranges of saikosaponin A and saikosaponin D were 440-8 800 ng ($r=0.9997$), 488-9 760 ng ($r=0.9992$) respectively. The average recoveries ($n=6$) were 99.88% (RSD 0.41%), 100.23% (RSD 0.46%) respectively. The amounts of saikosaponin A and saikosaponin D were in the range of 0.48%-1.08%. **Conclusion:** The whole grass of *B. marginatum* as a traditional chinese medicine has its scientific nature.

[Key words] *Bupleurum marginatum*; saikosaponin a; saikosaponin d; HPLC

[收稿日期] 20130521(017)

[基金项目] 国家星火计划(2010GA810056);国家科技富民强县专项行动计划项目(国科发农[2008]471号);乐山市重点科技计划项目

[第一作者] 李旻,在读博士,讲师,从事中药药效物质及质量标准化研究,Tel:13668362282,E-mail:liminmd@163.com

[通讯作者] *王书林,硕士,教授,从事中药品种品质研究,Tel:0833-5591044,E-mail:154233619@qq.com

竹叶柴胡为伞形科植物竹叶柴胡的干燥全草,收载于《四川省中药材标准》2010年版,与马尾柴胡、马尔康柴胡的干燥全草收载作竹叶柴胡药材用^[1]。竹叶柴胡广泛分布于四川北部、陕西南部、湖北西部及云南、贵州等省区,为目前市场上中药柴胡主要来源之一。而《中国药典》2010年版一部收载柴胡或狭叶柴胡的干燥根为药用柴胡来源^[2],药效成分为皂苷类成分(包括柴胡皂苷 a, d 等)。现代研究发现,竹叶柴胡中含有黄酮和皂苷类成分^[3],课题组前期采用 HPLC 测定了竹叶柴胡中黄酮类成分的含量^[4],本研究运用薄层鉴别和含量测定方法对竹叶柴胡根中皂苷类成分进行研究,以期对竹叶柴胡全草入药的科学性提供合理依据,为今后进一步开发及利用这一丰富的药用柴胡资源提供一定的实验依据。

1 材料

竹叶柴胡采自四川省自贡市,经成都中医药大学峨眉学院王书林教授鉴定为伞形科植物竹叶柴胡 *Bupleurum marginatum* Wall. ex DC.。

柴胡皂苷 a 对照品(中国药品生物制品检定所,批号 110778-200505),柴胡皂苷 d 对照品(中国药品生物制品检定所,批号 110777-200406),薄层色谱硅胶 G 板(青岛海洋化工厂),乙腈(色谱纯),超纯水,其他试剂均为分析纯。

Waters 2996-2695 型高效液相色谱仪(Empower 色谱工作站),BP-211D 型电子分析天平(赛多利斯股份有限公司,德国),KQ3200 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司),UPT-II-10T 型超纯水器(成都超纯科技有限公司)。

2 方法与结果

2.1 皂苷类成分薄层鉴别 参照《中国药典》2010年版一部柴胡项下的薄层鉴别方法对竹叶柴胡根进行薄层色谱鉴别^[2]。

2.1.1 供试品溶液制备 取竹叶柴胡根粉末 0.5 g,加甲醇 20 mL,超声处理 10 min,滤过,滤液浓缩至约 5 mL,作为供试品溶液。

2.1.2 对照品溶液制备 取柴胡皂苷 a 对照品、柴胡皂苷 d 对照品,加甲醇分别制成每 1 mL 含 0.5 mg 的对照品溶液。

2.1.3 薄层鉴别方法 照薄层色谱法(《中国药典》附录 VIB)试验,吸取供试品和对照品溶液各 5 μ L,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以乙酸乙酯-乙醇-水(8:2:1)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以 2% 对二甲氨基苯甲醛的 40% 硫酸溶液,在 60 $^{\circ}$ C 加热至斑点显色清晰,置日光及紫外灯光(365 nm)下检视。供试品

