

北柴胡及醋北柴胡标准汤剂质量差异性分析

宋 驰, 葛 威, 邹佳莉, 王 悦, 谭娟娟, 贡济宇*

长春中医药大学 药学院, 吉林 长春 130117

摘 要: 目的 建立北柴胡 *Bupleurum chinense* 及醋北柴胡标准汤剂质量评价方法, 比较二者质量的差异性。方法 制备北柴胡及醋北柴胡标准汤剂各 20 批, 对醋制前后标准汤剂的 pH 值及出膏率进行考察; 建立北柴胡醋制前后标准汤剂 HPLC 指纹图谱方法和多指标成分含量测定方法, 并结合化学计量学和统计学方法对二者差异进行分析。结果 北柴胡醋制后标准汤剂 pH 值降低, 出膏率降低; 建立了北柴胡及其醋制品标准汤剂指纹图谱, 分别确定了 16 个共有峰, 指认了其中 5 个共有峰; 北柴胡标准汤剂相似度为 0.976~0.995, 醋北柴胡标准汤剂相似度为 0.946~0.996。主成分分析将北柴胡及其醋制品标准汤剂归为 2 类, 正交偏最小二乘法-判别分析找出二者共 7 个差异色谱峰, 分别为峰 1、4 (柴胡皂苷 c)、6、7 (柴胡皂苷 a)、9 (柴胡皂苷 b₂)、10 (柴胡皂苷 b₁) 及 13 (柴胡皂苷 d), 为北柴胡及醋北柴胡标准汤剂差异化合物。多指标成分含量测定结果表明北柴胡醋制前后指标成分含量具有显著差异 ($P < 0.05$), 北柴胡醋制后标准汤剂中柴胡皂苷 a、柴胡皂苷 c 及柴胡皂苷 d 含量较低, 柴胡皂苷 b₁ 及柴胡皂苷 b₂ 含量较高。结论 建立了科学和实用的北柴胡及醋北柴胡标准汤剂质量评价方法, 也为北柴胡与其醋制品相关制剂的鉴别和质量控制提供参考。

关键词: 北柴胡; 醋制; 标准汤剂; 指纹图谱; 正交偏最小二乘法-判别分析; 柴胡皂苷; 质量控制

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2022)08-2331-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.08.009

Quality difference analysis of standard decoction of *Bupleurum chinense* and vinegar-processed *Bupleurum chinense*

SONG Chi, GE Wei, ZOU Jia-li, WANG Yue, TAN Juan-juan, GONG Ji-yu

College of Pharmacy, Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, China

Abstract: Objective To establish the quality evaluation method and investigate the quality differences of standard decoction of Chaihu (*Bupleurum chinense*) (CHD) and vinegar-processed *Bupleurum chinense* (VCHD). **Methods** Twenty batches of CHD and VCHD samples were prepared, the extract rates and pH were determined, respectively. Chromatographic fingerprints and multi-index content determination method of CHD and VCHD were generated from the high performance liquid chromatography (HPLC) and the quality differences were analyzed using the method of chemometrics and statistics. **Results** The extract rates and pH value of VCHD standard decoction was decreased. The fingerprints of the CHD and VCHD were established, a total of 16 common peaks were determined respectively, and five peaks were identified; The similarity of CHD and VCHD were 0.976—0.995 and 0.946—0.996, respectively. A clear classification among CHD and VCHD sample was observed in the score plot of the principal component analysis (PCA), then seven marker compounds were selected and identified by orthogonal partial least square discriminant analysis (OPLS-DA), including peaks 1, 4 (saikosaponin c), peaks 6, 7 (saikosaponin a), peak 9 (saikosaponin b₂), peak 10 (saikosaponin b₁), and peak 13 (saikosaponin d). Multiple-index content determination results showed that there was significant difference in the content of index components before and after vinegar processing of CHD ($P < 0.05$). The contents of saikosaponin a, saikosaponin c and saikosaponin d were lower. Besides, saikosaponin b₁ and saikosaponin b₂ was higher in the standard decoction of VCHD. **Conclusion** A scientific and practical quality evaluation method of CHD and VCHD was established, which also provided a reference for the identification and quality control of related preparations of *B. chinense* and its vinegar-processed products.

收稿日期: 2021-11-06

基金项目: 国家中药标准化项目 (ZYBZH-Y-JL-25); 吉林省科技发展计划项目 (20210204078YY)

作者简介: 宋 驰 (1998—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药分析学。E-mail: 2697733699@qq.com

*通信作者: 贡济宇, 教授, 博士生导师, 主要从事中药分析学研究。E-mail: gjy0431@126.com

Key words: *Bupleurum chinense* DC.; vinegar-processing; standard decoction; chromatographic fingerprints; orthogonal partial least squares-discriminant analysis; saikosaponin; quality control

中药标准汤剂是以中医理论为指导、临床应用为基础的单味中药饮片水煎剂，用于标准化不同的临床用药形式是否与传统汤剂一致，亦可作为配方颗粒、经典名方等产品的物质基准^[1]。建立规范、高效的标准汤剂制备工艺，并依照可量化的标准对其进行质量评价，将为中药应用的标准化、科学化提供重要的技术支持与参考。

北柴胡为伞形科柴胡属多年生草本植物柴胡 *Bupleurum chinense* DC. 的干燥根^[2]，又名韭叶柴胡、津柴胡，为大宗药材。具有疏散退热、疏肝解郁、升举阳气的功效，主要化学成分为皂苷类、多糖类、黄酮类、挥发油、有机酸及植物甾醇等^[3-5]。

现代药理研究表明，柴胡对于散热、消炎、抗肿瘤、抗抑郁、保肝及免疫调节等具有良好的治疗效果^[6-10]。北柴胡有熬制法、酒炒制、蜜制、醋炒、鳖血制、炒制法等炮制方法，其中以醋制最常用，且被《中国药典》2020 年版收载。

明代李梴《医学入门》认为：醋可引药入肝，醋柴胡重在养肝柔肝，起到缓和升散、解表退热之功效，可用于治疗腹痛、月经不调等症^[11]，在现有研究中，柴胡入药煎煮时，原生柴胡皂苷 a、柴胡皂苷 d 会转化为次生柴胡皂苷 b₁、柴胡皂苷 b₂，柴胡皂苷 b₂ 可抗炎、增强免疫、抑制脂肪分解、刺激 PGE₂ 合成^[12]。

