

HPLC-ELSD 指纹图谱分析提取与炮制对 柴胡中化学成分的影响

丛梦雨, 龚彦溶, 梁莎碧, 倪洁娜, 王术玲*

(广州中医药大学 中药学院, 广州 510006)

[摘要] **目的:**建立柴胡 HPLC-ELSD 指纹图谱,分析柴胡主要成分在提取和炮制过程中的变化规律。**方法:**色谱条件为 Phenomenex Kinetex[®] C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈(A)-水(B)梯度洗脱(0~60 min, 25%~58% A),柱温 30 ℃,流速 1.0 mL·min⁻¹,进样量 10 μL,检测器为蒸发光检测器,氮气流速 3.0 mL·min⁻¹;以此色谱条件分别对 4 种样品(柴胡水提液、柴胡醇提液、醋柴胡水提液、醋柴胡醇提液)进行指纹图谱研究,并测定柴胡皂苷 a, d, b₁, b₂ 的含量。**结果:**得到 4 种柴胡样品指纹图谱,共指认 23 个色谱峰,各样品的指纹图谱共有模式图不尽相同,成分色谱峰存在较大差异。柴胡经水提加热回流或醋炙后会使得原生皂苷向次生皂苷转化,其中醋柴胡水提液中的原生皂苷含量最少,次生皂苷含量最多,柴胡醇提液中次生皂苷含量最少。**结论:**所建立的 HPLC-ELSD 指纹图谱可作为柴胡化学成分分析测定的方法;柴胡经水提或醋炙后化学成分变化较大,含柴胡制剂的临床使用及质量评价应充分考虑到柴胡皂苷类成分的转变情况。

[关键词] 柴胡; 指纹图谱; 炮制; 提取; 皂苷类; 醋制

[中图分类号] R22; R283; R94; R284; O657.7 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)07-0013-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20180804

Effect of Extraction and Processing on Chemical Constituents in Bupleuri Radix by HPLC-ELSD Fingerprint

CONG Meng-yu, GONG Yan-rong, LIANG Sha-bi, NI Jie-na, WANG Shu-ling*

(School of Pharmaceutical Sciences, Guangzhou University of Chinese Medicine,
Guangzhou 510006, China)

[Abstract] **Objective:** To establish the HPLC-ELSD fingerprint of Bupleuri Radix and analyze the change rule of the main components from Bupleuri Radix in extraction and processing. **Method:** Phenomenex Kinetex[®] C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) was employed with the mobile phase of acetonitrile-water for gradient elution. The flow rate was 1.0 mL·min⁻¹, column temperature was 30 ℃ and the injection amount was 10 μL. Evaporative light scattering detector was adopted with the flow rate of nitrogen was 3.0 mL·min⁻¹. These chromatographic conditions were used to study on fingerprints of four kinds of samples and determine the contents of saikosaponin a, d, b₁, b₂. **Result:** A total of 23 chromatographic peaks were identified in the fingerprints of four samples of Bupleuri Radix. The common patterns of fingerprints were different from each other and there was a big difference between chromatographic peaks. After high temperature water extraction or processing with vinegar, the primary saponin of Bupleuri Radix was transformed into secondary saponin. Among them, the primary saponin content in the water extract of Bupleuri Radix processed with vinegar was the least, the content of secondary saponin was the most; and the content of secondary saponin was the least in methanol extract of Bupleuri Radix.

[收稿日期] 20170925(021)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81774193);广东省自然科学基金项目(2017A030313716);广州市科技计划项目(201707010443);广州中医药大学青年英才工程项目(QNYC20140109)

[第一作者] 丛梦雨,在读硕士,从事中药质量标准研究,E-mail:suismoiyu@163.com

[通信作者] *王术玲,教授,从事中医药防治代谢性疾病研究,E-mail:jingelwang@gzucm.edu.cn

Conclusion: The established HPLC-ELSD fingerprint can be used as a chemical component analysis method for Bupleuri Radix. The chemical compositions of Bupleuri Radix are greatly changed after water extraction or processing with vinegar. The clinical application and quality evaluation of preparations containing Bupleuri Radix should take into full account of change of saikosaponins.

