

均明显升高 ( $P < 0.01$ ), 说明哮喘模型大鼠炎症反应较强; 经过治疗后, 均明显降低, 说明炎症反应减轻, 其中高、中剂量药物及地塞米松均可降低显著模型大鼠肺泡灌洗液中的 WBC 及 EOS ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。

表 1 各组支气管肺泡灌洗液中白细胞及嗜酸性粒细胞的变化

组别	大鼠/ 只	WBC 总数/ ( $\times 10^9 \cdot L^{-1}$ )	嗜酸性粒细胞/ %	计数/ ( $10^9 \cdot L^{-1}$ )
畅肺防喘方				
大剂量组	10	$2.89 \pm 2.43^{*1}$	$0.09 \pm 0.22^{*1}$	$1.86 \pm 3.44^{*1}$
中剂量组	10	$4.30 \pm 2.35^{*2}$	$0.14 \pm 0.13^{*1}$	$3.07 \pm 2.79^{*1}$
小剂量组	10	$4.06 \pm 1.59^{*2}$	$0.19 \pm 0.15^{*1}$	$4.83 \pm 5.11^{*1}$
阳性对照组	10	$5.35 \pm 3.37^{*2}$	$0.09 \pm 0.07^{*1}$	$1.48 \pm 1.61^{*1}$
模型对照组	10	$10.35 \pm 5.57^{*3}$	$1.31 \pm 0.84^{*3}$	$12.59 \pm 4.89^{*3}$
正常对照组	10	$1.02 \pm 0.53$	$1.67 \pm 1.64$	$0.02 \pm 0.02$

与模型对照组比较,  $^{*1} P < 0.01$ ,  $^{*2} P < 0.05$ ; 与正常对照组比较,  $^{*3} P < 0.01$

#### 4 讨论

哮喘是一种呼吸道炎症和气道高反应性疾病, 气道炎症主要表现为支气管-肺泡和小血管周围水肿及炎症细胞浸润, 其中以 EOS 渗出浸润为主。EOS 在肥大细胞释放的过敏性嗜酸性粒细胞趋化因子作用下, 可在反应部位聚集, EOS 内颗粒中含有的主要碱性蛋白, 对正常组织有损伤作用。EOS 产生的血管活性的脂类递质, 对肥大细胞和嗜碱性粒细胞介导的炎症起到增强作用进而损伤炎症组织。EOS 的产生和活化受控于 TH<sub>2</sub> 细胞。它分泌的白细胞介素 (IL)-5 是嗜酸性粒细胞的活化

因子, IL-5 使静息的 EOS 转化为活化型<sup>[1]</sup>, 最终哮喘患者气道部位毛细血管通透性升高, 腺体分泌增加, 平滑肌收缩等引起气道炎症和高反应性。本实验显示, 模型对照组支气管肺泡灌洗液中 WBC 总数和 EOS 数量增加, 提示哮喘模型制作成功, 模型反映出 EOS 水平升高后的相应表现。

畅肺防喘方中炙麻黄宣泄肺气散邪以平喘, 桑白皮泄肺清热而平喘, 二者宣泄清降、肺气通畅共为君药。黄芩、地龙等清郁热化伏痰, 止咳平喘, 共为臣药。莱菔子、神曲、桔梗行肺气化大肠之滞、和肺肠脏腑表里之气使肺气通畅共为佐药。诸药合用有清热化痰、宣肺平喘之功。研究表明, 麻黄中的麻黄碱可作用于平滑肌, 使支气管舒张<sup>[2]</sup>; 地龙、黄芩等中药具有较好抗气道炎症性和降低气道炎反应性作用<sup>[3]</sup>。实验表明, 畅肺防喘方可显著抑制哮喘大鼠 BALF 中炎症细胞上升, 尤其是对 EOS 的抑制作用较为明显, 说明其治疗和预防作用可能通过降低炎症反应, 降低 EOS 水平, 起到抗气道炎症反应作用, 为畅肺防喘方治疗支气管哮喘的临床应用提供了有力的实验依据。

[DOI]10.3870/yydb.2009.04.011

#### [参考文献]

- [1] 赵孟辉, 张丽芬, 张纬萍, 等. 大鼠哮喘模型中气道炎症的定量研究[J]. 浙江医科大学学报, 1997, 26(3): 100-102.
- [2] 邵海生, 祝宝刚. 苏麻胶囊对哮喘大鼠肺泡灌洗液中白细胞及的影响[J]. 中医学刊, 2003, 21(10): 1719.
- [3] 张建军, 王莲芸, 阳志晖, 等. 双龙胶囊对哮喘大鼠肺功能的影响及其作用机制[J]. 中国中药杂志, 2007, 32(2): 126-129.