目前，对北柴胡的研究多集中在不同产地、不同加工方法与药材质量的相关性，以及对炮制前后北柴胡饮片的药效及质量评价研究，而北柴胡临床制剂多为汤剂、散剂及颗粒剂，已失去原饮片所具有的显微与性状鉴别特征，即无法从传统鉴别方法进行检查与鉴别，不利于临床用药质量的控制。因此，对北柴胡及醋北柴胡的标准汤剂进行全面的质

量控制与评价具有重要意义。

本研究收集具有代表性的 20 批北柴胡饮片，制备北柴胡与醋北柴胡标准汤剂各 20 批，对醋制前后标准汤剂的 pH 值及出膏率进行考察；建立北柴胡醋制前后标准汤剂 HPLC 指纹图谱方法和多指标成分含量测定方法，并结合化学计量学和统计学方法对二者差异进行分析，以期建立科学和实用的北柴胡及醋北柴胡标准汤剂质量评价方法，为北柴胡与其醋制品相关制剂的鉴别和质量控制提供参考。

1 仪器与试药

1.1 仪器

LC-2030 高效液相色谱仪，包括 DGC-20A 型在线脱气系统，SIL-20A 型自动进样系统，UV 检测器，日本岛津公司；AB135-S 型 1/10 万电子分析天平、AL204 型 1/1 万分之一电子天平，瑞士梅特勒-托利多公司；KQ-500E 型超声波清洗器，昆山市超声仪器有限公司；KES-W22CS208H 型电陶炉，深圳市康佳智能电器科技有限公司；SCIENTZ-12N 型冷冻干燥机，宁波新芝生物科技股份有限公司。

1.2 试药

对照品柴胡皂苷 a（批号 P03M9F50593，质量分数≥98%）、柴胡皂苷 c（批号 P17A8F41958，质量分数≥98%）、柴胡皂苷 d（批号 Z08A8L33357，质量分数≥98%）、柴胡皂苷 b₁（批号 58558-08-0，质量分数≥97%）及柴胡皂苷 b₂（批号 58316-41-9，质量分数≥95%），均购自上海源叶生物科技有限公司；乙腈、甲醇、磷酸，色谱级，赛默飞世尔科技有限公司；氨水，25%~28%，西陇科学股份有限公司；屈臣氏蒸馏水，广州屈臣氏食品饮料有限公司。20 批北柴胡饮片来源于河南省南阳市（S1~S5）、吉林省伊通县（S6~S10）、山西省运城市（S11~S15）及陕西省（S16~S20）共 4 个产地，经长春中医药大学中药鉴定教研室蔡广知副教授鉴定，均来源于伞形科柴胡属植物柴胡 *B. chinense* DC. 的干燥根，信息见表 1。

2 方法与结果

2.1 醋北柴胡饮片的制备

参照《中国药典》2020 年版四部^[13]醋炙法（通则 0213），取 20 批北柴胡饮片，加醋（每 100 kg 柴胡，加 20 kg 醋）拌匀，闷透 3.5 h 置炒药机内炒至表面呈淡棕黄色，微有醋香气，经检测北柴胡和醋北柴胡饮片质量均符合《中国药典》2020 年版一部要求。

2.2 北柴胡及醋北柴胡饮片指标性成分含量测定

参照文献方法^[14-15]测定 20 批北柴胡及醋北柴胡饮片指标性成分含量，结果见表 2。20 批北柴胡饮片中柴胡皂苷 a、柴胡皂苷 c、柴胡皂苷 d、柴胡皂苷 b₁ 及柴胡皂苷 b₂ 质量分数分别为 9.02~38.02、0.89~4.95、9.24~35.37、0.11~6.49、2.36~3.39 mg/g，

表 1 北柴胡饮片样品信息

Table 1 Information of prepared slices of *B. chinense*

样品	批号	产地	样品	批号	产地	样品	批号	产地
S1	Chj1-20170811	河南省南阳市	S8	Chd3-20171013	吉林省伊通县	S15	Chj1-20170915	山西省运城市
S2	Chj1-20170812	河南省南阳市	S9	Chd3-20171014	吉林省伊通县	S16	19010041	陕西省
S3	Chj1-20170813	河南省南阳市	S10	Chd3-20171015	吉林省伊通县	S17	19010042	陕西省
S4	Chj1-20170814	河南省南阳市	S11	Chj1-20170911	山西省运城市	S18	19010043	陕西省
S5	Chj1-20170815	河南省南阳市	S12	Chj1-20170912	山西省运城市	S19	19010044	陕西省
S6	Chd3-20171011	吉林省伊通县	S13	Chj1-20170913	山西省运城市	S20	19010045	陕西省
S7	Chd3-20171012	吉林省伊通县	S14	Chj1-20170914	山西省运城市			

表 2 北柴胡饮片及醋北柴胡饮片中指标成分含量

Table 2 Content of index components in prepared slices of *B. chinense* and vinegar-processed *B. chinense*

样品	柴胡皂苷 a/(mg·g ⁻¹)		柴胡皂苷 c/(mg·g ⁻¹)		柴胡皂苷 d/(mg·g ⁻¹)		柴胡皂苷 b ₁ /(mg·g ⁻¹)		柴胡皂苷 b ₂ /(mg·g ⁻¹)	
	北柴胡	醋北柴胡	北柴胡	醋北柴胡	北柴胡	醋北柴胡	北柴胡	醋北柴胡	北柴胡	醋北柴胡
S1	31.26	31.43	3.51	2.70	28.18	29.57	0.12	1.83	3.35	5.20
S2	32.97	31.04	2.94	2.82	29.63	28.49	1.59	1.97	3.07	4.90
S3	32.95	33.09	4.95	2.83	28.97	29.97	1.22	1.76	2.94	4.43
S4	31.80	31.12	2.84	2.75	28.75	29.39	0.11	1.88	3.34	4.92
S5	31.09	31.19	2.75	2.70	27.52	29.20	1.10	1.88	3.35	4.94
S6	37.70	31.11	2.48	3.13	34.55	25.88	5.63	5.15	2.88	6.25
S7	38.02	30.80	2.85	3.20	35.37	25.54	2.07	4.99	3.18	6.23
S8	37.67	31.52	2.72	3.57	32.32	26.23	3.08	5.06	2.76	6.33
S9	37.51	30.70	2.59	3.01	32.01	25.97	1.55	7.97	3.39	6.36
S10	37.63	30.73	2.64	3.50	31.67	25.99	2.86	8.04	2.36	6.46
S11	35.08	30.56	3.64	3.43	34.03	28.34	4.43	5.35	3.38	6.16
S12	35.26	30.46	2.90	3.32	34.26	28.83	4.60	7.20	3.35	6.47
S13	35.16	30.99	3.05	3.31	34.64	28.72	3.16	5.19	3.35	6.25
S14	34.71	31.19	3.37	3.35	33.71	29.36	4.72	7.13	3.35	6.61
S15	35.10	30.85	2.82	3.32	33.82	28.94	5.26	5.15	2.81	6.05
S16	9.07	5.70	0.90	1.91	9.36	5.90	5.93	3.59	2.53	6.20
S17	9.56	6.22	0.96	1.93	9.99	6.52	6.12	3.67	2.58	5.54
S18	9.43	5.74	0.89	1.93	9.84	5.90	6.49	3.59	2.81	5.15
S19	9.02	7.00	2.24	1.91	9.24	7.51	6.35	3.07	2.71	6.17
S20	9.06	7.08	2.19	1.92	9.30	7.59	6.45	3.16	2.78	6.54

