

黑柴胡质量标准

刘来正, 冀小君, 徐丽霞, 张妤, 张府君, 李德成, 壑榜琴*

(山西药科职业学院, 太原 030031)

[摘要] 目的: 修订和提高黑柴胡药材的质量标准。方法: 采用生药学研究考察不同黑柴胡药材的横切面显微特征和粉末特征, 依据 2010 年版《中国药典》附录药品标准研究方法对 10 批黑柴胡药材的水分、总灰分、酸不溶性灰分和浸出物进行检查, 并测定活性成分含量。结果: 修订了黑柴胡药材的性状特征和显微特征; 建立了 TLC 鉴别黑柴胡的方法; 黑柴胡的水分限度 $\leq 10.0\%$, 总灰分 $\leq 9.0\%$, 酸不溶性灰分 $\leq 3.1\%$, 浸出物的含量 $\geq 15\%$, 柴胡皂苷 a 和 d 的总质量分数 $\geq 0.2\%$ 。结论: 完善了黑柴胡药材的质量标准, 可作为该药材的修订内容。

[关键词] 黑柴胡; 小叶黑柴胡; 柴胡皂苷 a; 柴胡皂苷 d; 总灰分

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)09-0105-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014090105

Quality Standards of Bupleuri Smithii Radix

LIU Lai-zheng, JI Xiao-jun, XU Li-xia, ZHANG Yu, ZHANG Fu-jun, LI De-cheng, YA Bang-qin*

(Shanxi Pharmaceutical Vocational College, Taiyuan 030031, China)

[Abstract] **Objective:** To revise and improve quality standards of Bupleuri Smithii Radix. **Method:** Cross-section microscopic characteristics and powder characteristics of Bupleuri Smithii Radix were investigated by pharmacognosy study. According to drug standard methods in appendix of 2010 edition of 'Chinese Pharmacopoeia', moisture, total ash, acid-insoluble ash, alcohol-soluble extractives and contents of bioactive constituents in ten batches of Bupleuri Smithii Radix were determined. **Result:** Properties and microscopic characteristics of Bupleuri Smithii Radix were revised, and its TLC identification method was established; Moisture limit of Bupleuri Smithii Radix was $\leq 10.0\%$, total ash limit was $\leq 9.0\%$, acid insoluble ash limit was $\leq 3.1\%$, alcohol-soluble extractive limit was $\geq 15\%$, total mass fraction limit of saikosaponin-a and saikosaponin-d was $\geq 0.2\%$. **Conclusion:** Quality standards of Bupleuri Smithii Radix was improved, it could be used revision of this Chinese materia medica.

[Key words] *Bupleurum smithii*; *B. smithii* wolff var. *parvifolium* Shan et Y. Li; saikosaponina; saikosaponind; total ash

黑柴胡在山西、甘肃、宁夏、青海等地习惯作柴胡收购、销售和应用, 文献均以柴胡为名收载黑柴胡, 供临床入药使用^[1-3]。1977 年版《中国药典》一部收载“柴胡”项下来源描述如下: 本品为伞形科植

物柴胡 *Bupleurum chinensis* DC.、狭叶柴胡 *Bupleurum scorzonifolium* Willd. 或同属数种植物的干燥根^[4]。柴胡具有解表和里、疏肝解郁、升提中气之功效, 始载于《神农本草经》, 列为上品^[5]。根据文献记载和实地调查, 柴胡属植物绝大多数种类在产地均作柴胡药用^[3], 黑柴胡 1987 年已被《山西省中药材标准》收载。本品含有皂苷、挥发油、木脂素等成分^[6], 其中柴胡总皂苷、柴胡皂苷 a 和 d 已被证实具有解热、镇痛、抗炎、免疫调节、抗肝损伤、抗肝纤维化等药理活性^[7-9]。本实验对分布于山西境内和流通于山西医药市场的 10 批黑柴胡药材进行

[收稿日期] 20130813(017)

[基金项目] 山西省中药材地方标准研究编制专项 (2011019A)

