

柴胡属植物 HPLC 指纹图谱及聚类分析

王 砚^{1,2}, 王书林^{1*}¹成都中医药大学药学院, 成都 611137; ²四川省食品药品检验检测院, 成都 611731

摘要:为给柴胡属植物的合理使用和基源选育提供理论依据, 本文用 HPLC 法建立了北柴胡标准指纹图谱, 确立了 14 个色谱峰为共有峰, 测定了 13 批不同基源柴胡的指纹图谱及相似度, 并对包括北柴胡在内的 23 批柴胡进行聚类分析。实验结果显示 13 批不同基源柴胡相似度均高于 0.8, 与北柴胡具有较高的相似性, 可作为优质柴胡资源进一步研究。聚类分析结果显示竹叶柴胡聚为一类, 北柴胡聚为一类, 马尔康柴胡、马尾柴胡和抱茎柴胡聚为一类, 与竹叶柴胡基源更为接近, 聚类分析结果与传统分类结果具有一致性, 可用于柴胡属植物的基源鉴定。

关键词: 竹叶柴胡; 柴胡属; HPLC 指纹图谱; 相似度; 聚类分析

中图分类号: R946

文献标识码: A

HPLC Fingerprinting and Cluster Analysis of *Bupleurum* PlantsWANG Yan^{1,2}, WANG Shu-lin^{1*}¹Pharmacy College of Chengdu University of Chinese Traditional Medicine, Chengdu 611137, China;²Sichuan Provincial Institute for Food and Drug Control, Chengdu 611731, China

Abstract: In order to provide scientific evidence on rational use and origin select of *Bupleurum* plants, the HPLC standard fingerprint of *Bupleurum chinense* was established and 14 common peaks were confirmed. 13 batches of *Bupleurum* samples were analyzed by similarity evaluation. In addition, cluster analysis was performed with 23 batches of *Bupleurum* samples including *B. chinense*. The results suggested that the degree of similarity were over 0.8, and all of them showed highly similarity to *B. chinense*. It shown that *B. marginatum* can be further studied as a superiority resource of *Bupleurum*. Classification of different *Bupleurum* samples was obtained using systematic cluster method. The results indicated that *B. marginatum* was clustered as one class; *B. chinense* was clustered as one class; *B. malconense*, *B. microcephalum* and *B. longicaule var. amplexicaule* were clustered as one class. This result was consistent with the traditional classification and can be used for the identification of origins of *Bupleurum* samples.

Key words: *Bupleurum marginatum* Wall. ex DC.; *Bupleurum*; HPLC fingerprint; resemblance; cluster analysis

我国柴胡属植物分布广, 种类多, 有 36 种、17 变种、7 变型, 但《中国药典》2010 年版仅收录了北柴胡 (*Bupleurum chinense* DC.) 和狭叶柴胡 (*Bupleurum scorzoniferifolium* Willd.) 两个来源^[1], 其资源远远不能满足市场需求。竹叶柴胡 (*Bupleurum marginatum* Wall. ex DC.) 在中国西南地区分布广泛, 具有悠久的用药历史, 是目前市场上柴胡药材的主要来源之一, 但并非为药典正品柴胡, 故不能作为柴胡药材在制剂生产中投料, 在市场应用上受到一定限制。本文选择竹叶柴胡 (*B. marginatum* Wall.

ex DC.) 进行研究, 首先利用中国药典正品柴胡样品 (北柴胡) 建立标准指纹图谱, 将其与标准指纹图谱进行相似度比较, 以评估其内在质量, 考察其作为柴胡资源补充的可能性。同时增加其他几种基源如马尾柴胡 (*B. microcephalum* Diels.)、马尔康柴胡 (*B. malconense* Shan et Y. Li.)、抱茎柴胡 (*Bupleurum longicaule var. amplexicaule* C. Y. Wu), 通过相似度结果评价不同基源的柴胡质量的一致性和差异性, 再进行聚类分析, 考察各不同基源柴胡亲缘关系, 验证聚类分析方法作为基源鉴定的可行性, 为柴胡基源鉴定提供科学依据, 并可用于选育优质的柴胡品种。