[Key words] Bupleuri Radix; fingerprint; processing; extraction; saponins; processing with vinegar

柴胡味苦,性微寒,归肝、胆、肺经,具有疏散退热、疏肝解郁、升举阳气等作用^[1],为临床及制剂常用中药材,在中医临床应用已有2 000余年的悠久历史,并以汤剂为主要用药形式。在2015年版《中国药典》(一部)中收载有醋炙的炮制方法。现代研究认为,柴胡皂苷类是柴胡的主要成分,其中柴胡皂苷a和柴胡皂苷d为柴胡中的原生皂苷^[2],其结构不稳定,在煎煮或炮制过程中易发生结构转变,生成次生皂苷,如柴胡皂苷a降解为柴胡皂苷b₁,柴胡皂苷d降解为柴胡皂苷b₂^[3]。

除了已知的几种柴胡皂苷类成分的结构转化,其余化学成分在提取或炮制过程中的变化情况及其规律需借助指纹图谱技术进行深入研究。考虑到柴胡原生皂苷无明显紫外吸收峰,本实验拟建立柴胡的HPLC-ELSD指纹图谱,对柴胡水提液、柴胡醇提液、醋柴胡水提液、醋柴胡醇提液4种样品进行指纹图谱比较及其柴胡皂苷a, d, b₁, b₂的含量比较,探索柴胡经水提、醇提及醋炙后的化学成分变化规律,为柴胡的制剂生产、质量评价及临床使用提供参考。

1 材料

Nexera X2型高效液相色谱仪(日本岛津公司),ELSD 6000型蒸发光散射检测器(美国奥泰科技有限公司),DE-200 g型万能粉碎机(浙江红景天工贸有限公司),SC084999型实验室专用超纯水机(四川优普超纯科技有限公司),BP211D型电子分析天平(德国赛多利斯公司),TC-15型套式恒温器(海宁市新华医疗器械厂,恒温范围50~200℃,规格250 mL,电压220 V,功率130 W)。

柴胡皂苷a, b₁, b₂, d(SSa, SSb₁, SSb₂, SSd)对照品(成都曼思特生物科技有限公司,批号分别为MUST-1508014, MUST-15080110, MUST-15082505, MUST-15062114,纯度均>98.5%);柴胡饮片(产地湖北,广州至信中药饮片有限公司,生产批号160201,经广州中医药大学中药学院中药鉴定实验室黄海波教授鉴定为伞形科植物柴胡*Bupleurum chinense*的干燥根),醋柴胡(自制,用上述柴胡饮片参照2015年版《中国药典》柴胡项下方法制备),乙

腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Phenomenex Kinetex® C₁₈色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm),流动相乙腈(A)-水(B)梯度洗脱(0~60 min, 25%~58% A),柱温30℃,流速1.0 mL·min⁻¹,进样量10 μL,检测器为蒸发光检测器,氮气流速3.0 mL·min⁻¹。

2.2 对照品溶液的制备 精密称取干燥至恒重的各柴胡皂苷类成分对照品适量,分别加甲醇溶解并定容于50 mL量瓶中,超声使其充分溶解,得SSa, SSb₁, SSb₂, SSd质量浓度分别为0.273, 0.403 2, 0.388, 0.258 g·L⁻¹的对照品溶液。分别精密量取SSa, SSb₁, SSb₂, SSd对照品溶液800, 100, 500, 500 μL,置于2 mL量瓶中,加甲醇定容至刻度,摇匀,得混合对照品溶液。

2.3 醋柴胡饮片的制备^[4] 称取北柴胡片约5 g,加入米醋1 g,拌匀,闷润至醋被吸尽,置炒制容器用文火加热,炒干,取出晾凉,即得。

2.4 供试品溶液的制备^[1,5-6]

2.4.1 水提法 取样品粉末(过四号筛)约0.2 g,精密称定,精密加水25 mL,超声处理(300 W, 40 kHz,下同)1 h,滤过,加水5 mL洗涤滤渣,合并滤液,用水饱和正丁醇提取5次,每次25 mL,合并正丁醇提取液,水浴80℃挥干,残渣加甲醇溶解后转移至2 mL量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,用0.22 μm微孔滤膜滤过,即得。