[第一作者] 刘来正, 副教授, 从事资源开发与品质鉴定研究, Tel: 0351-7820668, E-mail: laizhengliu@163.com

[通讯作者] * 壑榜琴, 教授, 从事中药鉴定与药用植物栽培研究, Tel: 0351-7820668, E-mail: bangqin58@163.com

来源、性状、显微、薄层鉴别,并对其水分、总灰分、酸不溶性灰分、浸出物、活性成分含量等进行测定,为该药材质量标准提高和修订提供参考。

1 材料

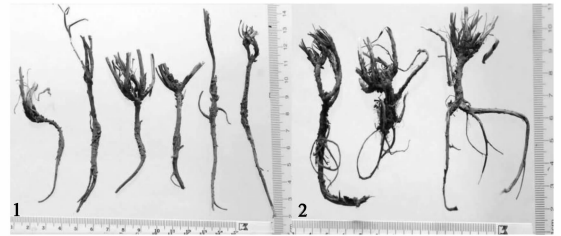
LC-2010型高效液相色谱仪(日本岛津), Inertsil C₁₈色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm, 天津谱祥科技有限公司), 2695型高效液相色谱仪(美国Waters公司), Diamonsil C₁₈(2)色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm, 北京迪马科技有限公司), Venusil ASB C₁₈色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm, 杭州赛析科技有限公司), DMBA300-C型Motic教师300万像素数码一体化显微镜系统(Motic Digital Class 2.0型系统控制软件, 麦克奥迪), YD-1508B型轮转式石蜡切片机(浙江金华益迪医疗设备厂), QE-100g型二两装高速中药粉碎机(武汉市屹立工具有限公司), KFBW2型电子天平(浙江凯丰集团有限公司), 92SM-202A-DR-SCS型1/万和XR125SM型1/10万电子天平(瑞士Precisa公司), WHF-203型紫外分析仪(上海精科实业有限公司), ZRD-5055型鼓风干燥箱(上海智城分析仪器制造有限公司)。

薄层层析硅胶G(青岛基亿达硅胶试剂厂, 青岛海洋化工厂分厂), FAA固定液(70%乙醇-甲醛-36%乙酸=90:5:5, 自制), 乙酸乙酯(天津市科密欧化学试剂有限公司), 石油醚(60~90℃, 北京化工厂), 柴胡皂苷a和d对照品(中国食品药品检定研究院, 批号分别为110777-200406, 110778-200505), 黑柴胡对照药材(批号N₃120816, 山西省药品检验所), 乙腈为色谱纯, 水为哇哈哈饮用纯净水。10批黑柴胡样品的编号(来源)分别为Hch01(山阴县), Hch02(中条山舜王坪), Hch03(芦芽山荷叶坪), Hch04(芦芽山黄草梁界), Hch05(芦芽山冰口洼), Hch06(管岑山秋千沟大梁), Hch07(宁武县麻地沟), Hch08(五台山鸿门岩), Hch09(灵丘县刁村空中草原), Hch10(岢岚县小涧村), 经本院捱榜琴教授鉴定, Hch01和Hch03~Hch09为黑柴胡 *Bupleurum smithii* Wolff, Hch02和Hch10为小叶黑柴胡 *B. smithii* Wolff var. *parvifolium* Shan et Y. Li, 全部样品干燥根均符合1987年版《山西省中药材标准》黑柴胡[性状]规定。

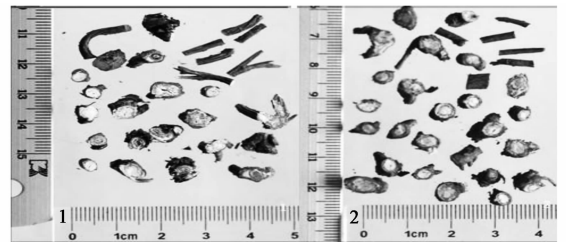
2 方法与结果

2.1 性状 呈长圆锥形或圆柱形至长圆锥形, 多弯曲, 有的具分枝, 长5~10(~17)cm, 直径0.2~0.8cm。表面黑褐色, 粗糙, 具突起的支根痕, 皮孔不明显。根头部增粗, 多具2~5分枝的根茎, 顶端有残

