柴胡挥发油质量的GC指纹图谱分析方法

李秀琴[1]，孙秀燕[2]，陈晓辉[1]，王 玺[1]，毕开顺[1*]

(1. 沈阳药科大学药学院，辽宁 沈阳 110016；2. 烟台大学药学院，山东 烟台 264005)

摘 要：目的 建立评价柴胡挥发油质量优劣的指纹图谱分析方法。**方法** 采用毛细管气相色谱分析，DB-1 毛细管柱(30 m×0.25 mm×0.25 μm)；程序升温：柱温 50 ℃(保持 5 min)，以 3 ℃/min 升至 170 ℃，再以 5 ℃/min 升至 230 ℃(保持 5 min)；气化室温度：250 ℃；载气：氮气；体积流量：1.03 mL/min；进样量：0.5 μL；分流比：10∶1。氢火焰离子化检测器(FID)，检测温度：250 ℃。以正壬烷为内参照物，测定了 25 批不同产地柴胡药材的 GC 指纹图谱。**结果** 根据聚类分析和相似度分析处理结果，将柴胡分为两类：推荐药材与不推荐药材。**结论** 本方法简便、快捷、可靠，可用于柴胡挥发油的质量控制。

关键词：柴胡；指纹图谱；气相色谱

中图分类号：R286.02 **文献标识码**：B **文章编号**：0253-2670(2006)08-1165-03

GC Fingerprint analysis for quality control of volatile oil in *Radix Bupleuri*

LI Xiu-qin[1], SUN Xiu-yan[2], CHEN Xiao-hui[1], WANG Xi[1], BI Kai-shun[1]

(1. College of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China;
2. College of Pharmacy, Yantai University, Yantai 264005, China)

Abstract: Objective To establish the GC fingerprint analysis for the quality control of volatile oil in *Radix Bupleuri*. **Methods** The GC with capillary column DB-1 (30 m×0.25 mm×0.25 μm) was used. The column was maintained at 50 ℃ for 5 min after injection then programmed at 3 ℃/min to 170 ℃ and at 5 ℃/min to 230 ℃ which was maintained for 5 min. Gasification temperature: 250 ℃, carrier gas: N_2, flow rate: 1.03 mL/min, inlet volumn: 0.5 μL, spliting ratio: 10∶1, FID Injector temperature: 250 ℃. The internal standard was *n*-nonane used to determine 25 batches of *Radix Bupleuri* from different habitats by GC fingerprint. **Results** The 25 batches of *Radix Bupleuri* are classified to be the qualified and unqualified based on the results of cluster and similarity analyses. **Conclusion** The method is simple and reliable and it is capable of effectively controlling the quality of *Radix Bupleuri*.

Key words: *Radix Bupleuri*; fingerprint; GC

柴胡为常用中药，系伞形科柴胡属植物部分种类的根或全草。《中国药典》2005 年版收载的柴胡为北柴胡 *Bupleurum chinense* DC. 和狭叶柴胡 *B. scorzonerifolium* Willd. 的干燥根。柴胡属植物我国有 40 种，17 个变种，主产于辽宁、甘肃、河北、河南、山东、湖北、江苏、四川、安徽等地[1]。文献多采用紫外分光光度法测定柴胡蒸馏液中柴胡挥发油来评价其质量[2]，但是仅用吸光度值来反映药材质量很不全面。本研究建立了柴胡挥发油的 GC 指纹图谱分析方法，分析了 25 批不同产地的柴胡药材，以其指纹图谱为特征，进行聚类分析和相似度分析处理，并与形态学鉴定结果相比较，对柴胡质量进行评价。

1 仪器与试药

Shimadzu GC—2010 气相色谱仪，氢火焰离子化检测器(FID)，Lab Solutions 色谱工作站。正己烷为分析纯，正壬烷为色谱纯，蒸馏水。柴胡药材由沈阳药科大学江泽荣教授进行形态学鉴定，药材来源见表 1。

2 色谱条件

色谱柱：DB-1 毛细管气相色谱柱(30 m×0.25 mm×0.25 μm)(安捷伦技术公司)；气化室温度：250 ℃；载气：氮气；体积流量：1.03 mL/min；进样量：0.5 μL；分流比：10∶1。氢火焰离子化检测器(FID)，检测温度：250 ℃。程序升温：柱温 50 ℃(保持 5 min)，以 3 ℃/min 升至 170 ℃，再以 5 ℃/min 升至 230 ℃(保持 5 min)。

