

冀南道地药材北柴胡 HPLC 特征图谱研究

张洪峰¹ 陈 晨¹ 王朝宗¹ 张 凯² 刘燕娟¹

(1.邯郸市中心医院药学部,河北邯郸 056001; 2.河北医科大学第二医院药学部,河北石家庄 050000)

摘 要 目的:建立冀南道地药材北柴胡的 HPLC 特征图谱,并与其他产地柴胡药材特征相比较,为科学评价与控制冀南道地药材柴胡质量提供新方法。方法:采用 HPLC 法测定冀南柴胡及其他不同来源的柴胡样品,得到 HPLC 色谱图,通过中药色谱指纹图谱相似度评价系统分析处理,构建冀南柴胡的 HPLC 特征图谱。其他产地柴胡与冀南柴胡进行相似度比较。结果:建立了冀南柴胡 HPLC-特征图谱。不同产地柴胡 HPLC-特征图谱比较发现,冀南柴胡与山西平顺县、黎城县所产柴胡相似度较接近,与甘肃产柴胡差别较大。结论:冀南柴胡作为河北道地药材,与其他产地柴胡有一定的区别,冀南柴胡特征图谱的建立,为全面控制冀南柴胡药材的质量提供了一种可靠的方法。

关键词 冀南柴胡 柴胡皂苷 特征图谱 高效液相色谱 道地药材

中图分类号 R282.71 **文献标志码** A **文章编号** 1672-397X(2017)02-0063-04

柴胡始载于《神农本草经》,为常用中药材,也是河北大宗道地药材之一,具有疏散退热、疏肝解郁、升举阳气之功效,主要用于感冒发热,寒热往

来,胸胁胀痛,月经不调,子宫脱垂,脱肛^[1]。《中国药典》(2015 年版)规定柴胡来源为伞形科植物柴胡 *Bupleurum chinense* DC.或狭叶柴胡 *Bupleurum*

甾体抗炎药镇痛,病情未能缓解。查体:双侧“4”字试验阳性,血沉:102mm/h,RF 阴性,CRP:68.20mg/L,HLA-B27 阳性,CT 示:双侧骶髂关节炎改变(双侧Ⅱ级)。四诊合参,中医诊断:大傺。属肾虚督空,痰瘀阻络证。西医诊断:强直性脊柱炎。治法:补肾强督,化痰祛瘀通络。药用强脊通络方加减。处方:

淫羊藿 20g,当归 10g,白芍 30g,川牛膝 10g,骨碎补 30g,橘络 10g,威灵仙 20g,蜈蚣 3 条,全蝎 5g,雷公藤 10g,甘草 6g。常法煎服。

二诊:口服上药 1 周腰背僵痛渐有缓解。2 周后已能弯腰,平抬手臂,手指关节肿痛亦减轻,但因天气骤变,周身疼痛有所加重,前方去骨碎补加麻黄 10g、桂枝 10g、防风 12g。

三诊:患者诉药后微微汗出,周身疼痛已消,后去麻黄、桂枝、防风,加入生熟地(各)15g,桃仁 10g 继服。3 月后,复查血沉:26mm/h,其他各项生化指标正常,继服中药巩固治疗,追诊至今,病情未见反复,骶髂关节 CT 复查病变无进展。

按语:患者以“腰背关节痛 1 年,加重 2 月”为主诉,四诊合参,辨证为肾虚督空,痰瘀阻络证,治拟补肾强督,化痰祛瘀通络,自拟强脊通络方加减。方中淫羊藿补肾温络为君药;其中当归养血活络,

白芍滋阴柔肝,和络止痛为臣药;橘络化痰祛瘀通络,蜈蚣、全蝎搜风剔络,威灵仙蠲痹通络,雷公藤藤类通经入络,牛膝、骨碎补补肾益督通络,为佐药;甘草调和入络,为使药。全方配伍严谨,集中体现金实教授从络论治思想,故临床疗效佳。