留的茎基及叶基, 有的叶基呈淡紫色; 多数下侧具两行呈疣状突起的不定芽。质较松脆, 易折断, 断面略平坦, 有的显片状纤维性, 皮部浅棕色, 木部淡黄色, 呈放射状, 皮部和木部均具裂隙。气微香, 味微苦辛, 见图1, 2。



1. 黑柴胡; 2. 小叶黑柴胡
图1 黑柴胡药材性状



1. 黑柴胡; 2. 小叶黑柴胡
图2 黑柴胡饮片性状

2.2 显微鉴别

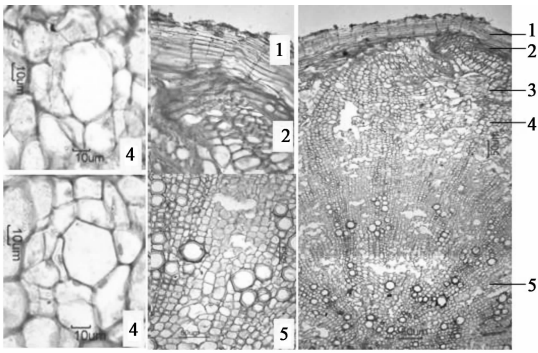
2.2.1 石蜡切片 采集新鲜的根用FAA液固定, 用不同体积分数乙醇和二甲苯脱水, 浸腊, 包埋, 切片, 黏片, 脱蜡, 染色, 脱色, 封片观察。

2.2.2 徒手切片 取根切片, 水合氯醛加热透化, 间苯三酚和浓盐酸染色, 稀甘油封片。

2.2.3 粉末制片 样品置80℃下烘干15min, 铜冲钵粉碎, 过4号筛。每批样品用斯氏液装片, 观察淀粉粒的情况, 加水合氯醛试液, 经酒精灯加热透化, 稀甘油封片, 观察其他特征。

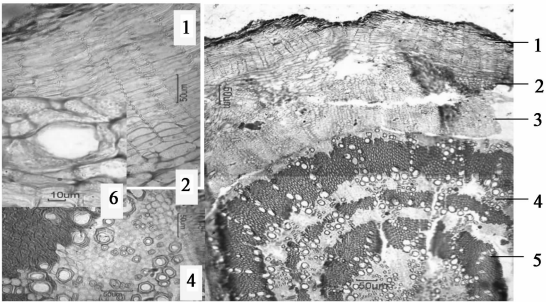
2.2.4 横切面显微特征 木栓层为(6)10~40余列细胞; 木栓细胞扁平, 长径约为短径4倍。木栓层内侧为3~5(7)层切向延长的薄壁细胞, 有油管5~10(12)个, 断续排列成一环, 油管周围分泌细胞4~9个。韧皮部较窄, 其中分泌组织较多, 排列成2~5层, 内含黄色油状物。形成层成环或不明显。木质部束放射状排列, 常现裂隙, 大型导管常3~5个相聚, 木纤维群多分布于木质部外侧, 散在或断续排列成1~3环, 结果见图3, 4。