3 实验方法

3.1 系统适用性试验：以参照物正壬烷计算，理论

收稿日期：2005-12-10

作者简介：李秀琴(1979—)，女，山西省人，博士，主要研究方向：中药质量控制方法。E-mail: Lixq@china.com.cn

*通讯作者 毕开顺 Tel: (024) 23843711-3380 E-mail: ksbi@mail.sy.ln.cn

表 1 柴胡药材的来源

Table 1 Source of *Radix Bupleuri*

样品	来源	植物学名	样品	来源	植物学名
1	辽宁	*B. chinense*	14	青海	*B. longicaule* var. *giraldii*
2	东北	*B. scorzonerifolium*	15	安徽	*B. onarginatum*
3	东北	*B. scorzonerifolium*	16	河北	*B. chinense*
4	吉林	*B. scorzonerifolium*	17	河南	*B. chinense*
5	吉林	*B. scorzonerifolium*	18	内蒙	*B. bicaule*
6	四川	*B. wenchuanse*	19	山西	*B. yinchowense*
7	河北	*B. chinense*	20	银川	*B. yinchowense*
8	吉林	*B. scorzonerifolium*	21	天津	*B. chinense*
9	山东	*B. scorzonerifolium*	22	吉林	*B. chinense*
10	山西	*B. chinense*	23	本溪	*B. chinense*
11	广西	*B. chinense*	24	山西	*B. bicaule*
12	四川	*B. microcephalum*	25	内蒙	*B. smithii*
13	四川	*B. malconense*			

塔板数不小于 150 000，相邻峰分离度大于 1.5。

3.2 参照物溶液的制备：精密称取正壬烷对照品约 0.1 g，置 50 mL 量瓶中，用正己烷稀释至刻度，即得。

3.3 供试品溶液的制备：分别取各批药材粗粉 50 g，精密称定，置于 500 mL 圆底烧瓶中，加入 150 mL 蒸馏水（pH 1，NaCl 的质量浓度为 10%）浸泡 10 h。参照《中国药典》2005 年版一部附录 XD 挥发油测定法，选择正己烷为提取溶剂，自测定器上端加水，使充满刻度部分并溢流入烧瓶为止，再用移液管加入正己烷 1 mL，连接回流冷凝管，置电热套中，将烧瓶内容物缓缓加热至沸腾并保持微沸 6 h，停止加热，放置 1 h。吸取正己烷层，置于 5 mL 量瓶中，加入 0.5 mL 内标溶液，正己烷稀释至刻度，摇匀，即得供试品溶液。

3.4 精密度试验

3.4.1 仪器精密度：精密吸取柴胡样品（1 号）溶液 0.5 μL，重复进样 6 次，在上述色谱条件下记录各共有色谱峰峰面积。以正壬烷峰面积为参照，换算出各共有峰的相对峰面积。分别计算 2、4、33 号峰的相对峰面积 RSD，结果分别为 0.72%、0.47%、4.5%。

3.4.2 方法精密度：精密称取 50 g 柴胡样品（1 号）5 份，制备供试品溶液，在上述色谱条件下考察各色谱峰峰面积比值的一致性。分别计算 2、4、33 号峰相对峰面积的 RSD，结果为 2.6%、1.8%、6.36%。

3.5 稳定性试验：精密吸取柴胡样品（1 号）溶液 0.5 μL，在上述色谱条件下分别在 0、2、4、6、8 和 24 h 进样，计算上述 3 个色谱峰相对峰面积的 RSD，结果为 1.72%、1.47%和 4.0%。结果表明，柴胡供试品溶液在常温下 24 h 内稳定。

3.6 样品色谱指纹图谱：分别取各批药材供试品溶液 0.5 μL，注入气相色谱仪，在上述色谱条件下记录 57.5 min 的色谱图。典型色谱图见图 1。

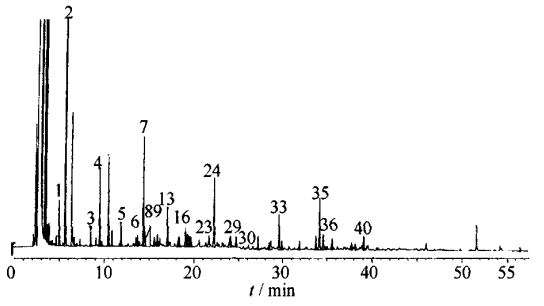

图 1 1 号柴胡样品 GC 指纹色谱图

Fig. 1 GC Fingerprint of No. 1 *Radix Bupleuri*

4 柴胡质量分级与评价方法的确定

本研究以 25 批不同产地的柴胡药材为研究对象，进行指纹图谱研究，获得包括己醛（2 号）、庚醛（4 号）和反式-2,4-癸二烯醛（33 号）在内的 40 个色谱峰。将色谱峰相对于参照物峰的峰面积量化，得到 25×40 阶的数据矩阵，对其分别进行系统聚类、相似度分析，从而实现对柴胡质量的分类评价。

4.1 系统聚类分析[3]：系统聚类分析是一种无管理、无指导的模式识别方法，依据所测样品的色谱指纹图谱特征，对样品进行分类。本研究应用 SPSS 软件，采用 Ward 法（Ward's method），选用欧式距离的平方（squared euclidean distance）为测度，聚类谱系图见图 2。聚类分析将 25 批样品粗分为 5 类，考虑到样品的实际情况（12、13、15、6 号为地上部分，而 22 号为伪品），在此基础上又把第 3 类细分为两类，即把 11、17、4、8、20、23 号样品归为第 3 类，把 12、13、15、22 号以及 6 号归为一类，而且聚类谱系图上也把这几号样品归在了一起，故把它们单独归为第 4 类，所以整体上把收集到的柴胡共分为 6 类，见表 2。聚类分析结果与形态学鉴定结果基本一致，第 1、2、3 类为推荐药材，第 4 类为不推荐药材，第 5、6 类为其他种属的药材。

