

# 生长期不同施肥方法对柴胡中 柴胡皂苷 a、d 含量的影响

刘伟\*, 郭蕾, 范婷, 董诚明, 陈志红  
(河南中医学院分析测试中心, 河南 郑州 450008)

[摘要] 目的:通过采用 HPLC-ELSD 法测定不同施肥柴胡中柴胡皂苷 a、d 的含量,为优选施肥方案提供一定的依据。方法:采用 HPLC-ELSD 法,色谱柱为 Agilent TC-C<sub>18</sub> (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 柱,以水-乙腈 (50: 50) 为流动相,检测器为蒸发光散射检测器,漂移管温度 93 ℃;空气流速 2.5 L · min<sup>-1</sup>;柱温 20 ℃。结果:确定了柴胡的施肥方案。结论:此方法简单、准确、重复性好,通过柴胡皂苷 a、d 的变化为优选柴胡施肥方法提供依据。

[关键词] 柴胡;不同施肥;柴胡皂苷 a;柴胡皂苷 d

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)01-0018-04

## Effect of Different Fertilizers on Content of Saikosaponin a、d in Radix Bupleuri

LIU Wei\*, GUO Lei, FAN Ting, DONG Cheng-ming, CHEN Zhi-hong

(Center of Analysis and Measurement, Henan College of TCM, Zhengzhou, 450008, China)

[Abstract] **Objective:** Determine the content of Saikosaponin a and d by HPLC-ELSD. To analyze different methods of fertilization of the programme as optimum Fertilization one of the targets. **Method:** The HPLC method was used, chromatography condition was: Agilent TC-C<sub>18</sub> (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) column, acetonitrile-water (50: 50) as mobile phase, detection is ELSD, drift temperature 93 ℃, air flow 2.5 L · min<sup>-1</sup>, column temperature 20 ℃. **Results:** Establishing the fertilizer programme of Radix Bupleuri. **Conclusion:** The method is accurate, simple, and can provide the basis for optimization method of fertilization scheme by changes of Saikosaponin a and d.

[Key words] Radix Bupleuri; different fertilizers; Saikosaponin a; Saikosaponin d

柴胡为伞形科植物柴胡 *Bupleurum chinense* DC. 的干燥根,具有和解表里、疏肝、升阳之功效,用于感冒发热、寒热往来等症。柴胡的供应长期以来依赖于野生资源,但过度的采挖、保护措施缺乏,导致柴胡野生资源严重匮乏,种植柴胡弥补了资源的不足,但在实施过程中存在许多急需解决的问题。如何提高种植柴胡的质量是目前有待研究的课题,特

别是栽培柴胡在不同生长期的施肥方法对其质量的影响也是柴胡 GAP 基地急需解决的难点。本研究采用 HPLC-ELSD 法建立了柴胡中柴胡皂苷 a、d 含量测定的分析方法。通过比较不同施肥柴胡中柴胡皂苷 a、d 含量的差别,来分析不同施肥对柴胡质量的影响,作为优选柴胡施肥方案的指标之一<sup>[1-5]</sup>。

### 1 仪器与试剂

DIONEX Summit 高效液相色谱仪(美国); Alltech 2000ES ELSD(美国); METTLER AE240 电子分析天平; BS210S 型电子天平(北京赛多利斯天平公司); KQ-500DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。对照品柴胡皂苷 a(批号:

[收稿日期] 2009-07-03

[基金项目] 国家“十一五”科技支撑计划项目 (2006BAI06A10-1)

[通讯作者] 刘伟, Tel: (0371) 65575838, E-mail: hnliuwei2088@sina.com

110777-200303, 中国药品生物制品检定所); 柴胡皂苷 d (批号: 111778-200402, 中国药品生物制品检定所); 乙腈为色谱纯; 水为双蒸水; 其余所用试剂均为分析纯。