溶液在与对照品色谱相应的位置上,显相同颜色的斑点,表明竹叶柴胡根中含柴胡皂苷 a 和柴胡皂苷 d。

2.2 皂苷类成分的含量测定 按照《中国药典》2010年版一部柴胡项含量测定方法对竹叶柴胡根中的柴胡 a 和柴胡皂苷 d 进行含量测定^[2]。

2.2.1 色谱条件与系统适用性试验 Agilent Zorbax SB C₁₈ 色谱柱(4.60 mm \times 150 mm, 5 μ m),乙腈为流动相 A,以水为流动相 B,梯度洗脱(0 ~ 50 min, 25% ~ 90% A, 50 ~ 55 min, 90% A),检测波长 210 nm,流速 0.8 mL \cdot min⁻¹,柱温 35 $^{\circ}$ C,进样量 10 μ L。理论板数按皂苷 a 峰计算不低于 10 000。

2.2.2 对照品溶液制备 取柴胡皂苷 a 对照品、柴胡皂苷 d 对照品适量,精密称定,加甲醇制成每 1 mL 甲醇含柴胡皂苷 a 0.440 0 mg、柴胡皂苷 d 0.488 0 mg 的溶液,即得。

2.2.3 供试品溶液制备 取竹叶柴胡根粉末(过四号筛)约 0.5 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,加入 5% 浓氨试液的甲醇溶液 25 mL,密塞,30 $^{\circ}$ C 水温超声处理 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,回收溶剂至干。残渣加甲醇溶解,转移至 5 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.2.4 方法学考察

2.2.4.1 线性关系考察 分别取柴胡皂苷 a 和柴胡皂苷 d 对照品溶液,分别进样 1, 2, 4, 6, 8, 10, 20 μ L,注入液相色谱仪,按上述色谱条件测定峰面积,并以峰面积(Y)对进样量(μ g)进行回归,得柴胡皂苷 a 的标准曲线 $Y = 487.3X + 49360$ ($r = 0.9997$),表明柴胡皂苷 a 在 440 ~ 8 800 ng 具有良好的线性关系;柴胡皂苷 d 的标准曲线 $Y = 405.14X - 196698$ ($r = 0.9992$),说明柴胡皂苷 d 在 488 ~ 9 760 ng 具有良好的线性关系。

2.2.4.2 精密度试验 精密吸取柴胡皂苷 a 和柴胡皂苷 d 对照品溶液各 10 μ L,连续进样 5 次,柴胡皂苷 a 峰面积值的 RSD 0.88%,柴胡皂苷 d 的峰面积值的 RSD 0.71%,表明本法精密度良好。

2.2.4.3 稳定性试验 取同一批竹叶柴胡根的供试品溶液,分别于 0, 2, 6, 12, 24 h 进样 10 μ L,测得样品中柴胡皂苷 a 峰面积的 RSD 0.69%,柴胡皂苷 d 峰面积的 RSD 0.71%,表明样品供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.2.4.4 重复性试验 取同一批竹叶柴胡根样品,分别制备供试液 6 份,按含量测定方法测得峰面积并计算含量,结果柴胡皂苷 a 含量的 RSD 0.97%,

柴胡皂苷 d 含量的 RSD 0.75% ,表明本法重复性良好。

2.2.4.5 加样回收率试验 称取已知含量的样品约 0.25 g,精密称定,分别精密加入柴胡皂苷 a 和柴胡皂苷 d 对照品适量,按供试品制备方法制备并注入高效液相色谱仪,结果柴胡皂苷 a 的平均回收率为 99.88% ,RSD 0.41% ,柴胡皂苷 d 的平均回收率为 100.23% ,RSD 0.46% 。结果见表 1,2。

表 1 柴胡皂苷 a 加样回收率试验

No.	样品重 /g	样品 含量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均 回收率 /%	RSD /%
1	0.250 5	0.673 8	1.332 9	99.86	99.88	0.41
2	0.252 0	0.677 9	1.334 8	99.53		
3	0.249 5	0.671 2	1.333 3	100.32		
4	0.250 1	0.672 8	1.328 2	99.30		
5	0.250 5	0.673 8	1.333 3	99.92		
6	0.249 8	0.672 0	1.334 2	100.33		

注:加入量均为 0.660 0 mg。

表 2 柴胡皂苷 d 加样回收率试验

No.	样品量 /g	样品 含量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均 回收率 /%	RSD /%
1	0.250 5	0.841 7	1.577 0	100.45	100.23	0.46
2	0.252 0	0.846 7	1.574 0	99.36		
3	0.249 5	0.838 3	1.573 5	100.44		
4	0.250 1	0.840 3	1.575 0	100.37		
5	0.250 5	0.841 7	1.574 5	100.11		
6	0.249 8	0.839 3	1.576 0	100.64		

