

# 柴胡口服液 HPLC 指纹图谱及柴胡皂苷 b<sub>2</sub> 的含量测定

刘伟<sup>1</sup>, 杨艳玲<sup>1</sup>, 刘乃强<sup>2\*</sup>, 樊磊磊<sup>2</sup>

(1. 河南中医学院分析测试中心, 郑州 450003; 2. 河南省食品药品检验所, 郑州 450003)

**[摘要]** 目的: 建立柴胡口服液 HPLC 指纹图谱, 并测定柴胡皂苷 b<sub>2</sub> 的含量, 为科学评价和有效控制其质量提供可靠的方法。方法: 用 HPLC 方法测定了 10 批柴胡口服液, 采用中药色谱指纹图谱相似度评价系统, 建立柴胡口服液的标准指纹图谱, 并计算了每批制剂的相似度及柴胡皂苷 b<sub>2</sub> 的含量。结果: 10 批柴胡口服液的 HPLC 指纹图谱主要有 11 个共有峰, 其中 1 个共有峰得到确认, 相似度均 >0.985。柴胡皂苷 b<sub>2</sub> 在 0.039 7~0.793 3 μg 呈良好的线性关系 ( $r=0.999\ 1$ ), 平均加样回收率 98.27%, RSD 1.79%。结论: 柴胡口服液制剂可通过与标准指纹图谱比较评价质量, 方法稳定易行、重复性好, 可用于柴胡口服液的质量评价。

**[关键词]** 柴胡口服液; 高效液相色谱法; 指纹图谱; 含量测定

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)08-0134-04

**[doi]** 10.11653/syfy2013080134

## Study on Fingerprint and Determination of Saikosaponin b<sub>2</sub> of Radix Bupleurioral Liquids by HPLC

LIU Wei<sup>1</sup>, YANG Yan-ling<sup>1</sup>, LIU Nai-qiang<sup>2\*</sup>, FAN Lei-lei<sup>2</sup>

(1. Center of Analysis and Measurement, Henan College of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450003, China; 2. Henan Province Institute for Food and Drug Control, Zhengzhou 450003, China)

**[Abstract]** **Objective:** To establish an HPLC method for a standard fingerprint and determination of saikosaponin b<sub>2</sub> for quality control of Radix Bupleurioral liquids. **Method:** About 10 samples from different batches were analyzed by HPLC. By the Similarity Evaluation System for Chromatographic Fingerprint of Traditional Chinese Medicine (Version 2004A), mean chromatogram was generated as the representative standard fingerprint and the similarity of each chromatogram against the standard chromatogram was also calculated. **Result:** Eleven main marker peaks were selected in the standard fingerprint and 1 peak of them were identified. The similarity of all samples was over 0.985. The linear range of saikosaponin b<sub>2</sub> was 0.039 7-0.793 3 μg ( $r=0.999\ 1$ ). The average recovery was 98.27% with RSD of 1.79% ( $n=6$ ). **Conclusion:** The developed method was reliable, and can be used for the quality control of Radix Bupleurioral liquids.

**[Key words]** Radix Bupleurioral liquids; HPLC; chromatographic fingerprint; determination

柴胡口服液为柴胡单味制剂, 由柴胡水煎液和柴胡挥发油混合而成<sup>[1]</sup>。研究证明, 柴胡属植物含

有柴胡皂苷、挥发油、有机酸、菌醇类、黄酮类、多糖、木脂素、香豆素等成分<sup>[2-4]</sup>。其中, 柴胡的主要药效物质基础有柴胡皂苷及苷元、挥发油及黄酮类等<sup>[5]</sup>。

本文主要研究柴胡水煎液部位, 其有效成分为柴胡皂苷, 具抗炎作用<sup>[6]</sup>。主要活性成分为柴胡皂苷 a, d, b, b<sub>2</sub>, C, f 等<sup>[7]</sup>。文献报道柴胡中主要活性成分柴胡皂苷 d 易分解成柴胡皂苷 b<sub>2</sub><sup>[8]</sup>。柴胡皂苷 b<sub>2</sub> 具有较好的生理活性, 如对感染上呼吸道而造成绝大部分成人普通感冒的冠状病毒 HCoV-229E