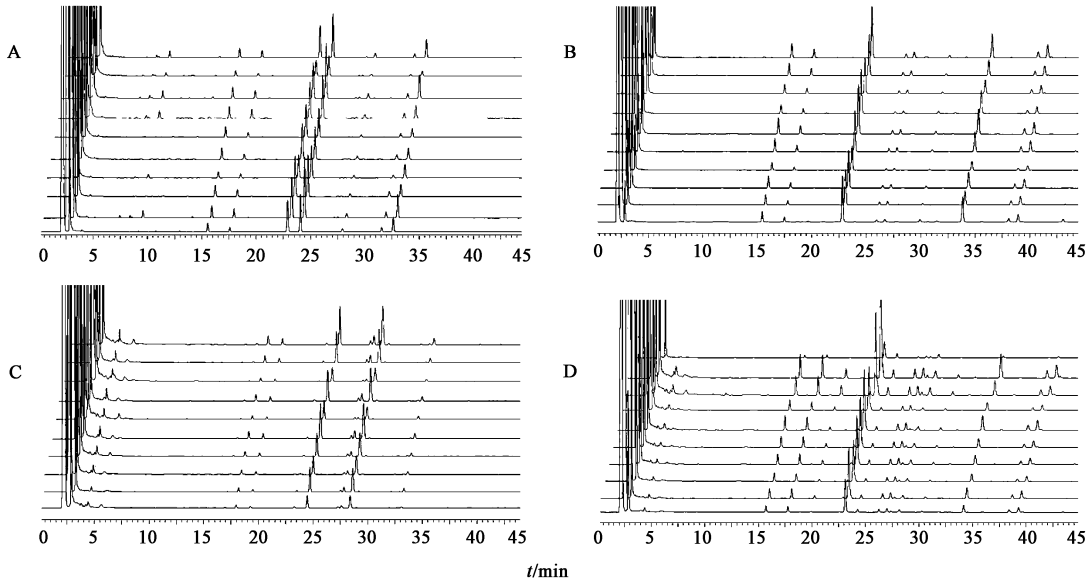
2.4.2 醇提法 取样品粉末(过四号筛)约0.2 g,精密称定,精密加甲醇25 mL,超声处理1 h,滤过,加甲醇5 mL洗涤滤渣,合并滤液,置80℃水浴挥干,残渣加水30 mL使溶解,用水饱和正丁醇提取5次,每次25 mL,合并正丁醇提取液,水浴80℃挥干,残渣加甲醇溶解后转移至2 mL量瓶,加甲醇稀释至刻度,摇匀,用0.22 μm微孔滤膜滤过,即得。

2.5 指纹图谱的建立和分析

2.5.1 指纹图谱的建立 按照2.4项下方法分别制备10份柴胡水提液、柴胡醇提液、醋柴胡水提液、醋柴胡醇提液的供试品溶液,按2.1项下色谱条件测定,记录色谱图,见图1,分别导入“中药色谱指纹

图谱相似度评价系统”(2004A 版)软件,结果发现 4

种柴胡样品的 10 个批次间相似度均 > 0.990。



A. 柴胡水提液; B. 柴胡醇提液; C. 醋柴胡水提液; D. 醋柴胡醇提液(图 2 同)

图 1 4 种样品的 HPLC-ELSD 指纹谱

Fig. 1 HPLC-ELSD fingerprints of 4 samples

2.5.2 指纹图谱的方法学考察 按 2.4 项下方法制备供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件连续进样 6 次,记录指纹图谱。运用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2004A 版)软件计算相似度,计算各色谱峰相对峰面积的相似度 RSD 0.1%,表明仪器的精密度良好。按 2.4 项下方法制备供试品溶液,分别按 2.1 项下色谱条件于制备后 0,1,2,4,6,8 h 进样分析,记录指纹图谱。采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2004A 版)软件计算相似度,计算不同时间色谱峰相对峰面积的相似度 RSD 0.1%,表明供试品溶液在 8 h 内稳定。按 2.4 项下方法平行制备 6 份供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件进样分析,记录指纹图谱。运用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2004A 版)软件计算相似度,计算色谱峰相对峰面积的相似度 RSD 0.4%,表明该分析方法重复性良好。

2.5.3 指纹图谱色谱峰的指认 将 4 种柴胡样品的 10 批次色谱图分别导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2004A 版)软件,选择平均数法为图谱生成方法,时间窗设定 0.1 min,经数据剪切、多点校正、自动匹配后生成各自的指纹图谱共有模式,见图 2。选择峰面积占总峰面积的比例 > 1% 的色谱峰进行指认,结果发现柴胡水提液、柴胡醇提液、醋柴胡水提液及醋柴胡醇提液的共有色谱峰分别为 14,12,14,19 个。

