

河南北柴胡 HPLC 指纹图谱的研究

杨云¹, 田润涛², 王忠东³, 谢培山², 冯卫生¹ (1. 河南中医学院药学院, 郑州 450008; 2. 珠海科曼中药研究有限公司, 广东 珠海 519085; 3. 洛阳梓生科技开发公司, 河南 洛阳 471003)

摘要:目的 对河南产北柴胡的 HPLC 指纹图谱进行研究, 建立河南北柴胡药材的质量评价体系。方法 采用 HPLC 测定了河南产北柴胡及其同属品种共 37 批样品的指纹图谱。色谱条件: Hypersil C₁₈ 柱 (200 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-水线性梯度洗脱, 流速 1 mL · min⁻¹, 检测波长为 205, 250 nm, 柱温 35 °C。结果 该判别方法准确可控, 具有较好的实用性。结论 所得河南北柴胡 HPLC 指纹图谱及其评价指标为科学评价河南北柴胡药材的质量提供了依据。

关键词: 北柴胡; 色谱指纹图谱; 高效液相色谱法; 模式识别

中图分类号: R917.101; R931.5 文献标识码: B 文章编号: 1007-7693(2007)05-0380-04

Study On the HPLC Fingerprints of *Bupleurum chinense* from Henan

YANG Yun¹, TIAN Run-tao², WANG Zhong-dong³, XIE Pei-shan², FENG Wei-sheng¹ (1. Pharmacy College, Henan College of TCM, Zhengzhou 450008, China; 2. Chromap Institute of Herbal Medicine Research, Zhuhai 519085, China; 3. Zisheng Technology Ltd, Luoyang 471003, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the HPLC fingerprint of *Bupleurum chinense* DC. from Henan Province and establish the quality evaluation system for this herb. **METHODS** HPLC method was used to analysis 37 samples of *B. chinense* DC. and its sibling plants. Chromatographic condition: Hypersil C₁₈ column (200 mm × 4.6 mm, 5 μm), mobile phase is linear gradient elute with acetonitrile-water, 1 mL · min⁻¹ flow rate, 205 nm, 250 nm detection wave-length, 35 °C column temperature. **RESULTS** This evaluation method is accurate and feasible. **CONCLUSION** The acquired HPLC fingerprints of *B. chinense* DC. and its evaluate guide line provide the scientific quality assessment of *B. chinense* DC.

KEY WORDS: *Bupleurum chinense* DC.; chromatographic fingerprint; HPLC; pattern recognition

柴胡为伞形科植物柴胡 *Bupleurum chinense* DC. (北柴胡) 和狭叶柴胡 *B. scorzonifolium* Willd. (南柴胡) 的干燥根。具有和解退热, 疏肝解郁, 升阳举气之功效, 为中医治疗少阳症之要药。河南省是全国北柴胡主产区之一, 由于受产地、气候和生态环境等的影响, 不同柴胡药材的有效成分三萜皂苷含量差异较大, 同时习用混用品种遍布各地。而现有的针对单一成分进行定性、定量分析的药材质量控制模式不能满足当前对于客观有效地评价和控制柴胡药材质量的迫切要求。

中药指纹图谱作为目前公认的中药和天然药物质量控制的有效手段, 其研究着眼于对象的宏观特征及内在规律, 具有整体性和模糊性等基本特点, 符合中医理论和中药药效模式^[1-2]。因此笔者通过高效液相色谱法对河南产北柴胡药材进行 HPLC 指纹图谱研究, 并结合多个柴胡皂苷化学对照品及其他柴胡属植物样本, 采用多元统计和模式识别等技术系统探讨了河南北柴胡主要成分的指纹特征规律, 初步建

立了河南北柴胡标准 HPLC 指纹图谱及河南北柴胡质量评价标准, 并对其适用性进行了考察。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Shimadzu LC2010A 高效液相色谱仪, SPD-445 PDA 检测器, ClassVP 色谱工作站。指纹图谱数据处理和识别分析使用的软件: Matlab 6.5 计算软件 (MathWorks Co.), Chromafinger 色谱指纹图谱系统解决方案软件 (珠海科曼中药研究有限公司)。