2.2.5 粉末特征 黑柴胡粉末棕黄色。木栓细胞黄棕色, 表面观长方形或类方形, 长28~82 μm, 宽16~51 μm。导管多见网纹、双螺紋和孔纹, 直径



1. 木栓层;2. 皮层;3. 韧皮部;4. 油室;5. 木质部

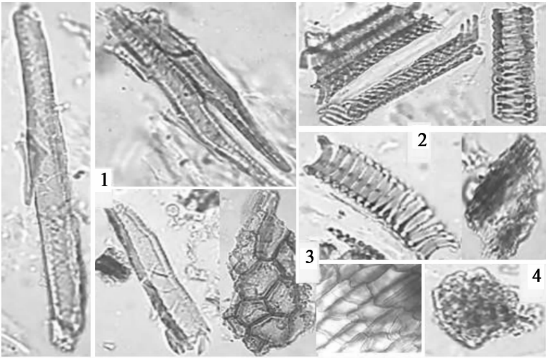
图3 黑柴胡横切面



1. 木栓层;2. 皮层;3. 韧皮部;4. 木质部;5. 纤维层;6. 油室

图4 小叶黑柴胡横切面

8~52 μm。木纤维多呈束,少分散,直径11~25 μm,壁厚5~10 μm。分泌物黄棕色,不规则形,见图5。

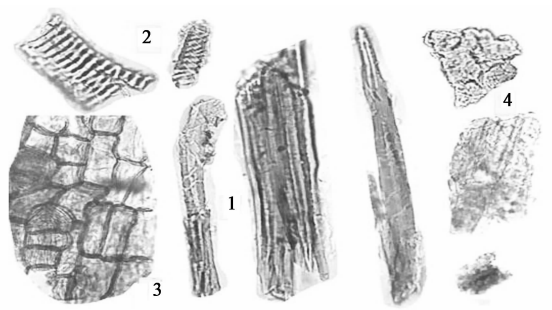


1. 纤维;2. 导管;3. 木栓细胞;4. 分泌物

图5 黑柴胡粉末(×400)

小叶黑柴胡粉末棕黄色。木栓细胞黄棕色,表面观长方形或类方形,长35~86 μm,宽17~57 μm。导管多见网纹、双螺纹和孔纹,直径8~54 μm。木纤维多呈束,少分散,直径12~24 μm,壁厚5~9 μm。分泌物黄棕色,不规则形,见图6。

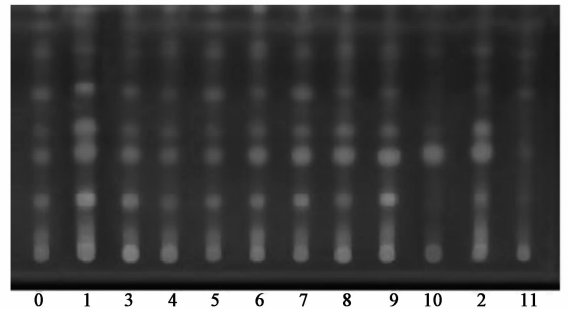
2.3 TLC 鉴别 分别称取10批黑柴胡药材粉末和北柴胡(易混淆品)药材粉末各0.5 g,加甲醇20 mL超声处理10 min,滤过,滤液浓缩至5 mL,作为供试品溶液。另取黑柴胡对照品药材0.5 g,同法制成对



1. 纤维;2. 导管;3. 木栓细胞;4. 分泌物

图6 小叶黑柴胡粉末(×400)

照药材溶液。照2010年版《中国药典》一部附录VI B的TLC试验,吸取上述2种溶液各5 μL,分别点于同一硅胶G薄层板上,以石油醚-乙酸乙酯(9:6)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,于60℃加热至斑点显色清晰,分别置日光和紫外光灯(365 nm)下检视,结果显示供试品色谱中,在与对照药材色谱相应的位置上,显相同颜色的斑点或荧光斑点,而北柴胡与黑柴胡的斑点或荧光斑点亮度均有所不同,见图7。



0. 对照药材;1,3~9. 黑柴胡;2,10. 小叶黑柴胡;11. 北柴胡

图7 黑柴胡 TLC(365 nm)

2.4 水分 按水分检查法(《中国药典》2010年版一部附录IX H 第一法)测定,结果10批样品中水分含量5.51%~7.54%,剔除异常值(2.34%),以最大值(7.54%)上浮20%设为水分测定上限(9.05%),暂定黑柴胡水分的限度为≤10.0%。