据报道, 竹叶柴胡的化学成分主要为五环三萜类齐墩果烷型衍生物, 含量较高的为柴胡皂苷 a、c、d^[2], 现代药理研究表明柴胡皂苷具有解热、抗炎、

保肝、免疫调节、抗肿瘤以及镇静、抗惊厥等多方面药理活性^[3-6]。《中国药典》2010年版柴胡项下鉴别和含量测定成分为柴胡皂苷 a、d, 功能与主治为疏散退热, 疏肝解郁, 升举阳气。竹叶柴胡的化学指标成分及药理作用跟药典正品柴胡具有一致性, 但竹叶柴胡习惯以全草入药, 目前对于竹叶柴胡的研究亦均为全草, 而药典收录的柴胡品种以根入药, 故对竹叶柴胡根部的化学成分研究缺乏针对性。故本文所用样品均为干燥根部分, 着力于阐明竹叶柴胡与北柴胡干燥根在内在成分上的相关性以及竹叶柴胡作为药典正品柴胡的补充资源的可行性。

1 材料与仪器

1.1 材料与试剂

不同基源柴胡药材于 2011 ~ 2013 年期间 8 月 ~ 9 月采自四川省荣县、绵阳、阿坝州地区、河北承德和陕西凤县, 共 13 份, 编号、基源见表 1。供建立标准指纹图谱的北柴胡样品于 2011 ~ 2013 年期间 8 月 ~ 9 月采自河北涉县、绵阳青川、河北承德、陕西凤县四川剑阁和河北安国, 共 10 份, 编号、基源见表 2。以上样品均由四川省食品药品检验检测院黎跃成主任药师鉴定。

表 1 柴胡药材样品

Table 1 Information of *Bupleurum* samples investigated in this study

编号 No.	基源 Origin	采集地 Collecting place	生长类型 Growth type
S1	竹叶柴胡 <i>B. marginatum</i> Wall. exDC.	绵阳剑阁	野生
S2	马尔康柴胡 <i>B. malconense</i> Shan et Y. Li.	马尔康松岗	野生
S3	抱茎柴胡 <i>B. longicaule</i> var. <i>amplexicaule</i> C. Y. Wu	小金两河口	野生
S4	马尾柴胡 <i>B. microcephalum</i> Diels.	茂县三龙乡	野生
S5	竹叶柴胡 <i>B. marginatum</i> Wall. exDC.	青川雁门关	野生
S6	竹叶柴胡 <i>B. marginatum</i> Wall. exDC.	荣县正紫镇	栽培
S7	竹叶柴胡 <i>B. marginatum</i> Wall. exDC.	荣县正紫镇	栽培
S8	竹叶柴胡 <i>B. marginatum</i> Wall. exDC.	荣县正紫镇	栽培
S9	竹叶柴胡 <i>B. marginatum</i> Wall. exDC.	荣县正紫镇	栽培
S10	竹叶柴胡 <i>B. marginatum</i> Wall. exDC.	荣县正紫镇	栽培
S11	竹叶柴胡 <i>B. marginatum</i> Wall. exDC.	荣县正紫镇	栽培
S12	竹叶柴胡 <i>B. marginatum</i> Wall. exDC.	荣县正紫镇	栽培
S13	竹叶柴胡 <i>B. marginatum</i> Wall. exDC.	荣县正紫镇	栽培

