

单味柴胡煎煮过程中皂苷煎出量的变化

李军*, 姜华, 张延萍, 张倩, 徐幽

(河南科技大学化工与制药学院, 河南 洛阳 471003)

[摘要] 目的:考察柴胡煎煮过程中皂苷 a, b₁, b₂, h 煎出量的变化。方法:采用 HPLC, Hypersil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈-水, 梯度洗脱(0~70 min, 22:78→50:50), 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 30 ℃, 检测波长 210, 254 nm。结果:柴胡在单煎时其皂苷的成分溶出随煎煮时间存在较大的变化。柴胡皂苷 a 的煎出量随时间逐渐下降, 煎煮的 4 h 后, 其含量下降逐渐趋于稳定。柴胡皂苷 b₁, b₂, h 的煎出量随时间增加, 其中柴胡皂苷 b₁ 的煎出量在煎煮 5 h 后其含量仍处于增加的阶段, 柴胡皂苷 b₂ 煎煮 2 h 后煎液中的含量便达到了最大值, 柴胡皂苷 h 在煎煮 4 h 后煎出量增加的幅度逐渐趋缓。结论:在从化学成分角度研究柴胡在方剂中配伍规律时, 应注意煎煮过程对柴胡皂苷成分含量变化的影响。本文对含不稳定性成分药材配伍规律研究模式的建立奠定基础。

[关键词] 柴胡; 含量测定; 柴胡皂苷

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)22-0155-04

Content Change of Saikosaponins During Preparation of Saiko Decoction

LI Jun*, JIANG Hua, ZHANG Yan-ping, ZHANG Qian, XU You
(Chemical Engineering and Pharmaceutics College, Henan University
of Science and Technology, Luoyang 471003, China)

[收稿日期] 20120508(019)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81001615)

[通讯作者] *李军, 博士, 副教授, 从事中药活性成分(组)研究, Tel:0379-64231914, E-mail:huomanlee@126.com

我们对酸枣仁分散片中的黄酮类与皂苷类成分的含量测定方法进行了研究, 从而为酸枣仁分散片的质量控制提供依据。

[参考文献]

- [1] 中国药典. 一部[S]. 2010:343.
- [2] 林渊, 周良良, 吴水生. 对中药汤剂剂型改革研究的思考[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(5): 264.
- [3] 王艳荣, 李慧, 张保献, 等. 新型辅料在中药分散片中的应用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(10): 207.
- [4] 张雪, 丁长河, 李和平. 酸枣仁的化学成分和药理作用研究进展[J]. 食品工业科技, 2009, 30(3): 348.
- [5] 刘婧姝, 乔卫, 郝兰芳, 等. 酸枣仁合欢方中酸枣仁皂苷 A 的薄层色谱鉴别和含量测定[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(5): 77.

- [6] 王燕, 柴程芝, 朱丹妮. HPLC-ELSD 测定 GSSM 颗粒中酸枣仁皂苷 A 和人参皂苷 Rb₁[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(12): 76.
- [7] 张彦青, 解军波, 张明春, 等. HPLC-ELSD 法测定酸枣仁滴丸中酸枣仁皂苷 A、B 和白桦脂酸[J]. 中草药, 2009, 42(2): 234.
- [8] 闫艳, 杜晨晖, 李小菊, 等. HPLC-DAD-ELSD 法同时测定酸枣仁中斯皮诺素、酸枣仁皂苷 A 和 B 的含量[J]. 药物分析, 2011, 31(1): 30.
- [9] 鲍康德, 李萍, 李会军, 等. HPLC-ELSD 法同时测定酸枣仁中黄酮及皂苷类成分[J]. 中国天然药物, 2009, 7(1): 47.
- [10] 闫艳, 杜晨晖, 裴香萍, 等. 不同产地酸枣仁药材 HPLC-DAD-ELSD 指纹图谱[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(4): 67.