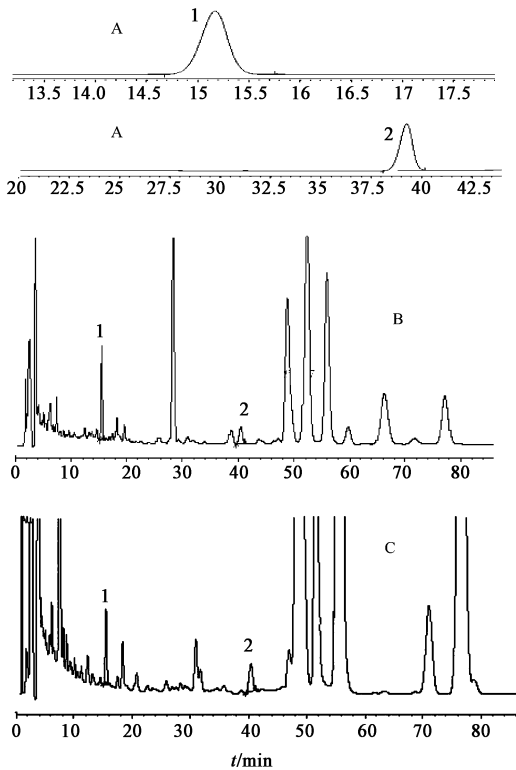
2.5 灰分 照总灰分测定法和酸不溶性灰分测定法(《中国药典》2010年版一部附录IX K)试验,结果10批样品总灰分含量5.2%~7.9%,以最大值(7.9%)上浮10%设为总灰分测定上限(8.69%),即黑柴胡总灰分限度为≤9.0%;酸不溶性灰分含量0.9%~2.8%,以最大值(2.8%)上浮10%设为杂质测定上限(3.08%),即黑柴胡酸不溶性灰分限度为≤3.1%。

2.6 浸出物 按《中国药典》2010年版一部(附录

X A 第二法)醇溶性浸出物测定法项下的热浸法,结果 10 批黑柴胡中浸出物含量 17.08% ~ 25.15%,以最低测定值的下浮 10% 设定下限,即 15.37%,故暂规定本品醇溶性浸出物 $\geq 15.0\%$ 。

2.7 含量测定

2.7.1 色谱条件与系统适用性试验^[10-11] 用十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂,流动相乙腈-水(38:62),流速 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$,检测波长 210 nm,进样量 $10 \mu\text{L}$ 。结果显示色谱峰分离度佳,柴胡皂苷 a 和 d 理论塔板数均 $> 10\,000$,见图 8。



A. 对照品; B. 黑柴胡; C. 小叶黑柴胡;
1. 柴胡皂苷 a; 2. 柴胡皂苷 d

图 8 黑柴胡提取液 HPLC

2.7.2 对照品溶液的制备 精密称取柴胡皂苷 a 和 d 对照品适量,加甲醇制成质量浓度分别为 $0.4, 0.3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的溶液,摇匀,即得。

2.7.3 供试品溶液的制备 精密称取本品粉末(过 4 号筛)约 1.0 g ,置具塞锥形瓶中,加入含 5% 浓氨试液的甲醇溶液 50 mL ,密塞,称定质量,于 $30 \text{ }^\circ\text{C}$ 水温超声处理($200 \text{ W}, 40 \text{ kHz}$) 30 min ,冷却至室温,称定质量,加甲醇补足缺失的质量,滤过,精密量取续滤液 25 mL 蒸干,残渣加水 20 mL 溶解,转移至分液漏斗中,用水饱和的正丁醇溶液提取 4 次,每次 20 mL ,合并正丁醇液,加氨试液充分洗涤 3 次,每次 20 mL ,将正丁醇液蒸干,残渣加甲醇使溶解,

转移至 5 mL 量瓶中,加甲醇定容至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.7.4 线性范围考察 精密称取柴胡皂苷 a 对照品配成质量浓度分别为 $0.0425, 0.1275, 0.2125, 0.2975, 0.4250, 0.6375 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的系列溶液,柴胡皂苷 d 对照品制成质量浓度分别为 $0.0130, 0.0195, 0.0325, 0.0650, 0.1625, 0.3205 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的系列溶液,按 2.7.1 项下色谱条件平行进样 2 次,以进样量为横坐标,峰面积为纵坐标,得回归方程分别为 $Y = 342\,544X - 4\,443.5$ ($r = 0.9999$), $Y = 402\,338X - 2\,670.1$ ($r = 0.9999$),线性范围依次为 $0.425 \sim 6.375, 0.130 \sim 3.25 \mu\text{g}$ 。