表 2 建立标准指纹图谱的北柴胡药材样品

Table 2 Information of *B. chinense* DC. samples for standard fingerprinting

编号 No.	基源 Origin	采集地 Collecting place	生长类型 Growth type
B1	北柴胡 <i>B. chinense</i> DC.	河北涉县	栽培
B2	北柴胡 <i>B. chinense</i> DC.	绵阳青川	栽培
B3	北柴胡 <i>B. chinense</i> DC.	河北承德	野生
B4	北柴胡 <i>B. chinense</i> DC.	陕西凤县	栽培
B5	北柴胡 <i>B. chinense</i> DC.	四川剑阁	栽培
B6	北柴胡 <i>B. chinense</i> DC.	陕西凤县	栽培
B7	北柴胡 <i>B. chinense</i> DC.	陕西凤县	栽培
B8	北柴胡 <i>B. chinense</i> DC.	河北安国	栽培
B9	北柴胡 <i>B. chinense</i> DC.	陕西凤县	栽培
B10	北柴胡 <i>B. chinense</i> DC.	陕西凤县	野生

柴胡皂苷 A (批号:110777-201108)、柴胡皂苷 D (批号:110778-201208) 对照品均来源于中国药品生物制品检定所;柴胡皂苷 B₂ (批号:12041002)、柴胡皂苷 C (批号:12091701) 对照品来源于通罗马科技有限公司。乙腈,色谱纯,购自 Fisher 公司;试剂均为分析纯。

1.2 仪器

Waters2695 高效液相色谱仪-Waters2487 紫外检测器(美国 Waters 公司), Empower 工作站; FB11207 超声处理仪(Fisherbrand);150 摇摆式粉碎机(浙江瑞安永厉制药机械有限公司);CPA2250 电子天平(赛多利斯科学仪器有限公司);SEG-021H 高温试验箱(上海爱斯佩克环境设备有限公司)

2 实验方法

2.1 供试品溶液和对照品溶液的制备

分别精密称取适量柴胡皂苷 A、B₂、C、D 对照品,置 10 mL 容量瓶中,用适量甲醇溶解后定容至刻度并摇匀,分别制成浓度为 1.04、0.62、0.68 和 1.04 mg/mL 的混合对照品溶液。

称取样品粉末(过四号筛)约 0.5 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,加入含 5% 浓氨试液的甲醇溶液 25 mL,密塞,30 °C 超声处理(功率 200 W,频率 40 kHz)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。残渣加甲醇溶解,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。

2.2 HPLC-UV 分析条件

色谱柱:Welch C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm);流动相为乙腈(A)和水(B);梯度洗脱条件为 0~50 min,25%~90% A;检测波长为 210 nm;柱温 35 °C;流速为 0.8 mL/min;进样量为 10 μL。

2.3 方法学验证

2.3.1 精密度试验

取 2.1 中供试品溶液在 2.2 液相色谱条件下,连续进样 5 次,测定各共有色谱峰的保留时间和峰面积,以柴胡皂苷 D 为参照峰,计算相对保留时间和相对峰面积的 RSD,结果表明相对保留时间 RSD 在 0.045%~0.98%,相对峰面积的 RSD 在 0.28%~1.11%,表明仪器精密度良好。

2.3.2 稳定性试验

取 2.1 中供试品溶液分别于制备后 0、8、16、24、48 h 进样,测定各共有峰的保留时间和峰面积,以柴胡皂苷 D 为参照峰,计算相对保留时间和峰面积的 RSD 值,结果表明相对保留时间 RSD 为 0.056%~1.22%,相对峰面积的 RSD 在 0.98%~2.65%,说明样品在 48h 内稳定。

2.3.3 重复性试验

取 S1 样品 5 份,按供试品溶液制备方法制备供试品溶液,分别进样,测定各共有峰的保留时间和峰面积,以柴胡皂苷 A 为参照峰,计算相对保留时间和相对峰面积的 RSD 值,结果表明相对保留时间 RSD 为 0.033%~2.01%,相对峰面积的 RSD 为 1.08%~2.39%,说明该方法重复性良好。

2.4 样品分析

将表 1 中 18 批柴胡样品按 2.1 项下方法制备所得供试液按 2.2 项下色谱条件进样分析,记录色谱图,同时定位柴胡皂苷 A、柴胡皂苷 B₂、柴胡皂苷 C 和柴胡皂苷 D。