1.2 材料与试剂

26 批河南北柴胡药材分别于春、秋两季采自柴胡传统产地河南嵩县及河南辉县柴胡栽培基地, 经河南中医学院鉴定教研室董明副教授鉴定为伞形科柴胡属植物柴胡 (*B. chinense* DC.) 的干燥根。其余 11 个供试样品分别收集自四川、安徽及内蒙古等地, 经河南科技大学化工与制药学院王忠东教授鉴定为伞形科柴胡属的 10 种入药植物, 见表 1。柴

基金项目: 国家十一五科技支撑计划 (2006BAI06A10), 河南省自然科学基金资助项目 (021104100)。

作者简介: 杨云, 女, 教授 Tel: (0371) 65680105 E-mail: yyun@china.com.cn

胡皂苷 a,d,c,f,b₂ 等化学对照品由河南中医学院药物化学学科提供。色谱级乙腈(天津四友有限公司),重蒸水。其他试剂为分析纯。

表1 样本来源及编号

Tab 1 Sample source and number

样品编号	产地/采集地	植物基源
1~12	河南辉县	北柴胡
13~26	河南嵩县	北柴胡
27	四川成都	北柴胡
28	陕西商洛	空心柴胡
29	河南嵩县	北柴胡
30	内蒙古	黑柴胡
31	四川成都	四川柴胡
32	四川	三岛柴胡
33	四川	线叶柴胡
34	内蒙古	狭叶柴胡
35	安徽亳州	大叶柴胡
36	四川	汶川柴胡
37	安徽亳州	银州柴胡

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Hypersil BDS C₁₈(4.6 mm×250 mm,5 μm) 色谱柱;流动相:A. 乙腈,B. 水。梯度洗脱,0~20 min:25% A,75% B;30 min:35% A,65% B; 45 min:45% A,55% B; 60 min:60% A,40% B。记录时间 60 min;流速 1.0 mL·min⁻¹;检测波长为 205,250 nm;进样量 20 μL;柱温 35 ℃。

2.2 对照品溶液的制备

取柴胡皂苷 a,d,c,f 和 b₂ 各 5 mg,精密称定,置 5 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,即得。

2.3 供试品溶液的制备

取柴胡粗粉 1 g(50 目筛),精密称定,加甲醇定容至 50 mL,超声提取 30 min,放冷,加甲醇补足损失量,过滤,精密量取续滤液 30 mL,减压浓缩至干,残渣用甲醇定容至 5 mL,临用前过 0.45 μm 微孔滤膜,作为供试品溶液。

2.4 精密度试验

精密吸取同一供试品溶液 20 μL,连续进样 5 次,记录指纹图谱。结果表明各主要色谱峰的峰面积及保留时间基本一致(RSD=0.25%~0.37%)。

2.5 重复性试验

取同一样品 5 份,按供试品制备方法进行制备,记录指纹图谱。结果表明各主要色谱峰的峰面积及保留时间基本一致(RSD=0.34%~0.6%)。

2.6 稳定性试验

取同一供试品溶液,分别在 0,2,8,24,48 h 测定,记录指纹图谱。结果表明各主要色谱峰的峰面积及保留时间基本一致(RSD=0.5%~2.3%),供试品溶液在 48 h 内基本稳定。

2.7 柴胡皂苷 a 标准曲线的测定

精密吸取柴胡皂苷 a 对照品各 1,5,10,15 及 20 μL 进样,记录色谱图。计算标准曲线,结果见式 1。

$$Amt = 2.00943 \times 10^{-6} Area - 0.0562713 \quad (r = 0.999\ 987)$$

(式 1)

2.8 样品 LC 指纹图谱的测定

测定了 26 个河南北柴胡样品和 11 个柴胡属样品的色谱指纹图谱,并计算柴胡皂苷 a 的含量,河南北柴胡所有样本皂苷 a 的含量为(0.327±0.193)%,见表 2。河南北柴胡典型样本的色谱指纹图谱见图 1。