均值分别为 28.50、2.66、26.36、3.64、3.01 mg/g。20 批醋北柴胡饮片中柴胡皂苷 a、柴胡皂苷 c、柴胡皂苷 d、柴胡皂苷 b₁ 及柴胡皂苷 b₂ 质量分数范围分别为 5.70~33.09、1.91~3.57、5.90~29.97、1.76~8.04、4.43~6.61 mg/g，均值分别为 24.93、2.83、22.69、4.38、5.86 mg/g。

2.3 北柴胡及醋北柴胡标准汤剂的制备

参照相关指导原则^[16-17]中标准汤剂的制备方法，分别取 20 批北柴胡饮片 100 g，浸泡 30 min，

武火转文火煎煮 2 次，第 1 次加 7 倍量水煎煮 30 min，第 2 次加 6 倍量水，煎煮 20 min。经 300 目绢布趁热滤过，合并 2 次滤液，进行分装，-20 ℃ 预冷冻后，置于冷冻干燥机中冷冻干燥，即得北柴胡标准汤剂冻干粉，编号为 CHD1~CHD20。同法制备醋北柴胡标准汤剂冻干粉，编号为 VCHD1~VCHD20。

2.4 物性参数测定

2.4.1 pH 值测定 分别测定各批次北柴胡及醋北

柴胡标准汤剂 pH 值, 结果见表 3。20 批北柴胡标准汤剂 pH 值范围在 7.95~8.27, 均值为 8.06, 北柴胡标准汤剂显碱性; 20 批醋北柴胡标准汤剂 pH 值范围在 6.70~7.87, 均值为 7.56, 北柴胡醋制后标准汤剂 pH 值降低。

2.4.2 出膏率测定 出膏率以标准汤剂冻干粉量

计, 按公式出膏率=标准汤剂冻干粉质量/饮片投料量。北柴胡标准汤剂和醋北柴胡标准汤剂出膏率计算结果见表 3。结果表明, 20 批北柴胡标准汤剂出膏率范围在 12.02%~21.54%, 均值为 18.14%。20 批醋北柴胡出膏率范围在 10.15%~20.45%, 均值为 17.11%, 北柴胡醋制后标准汤剂出膏率降低。

表 3 北柴胡及醋北柴胡标准汤剂 pH 值和出膏率

Table 3 pH value and ointment rate of CHD and VCHD

样品	pH 值		出膏率/%		样品	pH 值		出膏率/%		样品	pH 值		出膏率/%	
	CHD	VCHD	CHD	VCHD		CHD	VCHD	CHD	VCHD		CHD	VCHD	CHD	VCHD
S1	8.27	7.84	20.21	20.09	S8	7.97	6.70	20.53	19.46	S15	7.97	7.87	18.78	18.45
S2	8.23	7.83	20.00	20.15	S9	7.96	6.70	21.14	18.86	S16	8.11	7.84	12.48	10.88
S3	8.16	7.84	19.92	20.45	S10	7.97	6.70	20.35	19.78	S17	8.10	7.85	12.46	10.15
S4	8.23	7.84	19.52	19.68	S11	7.95	7.86	19.26	18.07	S18	8.08	7.85	12.02	11.04
S5	8.19	7.86	20.02	19.89	S12	7.96	7.85	18.55	18.45	S19	8.09	7.84	13.25	10.53
S6	7.97	6.72	21.54	19.38	S13	7.97	7.82	19.05	17.68	S20	8.07	7.83	13.45	10.23
S7	7.96	6.71	21.05	20.03	S14	7.96	7.86	19.15	18.86					

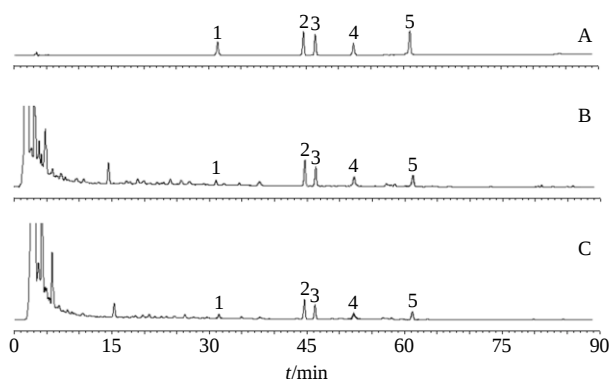
CHD-北柴胡标准汤剂 VCHD-醋北柴胡标准汤剂, 图 2~4 及表 4、5 同

CHD-standard decoction of *B. chinense* VCHD-vinegar-processed *B. chinense*, same as figures 2—4 and tables 4, 5

2.5 北柴胡及醋北柴胡标准汤剂指纹图谱研究

2.5.1 色谱条件 Thermo Hypersil Gold 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-0.01%磷酸水溶液, 梯度洗脱: 0~10 min, 26%乙腈; 10~65 min, 26%~46%乙腈; 65~90 min, 46%~70%乙腈; 检测波长 210 nm; 体积流量 1 mL/min; 柱温 30 °C; 进样量 10 μL。色谱图见图 1。

2.5.2 对照品溶液的制备 精密称取柴胡皂苷 a、



1-柴胡皂苷 c 2-柴胡皂苷 a 3-柴胡皂苷 b₂ 4-柴胡皂苷 b₁ 5-柴胡皂苷 d
1-saikosaponin c 2-saikosaponin a 3-saikosaponin b₂ 4-saikosaponin b₁ 5-saikosaponin d

图 1 混合对照品溶液 (A)、北柴胡标准汤剂 (B) 及醋北柴胡标准汤剂 (C) 的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC chromatogram of reference solution (A), CHD (B) and VCHD (C)