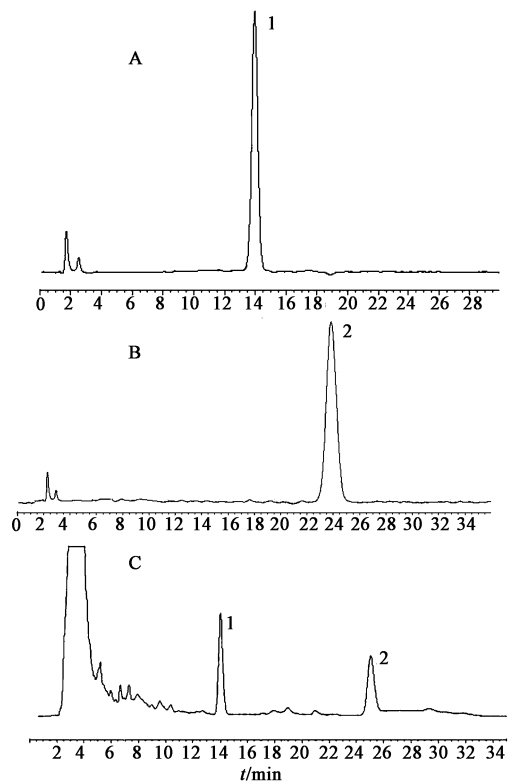
注:加入量均为 0.732 0 mg。

2.2.4.6 样品含量测定 按上述方法制得供试品溶液,分别精密吸取对照品溶液和供试品溶液各 10 μ L,注入高效液相色谱仪测定。结果见图 1,表 3。

由实验结果可知,14 批样品中柴胡皂苷 a 含量最高达 0.510% ,柴胡皂苷 d 含量最高达 0.584% ;二者含量总和最高达 1.08% ,最低达 0.48% ,均大于《中国药典》2010 年版中柴胡项下柴胡皂苷 a 和柴胡皂苷 d 总量的最低限度 0.30% 。

3 讨论

从文献报道^[3,9]和课题组前期实验结果可知,竹叶柴胡与药典柴胡品种含有相似的化学成分(主要为黄酮和皂苷类)。课题组通过对比试验发现,竹叶柴胡根中所含的皂苷类成分含量并不低于“北



A, B. 对照品; C. 供试品

1. 柴胡皂苷 a; 2. 柴胡皂苷 d

图 5 竹叶柴胡根样品 HPLC

表 3 14 批样品中柴胡皂苷 a 和柴胡皂苷 d 的含量测定 (n = 3) %

No.	采集地	采集时间	柴胡皂苷		总含量
			a	d	
Y1	荣县正紫镇窝棚湾村	2010-08-23	0.268	0.336	0.60
Y2	荣县正紫镇窝棚湾村	2010-08-23	0.286	0.359	0.64
Y3	荣县正紫镇窝棚湾村	2011-09-13	0.440	0.461	0.90
Y4	荣县正紫镇窝棚湾村	2011-09-18	0.414	0.433	0.85
Y5	荣县正紫镇窝棚湾村	2011-09-18	0.260	0.223	0.48
Y6	荣县正紫镇干沟村	2011-09-18	0.348	0.317	0.67
Y7	荣县度佳镇李家嘴村	2011-09-18	0.510	0.556	1.07
Y8	荣县正紫镇前进村	2011-09-18	0.291	0.278	0.57
Y9	荣县正紫镇丁家庙村	2011-09-18	0.310	0.378	0.69
Y10	荣县度佳镇胡家巷村	2011-09-18	0.491	0.501	0.99
Y11	荣县正紫镇坟嘴山村	2011-09-18	0.392	0.404	0.80
Y12	荣县度佳镇芭蕉湾村	2011-09-18	0.443	0.458	0.90
Y13	荣县正紫镇卫星村	2011-09-18	0.496	0.584	1.08
Y14	荣县度佳镇杨烧村	2011-09-18	0.417	0.524	0.94