## 不同产地狭叶柴胡的化学模式识别研究

李 辉

(华中科技大学同济医学院附属同济医院药学部, 武汉 430030)

[摘要] 目的 建立狭叶柴胡药材质量评价的化学模式识别方法。方法 采用反相高效液相色谱(RP-HPLC)法定量分析国内 10 个不同产地狭叶柴胡样品中 3 种柴胡皂苷的含量, 以系统聚类分析法对其进行化学模式识别研究。结果 10 个产地的狭叶柴胡样品按其质量等级划分为 3 类, 其中河南、四川产狭叶柴胡药材中指标成分含量较高。结论 该方法可用于狭叶柴胡药材的质量评价。

[关键词] 狭叶柴胡; 柴胡皂苷; 化学模式识别; 系统聚类分析

[中图分类号] R282.4 [文献标识码] A [文章编号] 1004-0781(2009)04-0440-03

### Studies on Chemical Pattern Recognition Assessment from Different Habitats of *Bupleurum Scorzoneri Folium* Willd.

LI Hui (Department of Pharmacy, Tongji Hospital Affiliated with Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China)

**ABSTRACT Objective** To establish a system of chemical pattern recognition on the quality assessment of *Bupleurum scorzoneri folium* Willd. **Methods** The content of saikosaponin a, c, d in *Bupleurum scorzoneri folium* Willd. Samples from 10 different areas in China was determined by RP-HPLC method. The chemical data were dealt with hierarchical clustering analysis. **Results** The 10 samples from different habitats were classified as 3 categories according to its quality. The content of active components in *Bupleurum scorzoneri folium* Willd. samples from henan and sichuan was relatively higher than that from other habitats. **Conclusion** This method is feasible to evaluate the quality of *Bupleurum scorzoneri folium* Willd.

**KEY WORDS** *Bupleurum scorzoneri folium* Willd. ; Saikosaponin ; Chemical pattern recognition ; Hierarchical clustering analysis

狭叶柴胡 (*Bupleurum scorzoneri folium* Willd.) 系伞形科 (Umbelliferae) 柴胡属 (*Bupleurum*) 植物的干燥根, 习称“南柴胡”, 《中华人民共和国药典》2005 年版一部收载为正品柴胡以供药用, 具有和解表里、疏肝、升阳之功效, 常用于感冒发热、寒热往来、胸胁胀痛等症, 为中医治疗少阳证的首选要药<sup>[1]</sup>。由于我国狭叶柴胡资源分布广泛, 产地的自然环境差异大, 现行《中华人民共和国药典》尚未规定其含量测定标准, 为考察不同产地狭叶柴胡的质量情况, 笔者采用反相高效液相色谱 (RP-HPLC) 法对国内 10 个产地的狭叶柴胡样品进行定量分析, 测定其柴胡皂苷 a (saikosaponin a)、柴胡皂苷 c (saikosaponin c)、柴胡皂苷 d (saikosaponin d) 等指标<sup>[2]</sup>, 并以系统聚类分析对其进行化学模式识别研究, 科学评价其质量, 为优选狭叶柴胡的 GAP 种植产地积累实验数据。

## 1 仪器与试剂

Agilent 1100 型高效液相色谱仪, VWD 型检测器; 柴胡皂苷 a、d 标准品 (中国药品生物制品检定所, 批号: 110777-200303, 110778-200301); 柴胡皂苷 c 标准品 (上海医药工业研究院提供), 实验试剂均为分析纯或色谱纯, 狭叶柴胡药材来源于国内南方 10 个不同产地, 经华中科技大学同济医学院药学院生药教研室张长弓副教授鉴定为伞形科植物狭叶柴胡的干燥根。

## 2 方法与结果

**2.1 色谱条件** 色谱柱: 大连依利特 Hypersil ODS 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-水 (40 : 60); 检测波长: 210 nm; 流速: 1.0 mL · min<sup>-1</sup>; 柱温: 40 °C; 进样量: 10 μL。理论塔板数分别按各标准对照品峰计算, 均不低于 4 000。

**2.2 线性范围考察** 分别精密称取柴胡皂苷 a、c、d 标准品 10.24, 10.52, 10.40 mg, 置于同一 50 mL 量瓶中, 以甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 作为混合标准品储备液。依次吸取储备液 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 5.0 mL, 分别置于 10 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀。依次吸取各标准品溶液 10 μL, 注入高效液相色谱仪, 按上述色谱条件进行分析, 记录各标准品色谱峰面积。以色谱峰面积对标准品浓度作线性回归, 得柴胡皂苷 a、c、d 的回归方程。柴胡皂苷 a 在 10.24 ~ 102.40 μg · mL<sup>-1</sup> 范围内得到线性回归方程为  $A = 27\ 785C + 1\ 387$ ,  $r = 0.999\ 7$ ; 柴胡皂苷 c 在