**[收稿日期]** 20120723(004)

**[第一作者]** 刘伟, 教授, 从事中药质量标准 and 仪器分析方法的研究, Tel: 0391-65575838, E-mail: hnliuwei2088@sina.com

**[通讯作者]** \* 刘乃强, 主任药师, 从事药品检验工作, Tel: 18625569160, E-mail: 13643819202@126.com

具有良好的抑制作用<sup>[9-10]</sup>等。

目前柴胡口服液的质量分析主要是薄层色谱法<sup>[11-12]</sup>。为完善柴胡口服液的质量评价体系,本实验开展了柴胡口服液 HPLC 指纹图谱研究,并测定柴胡皂苷 b<sub>2</sub> 的含量。相对于目前的研究使用了更先进的实验仪器,且实验方法简单易行,准确度高,完善了柴胡口服液的质量评价体系。

## 1 材料

Waters 高效液相色谱仪-Acquity™ (美国), Empower 色谱工作站, PrecisaXR205SM-DR 型电子天平(瑞士)、MILLI-Q 型超纯水器(Millipore 公司, 美国), PC-1000 型数显式电热恒温水浴锅(上海跃进医疗器械厂), 中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004A 版(珠海科曼中药研究有限公司)。

柴胡口服液(来源保密,批号 091101, 091102, 091103, 091201, 100201, 100202, 100203, 120201, 120202, 120203), 柴胡皂苷 b<sub>2</sub> 对照品购于四川省维克奇生物科技有限公司(批号 110928), 甲醇、乙腈为色谱纯(Merck 公司), 水为超纯水(MILLI-Q 型超纯水器制备)。

## 2 方法

**2.1 色谱条件**<sup>[13]</sup> Gemini-NX C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm)(广州菲罗门科学仪器有限公司); 流动相水(A)-乙腈(B), 洗脱程序 0 ~ 20 min, 30% ~ 38% B; 20 ~ 25 min, 38% ~ 40% B; 25 ~ 35 min, 40% ~ 50% B, 35 ~ 45 min, 50% ~ 60% B; 45 ~ 45.5 min, 60% ~ 30% B; 45.5 ~ 50 min, 30% B; 柱温 25 °C, 流速 1 mL·min<sup>-1</sup>, 检测波长 252 nm, 进样体积 10 μL。柴胡皂苷 b<sub>2</sub> 的理论塔板数不应低于 5 000。

**2.2 供试品溶液的制备**<sup>[7]</sup> 取柴胡口服液 2 mL 通过 SPE 小柱(安捷伦 BOND ELUT-C<sub>18</sub>, 500 mg/6 mL, 批号 0000724411), 依次以 50% 甲醇 20 mL 和甲醇 10 mL 洗脱, 依次收集 50% 甲醇洗脱部位(对照试验用)和甲醇洗脱部位(供试品用)。洗脱液分别水浴浓缩至干, 残渣用甲醇定容至 2 mL, 过 0.45 微孔滤膜。

**2.3 阴性供试品溶液制备** 按处方比例, 称取除柴胡的辅料, 按药典工艺制成阴性供试品溶液。

**2.4 对照品溶液的制备** 取柴胡皂苷 b<sub>2</sub> 对照品适量, 精密称定, 置量瓶中, 加甲醇制成 1 mL 含 79.33 μg 的溶液, 即得(10 °C 以下保存)。

**2.5 对照试验** 取对照品、样品溶液、阴性、50% 甲醇洗脱液和 50% 甲醇洗脱液加适量柴胡皂苷 b<sub>2</sub> 各

10 μL, 注入高效液相色谱仪, 按 2.1 的色谱条件进样, 记录色谱图, 见图 1, 2。

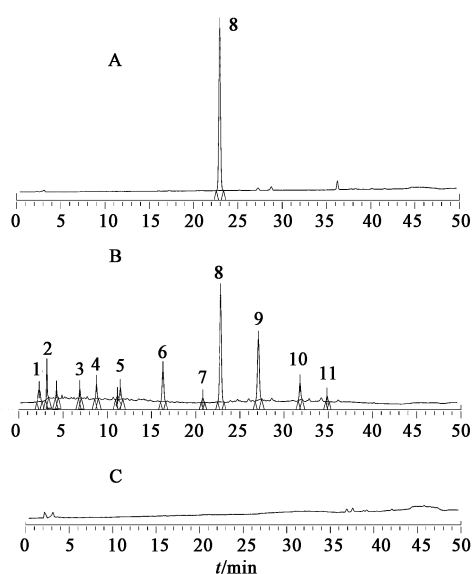


图 1 柴胡皂苷 b<sub>2</sub> 对照品(A)、柴胡口服液样品(B)和柴胡口服液阴性样品(C)