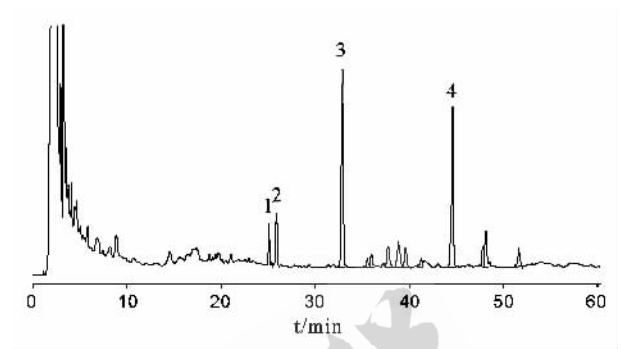


图1 河南北柴胡 HPLC 指纹图谱

1. 柴胡皂苷 c;2. 柴胡皂苷 f;3. 柴胡皂苷 a;4. 柴胡皂苷 d

Fig 1 HPLC Chromatogram of B. chinense DC. From Henan (205 nm) 1. Saikosaponin c; 2. Saikosaponin f; 3. Saikosaponin a; 4. Saikosaponin d

表2 河南北柴胡样品中柴胡皂苷 a 的含量测定结果

Tab 2 Quantitative determination result of saikosaponin a In B. chinense samples from Henan

样品编号	含量/%	样品编号	含量/%	样品编号	含量/%
1	0.19	11	0.32	21	0.13
2	0.26	12	0.57	22	0.15
3	0.40	13	0.22	23	0.19
4	0.33	14	0.03	24	0.30
5	0.10	15	0.19	25	0.17
6	0.34	16	0.37	26	0.64
7	0.36	17	0.84		
8	0.20	18	0.55		
9	0.61	19	0.47		
10	0.29	20	0.29		

2.9 河南北柴胡 HPLC 指纹图谱共有模式的建立

选取所有河南北柴胡样本,以中位数法筛选指纹特征峰及色谱峰面积值,共确认特征峰 12 个,建立的河南北柴胡标准 HPLC 指纹图谱见图 2。共有模式特征峰相关参数见表 3。

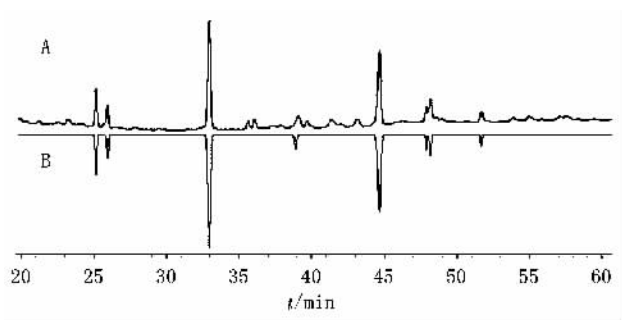


图2 河南北柴胡 HPLC 指纹图谱共有模式(205 nm)

A: 色谱轮廓线叠加生成;B: 高斯曲线模拟合成

Fig 2 HPLC fingerprint common pattern of B. chinense DC. from Henan (205 nm)

A. generated by chromatographic profile;B. simulation by Gaussian curve

表 3 河南北柴胡 HPLC 指纹图谱共有模式特征峰表

Tab 3 Peaks of HPLC fingerprint common pattern of B. chinense DC. from Henan

序号	近似保留时间/min	相对峰面积	成分名称
1	24.7	10.27	saikosaponin c
2	25.45	0.18	saikosaponin f
3(R)	32.49	1.00	saikosaponin a
4	35.64	0.10	
5	38.52	0.20	
6	41.01	0.13	
7	43.89	0.13	
8	44.13	0.80	saikosaponin d
9	47.72	0.16	
10	47.89	0.23	
11	51.35	0.14	
12	54.97	0.10	

2.10 样品的模式识别

2.10.1 相似度分析 以特征峰面积为指标进行的相关系数计算结果显示,相似度的参数统计为 0.88 ± 0.12 , 其中 $S < 0.80$ 的 4 个河南北柴胡样本及 7 个柴胡属样品都是由于主要皂苷峰不显著或比例失衡所致,与其微量皂苷含量高低关系不大。而某些总皂苷含量很低的样本由于各主要成分