柴胡皂苷 c、柴胡皂苷 d、柴胡皂苷 b₁ 及柴胡皂苷 b₂ 对照品适量, 加甲醇溶解, 制成含柴胡皂苷 a 0.431 mg/mL、柴胡皂苷 c 0.211 mg/mL、柴胡皂苷 d 0.512 mg/mL、柴胡皂苷 b₁ 0.266 mg/mL 及柴胡皂苷 b₂ 0.212 mg/mL 的混合对照品储备液, 备用。

2.5.3 供试品溶液的制备 精密称取各北柴胡及醋北柴胡标准汤剂冻干粉 1 g, 于具塞锥形瓶中, 加入含 5%浓氨试液的甲醇溶液 25 mL, 超声 30 min, 滤过, 用甲醇 20 mL 分 2 次洗涤容器及药渣, 洗液与滤液合并, 回收溶剂至干。残渣加 60%乙腈水溶液溶解, 转移至 10 mL 量瓶中, 加 60%乙腈水溶液至刻度, 摇匀, 0.22 μm 微孔滤膜, 滤过, 即得。

2.5.4 精密度考察 取 CHD1 样品溶液, 按“2.5.1”项下色谱方法重复进样 6 次, 记录色谱图, 以 7 号峰 (柴胡皂苷 a) 为参照峰, 计算各共有峰与参照峰的相对保留时间的 RSD 值均小于 0.21%, 相对峰面积 RSD 值均小于 4.48%, 表明仪器的精密度良好。

2.5.5 重复性考察 取同一批北柴胡标准汤剂冻干粉, 按“2.4.3”项下方法平行制备 6 份供试品溶液, 按“2.5.1”项下色谱条件进样, 计算各共有峰与参照峰的相对保留时间的 RSD 值均小于 0.74%, 相对峰面积的 RSD 值均小于 4.04%, 表明该方法的重复性良好。

2.5.6 稳定性考察 取 CHD1 样品溶液, 分别于供

试品溶液制备后 0、4、8、12、24 h, 按“2.5.1”项下色谱条件测定, 记录色谱图, 计算各共有峰与参照峰相对保留时间的 RSD 值均小于 0.88%, 相对峰面积的 RSD 值均小于 3.79%, 表明供试品溶液在室温下 24 h 内稳定性良好。

2.5.7 指纹图谱的建立 分别取北柴胡和醋北柴胡标准汤剂冻干粉, 按“2.5.3”项下方法制备供试品

溶液, 按“2.5.1”项下色谱条件分别依次进样测定, 记录色谱图信息。采用中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件(2012 版)进行评价, 设置 CHD1 号样品色谱图为参照图谱, 采用平均数法, 进行多点校正和色谱峰匹配, 经全谱峰匹配后得到北柴胡标准汤剂指纹图谱(图 2-A); 同法设置 VCHD1 号样品色谱图为参照图谱, 建立醋北柴胡标准汤剂指纹图

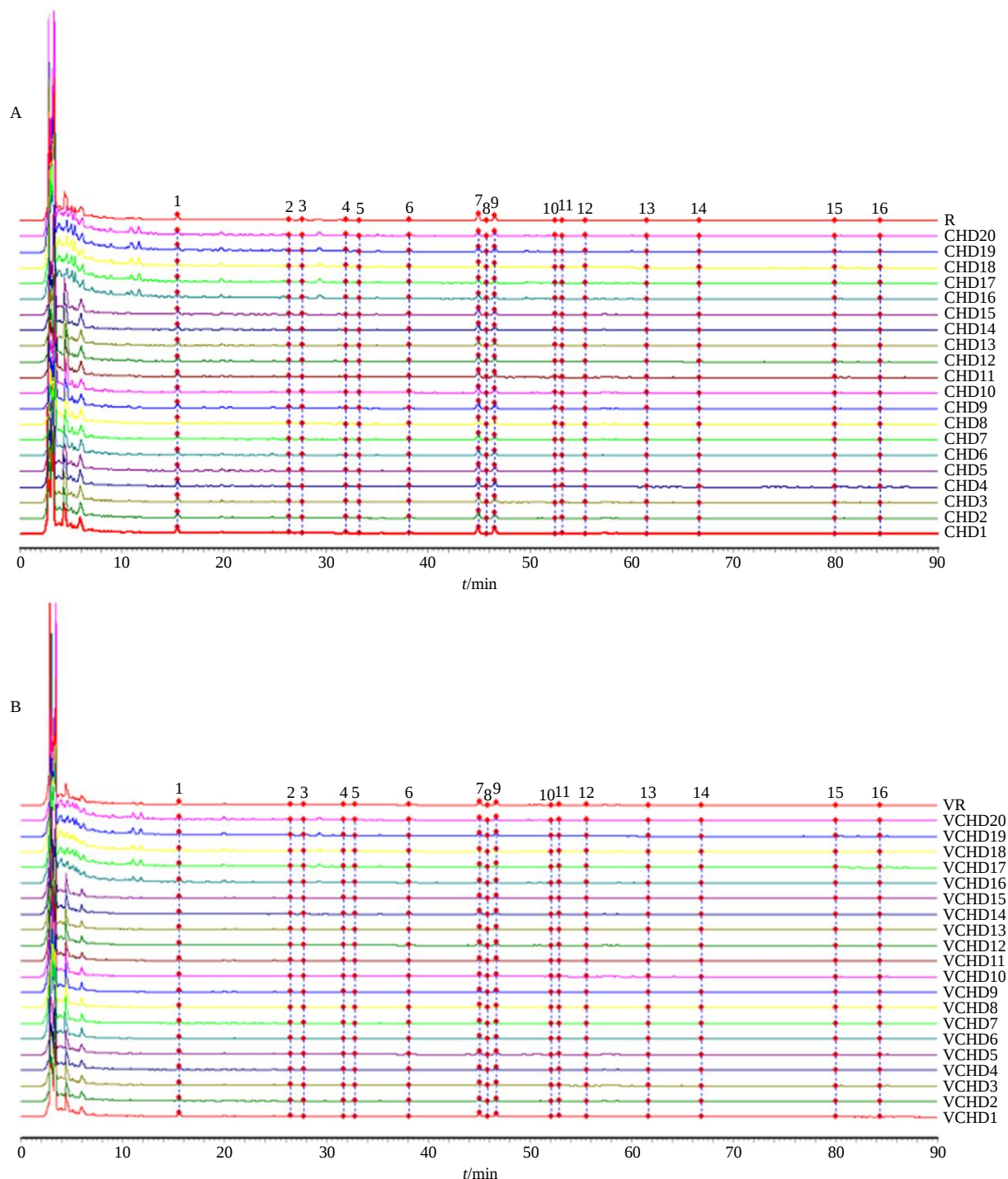


图 2 北柴胡标准汤剂 (A) 和醋北柴胡标准汤剂 (B) 指纹图谱
Fig. 2 Fingerprints of CHD (A) and VCHD (B)