参考文献

- [1] 叶天士.临证指南医案[M].北京:人民卫生出版社,2012:340.
- [2] 吴以岭.络病学[M].北京:中国科学技术出版社,2004:35.
- [3] 陆丹艳.金实教授治疗类风湿性关节炎经验[J].江苏中医药,2007,39(3):14.
- [4] 陆燕,金实.生津颗粒治疗原发性干燥综合征阴虚络滞证临床研究[J].南京中医药大学学报,2009,25(6):421.
- [5] 金实,朱方石,叶霜,等.补肾化毒法治疗 SLE 的理论机制探讨[J].南京中医药大学学报(自然科学版),2002,18(1):6.
- [6] 靖卫霞,朱跃兰.从络治痹理论探讨[J].中华中医药学刊,2014,32(12):2883.
- [7] 赵琳,金实.金实教授治疗原发性胆汁性肝硬化的经验[J].四川中医,2013,31(1):8.

第一作者:韩善秀(1975—),男,医学博士,副教授,副主任中医师,风湿病科专业。hsh.tcm@163.com

收稿日期:2016-07-20

编辑:傅如海

scorzoneri folium Willd.的干燥根,分别习称“北柴胡”和“南柴胡”^[2]。近年来由于市场需求量大,野生资源量减少等因素的影响,市场上柴胡品种较为混乱^[3-4]。冀南太行山区早在明代就盛产柴胡等中药,为北药产地之一^[5]。为阐明冀南柴胡道地性,本研究采用高效液相色谱法以柴胡皂苷 a 和柴胡皂苷 d 为对照,建立了冀南柴胡的特征图谱,并与不同产地的柴胡进行了相似度比较^[6]。这将为冀南建立规模化柴胡药材种植基地提供科学依据。

1 材料

1.1 仪器与试剂 高效液相色谱仪,岛津 LC-15C 泵,SPD-15C 型紫外检测器,SIL-10AF 自动进样器,CTO-15C 柱温箱,岛津 LC 工作站。电子分析天平:TB-215、BSA224S-CW(塞多利斯)。乙腈为色谱纯,水为纯化水,其他试剂均为分析纯。

1.2 对照品与样品 柴胡皂苷 a 对照品(批号:110777-201309)和柴胡皂苷 d 对照品(批号:110778-201409)均购自中国食品药品检定研究院。冀南柴胡及其他不同产地柴胡样品(见表 1),经鉴定均为 *Bupleurum chinense* DC.。所收集样品除去茎叶及泥沙,阴干后切小段,40℃减压干燥 4h,取出,粉碎,过 10 目筛,置干燥器保存,备用。

表 1 柴胡样品来源及编号

编号	生长年限	产地	编号	生长年限	产地
1~8	多年生	冀南 涉县	18~19	多年生	山西 平顺
9~10	多年生	冀南 永年	20~22	多年生	山西 黎城
11~15	多年生	冀南 武安	23~26	多年生	河北 安国
16~17	多年生	冀南 沙河	27	多年生	甘肃 天水

2 方法与结果

2.1 对照品溶液制备 精密称取对照品适量,加甲醇使溶解,制成每 1mL 含柴胡皂苷 a 0.3mg、柴胡皂苷 d 0.4mg 的溶液,作为对照品溶液。

2.2 供试品溶液制备 取柴胡粗粉约 0.5g,精密称定,用滤纸包好,置索氏提取器中,精密加入乙醚 100mL 提取 2h,弃去乙醚提取液。药渣挥干乙醚后,移至具塞锥形瓶中,加含 5%氨水的甲醇溶液 35mL,超声处理 30min,过滤,残渣用甲醇洗涤 3 次,每次 10mL,洗液并入提取液中,滤液蒸干,残渣加甲醇溶解并移至 5mL 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,过滤,即得。