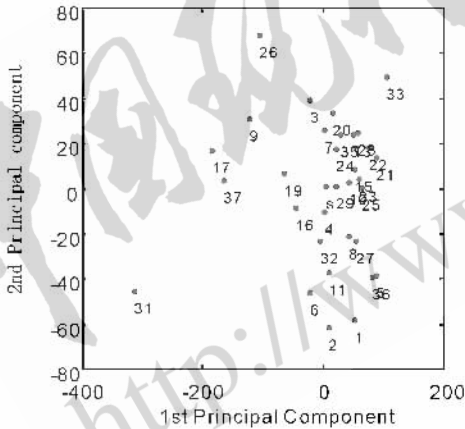


图 4 样品指纹图谱特征峰主成分分析散点图

Fig 4 Scatter plot of principal component analysis on fingerprints character peaks

取未标准化数据进行的主成分得分可知(见图 4),1st主成分中柴胡皂苷 a、d 等主要皂苷的系数显著,因此为“主皂苷含量因子”,且样本在 x 轴方向的散布明显体现出对数分布规律。2nd主成分中与之相反,凡是微量皂苷则均为较低的负数,故为“微量皂苷含量因子”。3rd主成分主要仍为主要皂苷得分但其符号各异,提示可能包含了量化相关的信息。再结合图谱解析证实凡远离 y 轴原点的均为某些色谱峰发生含量突变的样本,因此可称之为“成分相关因子”。由于该因子体现的是包含了距离向量信息的量化相关,故较相关系数对样本间关系的描述更为客观。总之,所采用的主成分分

间比例与标准指纹图谱相似,因此也取得了较高的 S 值。

2.10.2 系统聚类分析 样本距离度量采用欧几里德(Euclidean)距离,即样本几何空间的分布。采用的连接函数为离差平方和(Ward)法^[3]。除去 4 个明显离群的样本后,取未标准化的样本数据进行系统聚类分析,见图 3。从聚类结果可以看出基本上各样本是按总皂苷含量差异分聚各类。但样本间的判定边界较模糊,反映了实际的系统差异不明显。

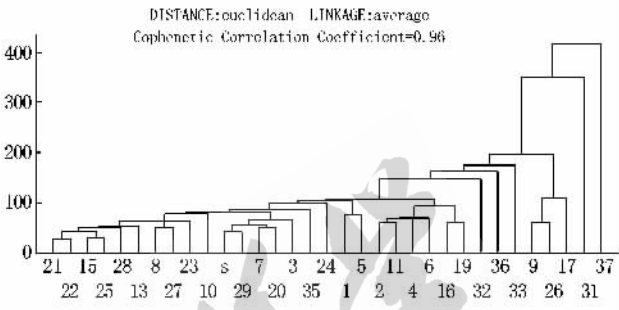
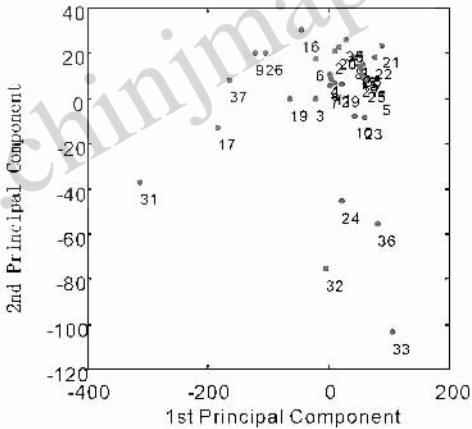


图 3 样品的指纹图谱特征峰系统聚类分析

Fig 3 Dendrogram based on HPLC fingerprint peaks

2.10.3 主成分分析 主成分分析是最常用的多指标线性降维压缩和多变量分析方法。通过对主成分的因子分解分析,可以给出主成分的专业解释,进而可指导对样品的系统分类^[4]。该方法适合对于色谱法获取的大量高度冗余指标的研究。