谱(图 2-B)。建立的北柴胡标准汤剂和醋北柴胡标准汤剂的指纹图谱,分别匹配了 16 个共有峰,通过对照品比对(图 1),指认了其中 5 个共有峰,峰 4(柴胡皂苷 c)、7(柴胡皂苷 a)、9(柴胡皂苷 b₂)、10(柴胡皂苷 b₁)及 13(柴胡皂苷 d)。

2.5.8 相似度评价 20 批北柴胡标准汤剂(CHD1~CHD20)相似度计算结果为 0.990、0.989、0.991、0.994、0.989、0.992、0.993、0.995、0.995、0.991、0.989、0.979、0.983、0.984、0.987、0.979、0.976、0.978、0.979、0.978; 20 批醋北柴胡标准汤剂(VCHD1~VCHD20)相似度计算结果为 0.996、0.996、0.992、0.994、0.995、0.973、0.957、0.958、0.976、0.956、0.987、0.988、0.992、0.985、0.946、0.973、0.973、0.966、0.971、0.967,结果均大于 0.90,表明北柴胡和醋北柴胡标准汤剂整体相似性均较好,所建立的指纹图谱可用于北柴胡和醋北柴胡标准汤剂质量评价研究。

2.6 基于指纹图谱的北柴胡与醋北柴胡标准汤剂差异性分析

2.6.1 主成分分析(principal component analysis, PCA) PCA 是在尽可能保持原有数据信息的前提下,通过降维处理达到简化指标的目的,目前已被广泛用于中药质量标准研究的数据统计分析中。以北柴胡和醋北柴胡标准汤剂指纹图谱中的 16 个共有峰峰面积为变量,借助 SIMICA 14.0 软件,采用无监督模式法 PCA 进行分析,北柴胡和醋北柴胡标准汤剂被分为 2 组,见图 3,表明北柴胡醋制前后标准汤剂质量存在一定差异。

2.6.2 正交偏最小二乘法-判别分析(orthogonal partial least square method-discriminant analysis, OPLS-DA) 为进一步找出影响北柴胡与醋北柴胡标准汤剂差异的主要变量,在 PCA 聚类结果基础

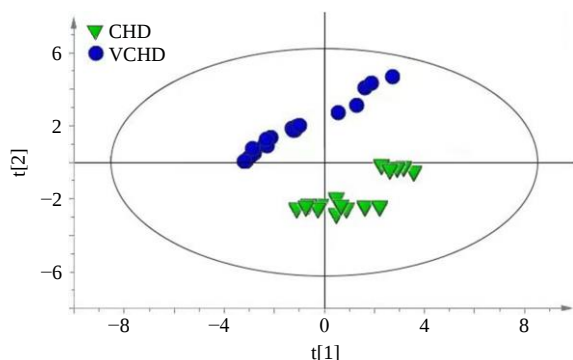


图 3 PCA 得分图

Fig. 3 PCA score plot

上,建立有监督模式识别分析法 OPLS-DA 模型,样本得分矩阵见图 4-A,模型对自变量拟合指数 $R^2_X=0.961$,对因变量拟合指数 $R^2_Y=0.962$,模型预测指数 $Q^2=0.945$,说明该模型有较好的解释能力和预测能力,可用于区分北柴胡和醋北柴胡标准汤剂。图 4-B 为 OPLS-DA 模型的变量重要性投影值(variable importance in projection, VIP),VIP 值的大小代表了各指标成分对模型贡献率的大小,值越大贡献越大,表明该色谱峰对于北柴胡和醋北柴胡标准汤剂的分类贡献越大,同时也是导致北柴胡和醋北柴胡标准汤剂相区分的差异成分。以 $VIP>1$ 为界限进行筛选,结合北柴胡和醋北柴胡标准汤剂指纹图谱中的 16 个共有峰峰面积 t 检验分析,结果共确定 7 个差异性色谱峰,分别为峰 1、4(柴胡皂苷 c)、6、7(柴胡皂苷 a)、9(柴胡皂苷 b₂)、10(柴胡皂苷 b₁)及 13(柴胡皂苷 d)。

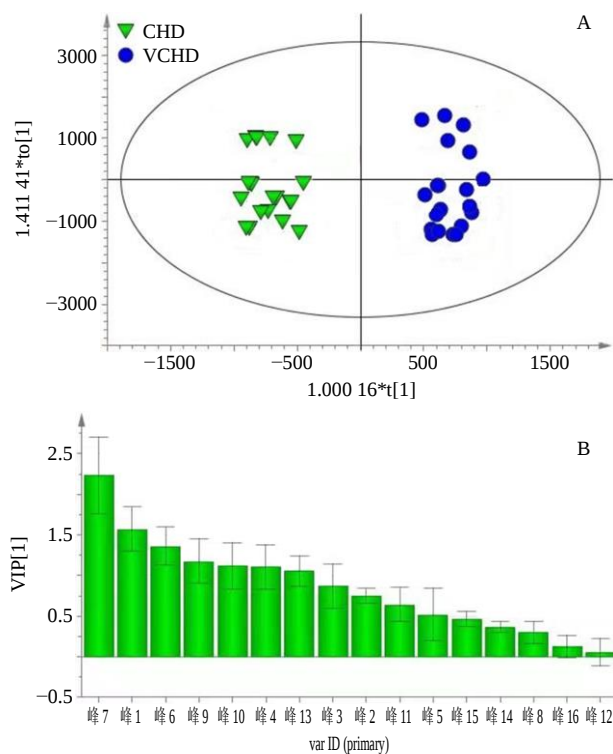


图 4 OPLS-DA 得分图 (A) 和 VIP 值 (B)

Fig. 4 OPLS-DA score plot (A) and VIP (B)

2.7 北柴胡及醋北柴胡标准汤剂含量测定研究

2.7.1 线性关系考察 精密移取“2.5.2”项下各对照品溶液适量,稀释成一系列不同质量浓度的对照品溶液,按照“2.5.1”项下色谱条件进行测定,以对照品质量浓度为横坐标(X),以对照品峰面积为纵坐标(Y)绘制标准曲线,进行线性回归,得到 5 种成分的回归方程,结果分别为柴胡皂苷 a $Y=3\ 153.1$