[责任编辑 顾雪竹]

[Abstract] Objective: To study the content changes of Saikosaponin a, b₁, b₂, h in the process of the preparation of Saiko decoction. **Method:** A HPLC method was employed, which was carried out on a Hypersial C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) with gradient elution of acetonitrile-water (0-70 min, 28:78-50:50). The flow rate was set at 1.0 mL · min⁻¹. The column temperature was 30 °C. The wavelength was set at 210 and 254 nm. **Result:** The contents of saikosaponins vary greatly with the time of decoction. The content of saikosaponin a, which decreased with the decoction time, tended to be stable after 4 hours. However the content of saikosaponin b₁, b₂, h increased with the decoction time. The content of saikosaponin b₁ was also in the ascent stage after 5 hours. The saikosaponin b₂ reached its stability stage after 2 hours. And the saikosaponin h tended to be stable after 4 hours. **Conclusion:** Attention should be paid to the influence of decoction process when research was carried out on the chemical constitution compatible regularity of saiko. This paper set foundation to the research model of compatible regularity for the Chinese crude medicines containing unstable chemical constitutions.

[Key words] Saiko; content determination; saikosaponin

中药配伍前后化学成分变化的研究是探讨配伍规律的一个重要途径^[1-5]。但是该研究模式有一个前提,即成方单味药在单煎时成分的溶出情况可控。在此基础之上,配伍前后(或配伍比例变化)引起的成分变化可以作为配伍研究的依据。但是,对于单煎时成分的溶出情况不可控的单味药,该研究方法就不适用,如柴胡^[6-7]。柴胡为我国常用中药,具有疏散退热、升阳舒肝之功效^[8],皂苷是柴胡中主要的有效成分,具有多种药理作用^[9]。在对柴胡相关药对配伍研究时发现,柴胡在单煎时其皂苷的成分溶出随煎煮时间变化较为复杂,即柴胡的配伍不能采用常规方法进行研究。同时文献检索显示,针对该现象的相关研究未见报道。可见,中药配伍的化学成分研究模式有待进一步的完善。对单味柴胡中皂苷类成分随煎煮时间的变化情况进行了研究,为中药配伍研究新模式的建立提供参考。

1 仪器与试剂

Waters 600-2487 型高效液相色谱仪, RE-52AA 型旋转蒸发仪(郑州长城科工贸), KQ-500DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司), METTLER-AE240 型电子分析天平。柴胡药材购自洛阳关林药材市场,经河南科技大学路西明教授鉴定为柴胡 *Bupleurum chinense* DC. 的干燥根;柴胡皂苷 a, b₁, b₂, h(自制,面积归一化法测定其纯度均高于 98%);乙腈(DIKMA 公司,色谱纯),重蒸水自制,大孔树脂 AB-8 型(天津南开大学化工厂),其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Hypersil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈-水, 梯度洗脱(0 ~ 70 min, 22:78 ~ 50:50), 流速 1.0 mL · min⁻¹, 柱温

30 °C, 检测波长 210 nm(柴胡皂苷 a), 254 nm(柴胡皂苷 b₁, b₂, h), 进样量 10.0 μL。在此色谱条件下, 柴胡皂苷 a, b₁, b₂, h 能够很好的分开, 分离度均大于 1.5。见图 1 ~ 2。

2.2 对照品溶液的制备 精密称取干燥至恒重的柴胡皂苷 a 和 b₁, b₂, h 对照品适量, 分别置于 2 个不同的 10 mL 量瓶中, 加甲醇超声溶解并稀释至刻度, 摇匀, 得柴胡皂苷 a 0.23 g · L⁻¹ 和混合对照品溶液(其中柴胡皂苷 b₁ 0.35 g · L⁻¹、柴胡皂苷 b₂ 0.71 g · L⁻¹、柴胡皂苷 h 0.15 g · L⁻¹)。