2.5 数据处理

将表 2 中 10 批北柴胡样品(分别采自陕西凤县、河北涉县、河北承德、绵阳青川和河北安国)HPLC 色谱图导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》,生成北柴胡对照图谱。再以北柴胡对照图谱为参照图谱,将表 1 中 13 批柴胡样品 HPLC 色谱图导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》,计算相似度。

以共有峰峰面积为变量,运用 SPSS 18.0 软件对各样品进行聚类分析,得出树形图。

3 实验结果

3.1 北柴胡标准指纹图谱的建立

按 2.2 项下色谱条件对表 2 中北柴胡样品进行检测,记录色谱图 50 min 并导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004》,进行色谱峰匹配,匹配数据显示 14 个峰是所有样品共有的,按出峰时间依次标定为 1~14 号峰。见图 1。通过与对照品图谱比较鉴定,第 3、6、9 号峰分别为柴胡皂苷 C、柴胡皂苷 A 和柴胡皂苷 D,未检出柴胡皂苷 B₂,选择 6 号峰为参照峰。

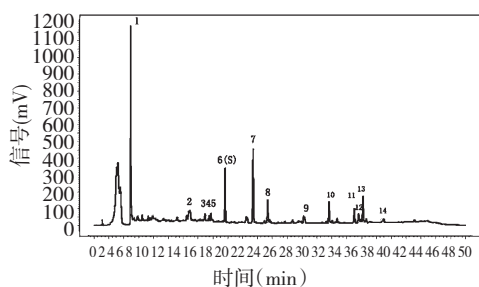


图 1 北柴胡 HPLC 对照指纹图谱

Fig. 1 HPLC chromatogram of *B. chinense*

3.2 指纹图谱的相似度计算

按照国家药典委员会公布的中药指纹图谱评价软件计算方法,得到各批次柴胡的 HPLC 指纹图谱相似度结果见表 2,各批次柴胡样品色谱重叠图见图 2。从表 2 可知,13 批柴胡样品的相似度均高于 0.8,与药典正品北柴胡相比较,不同基源的柴胡均具有较高的相似性。其中 8 批栽培竹叶柴胡相似度在 0.877~0.925 之间,两批野生品种相似度分别为 0.941 和 0.932,因此同基源药材由于生长环境不同,指纹图谱相似度也有所差异,野生竹叶柴胡相似度高于栽培竹叶柴胡,10 批竹叶柴胡平均相似度为 0.908;马尔康柴胡、马尾柴胡相似度分别为 0.915 和 0.900,说明同为川产道地品种的柴胡与竹叶柴胡化学成分相似度高,基源上较为接近;抱茎柴胡为 0.858;

相似度从高到低依次为:竹叶柴胡 > 马尔康柴胡 > 马尾柴胡 > 抱茎柴胡。结果显示,竹叶柴胡与北柴胡化学成分具有较高一致性,并且质量稳定可控。

3.3 聚类分析

根据各色谱峰的峰面积进行系统聚类,结果见

表 3 柴胡药材样品 HPLC 指纹图谱的相似度结果

Table 3 Similarities of *Bupleurum* samples

编号 No.	相似度 Similarity	编号 No.	相似度 Similarity
S1	0.932	S8	0.883
S2	0.915	S9	0.877
S3	0.858	S10	0.897
S4	0.900	S11	0.925
S5	0.941	S12	0.892
S6	0.899	S13	0.927
S7	0.903	-	-