$X-22\ 544$, $R^2=0.999\ 6$, 线性范围 $204.67\sim1228.00\ \mu\text{g/mL}$; 柴胡皂苷 c $Y=2\ 428.8\ X-1\ 056.3$, $R^2=0.999\ 4$, 线性范围 $30.83\sim185.00\ \mu\text{g/mL}$; 柴胡皂苷 d $Y=3\ 431.6\ X-4\ 363.2$, $R^2=0.999\ 5$, 线性范围 $150.83\sim905.00\ \mu\text{g/mL}$; 柴胡皂苷 b_1 $Y=2\ 576.0\ X-435.47$, $R^2=0.999\ 5$, 线性范围 $6.65\sim133.00\ \mu\text{g/mL}$; 柴胡皂苷 b_2 $Y=2\ 620.1\ X+146.96$, $R^2=0.999\ 3$, 线性范围 $5.30\sim106.00\ \mu\text{g/mL}$ 。

2.7.2 精密度考察 取 CHD1 样品溶液, 按“2.5.1”项下色谱方法重复进样 6 次, 计算柴胡皂苷 a、柴胡皂苷 c、柴胡皂苷 d、柴胡皂苷 b_1 及柴胡皂苷 b_2 峰面积 RSD 值分别为 0.68%、2.00%、1.98%、2.00%、0.97%, 表明仪器的精密度良好。

2.7.3 重复性考察 取同一批北柴胡标准汤剂冻干粉, 按“2.5.3”项下方法平行制备 6 份供试品溶液, 按“2.5.1”项下色谱条件进样, 计算柴胡皂苷 a、柴胡皂苷 c、柴胡皂苷 d、柴胡皂苷 b_1 及柴胡皂苷 b_2 含量 RSD 值分别为 0.38%、3.07%、0.49%、1.78%、1.12%, 表明该方法的重复性良好。

2.7.4 稳定性考察 取 CHD1 样品溶液, 室温放置 0、2、4、8、12、24 h。按“2.5.1”项下色谱条件进样, 计算柴胡皂苷 a、柴胡皂苷 c、柴胡皂苷 d、柴胡皂苷 b_1 及柴胡皂苷 b_2 峰面积 RSD 值分别为 1.13%、0.95%、2.81%、1.01%、1.16%, 表明供试品溶液在室温下 24 h 内稳定性良好。

2.7.5 加样回收率 取已知含量北柴胡标准汤剂冻干粉约 0.5 g, 精密称定, 共 6 份, 按 1:1 加入对照品, 按“2.5.3”项下方法制备供试品溶液, 按“2.5.1”项下色谱条件进行测定, 计算柴胡皂苷 a、柴胡皂苷 c、柴胡皂苷 d、柴胡皂苷 b_1 及柴胡皂苷 b_2 的平均回收率分别为 97.63%、96.12%、97.00%、96.17%、96.71%, 符合相关规定, 表明方法准确度良好。

2.7.6 北柴胡及醋北柴胡标准汤剂指标成分的含量测定 分别取北柴胡和醋北柴胡标准汤剂冻干粉, 按“2.5.3”项下方法制备供试品溶液, 按“2.5.1”项下色谱条件测定并计算柴胡皂苷 a, 柴胡皂苷 c, 柴胡皂苷 d、柴胡皂苷 b_1 及柴胡皂苷 b_2 的含量, 结果见表 4, 20 批北柴胡标准汤剂的柴胡皂苷 a、柴

表 4 北柴胡及醋北柴胡标准汤剂中指标成分含量

Table 4 Multi-index components content of CHD and VCHD

批号	柴胡皂苷 a/(mg·g ⁻¹)		柴胡皂苷 c/(mg·g ⁻¹)		柴胡皂苷 d/(mg·g ⁻¹)		柴胡皂苷 b_1 /(mg·g ⁻¹)		柴胡皂苷 b_2 /(mg·g ⁻¹)	
	CHD	VCHD	CHD	VCHD	CHD	VCHD	CHD	VCHD	CHD	VCHD
S1	5.75	4.28	1.73	1.24	0.20	0.13	3.35	6.32	20.83	28.27
S2	5.63	3.61	1.65	1.16	0.19	0.12	4.26	6.66	20.76	21.07
S3	5.78	5.63	1.75	1.71	0.20	0.20	3.34	5.31	20.86	29.74
S4	6.20	5.90	2.24	2.14	0.21	0.20	4.13	6.69	22.91	22.15
S5	5.64	5.32	1.66	1.57	0.20	0.19	5.27	6.31	20.80	28.92
S6	5.73	3.59	1.55	0.72	0.47	0.16	6.24	8.17	30.81	24.13
S7	5.70	3.28	1.99	0.58	0.49	0.14	7.44	8.16	31.54	22.33
S8	6.22	3.48	2.20	0.62	0.56	0.16	7.77	6.17	34.99	23.45
S9	6.19	6.09	2.14	2.10	0.55	0.54	7.75	7.19	34.89	22.62
S10	5.54	3.21	2.00	0.58	0.43	0.14	6.72	9.14	29.41	21.89
S11	5.97	3.57	1.50	0.98	0.34	0.10	10.40	9.28	23.06	29.76
S12	5.03	4.07	0.83	1.21	0.23	0.10	7.45	8.15	25.58	34.69
S13	5.51	3.45	1.22	1.17	0.29	0.08	8.37	8.27	29.24	28.63
S14	5.53	4.18	1.23	1.06	0.29	0.10	8.27	8.16	29.40	34.99
S15	5.05	4.19	1.35	0.78	0.26	0.10	7.56	9.16	25.68	35.24
S16	5.28	3.88	3.80	2.83	0.65	0.16	9.81	10.79	32.83	38.86
S17	4.90	4.63	3.51	3.24	0.30	0.20	8.14	9.68	30.01	48.63
S18	5.19	3.94	3.60	2.91	0.56	0.15	9.45	9.68	32.78	39.76
S19	5.23	4.89	3.64	3.38	0.58	0.34	9.53	8.90	32.74	51.37
S20	5.16	4.75	3.60	3.37	0.56	0.15	9.50	9.78	32.65	49.67

胡皂苷 c、柴胡皂苷 d、柴胡皂苷 b₁ 及柴胡皂苷 b₂ 质量分数分别为 4.90~6.22、0.83~3.80、0.19~0.65、3.34~10.40、20.76~34.99 mg/g, 均值分别为 5.56、2.16、0.38、7.24、28.09 mg/g。20 批醋北柴胡标准汤剂的柴胡皂苷 a、柴胡皂苷 c、柴胡皂苷 d、柴胡皂苷 b₁ 及柴胡皂苷 b₂ 质量分数范围分别在 3.21~6.09、0.58~3.38、0.08~0.54、5.31~10.79、21.07~49.67 mg/g, 均值分别为 4.30、1.67、0.17、8.10、31.81 mg/g。