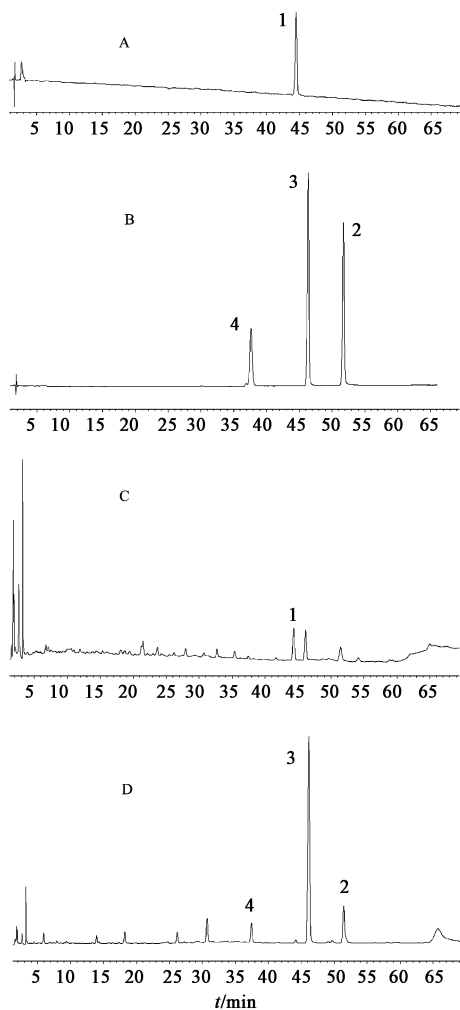
2.3 样品溶液的制备

2.3.1 柴胡煎液的制备 取柴胡药材若干份, 每份 50 g, 置 1 000 mL 的圆底烧瓶中, 加入 500 mL 蒸馏水, 浸泡 1 h 后, 加热至微沸, 回流提取一定时间(考察的时间有 1, 2, 3, 4, 5 h), 趁热过滤, 并用少量水洗涤药渣, 滤液在冰浴中迅速冷却, 然后, 转移至 500 mL 量瓶中, 用蒸馏水定容, 摇匀, 即得柴胡煎液。

2.3.2 柴胡皂苷的富集^[10] 精密移取煎煮不同时间的柴胡煎液 20.0 mL, 于 AB-8 型大孔树脂(内径 1.2 cm, 柱长 9 cm) 上样, 先用 0.5 mol · L⁻¹ NaOH 80 mL 洗脱, 弃去; 然后用水洗脱至中性(约 40 mL); 再用 30% 乙醇 30 mL 洗脱, 弃去; 最后用 95% 乙醇 100 mL 洗脱, 收集 95% 乙醇洗脱部分, 水浴蒸干, 用 50% 乙醇溶解转至 10 mL 量瓶中, 用 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 即得。

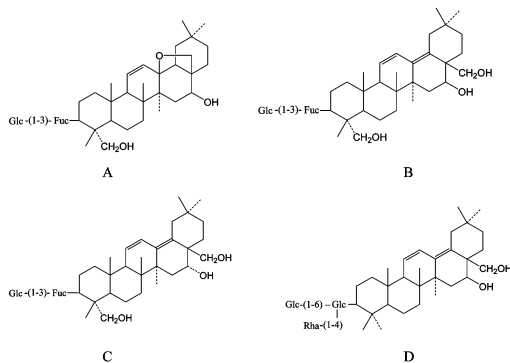
2.4 方法学考察

2.4.1 线性关系考察 取 2.2 项下制备的对照品溶液, 进样不同的体积, 依法测定峰面积。以对照品的进样量 X(μg) 为横坐标, 峰面积 Y(× 10⁻⁶) 为纵坐标进行线性回归, 结果见表 1。



1. 柴胡皂苷 a; 2. 柴胡皂苷 b₁; 3. 柴胡皂苷 b₂; 4. 柴胡皂苷 h

图1 对照品(A,B)、柴胡煎剂 210 nm (C) 和柴胡煎剂 254 nm (D) 的 HPLC



A. 柴胡皂苷 a; B. 柴胡皂苷 b₁; C. 柴胡皂苷 b₂; D. 柴胡皂苷 h

图2 柴胡皂苷 a, b₁, b₂, h 的结构

2.4.2 精密度试验 精密移取 20.0 mL 柴胡 2 h 水煎液,按照 2.3.2 项下方法制备供试品溶液,连续进样 5 次,每次 10.0 μL,测定峰面积。结果柴胡皂苷 a, b₁, b₂, h 峰面积的 RSD 分别为 2.2%, 0.8%, 0.5%, 1.8%, 表明精密度良好。