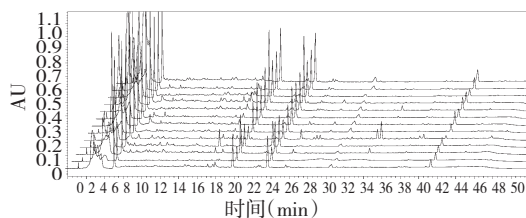


图 2 柴胡药材样品 HPLC 色谱重叠图

Fig. 2 Overlapped HPLC chromatograms of *Bupleurum* samples

图 3。由以下树状图可以看出,聚类距离为 1 时 S12、S13、S1、S10、S11、S8、S9、S6、S7、S5 聚为一类均为竹叶柴胡,S2 (马尔康柴胡)、S4 (马尾柴胡)在聚类距离为 2 时聚为一类,聚类距离为 3 时再与 S3 (抱茎柴胡)聚为一类,聚类距离为 4 时与竹叶柴胡聚为一类,说明马尔康柴胡、马尾柴胡、抱茎柴胡与竹叶柴胡基源相近。B9、B10、B4、B6、B7 在聚类距离为 1 是聚为一类,均为采自陕西凤县的北柴胡,B1、B8 为采自河北的北柴胡栽培品种,在聚类距离为 2 时聚为一类,再与 B2、B5、B3 分别在聚类距离为 5、7、12 时聚为一类,北柴胡采收地点相差较大,说明不同的生长环境会导致化学成分的差异较大。

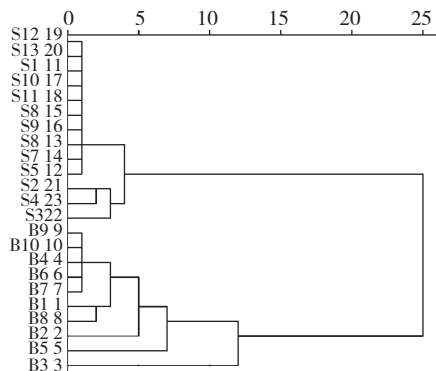


图 3 柴胡属植物的聚类树状图

Fig. 3 Dendrogram of *Bupleurum* samples

4 讨论

从指纹图谱分析来看,13 批柴胡样品相似度结果均高于 0.8,竹叶柴胡样品相似度平均为 0.908,说明竹叶柴胡与药典正品北柴胡物质基础相近,且质量可控。竹叶柴胡可作为优质柴胡资源进一步研究,以补充药典收载的品种基源。

聚类分析的结果显示竹叶柴胡聚为一类,马尔康柴胡与马尾柴胡聚为一类,抱茎柴胡聚为一类,以上三种川产柴胡与竹叶柴胡基源最为接近,北柴胡

聚为一类。聚类分析与传统基源分类结果一致,因此聚类分析能够对不同基源的柴胡进行分类鉴定。

柴胡属植物种类多,变种、变型多,纷繁复杂,传统基源鉴别主要依赖植物的地上部分形态特征,对于仅使用根部的柴胡药材,鉴别其药材及饮片难度较大。使用 HPLC 指纹图谱可全面地得到柴胡药材的皂苷类成分化学信息,并利用这些化学信息可对其进行相似度计算进行有效的质量控制。再结合聚类分方法,可从基源上筛选优质可靠的柴胡品种进行培育,缓解药典正品柴胡供不应求的市场压力。