表 5 北柴胡及醋北柴胡标准汤剂指标成分含量差异性分析 ($\bar{x} \pm s, n = 20$)

Table 5 Analysis of differences of index components in CHD and VCHD ($\bar{x} \pm s, n = 20$)

样品	质量分数/(mg·g ⁻¹)				
	柴胡皂苷 a	柴胡皂苷 c	柴胡皂苷 d	柴胡皂苷 b ₁	柴胡皂苷 b ₂
CHD	5.562±0.399	2.160±0.939	0.378±0.160	7.238±2.173	28.089±5.050
VCHD	4.297±0.881*	1.668±0.987*	0.173±0.103*	8.099±1.489*	31.809±9.672*

与 CHD 比较: * $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs CHD

($P < 0.05$)。

3 讨论

3.1 饮片的收集

北柴胡主产区和道地产区为陕西省, 河北、河南、山西及吉林等地, 本实验收集的 20 批北柴胡来源于道地产区、主产区及集散地共 4 个产地, 实验取材在一定程度上能够涵盖药材市场实际情况, 使本实验的标准汤剂具有较好的代表性, 可用于后续质量评价研究。

3.2 指纹图谱差异性分析

本研究分别建立北柴胡及醋北柴胡标准汤剂 HPLC 指纹图谱, 分别确认了 16 个共有峰, 对指纹图谱进行相似度评价, 各批次相似度结果均良好。为进一步分析北柴胡与醋北柴胡标准汤剂, 寻找二者差异性成分, 本实验引入化学计量学方法, 通过 PCA 和 OPLS-DA 分析确定指纹图谱中 7 个具有显著差异的色谱峰, 通过对照品指认峰 4 为柴胡皂苷 c, 峰 7 为柴胡皂苷 a, 峰 9 是柴胡皂苷 b₂, 峰 10 为柴胡皂苷 b₁, 峰 13 为柴胡皂苷 d, 峰 1 及峰 6 尚未知, 后续将会进一步采用液质联用手段对其进行鉴定, 以便更好地对北柴胡及醋北柴胡标准汤剂进行质量控制。

3.3 含量测定差异性分析

北柴胡中皂苷类化合物是其主要化学成分, 也是其发挥药理药效最重要的成分^[18]。《中国药典》、《香港中药材标准》及各部分地方标准评价柴胡药材

2.7.7 北柴胡及醋北柴胡标准汤剂指标成分含量差异性分析 运用 GraphPad Prism 8.0.1 软件, 采用方差分析分别对北柴胡及醋北柴胡标准汤剂中 5 种指标成分含量进行统计学分析, $P < 0.05$ 表示差异显著, 结果见表 5。结果显示, 北柴胡醋制前后指标成分柴胡皂苷 a、柴胡皂苷 c、柴胡皂苷 d、柴胡皂苷 b₁ 及柴胡皂苷 b₂ 含量均有统计学意义。北柴胡醋制后标准汤剂中柴胡皂苷 a、柴胡皂苷 c、柴胡皂苷 d 含量较低, 柴胡皂苷 b₁、柴胡皂苷 b₂ 含量较高

多以柴胡皂苷 a、柴胡皂苷 d 为质量检测指标。中药饮片是中药制剂的原料药, 本研究对北柴胡饮片及醋柴胡饮片进行含量测定分析, 北柴胡饮片中柴胡皂苷 a、柴胡皂苷 c、柴胡皂苷 d、柴胡皂苷 b₁ 及柴胡皂苷 b₂ 质量分数均值分别为 28.50、2.66、26.36、3.64、3.01 mg/g。醋北柴胡饮片中柴胡皂苷 a、柴胡皂苷 c、柴胡皂苷 d、柴胡皂苷 b₁ 及柴胡皂苷 b₂ 质量分数均值分别为 24.93、2.83、22.69、4.38、5.86 mg/g。结果表明北柴胡饮片醋制后柴胡皂苷 a、柴胡皂苷 d 含量下降, 柴胡皂苷 c 含量无显著变化、柴胡皂苷 b₁ 及柴胡皂苷 b₂ 含量升高。

结合 HPLC 指纹图谱差异分析, 北柴胡及醋北柴胡标准汤剂中共 7 个差异性成分, 为进一步验证差异性结果, 建立其中 5 个化学成分含量测定方法, 对醋制前后标准汤剂含量结果对比分析研究。结果表明北柴胡醋制后标准汤剂中柴胡皂苷 a、柴胡皂苷 c、柴胡皂苷 d 含量下降, 柴胡皂苷 b₁、柴胡皂苷 b₂ 含量升高。

综上所述, 柴胡皂苷 a、柴胡皂苷 c、柴胡皂苷 d、柴胡皂苷 b₁ 及柴胡皂苷 b₂ 含量在各工艺环节(饮片-醋制饮片-标准汤剂)均有变化, 分析原因可能是醋制对各成分的含量存在影响, 在质量传递过程中醋制北柴胡饮片可能会增强其有效成分的溶出, 研究表明^[19-20]柴胡皂苷 a、柴胡皂苷 c、柴胡皂苷 d 的苷元为环氧醚型, 结构中含有 13, 28-环氧键, 属 I 型柴胡皂苷, 在酸性环境中控制温度等

条件可使柴胡皂苷 c 转化为柴胡皂苷 h (II 型柴胡皂苷)。同时有研究表明在水煎液中, 柴胡皂苷 a 及柴胡皂苷 d 结构中 13 和 28 号位的氧醚环结构易断裂, 柴胡皂苷 a、柴胡皂苷 d 会转化为柴胡皂苷 b₁ (II 型柴胡皂苷)、柴胡皂苷 b₂ (II 型柴胡皂苷), 柴胡皂苷 d 结构不稳定, 会转化为大量的柴胡皂苷 b₂, 柴胡皂苷 a 相对于柴胡皂苷 d 较稳定, 但柴胡皂苷 a 在中性环境中转化产物主要是羟基柴胡皂苷 a, 且羟基柴胡皂苷 a 会转化为柴胡皂苷 b₁, 这与现有研究结果相一致^[21-22]。