10.52 ~ 105.20 μg · mL<sup>-1</sup> 范围内得到线性回归方程为  $A = 29\ 212C + 1\ 023$ ,  $r = 0.999\ 8$ ; 柴胡皂苷 d 在 10.40 ~ 104.00 μg · mL<sup>-1</sup> 范围内得到线性回归方程为  $A = 28\ 489C + 974$ ,  $r = 0.999\ 6$ ; 结果表明柴胡皂苷 a、c、d 在所规定的条件下测定其线性关系良好。

**2.3 精密度实验** 精密吸取柴胡皂苷 a、c、d 混合标准溶液 (浓度分别为 20.48, 21.04, 20.80 μg · mL<sup>-1</sup>) 10 μL, 按上述色谱条件测定峰面积, 连续 5 次, 各标准品峰面积 RSD 分别为 1.8%, 1.1%, 1.6% ( $n = 5$ ), 表明本方法精密度良好。

**2.4 重复性实验** 精密称定湖北武汉狭叶柴胡样品粉末, 按供试品溶液制备方法制成 6 份溶液, 按上述色谱条件分别测定。结果表明该样品中柴胡皂苷 a、c、d 的平均含量分别为 0.93%, 0.34%, 0.29%, RSD 分别为 2.1%, 1.6%, 1.1% ( $n = 6$ ), 表明本方法重复性良好。

**2.5 稳定性实验** 精密吸取湖北武汉狭叶柴胡供试品溶液, 于室温下放置, 在不同时间 (0, 2, 4, 8, 12, 24 h) 按上述色谱条件进行测定, 结果表明该样品中柴胡皂苷 a、c、d 含量的 RSD 分别为 2.4%, 2.3%, 2.1% ( $n = 6$ ), 表明本方法制备的供试品溶液放置 24 h 内含量稳定。

**2.6 回收率实验** 精密称取已知柴胡皂苷含量的湖北武汉狭叶柴胡样品粉末 [过筛孔内径 (355 ± 13) μm (三号) 筛] 0.1 g, 共计 9 份, 精密加入柴胡皂苷 a、c、d 混合对照品储备溶液 (浓度分别为 204.8, 210.4, 208.0 μg · mL<sup>-1</sup>) 4.0, 5.0, 6.0 mL, 每个梯度平行作 3 份; 按供试品溶液制备方法制成 9 份溶液, 按上述色谱条件分别测定。结果 3 个不同浓度的加样回收率分别为: 柴胡皂苷 a 为 95.8% (RSD = 2.8%)、97.7% (RSD = 2.1%)、97.1% (RSD = 2.3%); 柴胡皂苷 c 为 98.1% (RSD = 2.1%)、98.5% (RSD = 1.7%)、97.7% (RSD = 1.9%); 柴胡皂苷 d 为 99.1% (RSD = 1.9%)、97.5% (RSD = 2.1%)、98.1% (RSD = 2.4%)。

**2.7 供试品溶液制备方法及其含量测定** 精密称取狭叶柴胡样品粉末 [过筛孔内径 (355 ± 13) μm (三号) 筛] 0.2 g, 加入含 5% 吡啶的甲醇 50 mL, 密塞, 于 70 °C 水浴加热回流 1 h, 放至室温, 过滤, 滤液浓缩, 残渣以甲醇溶解并定容至 25 mL 棕色量瓶中, 摇匀, 以微孔滤膜过滤, 取续滤液作为供试品溶液。精密吸取不同产地狭叶柴胡供试品溶液各 10 μL, 注入高效液相色谱仪中, 按上述色谱条件进行分析, 记录柴胡皂苷 a、c、d 的色谱峰面积, 计算不同产地狭叶柴胡中 3 种柴胡皂苷的含量, 并以总皂苷含量为依据对各产地药材进行初步分级 (总皂苷含量 ≤ 1%, 质量为差;

[收稿日期] 2008-06-10

[作者简介] 李辉 (1975 -), 男, 江西临川人, 主管药师, 硕士, 主要从事天然药物制剂及其分析研究。电话: 027 - 83762515, E-mail: lihuizhlys@yahoo.com.cn。