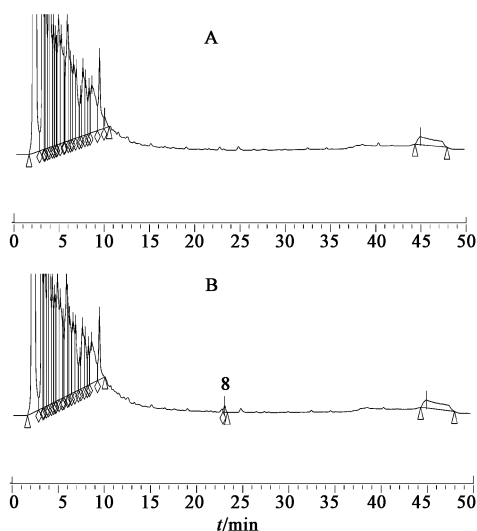


图 2 50% 甲醇洗脱液(A)和 50% 甲醇洗脱液加柴胡皂苷 b<sub>2</sub> 对照品(B)

**2.6 线性关系的考察** 精密量取 2.3 项下柴胡皂苷 b<sub>2</sub> 对照品溶液, 加甲醇稀释得到 6 个系列质量浓度, 分别为 79.33, 52.89, 39.67, 15.87, 7.93, 3.97 mg·L<sup>-1</sup>。按 2.1 的色谱条件各进样 10 μL, 以进样量(X)为横坐标, 峰面积(Y)为纵坐标, 绘制标准曲线, 得到线性回归方程  $Y = 19\,282X - 78\,487$  ( $r = 0.999\,1$ ), 结果表明, 柴胡皂苷 b<sub>2</sub> 进样量在 0.039 7 ~ 0.793 3 μg 与峰面积呈良好线性关系。

**2.7 精密度试验** 取同一供试品溶液, 按 2.1 的色谱条件连续进样 5 次, 记录色谱图中共有峰的峰面积, 计算 5 次的 RSD, 各共有峰的 RSD 均 < 3%, 表

明仪器精密度良好。

**2.8 重复性试验** 平行制备 5 份供试品溶液,按 2.1 的色谱条件进样,记录各共有峰的峰面积,计算 5 份平行样品间的 RSD 均 < 3%,符合指纹图谱要求,重复性良好。

**2.9 稳定性试验** 制备供试品溶液,室温下放置,在相同条件下分别于 0, 4, 8, 12, 24 h 进样分析,考察供试品溶液当天的稳定性。共有峰的峰面积 RSD 均 < 3%,符合指纹图谱要求,表明样品在 24 h 内稳定。

**2.10 加样回收率试验** 取已知含量的柴胡口服液样品 1 mL,分别精密加入 1 mL 一定浓度的柴胡皂苷  $b_2$  对照品溶液,按 2.2 项下平行操作 6 份,按 2.1 的色谱条件进样分析。计算加样回收率,并求得 RSD,结果见表 1。

表 1 柴胡皂苷  $b_2$  的回收率试验 ( $n=6$ )

取样量 /mL	样品中含量/ $\mu\text{g}$	加入量/ $\mu\text{g}$	测得量/ $\mu\text{g}$	回收率/%	平均值/%	RSD/%
1	33.30	39.67	71.80	97.05		
1	33.30	39.67	71.32	95.84		
1	33.30	39.67	72.10	97.81	98.27	1.79
1	33.30	39.67	72.35	98.44		
1	33.30	39.67	73.01	100.10		
1	33.30	39.67	73.12	100.38		