北柴胡醋制后对二甲苯所致大鼠耳肿胀有拮抗作用^[23-24], 同时能减轻 CCl₄ 造成的小鼠肝损伤, 降低小鼠体内的谷草转氨酶转氨酶和谷丙转氨酶。文献报道^[25], 柴胡皂苷 b₂ 具有同样药理活性, 此外还具有抗凋亡^[26]、抗肿瘤^[27]、抗病毒^[28]等药理作用。由本研究结果推测, II 型柴胡皂苷可能是发挥药理作用的重要成分, I 型柴胡皂苷向 II 型柴胡皂苷的转化可能是引起北柴胡标准汤剂和醋北柴胡标准汤剂差异的主要原因之一, 建议对二者质量控制时应考虑对 I、II 型柴胡皂苷的测定。

3.4 小结

中药饮片标准汤剂作为临床制剂的标准参照物, 为衡量中药配方颗粒是否与临床汤剂基本一致的物质基准, 用来标准化不同的临床用药形式, 保障用药的准确性和剂量的一致性, 具有重大的现实意义。

北柴胡与醋柴胡的标准汤剂作为相关成型制剂与传统汤剂的中间桥梁, 在配方颗粒、中成药、经典名方等制剂生产过程有着十分重要的地位。本研究从北柴胡及醋北柴胡标准汤剂的 pH 值、出膏率、HPLC 指纹图谱和多指标成分含量测定方法入手, 全面对二者质量进行分析, 建立了科学和实用的北柴胡及醋北柴胡标准汤剂质量评价方法, 为二者相关制剂的鉴别和质量控制提供参考。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 陈士林. 标准汤剂——提升中药配方颗粒质量的重要桥梁 [N]. 中国医药报, 2021-03-09(003).
- [2] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 280.
- [3] 夏召弟, 刘霞. 北柴胡化学成分及质量控制方法研究进展 [J]. 中国现代中药, 2021, 23(5): 940-949.
- [4] 黄海强. 柴胡属植物化学成分和质量控制研究及天目藜芦化学成分研究 [D]. 上海: 第二军医大学, 2010.

- [5] 陈朝, 伍小燕. 柴胡有效成分提取分离方法的研究进展 [J]. 实用临床医药杂志, 2011, 15(19): 190-192.
- [6] Yu M, Chen H, Liu S H, et al. Differential expression of genes involved in saikosaponin biosynthesis between *Bupleurum chinense* DC. and *Bupleurum scorzonnerifolium* Willd [J]. *Front Genet*, 2020, doi: 10.3389/fgene.2020.583245.
- [7] 李书启. 柴胡疏肝散抗氧化活性及其活性成分柚皮苷药代动力学研究 [D]. 北京: 北京化工大学, 2010.
- [8] 孙婷婷. 北柴胡饮片化学成分及质量标准研究 [D]. 长春: 吉林农业大学, 2020.
- [9] 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): 963-966.
- [10] Zhang W H, Sun X L, Sui W W, et al. Quality control of Xiebai San Standard Decoction assisted by network pharmacology strategy [J]. *Chromatographia*, 2020, 83(9): 873-884.
- [11] 张伟, 陈萍, 朱蕾. 醋制柴胡炮制经验探讨 [J]. 基层医学论坛, 2019, 23(17): 114-115.
- [12] 李军, 姜华, 张延萍, 等. 柴胡水煎液中柴胡皂苷 a 和 d 的溶出与转化差异 [J]. 中国药理学杂志, 2014, 49(19): 1692-1696.
- [13] 中国药典 [S]. 四部. 2020: 251.
- [14] 高文义, 王康宇, 贡济宇, 等. 基于化学模式识别分析的醋北柴胡 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 中药材, 2020(9): 2200-2203.
- [15] 马守芳, 孙江伟, 高晓洁, 等. HPLC-ELSD 同时测定北柴胡中柴胡皂苷 A、C、D、B₁、B₂ 及山奈苷含量 [J]. 沈阳药科大学学报, 2021, 38(8): 821-826.
- [16] 陈士林, 刘安. 《中药饮片标准汤剂》(第二卷) [J]. 北京: 科学出版社, 2019: 8.
- [17] 窦志华, 许波, 居宇峰, 等. 栀子标准汤剂量值传递规律研究 [J]. 中草药, 2021, 52(23): 7162-7175.
- [18] 许磊, 田稷馨, 宋瑞, 等. 柴胡醋制前后柴胡皂苷 a、b₂、c、d 的 LC-MS/MS 法测定及比较 [J]. 中国药科大学学报, 2012, 43(4): 334-340.
- [19] Shimizu K, Amagaya S, Ogihara Y. New derivatives of saikosaponins [J]. *Chem Pharm Bull*, 1985, 33(8): 3349-3355.
- [20] 闵宇航, 王京辉, 范妙璇, 等. 柴胡饮片皂苷类成分变化及质量控制研究 [J]. 药物分析杂志, 2014, 34(5): 836-843.
- [21] 刘树强, 王术玲, 高晓玲, 等. 柴胡水煎过程中皂苷成分的变化规律 [J]. 中药新药与临床药理, 2013, 24(6): 602-606.
- [22] 王丽娜, 汪巍, 徐驰, 等. 柴胡醋制前后抗炎作用比较研究 [J]. 中成药, 2013, 35(5): 1079-1081.

- [23] Li Z Y, Sun H M, Xing J, *et al.* Chemical and biological comparison of raw and vinegar-baked *Radix Bupleuri* [J]. *J Ethnopharmacol*, 2015, 165: 20-28.
- [24] Shin J S, Im H T, Lee K T. Saikosaponin B₂ suppresses inflammatory responses through IKK/I κ B α /NF- κ B signaling inactivation in LPS-induced RAW 264.7 macrophages [J]. *Inflammation*, 2018, 42: 342-353.
- [25] 高子涵, 王红伟, 吕行直, 等. 柴胡皂苷 b₂ 通过抑制线粒体凋亡通路减轻过氧化氢诱导的 L-02 细胞损伤 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2018, 32(7): 543-549.
- [26] Zhao Y, Feng L M, Liu L J, *et al.* Saikosaponin b₂ enhances the hepatotargeting effect of anticancer drugs through inhibition of multidrug resistance-associated drug transporters [J]. *Life Sci*, 231: 116557-116557.
- [27] Lin L T, Chung C Y, Hsu W C, *et al.* Saikosaponin b₂ is a naturally occurring terpenoid that efficiently inhibits hepatitis C virus entry [J]. *J Hepatol*, 2014, 62(3): 541-548.
- [28] Lee W P, Lan K L, Liao S X, *et al.* Antiviral effect of saikosaponin B₂ in combination with daclatasvir on NS5A resistance-associated substitutions of hepatitis C virus [J]. *J Chin Med Assoc*, 2019, 82(5): 368-374.

[责任编辑 郑礼胜]

• 公益广告 •