2.3 色谱条件及系统适用性试验 岛津 WondaSil

C₁₈ 色谱柱(4.6mm×250mm,5μm);乙腈为流动相 A,水为流动相 B,梯度洗脱(0~50min,23%→75% A;50~55min,75%→23% A;55~60min,23% A);柱温:35℃;流速:1.0mL/min;检测波长 210nm,进样量 10μL。理论板数按柴胡皂苷 a 峰计算应不低于 5000。

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度试验 精密吸取同一供试品溶液 10μL,按 2.3 项下色谱条件连续进样 6 次,记录色谱图,以柴胡皂苷 a 为参照物峰,计算各特征峰的相对保留时间和相对峰面积。结果各共有峰相对保留时间的 RSD 为 0.12%~0.27%,相对峰面积 RSD 为 0.98%~2.54%,表明仪器精密度良好。

2.4.2 稳定性试验 精密吸取同一供试品溶液,分别于 0、2、4、8、12、24h 进样测定,记录色谱图,并以柴胡皂苷 a 为参照物峰,计算各特征峰的相对保留时间和相对峰面积。结果各共有峰相对保留时间的 RSD 为 0.15%~0.34%,相对峰面积 RSD 为 1.16%~3.49%,表明供试品溶液在 24h 内测定结果稳定。

2.4.3 重复性试验 精密称取同一批供试品 6 份,按 2.1 项下方法制备供试品溶液,精密吸取 10μL 进样测定,记录色谱图,以柴胡皂苷 a 为参照峰,计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果各共有峰相对保留时间的 RSD 为 0.11%~0.26%,相对峰面积 RSD 为 1.07%~2.68%,表明该方法重复性良好。

2.4.4 参照物及空白对照试验 精密吸取空白溶液、混合参照物溶液及 2.4.1 项下供试品溶液各 10μL,注入液相色谱仪,按 2.1 项下色谱条件进样,记录色谱图(图 1、图 2)。结果表明空白对照无干扰,柴胡皂苷 a 和柴胡皂苷 d 保留时间分别为 25.31min 和 31.46min。

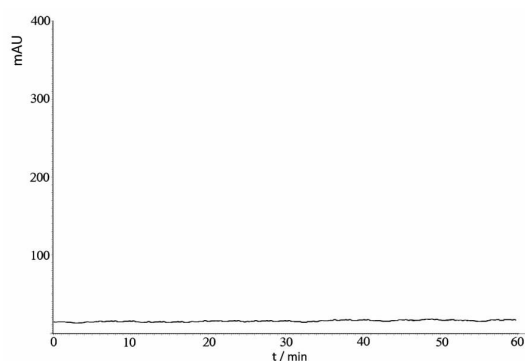


图 1 空白溶液色谱

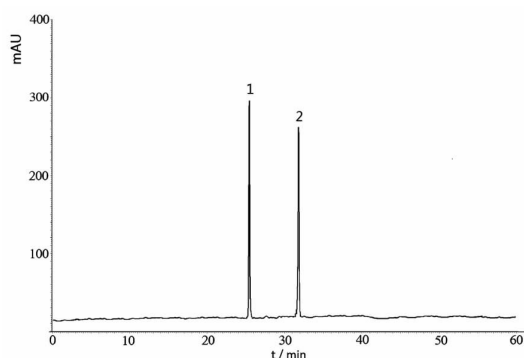


图2 对照品溶液色谱
注:1.柴胡皂苷a;2.柴胡皂苷d。

2.5 冀南柴胡药材特征图谱的建立^[7] 取 17 批冀南柴胡,按 2.2 项下供试品溶液制备方法制备,按 2.3 项下条件进行试验,得 17 批冀南柴胡药材的 HPLC 图谱(见图 3)。经国家药典委员会中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件(2012 年版)进行多点校正后,按中位数法生成 17 批冀南柴胡特征图谱(图 4)。将相对峰面积大于 0.120 的 8 个峰作为共有峰,以 5 号峰(S 峰)柴胡皂苷 a 峰为内参比峰,计算各共有峰与内参比峰的相对保留时间及相对峰面积,并以相对保留时间定性,见表 2。