### 3 结果

**3.1 柴胡口服液的 HPLC 指纹图谱的建立** 按 2.2 项下制备 10 批柴胡口服液样品,按 2.1 项下色谱条件进样,记录各色谱图,以 6 号峰为内参照峰,计算各共有峰相对峰面积。结果见表 2。

表 2 柴胡口服液 10 批样品相对峰面积

共有峰号	样品编号										RSD/%
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
1	0.149 4	0.176 6	0.150 6	0.165 1	0.196 6	0.165 0	0.194 3	0.162 9	0.171 3	0.166 6	9.32
2	0.145 1	0.189 8	0.364 7	0.152 3	0.692 8	0.152 0	0.150 2	0.298 1	0.124 2	0.388 5	67.28
3	0.141 8	0.194 6	0.134 5	0.193 0	0.170 0	0.142 1	0.187 6	0.143 2	0.175 9	0.158 4	14.10
4	0.229 1	0.281 9	0.245 1	0.302 4	0.259 1	0.227 6	0.273 9	0.260 0	0.273 5	0.241 3	9.29
5	0.241 1	0.267 9	0.225 6	0.289 8	0.239 3	0.238 4	0.271 2	0.229 7	0.275 2	0.227 7	9.24
6	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	0.00
7	0.097 5	0.134 0	0.090 9	0.143 4	0.119 2	0.134 4	0.111 1	0.085 4	0.135 1	0.093 0	18.94
8	2.796 8	3.083 1	2.686 3	3.235 4	2.833 6	2.739 8	3.112 9	2.709 0	3.019 9	2.782 7	6.73
9	1.736 5	1.890 8	1.678 0	1.982 4	1.718 7	1.704 2	1.870 9	1.655 6	1.811 6	1.695 7	6.13
10	0.380 6	0.415 6	0.357 9	0.430 0	0.366 9	0.363 5	0.410 7	0.361 7	0.396 1	0.365 3	6.83
11	0.099 9	0.108 3	0.094 4	0.114 9	0.097 7	0.099 1	0.108 6	0.098 3	0.107 7	0.099 4	6.34

**3.2 柴胡口服液共有指纹图谱的建立** 应用中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004A 版对 10 批柴胡口服液色谱图进行分析,建立其指纹图谱及共有模式,如图 3 所示。

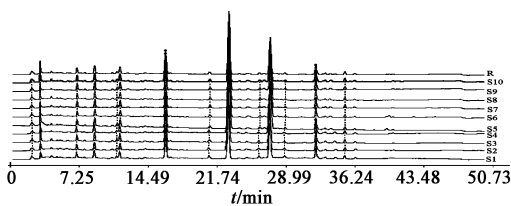


图 3 柴胡口服液 10 批样品 HPLC 指纹图谱及共有模式

**3.3 柴胡口服液相似度计算** 10 批柴胡口服液 HPLC 图与对照图谱比较,用中药色谱指纹图谱相

似度评价系统 2004A 版计算得到相似度,见表 3。

**3.4 柴胡口服液的含量测定** 柴胡口服液按 2.2 项下制备,测得柴胡皂苷  $b_2$  的含量,见表 4。

### 4 讨论

**样品处理方法的选择** 通过色谱图形比较不同的样品处理方法,最终采用本实验方法,即使用 SPE 小柱进行样品前处理。分别选用水 10 mL + 30% 甲醇 20 mL, 30% 甲醇 10 mL + 50% 甲醇 10 mL, 50% 甲醇 20 mL,对柴胡口服液进行杂质洗脱,发现 50% 甲醇 20 mL 洗脱后所得色谱图效果最佳。