2.5.4 样品指纹图谱成分的比较 以 SSd 为参照峰,分别计算 4 种样品的共有模式图中各色谱峰的相对保留时间,并按保留时间顺序统一进行色谱峰编号,见图 2,4 种柴胡样品指纹图谱共指认 23 个色谱峰,其中 9 号峰为 SSa,10 号峰为 SSb₂,15 号峰为 SSb₁,20 号峰为 SSd,各样品间成分对比见表 1。整体看起来 4 张共有模式色谱图不尽相同,成分色谱峰存在较大差异。柴胡水提液与醋柴胡水提液色谱图比较相似;柴胡醇提液的色谱峰数最少,醋柴胡醇提液的色谱峰数最多。在指认的这 23 个色谱峰中,4 种提取液共同包含峰 3,峰 5,峰 9(SSa),峰 13,峰 15(SSb₁),峰 18 和峰 20(SSd)7 个色谱峰,峰 11 为柴胡醇提液特有,峰 7,峰 8 和峰 12 为醋柴胡醇提液特有,峰 4 为醋柴胡水提液特有。水提样品与醇提样品相比较,醇提样品具有特征峰 21~23,而水提样品则没有;水提样品具有特征峰 2,16,而醇提样品则没有,说明峰 21~23 在水提过程中发生降解,而峰 2,16 则是在水提过程中新生成的。醋炙柴胡与柴胡生品相比较,醋制品具有特征色谱峰 19,提示峰 19 是炮制过程中生成的新成分。

2.6 指标成分的含量测定

2.6.1 标准曲线的制备 取 2.2 项下制备的混合对照品溶液,分别进样 2,5,10,15,20,30 μL ,按 2.1 项下色谱条件测定,以进样量对数为横坐标,峰面积对数为纵坐标,绘制标准曲线,得 SSa, SSb₁, SSb₂,