~3%, 质量为良; 总皂苷含量 >3%, 质量为优)。柴胡皂苷 a、c、d 标准溶液及狭叶柴胡(湖北武汉)供试品溶液 HPLC 色谱图见图 1, 含量结果见表 1。

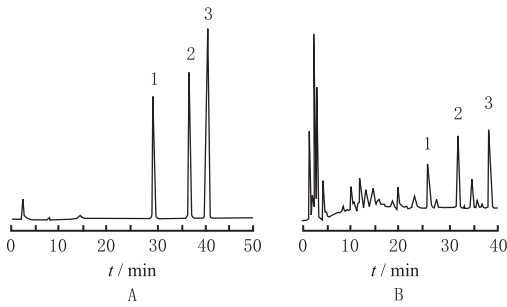


图 1 对照品和狭叶柴胡(湖北武汉)供试品液 HPLC 色谱图

A. 对照品; B. 供试品; 1. 柴胡皂苷 a; 2. 柴胡皂苷 c; 3. 柴胡皂苷 d

表 1 不同产地狭叶柴胡中 3 种柴胡皂苷的含量 %

序号	产地	柴胡皂苷			总皂苷含量	质量等级
		a	c	d		
1	河北易县	0.44	0.19	0.21	0.84	差
2	河北承德	0.72	0.32	0.29	1.33	良
3	河南信阳	0.89	0.45	0.89	2.23	良
4	湖北武汉	0.95	0.32	0.29	1.56	良
5	四川成都	0.83	0.51	0.73	2.07	良
6	河南郑州	0.77	0.48	0.88	2.13	良
7	河南嵩县	1.61	0.55	0.95	3.11	优
8	山西临汾	1.06	0.21	0.47	1.74	良
9	湖北汉川	0.88	0.29	0.31	1.48	良
10	湖北房县	0.42	0.25	0.19	0.86	差

2.8 聚类分析结果 本实验对所得化学数据采用极差法(Range - 1 to 1)进行标准化处理,用欧氏距离平方方法(squared euclidean distance)计算样品间相似性程度,选用中间距离法(median clustering)进行聚类,系统聚类分析结果见图 2。

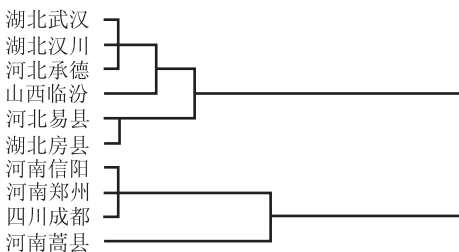


图 2 聚类分析树状图

### 3 讨论

中药的质量评价一直是中药基础研究与应用的重点和难点问题,只有对中药材进行科学地质量控制,才能更好地保证中药饮片及其相关制剂的质量,实现中药安全、有效、稳定、可控,为中药走向世界奠定良好的基础<sup>[3]</sup>。近年来,在有关中药有效物质基础明确的前提下,模式识别技术业已成为评价中药材品质的一种卓有成效的方法,被广泛用于区分中药材的质量等级,鉴别其真伪、优劣等方面,其结果真实客观,消除主观人为因素的偏差<sup>[4,5]</sup>。

本实验采用系统聚类分析法,以 3 种柴胡皂苷的含量为考察指标,对 10 个产地的狭叶柴胡样品进行化学模式识别研究。系统聚类分析将狭叶柴胡药材按质量等级划分为优、良、差 3 类,结果显示大多数产地的狭叶柴胡质量尚可,且与其地域性有较大相关度,质量优良品种大都分布于河南、四川等传统中药材产地。本研究以狭叶柴胡药材中 3 种主要有效成分的含量为评价依据,较单纯以总皂苷含量或任一柴胡皂苷单一指标评价更为科学,避免简单加权所致质量评价误判性,有利于判断各产地药材的相似程度,若今后能够结合其主要药理活性指标,则其质量的模式识别研究将更加系统、全面,值得进一步推广。

[DOI] 10.3870/yydb.2009.04.012

#### [参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[Z]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 198.

[2] 林东昊, 茅仁刚, 王智华, 等. 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.

[3] 谢培山. 基于传统的中药现代化与质量评价——继承与创新[J]. 世界科学技术: 中医药现代化, 2006, 8(3): 8 - 13.

[4] 梁晶, 谢彩娟, 张志琪, 等. 延胡索药材 HPLC 指纹图谱的化学模式识别研究[J]. 药物分析杂志, 2006, 26(12): 1698 - 1701.

[5] 张崇禧, 李金刚, 徐海波, 等. 五味子藤茎化学成分分析及化学模式识别[J]. 中成药, 2007, 29(8): 1190 - 1193.