表1 各对照品的回归方程、线性系数及线性范围

对照品	回归方程	r	线性范围/μg
柴胡皂苷 a	$Y = 3.371X - 0.0271$	0.9998	0.23 ~ 4.6
柴胡皂苷 b ₁	$Y = 119.3X + 1.1876$	0.9993	0.35 ~ 3.5
柴胡皂苷 b ₂	$Y = 14.326X + 0.3233$	0.9997	0.71 ~ 7.1
柴胡皂苷 h	$Y = 9.2438X - 0.1945$	0.9996	0.15 ~ 3.0

2.4.3 稳定性试验 精密移取 20.0 mL 柴胡 2 h 水煎液,按照 2.3.2 项下方法制备供试品溶液,分别于制备后 0, 2, 4, 6, 8, 10 h 进样,每次 10.0 μL,测定峰面积。结果柴胡皂苷 a, b₁, b₂, h 峰面积的 RSD 分别为 1.8%, 1.9%, 1.0%, 2.2%, 表明供试品溶液在 10 h 内基本稳定。

2.4.4 重复性试验 精密移取 20.0 mL 柴胡 2 h 水煎液 5 份,按照 2.3.2 项下方法制备各供试品溶液,精密吸取各供试品溶液 10.0 μL 进样,测定峰面积并计算含量。结果显示柴胡皂苷 a, b₁, b₂, h 含量的 RSD 分别为 1.5%, 1.00%, 1.8%, 0.9%, 2.1%。表明该方法重复性良好。

2.4.5 回收率试验 精密移取 10.0 mL 柴胡 2 h 水煎液 9 份,分成 3 组,每组 3 份,分别精密加入各对照品溶液适量,按 2.3.2 项下柴胡皂苷富集方法制备供试品溶液,并进样。计算平均加样回收率,结果见表 2。

表2 柴胡皂苷 a, b₁, b₂, h 回收率试验

对照品	称样量 /mL	样品中含量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
柴胡皂苷 a	10.0	0.409	0.352	0.749	96.0	98.2	2.48
	10.0	0.409	0.440	0.840	97.7		
	10.0	0.409	0.528	0.942	100.8		
柴胡皂苷 b ₁	10.0	0.287	0.240	0.523	98.3	96.9	1.75
	10.0	0.287	0.300	0.579	97.3		
	10.0	0.287	0.360	0.631	95.0		
柴胡皂苷 b ₂	10.0	1.160	0.960	2.118	99.8	99.0	1.70
	10.0	1.160	1.200	2.362	100.2		
	10.0	1.160	1.440	2.558	97.1		
柴胡皂苷 h	10.0	0.199	0.176	0.373	97.7	98.6	1.94
	10.0	0.199	0.220	0.414	97.3		
	10.0	0.199	0.264	0.466	100.8		

2.4.6 样品含量测定 精密移取 20.0 mL 柴胡各水煎液,按照 2.3.2 项下方法制备各供试品溶液,精密吸取各供试品溶液 10.0 μL 进样,测定峰面积并

计算 50 g 柴胡药材煎液中柴胡皂苷的含量。结果见表 3。

表 3 柴胡皂苷 a, b₁, b₂, h 煎出量测定 (n = 3) mg

煎煮时间/h	柴胡皂苷 a	柴胡皂苷 b ₁	柴胡皂苷 b ₂	柴胡皂苷 h
1	21.050	14.150	54.500	9.700
2	20.450	14.350	58.000	9.950
3	15.600	17.000	58.500	10.300
4	9.100	19.050	57.500	10.850
5	8.650	26.250	57.500	11.000

由表 3 的结果可知,柴胡在煎煮的过程中,皂苷的溶出随着时间在不断的变化。其中,柴胡皂苷 a 的煎出量随时间逐渐下降,煎煮的 4 h 时的下降的速率最快,此后其含量逐渐趋于稳定。而柴胡皂苷 b₁, b₂, h 的煎出量随时间的增加而增加,其中柴胡皂苷 b₁ 在煎煮 5 h 时,煎液中含量增加的幅度变大,柴胡皂苷 b₂ 在煎煮 2 h 煎液中的含量便达到了最大值,柴胡皂苷 h 在煎煮 4 h 后煎出量增加的幅度逐渐变缓。