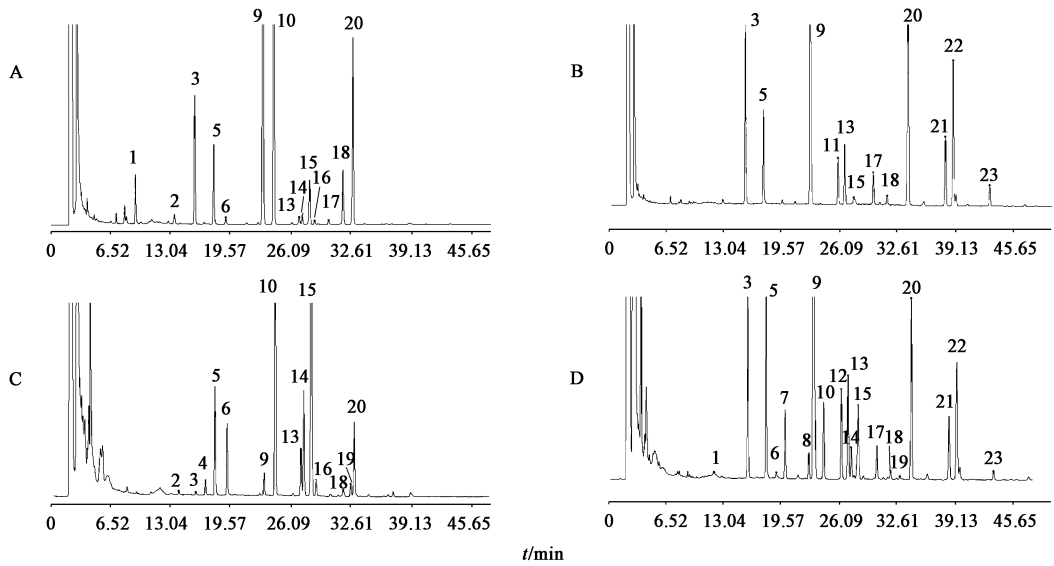


图 2 柴胡样品的 HPLC-ELSD 共有模式
Fig. 2 Common pattern of different samples

表 1 柴胡样品的 HPLC 色谱峰数对比

Table 1 Comparison of chromatographic peaks of each sample

峰号	成分	t_R /min	柴胡 醇提液	柴胡 水提液	醋柴胡 醇提液	醋柴胡 水提液
1		9.28	-	+	+	-
2		13.54	-	+	-	+
3		15.69	+	+	+	+
4		16.90	-	-	-	+
5		17.75	+	+	+	+
6		19.08	-	+	+	+
7		19.97	-	-	+	-
8		22.64	-	-	+	-
9	SSa	23.08	+	+	+	+
10	SSb ₂	24.35	-	+	+	+
11		25.95	+	-	-	-
12		26.31	-	-	+	-
13		27.02	+	+	+	+
14		27.46	-	+	+	+
15	SSb ₁	28.16	+	+	+	+
16		28.83	-	+	-	+
17		30.16	+	+	+	-
18		31.76	+	+	+	+
19		32.83	-	-	+	+
20	SSd	33.51	+	+	+	+
21		38.29	+	-	+	-
22		39.16	+	-	+	-
23		43.30	+	-	+	-

SSd 线性回归方程分别为 $Y = 1.46X + 5.415$ ($r = 0.9964$), $Y = 1.62X + 5.317$ ($r = 0.9957$), $Y = 1.484X + 5.591$ ($r = 0.9971$), $Y = 1.646X + 5.346$

($r = 0.9971$), 线性范围依次为 0.2184 ~ 3.276, 0.0403 ~ 0.6048, 0.194 ~ 2.910, 0.129 ~ 1.935 μg 。混合对照品溶液的 HPLC 色谱见图 3。

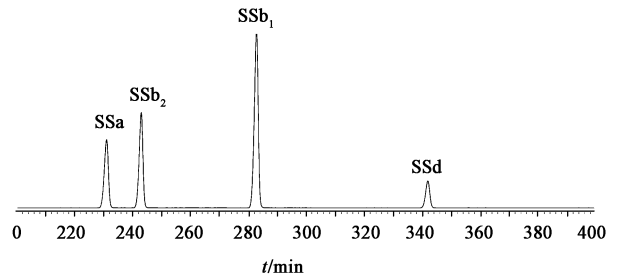


图 3 混合对照品溶液的 HPLC
Fig. 3 HPLC chromatogram of mixed reference solution

2.6.2 精密度试验 取同一柴胡水提液,按 2.1 项下色谱条件连续进样 6 次,记录指纹图谱,计算各主要色谱峰的相对峰面积,结果 SSa, SSb₁, SSb₂ 和 SSd 相对峰面积的 RSD 分别为 0.4%, 1.3%, 1.1% 和 0.5%,表明仪器精密度较好。

2.6.3 稳定性试验 取同一柴胡水提液,分别在制备后 0, 1.5, 3, 4.5, 6, 7.5 h 按 2.1 项下色谱条件测定,结果 SSa, SSb₁, SSb₂ 和 SSd 相对峰面积的 RSD 依次为 0.4%, 1.3%, 1.1%, 0.5%,表明供试品溶液在常温下放置 7.5 h 稳定性良好。

2.6.4 重复性试验 按 2.4 项下方法平行制备 6 份柴胡水提液。按 2.1 项下色谱条件测定,结果 SSa, SSb₁, SSb₂ 和 SSd 相对质量分数分别为 34.67%, 9.46%, 29.36%, 26.51%, RSD 分别为 1.3%, 1.9%, 2.2%, 1.4%。表明该方法重复性良好。

2.6.5 样品测定 按 2.4 项下方法分别制备柴胡水提液、柴胡醇提液、醋柴胡水提液、醋柴胡醇提液的供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件测定,结果见表 2。同时将 SSa 与 SSd 的含量之和作为原生皂苷含

量,将 SSb₁ 与 SSb₂ 的含量之和作为次生皂苷含量,对 4 种样品中的原生皂苷与次生皂苷含量进行对比分析,结果见表 2。

由表 2 可知,在 4 种提取液中,醋柴胡水提液中

表 2 柴胡样品中 SSa,SSb₁,SSb₂ 和 SSd 的质量分数($\bar{x} \pm s, n = 10$)

样品	SSa	SSd	SSb ₁	SSb ₂	原生皂苷	次生皂苷
柴胡醇提液	1 708.0 ± 43	1 119.0 ± 53	154.2 ± 7	-	2 827 ± 91	154 ± 7
柴胡水提液	1 785.0 ± 55	943.4 ± 45	472.2 ± 25	1 299.0 ± 64	2 728 ± 68	1 771 ± 86
醋柴胡醇提液	2 378.0 ± 70	895.0 ± 35	583.2 ± 36	303.8 ± 17	3 273 ± 102	886 ± 53
醋柴胡水提液	212.8 ± 3	573.8 ± 37	2 011.0 ± 60	1 209.0 ± 51	785 ± 40	3 220 ± 110