柴胡样品种类: m1, m2, m4, m5, m6, m7, mk, mi1, mi2, mi3, mi4, mi5, mi6, mi7, b1, b2, b3, b4, b5, b6, b7, bk, bi1, bi2, bi3, bi4, bi5, bi6, bi7, s1, s2, s3, s4, s5, s6, s7, sk, si1, si2, si3, si4, si5, si6, si7 注: 苗期用 m 表示, 苗期重复施肥用 mi 表示; 拔节期用 b 表示, 拔节期重复施肥用 bi 表示; 3 期(苗期、拔节期、花期)同施用 s 表示, 3 期重复施肥用 si 表示; 1, 2, 3... 分别代表施肥种类: N、P、K、NP、NK、PK、NPK; k 为空白对照。试验所用柴胡样品采自于河南省洛阳市嵩县顺势药业柴胡种植基地。所用柴胡样品按上述不同施肥方法种植一年后采集, 供含量测定用。样品经河南中医学院药学院董诚明教授鉴定为柴胡 *Bupleurum chinense* DC. 的干燥根。

## 2 色谱条件

色谱柱: Agilent TC-C<sub>18</sub> (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 柱温: 20 °C; 漂移管温度: 93 °C; 空气流速: 2.5 L · min<sup>-1</sup>; 流速: 0.8 mL · min<sup>-1</sup>; 流动相: 乙腈-水 (50: 50)。

## 3 溶液制备

**3.1 供试品溶液** 取各柴胡干燥样品, 粉碎, 过 40 目筛, 分别取各样品粉末约 1 g, 精密称定, 精密加入 5% 氨水甲醇溶液 30 mL, 称重, 回流 1 h (80 °C 水浴), 提取完毕后取出放置至室温, 称定并补足重量, 混匀, 精密取续滤液 15 mL, 蒸干 (80 °C 水浴), 加甲醇定容至 5 mL, 过微孔滤膜 (0.45 μm), 即得供试品溶液。

**3.2 对照品溶液** 精密称取柴胡皂苷 a 19.01 mg、柴胡皂苷 d 19.03 mg 分别置于 25 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并定容至刻度, 摇匀, 即得。

## 4 方法学考察

**4.1 线性范围试验** 分别精密量取“3.2”项下柴胡皂苷 a 对照品溶液 1, 2, 4, 6, 8 mL, 用甲醇定容至 10 mL, 混匀即得浓度分别为 0.076, 0.152, 0.304, 0.456, 0.608 mg · mL<sup>-1</sup> 的柴胡皂苷 a 对照品溶液; 再分别精密移取“3.2”项下柴胡皂苷 d 对照品溶液 1, 2, 3, 4, 5 mL, 用甲醇定容至 5 mL, 混匀即得浓度分别为 0.152, 0.304, 0.456, 0.608, 0.76 mg · mL<sup>-1</sup> 的柴胡皂苷 d 对照品溶液。按上述色谱条件各进样

10 μL, 以峰面积的自然对数为纵坐标, 柴胡皂苷 a (d) 量的自然对数为横坐标, 绘制标准曲线, 柴胡皂苷 a 在 0.76 ~ 6.08 μg 范围内呈良好线性关系, 回归方程:  $Y = 1.4291X + 0.9964$ ,  $r = 0.9999$ ; 柴胡皂苷 d 在 1.52 ~ 7.6 μg 范围内呈良好线性关系, 回归方程:  $Y = 1.4240X + 0.6848$ ,  $r = 0.9999$ 。色谱图见图 1 ~ 3。