2.7.5 精密度试验 取同一供试品溶液,按 2.7.1 项下色谱条件重复进样 6 次,结果柴胡皂苷 a 和 d 峰面积的 RSD 分别为 $0.69\%, 1.2\%$,表明仪器精密度良好。

2.7.6 稳定性考察 取同一供试品溶液,分别于制备后 $0, 1.5, 3, 4.5, 6, 7.5, 24 \text{ h}$ 按 2.7.1 项下色谱条件测定,结果柴胡皂苷 a 和 d 峰面积的 RSD 分别为 $0.64\%, 1.11\%$,表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.7.7 重复性试验 精密称取同一批样品 6 份,按 2.7.3 项下方法制备供试品溶液,按 2.7.1 项下色谱条件测定,结果发现柴胡皂苷 a 和 d 峰面积的 RSD 分别为 $1.40\%, 1.48\%$,表明该方法重复性良好。

2.7.8 加样回收率试验 精密称取已知含量的样品 6 份,每份 0.5 g ,精密加入柴胡皂苷 a 和 d 对照品溶液适量,按 2.7.3 项下方法制备供试品溶液,按 2.7.1 项下色谱条件测定,计算柴胡皂苷 a 和 d 平均回收率分别为 96.66% (RSD 1.11%), 96.20% (RSD 0.78%),表明该方法准确度良好。

2.7.9 专属性试验 取黑柴胡药材,按 2.7.3 项下方法制备供试品溶液并按 2.7.1 项下色谱条件测定,以二极管阵列检测器对柴胡皂苷 a 和 d 色谱峰进行单一性验证,结果表明样品与对照品目标峰纯度一致。

2.7.10 耐用性试验 在相同试验条件下使用岛津 LC-2010 型高效液相色谱仪和 Waters2695 型高效液相色谱仪, Diamonsil C_{18} (2) 和 Venusil ASB C_{18} 色谱柱,对同样品进行分析,结果表明采用不同高效液相色谱仪和色谱柱在室温或 $25 \text{ }^\circ\text{C}$ 下对同样品进行测定时,目标峰出峰顺序一致,重复性较好,说明该方法耐用性较好。

2.7.11 样品测定 分别称取 10 批黑柴胡样品适量,按 2.7.3 项下方法制备供试品溶液,按 2.7.1 项下色谱条件测定,结果柴胡皂苷 a 和 d 的总质量分数 0.115 7% ~ 0.444 2%,见表 1,表明不同产地样品中含柴胡皂苷 a 和 d 的总量差异较大。

表 1 10 批黑柴胡样品的含量测定($n=2$)

| No. | 取样量/g | 柴胡皂苷 a 质量分数/% | 柴胡皂苷 d 质量分数/% |
|-------|---------|------------------|------------------|
| Hch01 | 1.001 2 | 0.156 1 | 0.129 6 |
| Hch02 | 1.000 5 | 0.217 6 | 0.226 8 |
| Hch03 | 1.001 2 | 0.205 7 | 0.102 8 |
| Hch04 | 1.003 5 | 0.239 3 | 0.095 0 |
| Hch05 | 1.001 7 | 0.165 9 | 0.063 5 |
| Hch06 | 1.001 5 | 0.206 9 | 0.056 1 |
| Hch07 | 1.001 6 | 0.253 9 | 0.089 0 |
| Hch08 | 1.001 0 | 0.098 6 | 0.017 1 |
| Hch09 | 1.001 1 | 0.090 6 | 0.158 5 |
| Hch10 | 1.000 4 | 0.061 9 | 0.138 4 |