的原生皂苷总量最少,其余 3 种相差不大;而次生皂苷总量方面,醋柴胡水提液最多,柴胡醇提液中最少,说明加热水提和醋炙均可促进原生皂苷向次生皂苷转化,作用力度相当,两者叠加作用(醋柴胡水提)则达到最大值。与柴胡醇提液相比,柴胡水提液中次生皂苷 SSb₁ 和 SSb₂ 含量大幅增加,说明加热水提可促使次生柴胡皂苷生成。这一点在醋柴胡上表现更为明显,与醇提液相比,其水提液中原生皂苷 SSa 和 SSd 均大量降解,相应生成大量次生皂苷 SSb₁ 和 SSb₂。进行醋炙影响的对比时发现,柴胡炮制品的醇提液比生品的醇提液中 SSb₁ 和 SSb₂ 含量明显增加,说明醋炙与加热水提相似,都可促使柴胡次生皂苷的生成。结合图 2 可知,醋柴胡水提液与柴胡水提液的指纹图谱成分相似,但成分含量比例不同,最大的区别就是炮制品中 SSa 大量降解,而相应生成的 SSb₁ 含量则大量升高,4 种皂苷在柴胡水提液中的质量分数顺序为 SSa > SSb₂ > SSd > SSb₁,在醋柴胡水提液中排序则为 SSb₁ > SSb₂ > SSd > SSa。

3 讨论

本研究采用 HPLC 建立了不同柴胡炮制品水提液和醇提液的指纹图谱,并分别对其进行分析和比较;建立的方法精密度、重复性和稳定性均良好,其数据结果可有效反映不同处理方法的质量差异。系统地研究了柴胡水提液、柴胡醇提液、醋柴胡水提液、醋柴胡醇提液 4 种样品中柴胡化学组分的变化。虽然已有研究表明柴胡皂苷间的转化规律为 SSa 转化为 SSb₁,SSd 转化为 SSb₂,但本研究表明与醇提相比,柴胡水提过程中 SSa 含量不变,SSd 小幅减少,但却生成了大量的 SSb₁ 和 SSb₂,说明另有其他成分转化生成了 SSb₁ 和 SSb₂;研究柴胡醋炙过程发现,

与生柴胡相比,醋柴胡醇提液中 SSa 和 SSb₁ 含量都是增多的,印证了次生皂苷 SSb₁ 和 SSb₂ 的来源不一定局限于 SSa,SSd;另一方面,SSd 在醋炙后比生品少,但二者的 SSb₂ 含量相当,说明 SSd 也不一定只转化生成 SSb₂,也会降解成为其他化合物,或者 SSb₂ 也会进一步再降解。揭示了柴胡皂苷的转化规律及影响其转化的因素,对于中药材质量控制、分析临床药效的物质基础、制订质量标准具有一定的参考价值。不足之处在于柴胡皂苷结构不稳定,这些皂苷在体内的生物利用情况及药理作用还未作研究。现拟比较柴胡不同炮制品在指纹图谱和化学成分变方面的差异,关于其他炮制方法对柴胡中柴胡皂苷等成分的影响还需进一步探讨。

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:281.
- [2] ZHOU Y, WANG Y L, MA Z Q, et al. Chromatographic fingerprint analysis of Bupleuri Radix by HPLC-ELSD [J]. 中国药学:英文版,2013,22(1):40-46.
- [3] 李军,姜华,张延萍,等. 柴胡汤剂中次生柴胡皂苷结构研究[J]. 中国中药杂志,2012,37(20):3078-3082.
- [4] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 四部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:31.
- [5] 薛文峰,刘长利,张淑华,等. 柴胡药材中的矿质元素与有效成分的相关性分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2017,23(8):45-49.
- [6] 赵建军,高晓娟,雍婧姣,等. 宁夏产柴胡药材与其对照药材的 HPLC 指纹图谱及近红外光谱比较[J]. 中国实验方剂学杂志,2017,23(8):50-56.

[责任编辑 刘德文]