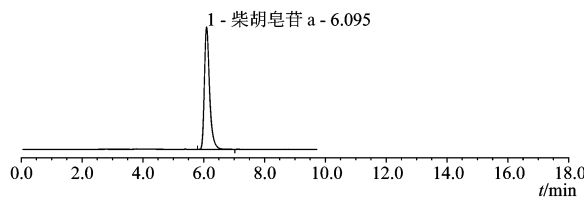


图1 柴胡皂苷 a HPLC 图

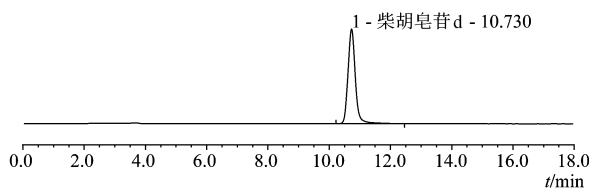


图2 柴胡皂苷 d HPLC 图

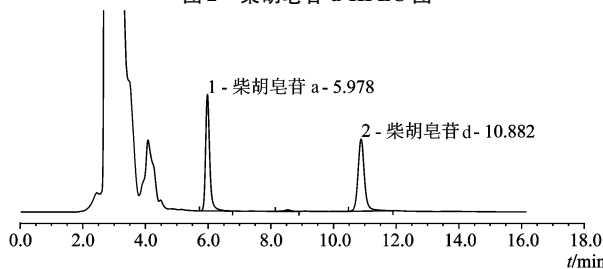


图3 柴胡样品 HPLC 图

**4.2 精密度试验** 精密吸取对照品溶液 10 μL, 按上述色谱条件连续进样 6 次, 测定峰面积, 结果柴胡皂苷 a、d 的 RSD 分别为 1.64%、1.98%。

**4.3 重复性试验** 精密称取柴胡样品 (ml) 6 份, 按含量测定方法及色谱条件进行测定, 结果柴胡皂苷 a、d 的 RSD 分别为 1.84%、1.94%, 表明本方法重复性良好。

**4.4 稳定性试验** 取柴胡样品 (ml) 溶液, 按“2”项下分别于 0, 2, 4, 6, 8, 12 h 测定, 结果柴胡皂苷 a、d 的 RSD 分别为 1.26%、1.13%, 表明样品在 12 h 内稳定。

**4.5 加样回收率试验** 取已知柴胡皂苷 a、d 含量的样品 6 份 (取 0.5 g 并精密称定), 精密加入柴胡皂苷 a、d 对照品适量, 按供试品制备项下制备并按上述色谱条件进行测定, 计算回收率, 结果见表 1。

## 5 样品测定

**5.1** 分别精密吸取供试品溶液 6 μL, 柴胡皂苷 a

5、20 μL、柴胡皂苷 d 5、25 μL 进样,外标两点法测定各样品中柴胡皂苷 a、d 的含量,结果见表 2。

表 1 回收率试验 (n = 6)

编号	样品值 (mg)	加入量 (mg)	测定值 (mg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
a1	3.118	3.001	6.017 9	96.63	98.27	1.89
2	3.119	3.001	5.988 9	95.63		
3	3.117	3.001	6.110 5	99.75		
4	3.119	3.001	6.137 1	100.57		
5	3.119	3.001	6.071 4	98.38		
6	3.118	3.001	6.077 9	98.63		
d1	4.945	5.009	10.021 6	101.35	98.74	1.8
2	4.947	5.009	9.891 9	98.72		
3	4.944	5.009	9.900 9	98.96		
4	4.946	5.009	9.758 6	96.08		
5	4.947	5.009	9.937 5	99.63		
6	4.945	5.009	9.840 3	97.73		

表 2 不同施肥方法柴胡中柴胡皂苷 a、d 的含量 (%)

编号	a	d	编号	a	d
m1	0.504 5	0.657 1	bi1	0.401 0	0.567 2
m2	0.470 4	0.758 6	bi2	0.510 3	0.723 2
m4	0.591 1	0.911 3	bi3	0.409 7	0.563 2
m5	0.523 6	0.691 1	bi4	0.341 5	0.404 5
m6	0.683 5	0.926 6	bi5	0.419 2	0.677 3
m7	0.746 3	1.069 8	bi6	0.443 4	0.558 3
mk	0.420 2	0.642 8	bi7	0.343 7	0.450 1
mi1	0.406 2	0.629 1	s1	0.674 7	1.067 9
mi2	0.450 2	0.643 3	s2	0.587 7	0.939 3
mi3	0.498 2	0.738 0	s3	0.522 5	1.000 7
mi4	0.467 3	0.760 4	s4	0.663 7	1.398 1
mi5	0.654 0	0.982 2	s5	0.563 0	1.255 0
mi6	0.380 8	0.549 9	s6	0.521 2	0.9549
mi7	0.632 3	0.905 7	s7	0.638 6	1.223 6
b1	0.326 7	0.476 7	sk	0.321 8	0.636 2
b2	0.332 2	0.479 1	si1	0.383 9	0.753 8
b3	0.372 1	0.580 8	si2	0.481 3	1.009 6
b4	0.281 1	0.376 9	si3	0.414 9	0.869 4
b5	0.174 3	0.262 4	si4	0.463 9	0.980 2
b6	0.264 3	0.374 6	si5	0.321 8	0.619 9
b7	0.383 7	0.609 0	si6	0.455 1	0.979 9
bk	0.354 7	0.489 7	si7	0.434 9	0.892 1