析方法着眼于共有峰的特征分析。前 3 个主成分信息量达 81%,从主要和微量成分以及整体相关性等三个不同角度综合提炼了样本的原始信息。

3 结论

结合模式识别结果,暂定样品与河南北柴胡指纹图谱共有模式之间的相似度以 205nm 波长下基于峰面积值的夹角余弦法计算,不得低于 0.92。

4 讨论

4.1 柴胡中主含三萜皂苷类成分,此外尚有黄酮、木脂素、挥发油、多糖及多炔等类化合物。柴胡皂苷类成分的化学组

成及药理作用研究得最为深入,被确认为柴胡发挥中枢抑制、拟 ACTH 样作用的药用基础,其药理机制与中医辨证理论和传统中药之功效基本相符,被认为是柴胡的主要药效成分。因此在制定河南北柴胡 HPLC 指纹图谱时,将柴胡皂苷类成分列为考察重点。

考察样品溶液的制备时曾将样品水溶液通过 C_{18} 小柱,收集 80% 甲醇洗脱部分的除杂处理,但因原生皂苷分解多,故未采用。此外由于柴胡中的一些非皂苷类化合物在 UV 末端区呈现强吸收峰,因此采用 HPLC-ELSD 法可取得更好的效果,具体研究内容将另文发表。

4.2 由于柴胡中的主要有效成分柴胡皂苷 d 在药材存储和提取过程中极易受热或遇酸分解为药理活性较弱的柴胡皂苷 b_2 ,因此正文的指纹图谱测定选择柴胡皂苷 b_2 的最大吸收波长 250 nm 作为检测分解产物的手段。在共有模式及合格样品的 205 nm 和 250 nm 波长下的色谱指纹图谱中均不应检出该色谱峰。

4.3 河南北柴胡的皂苷成分含量规律基本一致,仅个别所采集的幼年期植株样本含量偏低。而全国大部分地区做柴胡入药使用的同属药材与北柴胡相比,其中许多样本的皂苷及其他成分的含量和比例存在明显差异,它们之间的系统规律和差异将待进一步收集样本后做深入分析。

4.4 本课题通过采用各种统计和模式识别技术较完整地获取了能够进行质量评价和控制之用的数据集,并借助计算机辅助完成了对河南北柴胡指纹图谱的研究及质量评价^[5]。因此充分重视数学分析、数据挖掘及计算机辅助研究等技术的引入和深化,借助其系统研究和揭示中药成分纷乱芜杂的表象下的内在客观规律,对于指纹图谱的深入研究将是大有裨益的。

4.5 中药材中的有效成分作为自然界生物的次生代谢产物,成分分布情况存在较大波动是完全符合客观规律的(服从正态分布),造成目前药材及饮片质量参差不齐的部分原因也正在于此。故当前不应对中药材及饮片的质量标准过于苛求,但从切实确保中药临床疗效稳定均一的角度考虑,应加强对生产原料的控制,重点采用指纹图谱模式来完善标准提取物和制剂等产品的质量平台,在药效学及临床实验验证通过的前提下,鼓励药品生产企业采用标准提取物投料。

REFERENCES

- [1] XIE P S. Concept, property, techniques and application of chromatographic fingerprint identification on traditional Chinese medicine [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志),2001,26(10):653.
- [2] GONG F, LIANG Y Z, XIE P S. Information theory applied to chromatographic fingerprint of herbal medicine for quality control [J]. J Chromatogr (A)(色谱杂志),2003(1002):25-40.
- [3] MASSART D L, KAUFMAN L. The Interpretation of Analytical Chemical Data by the Use of Cluster Analysis(聚类分析法解析分析化学数据)[M]. Beijing:Chemical Industry Press, 1990.
- [4] PAN Z X, YU S Z, NIE S Z, et al. Chemical factor analysis(化学因子分析)[M]. Hefei: Press of University of Science and Technology of China, 1993.
- [5] TIAN R T. Study on the HPLC fingerprint of *Bupleurum chinense* DC. and chromatographic fingerprint technical discussion (Postgraduate Paper of Henan College of TCM) [D]. Zhengzhou: Pharmacy College, Henan College of TCM,2004.

收稿日期:2006-11-10