3 讨论

通过实地采集调查研究,山西省黑柴胡药材以植物黑柴胡 *B. smithii* Wolff 为主,而非文献记载的以植物小叶黑柴胡 *B. smithii* Wolff var. *parvifolium* Shan et Y. Li 为主^[12];《山西省植物志》未记载小叶黑柴胡,《中国植物志》在产地中亦无记载山西省^[13],但实地采集发现在山西省中条山黄姑曼、舜王坪、芦芽山荷叶坪、岢岚县、五寨县均有小叶黑柴胡分布。

黑柴胡药材易与 2010 年版《中国药典》记载的柴胡品种北柴胡相混淆,主要性状区别为黑柴胡根较松脆,易折断,根头部增粗,多具 2 ~ 5 分枝的根茎,顶端有残留的茎基及叶基,而北柴胡根质硬而韧,不易折断,根头部一般没有分枝的根茎。

黑柴胡药材横切面与 2010 年版《中国药典》记载的北柴胡主要区别为黑柴胡木质部约占断面直径的 1/2 ~ 2/3,纤维较少,多分布于木质部外侧,沿形成层内侧排成稀疏一环或略呈 1 ~ 3(4) 间断的环;北柴胡木质部约占断面的 2/3 以上,纤维发达,与木薄壁细胞排成多个几乎连续的环层。文献记载小叶黑柴胡横切面木纤维排成 1 ~ 2 环^[6],但经大量切片观察研究发现,小叶黑柴胡横切面木纤维多排成 1 ~ 3 环,个别亦有略呈 4 环的。

TLC 鉴别的影响因素包括有效成分的提取、层

析板的种类、展开系统的组成、显色剂等。结果发现采用石油醚-乙酸乙酯(9:6)为展开剂,点样量 5 μ L,显色方法为喷以 2% 对二甲氨基苯甲醛的 40% 硫酸溶液,于 60 $^{\circ}$ C 加热 3 min 后,置紫外光灯(365 nm)下检视,斑点显色清晰。在与对照药材色谱相应的位置上,供试品显相同颜色的荧光斑点,不同种的北柴胡则不完全相同。

在文献检索分析基础上,含量测定采用高效液相色谱法,参照 2010 年版《中国药典》中柴胡供试品溶液的制备方法进行提取,并在此基础上进行纯化处理,结果显示在保证提取完全的基础上,经纯化后更有利于分析。通过比较不同的等度和梯度流动相比比例,最终选择乙腈-水(38:62)等梯度作为含量测定方法。

[参考文献]

- [1] 山西省卫生厅. 山西省中药材标准[S]. 太原:山西省卫生厅,1987:59.
- [2] 王有志,张亚云. 中药柴胡的物种调查和鉴定[J]. 中国药学杂志,1994,29(1):16.
- [3] 潘胜利. 中药柴胡的药源调查及商品鉴定(1)[J]. 中药材,1996,19(5):231.
- [4] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:人民卫生出版社,1977:477.
- [5] 黄奭(清). 神农本草经[M]. 北京:中医古籍出版社,1982:43.
- [6] 潘胜利,顺庆生,柏巧明,等. 中国药用柴胡原色图志[M]. 上海:上海科学技术文献出版社,2002:26.
- [7] 朱兰香,刘世增,顾振纶. 柴胡皂苷的药理作用及抗肝纤维化的应用[J]. 中草药,2002,33(10):附 5.
- [8] 黄幼异,黄伟,孙蓉. 柴胡皂苷对肝脏的药理毒理作用研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(17):298.
- [9] 卫冰,李晓坤,杨云,等. 北柴胡正丁醇部位保肝作用及其化学成分特征初步研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(19):141.
- [10] 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.
- [11] 甘肃省食品药品监督管理局. 甘肃省中药材标准[S]. 兰州:甘肃文化出版社,2009:129.
- [12] 徐国钧,徐璐珊,王峥涛. 常用中药材品种整理和质量研究. 南方协作组第 3 册[M]. 福州:福建科学技术出版社,2002:6.
- [13] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志. 第 55 卷第 1 分册[M]. 北京:科学出版社,1979:232.

[责任编辑 刘德文]