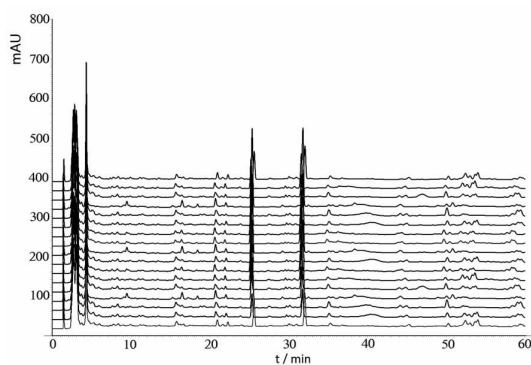


图3 17批冀南柴胡 HPLC 图谱

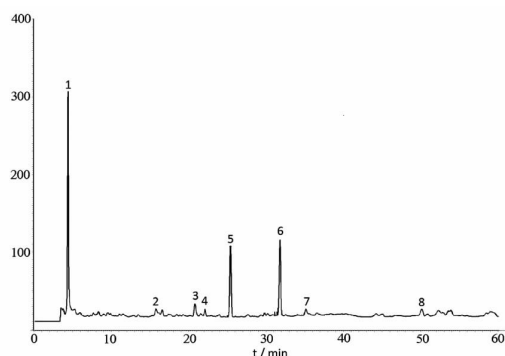


图4 17批冀南柴胡药对照特征图谱
注:5.柴胡皂苷 a(S);6.柴胡皂苷 d。

2.6 冀南柴胡药材相似度计算 将 17 批冀南柴胡药材 HPLC 测定结果与所获特征图谱进行匹配,计算相似度,结果见表 3。

2.7 其他产地柴胡与冀南柴胡相似度比较 将所获的其他产地 10 批药材经提取及测定,获得 HPLC 图谱(图 5),南柴胡特征图谱比对相似度在 0.727~0.946 之间。结果表明,冀南柴胡与山西平顺县、黎城县所产柴胡相似度较接近,在 0.915~0.946 之间;与甘肃产柴胡差别较大,相似度仅为 0.727。

2.8 特征图谱的聚类分析 将特征图谱共有峰作为描述样品特征的变量,样品距离选择欧氏距离,选择最临近法描述两个样品类之间的相似度。对所获样品进行聚类分析,结果见图 6。结果显示,冀南柴胡与山西黎城和平顺产柴胡距离较近,与甘肃天水之间的差异较大。究其原因可能涉县、黎城、平顺等地均处于太行山区域,气候条件较为接近导致品种相似性较大。