**除杂溶剂的考察** 同样品的处理方法,收集 50% 甲醇 20 mL 的洗脱液,水浴蒸干,50% 甲醇定容至 2 mL,过 0.45 微孔滤膜;平行 1 份加入适量柴胡

表 3 10 批柴胡口服液样品的相似度

No.	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	对照
S1	1	0.999	0.997	0.998	0.987	0.998	0.998	0.997	0.997	0.996	0.999
S2	0.999	1	0.996	0.999	0.988	0.996	0.997	0.996	0.997	0.995	0.998
S3	0.997	0.996	1	0.996	0.994	0.995	0.995	0.998	0.994	0.998	0.999
S4	0.998	0.999	0.996	1	0.985	0.996	0.998	0.995	0.997	0.994	0.998
S5	0.987	0.988	0.994	0.985	1	0.987	0.987	0.994	0.986	0.996	0.993
S6	0.998	0.996	0.995	0.996	0.987	1	0.998	0.998	0.999	0.996	0.998
S7	0.998	0.997	0.995	0.998	0.987	0.998	1	0.998	0.999	0.996	0.999
S8	0.997	0.996	0.998	0.995	0.994	0.998	0.998	1	0.997	0.999	0.999
S9	0.997	0.997	0.994	0.997	0.986	0.999	0.999	0.997	1	0.995	0.998
S10	0.996	0.995	0.998	0.994	0.996	0.996	0.996	0.999	0.995	1	0.999
对照	0.999	0.998	0.999	0.998	0.993	0.998	0.999	0.999	0.998	0.999	1

表 4 柴胡口服液中柴胡皂苷 b<sub>2</sub> 含量 mg·L<sup>-1</sup>

批号	含量	批号	含量
091101	33.38	100202	33.29
091102	30.56	100203	33.26
091103	30.71	120201	32.43
091201	34.01	120201	31.19
100201	30.40	120201	33.18

皂苷 b<sub>2</sub> 对照品,按 2.1 的色谱条件进样分析,确定无柴胡皂苷 b<sub>2</sub> 的流失。

色谱条件的选择 分别考察了流动相水-乙腈不同梯度洗脱,结果显示实验所用条件所得峰形好、分离效果佳,且基线平稳,有利于指纹图谱及柴胡皂苷 b<sub>2</sub> 定量的分析。

检测波长的选择 本试验采用二极管阵列紫外检测器作为检测器,首先在 2.1 的色谱条件下采用全波长扫描进行测定,并同时在 199~400 nm 下采集其三维色谱图,通过对三维色谱图在所有波长下的出峰情况、基线的平稳程度,以及各成分的分离情况等综合考虑,最终选定检测波长为 252 nm。

考察了 50 min 的色谱峰,指纹图谱选择 6 号峰为内参照峰,因为其保留时间居中约为 23.52 min,且分离度较好。

#### [参考文献]

- [1] 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,2010:992.
- [2] 史青,聂淑琴,黄璐琦. 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.

- [3] 陈莹. 柴胡属植物化学成分研究进展[J]. 中国野生植物资源,2006,25(2):4.
- [4] 刘永春. 柴胡的化学成分及药理作用研究概况[J]. 黑龙江医药,2006,19(3):216.
- [5] 张国松,封传华,罗晓健,等. 柴胡总皂苷提取工艺的优化[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(12):17.
- [6] 牛向荣. 柴胡药理作用研究概述[J]. 中国药师,2009,12(9):1310.
- [7] 刘和平,谢培山,田润涛. 柴胡属药材皂苷高效薄层色谱指纹图谱的研究[J]. 中国新药与临床药理,2008,19(1):38.
- [8] Ariyoshi Shirrmoaka, A Seo S, Minato H, et al. Saponins isolated from *Bupleurum faletum* L.; components of saikosaponin b [J]. J Chem Society, Perkin Tram, 1975, 1:2043.
- [9] Liu Cheng, Feng You jun, Gao Feng, et al. Characterization of HCoV-229E fusion core: implications for structure basis of coronavirus membrane fusion[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2006, 345(3):1108.
- [10] Cheng Pei-win, Ng Lean-teik, Chiang Lien-chai, et al. Antiviral effects of saikosaponins on human coronavirus 229E *in vitro*[J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2006, 33(7):612.
- [11] 卢劲伟. 含有柴胡的中成药定性定量方法研究析要[J]. 中医药学刊,2003,21(11):1972.
- [12] 何美姗,孙小玉. 正柴胡饮颗粒的解热及抗过敏作用[J]. 中草药,2000,31(4):284.
- [13] 赵丽,钟巧妮,雷玉霞. 柴胡总苷高效液相色谱指纹图谱与主成分含量测定[J]. 医药导报,2008,27(3):323.

[责任编辑 顾雪竹]