5.2 选取不同生长期柴胡中柴胡皂苷 a、d 含量最高点组成不同施肥方法含量对比趋势图见图 4、5。

## 6 讨论

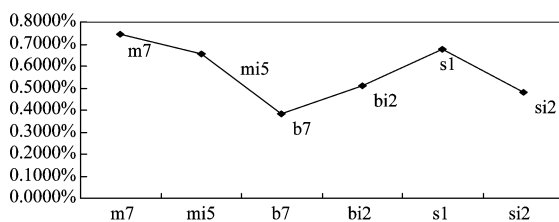


图 4 不同生长时期柴胡皂苷 a 含量最高施肥方案对比图

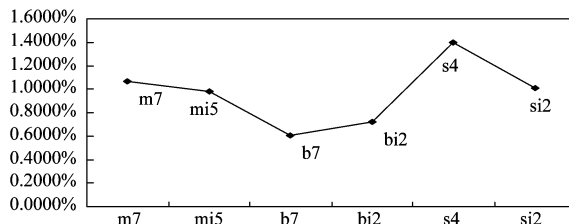


图 5 不同生长时期柴胡皂苷 d 含量最高施肥方案对比图

6.1 流动相的选择 曾采用甲醇-水作为流动相,但是不能满足柴胡皂苷 a、d 分离度的要求,后换用乙腈-水,发现乙腈-水 (50: 50) 时分离度达到要求且保留时间合适。

6.2 分离方法的选择 本试验采用回流提取的样品直接进行液相分析,并未经萃取、过大孔吸附树脂,操作简便,有效成分损失少,回收率较高。采用上述流动相进行洗脱分离,在图谱上并未见干扰组分,选择性好。

6.3 从图 4、5 中可以看出 柴胡皂苷 a、d 在不同生长时期的含量最高点基本一致,只有在 3 期的时候有所不同。据此可以推断不同施肥对柴胡皂苷 a、d 含量的影响基本上具有同向促进作用。

苗期和 3 期施一次肥的柴胡样品的柴胡皂苷 a、d 含量比施两次肥的高,由此可知,施肥次数多并不能提高柴胡皂苷 a、d 的含量;拔节期施肥的柴胡皂苷 a、d 含量均明显低于苗期和 3 期。由此推断,在柴胡生长的苗期必须给足养分,如果错过这个时期再进行养分补充,柴胡皂苷 a、d 的含量均比较低。

结合图 4、5 和表 2 可知:在 44 批样品中,柴胡样品 m7 和 s4 的柴胡皂苷 a、d 的含量明显高于其他样品,说明苗期施 N、P、K 肥和 3 期施 N、P 肥均能有效提高柴胡皂苷 a、d 的含量,但后者成本较高。

综上所述,以柴胡皂苷 a、d 为指标,考虑经济成

本因素,在柴胡生长过程中苗期施一次 N、P、K 肥,即能有效提高柴胡质量。

### [参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 一部,北京:化学工业出版社,2005:198.
- [2] 宋宏刚,许红辉,裴彩云,等. 高效液相色谱—蒸发光散射法测定柴胡中柴胡皂苷 a 及柴胡皂苷 d 的含量[J]. 时珍国医国药,2006,17(10):1963-1964.

- [3] 王 鹏,贾凌云,孙启时,等. 不同产地柴胡中柴胡皂苷的含量测定[J]. 沈阳药科大学学报,2004,21(3):193-195.
- [4] 胡 迪,胡 克. 高效液相色谱—蒸发光散射检测法测定护肝胶囊中柴胡皂苷 a 的含量[J]. 湖北中医杂志,2006,28(11):53-54.
- [5] 林东昊,茅仁刚. HPLC 测定不同产地北柴胡中的柴胡皂苷 a、c、d[J]. 中成药,2002,24(5):382-384.