柴胡”和“南柴胡”,且均大于《中国药典》2010 年版中柴胡项下规定的最低限度 0.30% 。这为竹叶柴胡在西南地区广泛的药用提供了科学依据,同时也为竹叶柴胡全草入药提供了依据。

金荞麦中原花青素 B₂ 和表儿茶素 在人工胃肠液中的含量变化

盛华刚*, 朱立俏, 张津萌
(山东中医药大学, 济南 250355)

[摘要] 目的:研究金荞麦中原花青素 B₂ 和表儿茶素在人工胃肠液中的含量变化,为金荞麦的体内物质基础研究提供依据。方法:采用 HPLC 测定金荞麦提取液中原花青素 B₂ 和表儿茶素在人工胃液和人工肠液中的含量变化。结果:原花青素 B₂ 和表儿茶素在酸性的人工胃液中含量的含量随时间延长明显增加,胃蛋白酶对原花青素 B₂ 和表儿茶素的含量影响不大。原花青素 B₂ 和表儿茶素在人工肠液 NE(无胰蛋白酶)中含量的含量增加,胰酶能够降低原花青素 B₂ 和表儿茶素的含量,对原花青素 B₂ 含量影响尤为明显。结论:酸性的人工胃液是引起金荞麦提取液中原花青素 B₂ 和表儿茶素含量上升的主要原因,胰酶与原花青素 B₂ 和表儿茶素发生结合是降低原花青素 B₂ 和表儿茶素的含量的主要原因。

[关键词] 金荞麦; 原花青素 B₂; 表儿茶素; 人工胃液; 人工肠液

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)04-0077-04

[doi] 10.11653/syfj2014040077

Changes of Procyanidin B₂ and Epicatechin of Fagopyri Dibotryis Rhizoma in Artificial Gastric Juice and Artificial Intestinal Juice

SHENG Hua-gang*, ZHU Li-qiao, ZHANG Jin-meng
(Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Ji'nan 250355, China)

[收稿日期] 20130127(006)

[基金项目] 山东省高等学校科技计划项目(J11LF30)

[通讯作者] * 盛华刚, 讲师, 博士, 从事中药新制剂的研究, Tel:0531-89628590, E-mail:shenghuagang@sina.com

实验过程中所采集的竹叶柴胡样品生长年限有一年及两年,但含量测定结果尚未发现其含量与生长年限间的相关性,且各产地含量差异较大,这可能与产地的生态环境、人工栽培技术等有关,这也证实了中药材规范化种植的重要性,只有严格的进行中药材的规范化种植,才可能保证中药材质量的均一、稳定。

若仅从药效成分含量测定结果来看,竹叶柴胡符合《中国药典》的法定要求,但竹叶柴胡能否作为药典柴胡品种补充,还需进一步将其与药典收录的柴胡品种在药理学等方面进行更为系统的对比研究。

[参考文献]

- [1] 四川省食品药品监督管理局. 四川省中药材标准[S]. 成都:四川出版集团·四川科学技术出版社, 2011:250.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S].

北京:中国医药科技出版社,2010:263.

- [3] 梁之桃,秦民坚,王峥涛. 竹叶柴胡化学成分的研究[J]. 中国药科大学学报,2003, 34(4):305.
- [4] 林海霞,王书林,王砚,等. HPLC 测定竹叶柴胡中黄酮类成分的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2012, 18(15):76.
- [5] 汪琼,徐增莱,王年鹤,等. 竹叶柴胡地上部分的化学成分研究[J]. 植物资源与环境学报,2007, 16(4):71.
- [6] 张婷婷,周颈松,王强,等. 竹叶柴胡地上部分指纹图谱研究[J]. 中药材,2011,34(8):1203.
- [7] 王建科,张永萍,李玮,等. 竹叶柴胡药材 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中国药房,2011,22(47):4462.
- [8] 赵晓辉,蒋福全,周剑波,等. HPLC 法测定柴胡地上部分的黄酮苷元[J]. 分析实验室,2007,26(1):46.
- [9] 林海霞,王砚,孙翠萍,等. 竹叶柴胡规范化种植标准操作规程(SOP)[J]. 中国医药指南,2011, 9(31):380.

[责任编辑 顾雪竹]