表2 冀南柴胡特征图谱共有峰相对保留时间及相对峰面积

样品号	峰号[t'(S')]							
	1	2	3	4	5(S)	6	7	8
1	0.169 (3.673)	0.651 (0.152)	0.816 (0.273)	0.872 (0.127)	1.000 (1.000)	1.251 (1.291)	1.38 (0.136)	1.978 (0.143)
2	0.173 (3.671)	0.653 (0.154)	0.819 (0.274)	0.871 (0.124)	1.000 (1.000)	1.254 (1.293)	1.385 (0.135)	1.978 (0.147)
3	0.168 (3.673)	0.648 (0.154)	0.819 (0.273)	0.869 (0.126)	1.000 (1.000)	1.254 (1.294)	1.385 (0.138)	1.976 (0.145)
4	0.169 (3.670)	0.651 (0.154)	0.818 (0.273)	0.870 (0.126)	1.000 (1.000)	1.254 (1.292)	1.384 (0.138)	1.976 (0.145)
5	0.169 (3.670)	0.649 (0.154)	0.818 (0.274)	0.870 (0.126)	1.000 (1.000)	1.253 (1.292)	1.385 (0.138)	1.975 (0.146)
6	0.167 (3.668)	0.650 (0.155)	0.817 (0.274)	0.870 (0.126)	1.000 (1.000)	1.254 (1.292)	1.386 (0.136)	1.975 (0.145)
7	0.169 (3.668)	0.648 (0.154)	0.818 (0.275)	0.869 (0.124)	1.000 (1.000)	1.256 (1.292)	1.386 (0.137)	1.975 (0.144)
8	0.171 (3.668)	0.648 (0.155)	0.817 (0.276)	0.869 (0.125)	1.000 (1.000)	1.254 (1.291)	1.386 (0.138)	1.976 (0.144)
9	0.169 (3.671)	0.649 (0.154)	0.819 (0.275)	0.870 (0.125)	1.000 (1.000)	1.254 (1.291)	1.385 (0.139)	1.977 (0.144)
10	0.169 (3.671)	0.647 (0.155)	0.818 (0.274)	0.871 (0.124)	1.000 (1.000)	1.255 (1.294)	1.383 (0.138)	1.976 (0.145)
11	0.169 (3.673)	0.650 (0.155)	0.817 (0.274)	0.871 (0.122)	1.000 (1.000)	1.254 (1.294)	1.385 (0.141)	1.974 (0.146)
12	0.170 (3.670)	0.651 (0.154)	0.818 (0.274)	0.871 (0.123)	1.000 (1.000)	1.255 (1.292)	1.384 (0.138)	1.974 (0.145)
13	0.169 (3.670)	0.650 (0.153)	0.816 (0.276)	0.870 (0.122)	1.000 (1.000)	1.256 (1.292)	1.386 (0.140)	1.976 (0.146)
14	0.168 (3.671)	0.650 (0.153)	0.816 (0.273)	0.870 (0.123)	1.000 (1.000)	1.256 (1.293)	1.385 (0.138)	1.978 (0.145)
15	0.171 (3.671)	0.648 (0.153)	0.819 (0.274)	0.868 (0.123)	1.000 (1.000)	1.254 (1.294)	1.385 (0.138)	1.976 (0.146)
16	0.168 (3.668)	0.650 (0.154)	0.820 (0.276)	0.868 (0.124)	1.000 (1.000)	1.254 (1.292)	1.383 (0.137)	1.978 (0.143)
17	0.169 (3.669)	0.649 (0.154)	0.818 (0.274)	0.870 (0.122)	1.000 (1.000)	1.253 (1.291)	1.386 (0.138)	1.977 (0.144)
平均	0.169 (3.670)	0.650 (0.154)	0.818 (0.274)	0.870 (0.124)	1.000 (1.000)	1.254 (1.292)	1.385 (0.138)	1.976 (0.145)

表3 17批冀南柴胡药材特征图谱相似度评价

编号	相似度	编号	相似度	编号	相似度
1	0.992	7	0.982	13	0.968
2	0.987	8	0.985	14	0.949
3	0.994	9	0.953	15	0.976
4	0.951	10	0.993	16	0.994
5	0.967	11	0.978	17	0.961
6	0.975	12	0.974		