参考文献

- Chinese Pharmacopoeia Commission (国家药典委员会). Pharmacopoeia of People's Republic of China (中华人民共和国中国药典). Beijing: China Medical Science Press, 2010. Vol I, 263-264.
- Liang ZT(梁之桃), Qin MJ(秦民坚), Wang ZT(王峥涛). Study the chemical composition of *Bupleurummarginatum* Wall. exDC. *J Chin Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2003, 34:305-308.
- Liu YC(刘永春), Cong PC(丛培臣). The study verview for Chemical composition and pharmacological effects of *Bupleurum*. *J Heilongjiang Med* (黑龙江医药), 2006, 3:216-218.
- Xie DH(谢东浩), Cai BC(蔡宝昌), An YQ(安益强), et al. Study progress of chemical constituents and pharmacological effects for Saikosaponin. *J Nanjing Univ Trad Chin Med* (南京中医药大学学报), 2007, 23:63-65.
- Yang RM(杨润梅), Gao NN(高南南). Research of the effects of *Bupleurum* for four different models of kidney disease. *Chin J Mod Med* (中国现代实用医学杂志), 2006, 5: 41-44.
- Yang ZG(杨志刚), Chen AQ(陈阿琴), Sun HX(孙红祥), et al. Progress of pharmacological effects of Saikosaponin. *Chin J Veterin Drug* (中国兽药杂志), 2005, 39:27-30.
- Huang FJ(黄凤娇). 紫红獐牙菜化学成分的含量测定及体外抗 HBV 活性物质的筛选. Wuhan: Hubei Collage of Traditional Chinese Medicine(湖北中医学院), MSc. 2006.
- Tian LY(田峦鸾), Chen JC(陈家春), Bai X(白雪), et al. Xanthonoids and Iridoid Glycosides from *Swertia punicea* Hemsl. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2010, 22:979-983.
- Tian LY(田峦鸾). 紫红獐牙菜化学成分和 HPLC 指纹图谱的研究. Wuhan: Hubei Collage of Traditional Chinese Medicine(湖北中医学院), MSc. 2006.
- Tan P(谭沛), Liu YL(刘永隆), Hou CY(侯翠英). *Swertia punimaria* from *Sweaia punicea* Hemsl. *Acta Pharm Sinica* (药学学报), 1993, 28:522-525.
- Fukamiya N, Okano M, Kondo K, et al. Xanthones from *Swertia punicea*. *J Nat Prod*, 1990, 53:1543-1547.
- Kanamori H, Sakamoto I. The components of *Swertia punicea*. *Hiroshima · ken Hoken Kankyo Senta Kenkyu Hokoku*, 1993, 1:13-16.
- Zhang JP(张建平), Yi X(易醒), Xiao XN(肖小年). Free radical scavenging activity of the extracts from *Alisma orientalis*. *Lishizhen Mater Med Res* (时珍国医国药), 2009, 20: 1181.
- Guo SY(郭少英), Cheng FF(程发峰), Zhong XG(钟相根), et al. Antioxidative effects of Baicalin *in vitro*. *Lishizhen Mater Med*(时珍国医国药), 2011, 22:9-11.
- Tian LY(田峦鸾). Studies on the anti-HBV and anti-NID-DM active substances and the resource quality of *Swertia Punicea* Hemsl. Wuhan: Huazhong University of Science and Technology(华中科技大学), 2009.
- Luo CT(罗翠婷), Mao SS(毛双双), Chen HR(陈河如), et al. Chemical constituents from *Swertia mussotii*. *Chin Tradit Herb Drug* (中草药), 2013, 44:942-946.
- Silvera ER, Falcao MJ, Menezes AJ, et al. Pentaoxygenated xanthones from *Bredemeyera floribunda*. *Phytochemistry*, 1995, 39:1433-1436.
- Pei T, Cui YH, Liu YL, et al. 3-O-demethylswertipunicoside from *Swertia punicea*. *Phytochemistry*, 1992, 40:4313-4315.
- Tang K(汤昆), Qiu N(邱娜), Qiu JD(邱金东). Studies on free radical DPPH scavenging time and clearance of antioxidant components form Walnut. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 2009, 31:1287-1288.
- Larrauri JA, Sanchez-Moreno C, Saura-Calixto F. Effect of tempe on the free radical scavenging capacity of extracts from red and white grape pomace peels. *J Agric Food Chem*, 1998, 46:2143-2150.
- Wang SS(王莎莎). Separation and strueture identification of the antioxidant chemical constituents from *Flos Rosae* Chillellsis. Zhengzhou: Zhengzhou University(郑州大学), 2010.
- Xian H(先宏), Wu K(吴可), Sun CP(孙存普). The main component of medicine antioxidant activity and its free radical scavenging effects. *Inter Tradi Chin Med* (国际中医中药杂志), 2003, 25:150-153.

(上接第 690 页)