3 讨论

由于柴胡煎液中其他成分对皂苷含量测定的干扰,无法直接对柴胡皂苷进行测定,基于大孔吸附树脂对柴胡皂苷具有良好的吸附效果^[11],通过考察除杂过程中氢氧化钠的浓度(0.1, 0.3, 0.5, 0.8 mol·L⁻¹)、乙醇的体积分数(30%, 50%, 70%, 95%)及其不同用量(50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 130 mL)条件下柴胡皂苷的转移率,结果显示使用 0.5 mol·L⁻¹ 氢氧化钠 80 mL 和 95% 乙醇 100 mL 可有效的去除杂质,有利于含量测定,同时能够保证柴胡皂苷的回收率符合标准。

表 3 的结果显示,柴胡皂苷 a, b₁, b₂, h 在柴胡煎煮的过程中处于动态的变化过程。其中,柴胡皂苷 a 的含量下降,而柴胡皂苷 b₁, b₂, h 的含量上升。该现象的原因在于,柴胡皂苷 a 属于柴胡药材中含有的原生皂苷,其结构不稳定,在煎煮的过程中存在降解的现象,形成柴胡皂苷 b₁, 故前者含量下降,后者含量增加。同理,柴胡皂苷 b₂, h 分别为柴胡皂苷 d, c 的降解产物^[12]。

这种现象增大了柴胡相关配伍考察的难度,因为不易确定配伍前后的化学成分变化到底是配伍引起的,还是配伍前后煎煮时间的差异引起的。基于此,认为与柴胡相关的配伍研究需要有一种新的研

究模式与之相适应。本文的研究为该种新配伍研究模式的建立提供参考。

化学成分是疗效的物质基础。因此,本文所述的情况,还直接影响到柴胡相关药理作用和相关中成药质量,因为它们都与柴胡的煎煮过程有关。前者牵扯到样品的制备,后者牵扯到制药工艺前处理阶段煎煮提取的过程。而相关研究未见报道,有待进一步的研究。

[参考文献]

[1] 韩刚,郭肖菲,赵会新,等. 芒硝在中药组方中对大黄蒽醌类化合物溶出的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(1): 72.

[2] 卢林,吴君金,马强,等. UPLC 研究白虎汤不同配伍对芒果苷含量的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(9): 35.

[3] 陈建真,吕圭源,罗小敏,等. 配伍对黄芩汤中甘草酸溶出率的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2008, 14(5): 35.

[4] 李林,殷放宙,陆兔林,等. 莪术与三棱配伍前后姜黄素煎出率变化[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(13): 28.

[5] 史芳,李清,陈晓辉,等. 黄芩配伍知母后黄芩中主要黄酮类成分的含量变化[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(17): 84.

[6] Yukio Ogihara, Masaki Aburada. Sho-Saiko-To: Scientific evaluation and clinical applications [M]. Florida: CRC press, 2003: 126.

[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): 1840.

[8] 中国药典. 一部[S]. 2010: 263.

[9] 李芳,李建北,张东明. 柴胡的药理研究进展[J]. 时珍国医国药, 2004, 15(2): 120.

[10] 李军,姜华,石任兵,等. 四逆散不同配伍对柴胡皂苷 b₁, h 提取量的影响[J]. 中国中药杂志, 2008, 33(15): 1912.

[11] 王胜春,李晓玮,王俊琴. 反相高效液相色谱法测定柴胡及柴葛颗粒中柴胡皂苷 D 的含量[J]. 时珍国医国药, 2004, 15(5): 262.

[12] 刘密新,吴筑平,杨成对,等. 中药复方中柴胡皂甙 A 和 D 的 LC/MS/MS 研究[J]. 质谱学报, 2000, 21(3): 77.

[责任编辑 邹晓翠]