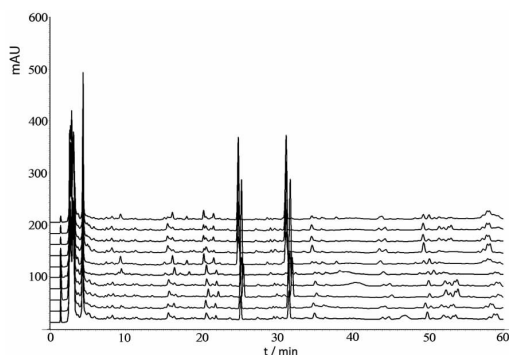


图5 其他产地10批柴胡HPLC图谱

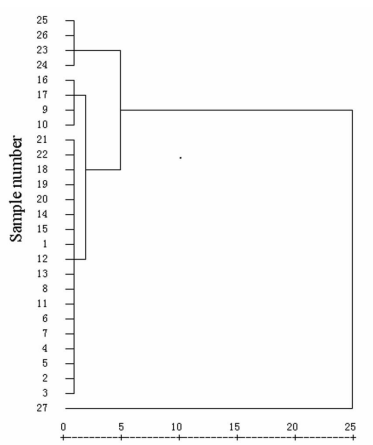


图6 样品聚类分析树状图

3 讨论

研究中供试品溶液制备采用索氏提取法、超声提取法、热回流法进行提取效率对比,发现索氏提取法提取效率高且操作相对简便。柴胡中含0.03%左右的挥发油^[8],提取首先采用乙醚将柴胡药材中挥发油等低极性的成分除去,减少低极性成分对测定的干扰并保护色谱柱。柴胡中含柴胡皂苷约2%左右^[8],柴胡皂苷a和柴胡皂苷d具有显著的药理活性,在提取过程中容易受到酸的影响导致环氧醚键水解开环,故提取中加入一定量的氨水,维持提取体系的pH值,防止活性成分水解损失。因为紫外

检测器在高效液相色谱仪中使用较多,本实验采用紫外检测器末端吸收为实验条件,建立冀南柴胡特征图谱。

通过冀南柴胡特征图谱及与10批其他产地HPLC图谱比较发现,北柴胡中均含有柴胡皂苷a和柴胡皂苷d,含量相对较高,这充分说明柴胡药材采用柴胡皂苷a和柴胡皂苷d为定量成分的科学性。王启帅等^[9]研究了不同采收期北柴胡指标性成分和变化情况,认为不同采收期柴胡中的各种成分含量有明显的差别。为避免采收时间对特征图谱的影响,本研究中的柴胡样本为9~10月间采集和收集。但冀南柴胡作为道地药材,受当地环境的影响也表现出一定的特异性。与10批其他产地药材相似度比较结果可以看出,8个共有峰在上述图谱中基本上都可以出现,但相似度存在一定差异,说明地域是造成相似度差异的主要影响因素。这为研究柴胡药材的指纹图谱分析鉴定提供了较好的参考。

参考文献

- [1] 赵香妍,刘长利.中药柴胡的研究概况与发展趋势[J].时珍国医国药,2015,26(4):963.
- [2] 国家药典委员会.中国药典:一部[M].北京:中国医药科技出版社,2015:280.
- [3] 梁镇标,刘力,晁志.柴胡属植物资源及生产状况调查[J].时珍国医国药,2012,23(8):2011.
- [4] 于俊林,赵莎,任明波,等.基于ITS2条形码鉴定柴胡与大叶柴胡[J].中国中药杂志,2014,39(12):2160.
- [5] 王玉庆,牛颜冰,秦雪梅.野生柴胡资源调查[J].山西农业大学学报(自然科学版),2007,27(1):103.
- [6] 屠鹏飞.高效液相色谱法制定中药材和中药注射剂特征指纹图谱的探讨[J].中成药,2000,22(7):516.
- [7] 聂黎行,石上梅,翟为民,等.指纹图谱技术在中药注射剂标准提高中的应用[J].中成药,2015,37(3):607.
- [8] 蔡少青.生药学[M].6版.北京:人民卫生出版社,2011:198.
- [9] 王启帅,杨云,肖功胜,等.北柴胡HPLC-ELSD指纹图谱的建立及色谱数据的分析[J].中成药,2011,33(3):373.

第一作者:张洪峰(1966—),男,本科学历,主任药师,研究方向为医院药学。1388097@163.com

收稿日期:2016-06-08

编辑:吴宁

中医药学——中华文明的结晶,世界文化的瑰宝!