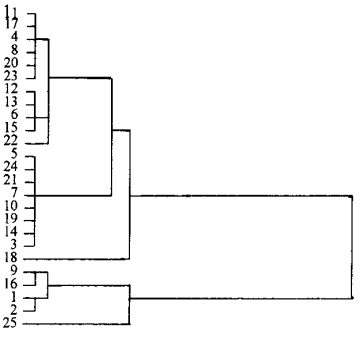

图 2 系统聚类分析树状图

Fig. 2 Dendrogram of cluster analysis of *Radix Bupleuri*

表 2 柴胡药材的分类

Table 2 Classification of *Radix Bupleuri*

分类	样品号	分类	样品号
第 1 类	1、2、9、16	第 4 类	6、12、13、15、22
第 2 类	3、5、7、10、14、19、21、24	第 5 类	18
第 3 类	4、8、11、17、20、23	第 6 类	25

4.2 相似度分析：根据专家的形态学鉴定结果，结合聚类分析结果，首先从 25 批柴胡药材中选取 12 批具有代表性的合格药材（1、2、5、7、9、10、14、16、19、21、23、24 号），再依据 12 批代表性的合格药材的色谱指纹图谱，建立共有模式。以共有模式为参照，分别采用夹角余弦、相关系数、欧氏距离为测度，计算各样品与共有模式间的相似度，见表 3。若以夹角余弦和相关系数为测度，则相似度高于 0.85 为推荐药材，低于 0.85 的则为不推荐药材或者为其他种属的柴胡药材。若以欧氏距离为测度，相似度高于 0.90 则为推荐药材，低于 0.90 的则为不推荐药材或者是其他种属的柴胡药材。结果表明：由 3 种相似度计算所得结果趋势一致。

表 3 相似度分析结果

Table 3 Results of similarity analysis

样品	欧氏距离	夹角余弦	相关系数	样品	欧氏距离	夹角余弦	相关系数	样品	欧氏距离	夹角余弦	相关系数
1	0.99	0.99	0.99	11	0.91	0.90	0.88	22	0.88	0.64	0.58
2	0.93	0.99	0.99	14	0.95	0.93	0.92	12	0.90	0.65	0.56
3	0.94	0.90	0.88	16	0.97	0.99	0.99	13	0.89	0.65	0.56
4	0.91	0.92	0.91	17	0.91	0.92	0.91	15	0.88	0.38	0.19
5	0.98	0.99	0.99	19	0.95	0.95	0.95	18	0.84	0.38	0.28
7	0.96	0.98	0.98	20	0.94	0.97	0.97	6	0.89	0.45	0.32
8	0.93	0.95	0.95	21	0.97	0.97	0.96	25	0.83	0.80	0.75
9	0.95	0.99	0.99	23	0.94	0.98	0.98				
10	0.95	0.99	0.99	24	0.98	0.99	0.99				

结果表明，相似度分析结果与系统聚类分析结果一致，两种方法得到了相互验证。对于待测样品，只需测得该样品的色谱指纹数据，计算其与共有模式的相似度，即可评价其质量。

5 讨论

5.1 药材的“批”不同于工业生产的“批”，是指相互独立的样本，建立共有模式需要不少于 10 批代表性合格药材，且必须是经专家鉴定的药材，并结合系统聚类分析结果，以保证这 10 批药材有代表性。他们与共有模式的相似度范围可作为推荐药材的域值，待测样品与共有模式的相似度若低于阈值则为不推荐药材。建立共有模式时，如只选择优质的道地药材，质量一般的药材则可能被判为不推荐药材。本研究选择了 12 批代表药材，主要是根据聚类分析的结果选择了第 1、2、3 类中的大部分药材，经专家鉴定这 3 类药材大多数为药典收载的南、北柴胡，同时结合试验数据发现此 3 类中别的种属的柴胡化学成分也与南北柴胡相类似，其中第 1、2 类药材质量较优，第 3 类药材质量一般，但也可作为药用，所以这 3 类药材具有一定的代表性。而第 4 类为柴胡的地上部分和伪品，其挥发油质量分数很少，不能用于挥发油的提取，所以不能选择这一类的药材来建立共有模式。第 5、6 类药材其实是 2 个种属的柴胡，他们所含化学成分的种类以及质量分数与前 3 类柴胡药材的差别很大，其药理活性有待进一步研究，所以未选择这 2 类柴胡来建立共有模式。

5.2 指纹图谱的建立应从样品的整体性出发，通过对足够样品图谱的比较、辨认，找出可以构成“指纹”的特征峰，而单纯以峰数的多少、峰的高低（或大小）来选取指纹峰不一定可靠。本实验是在仔细观察了各个样品色谱图的基础上，以能否构成“指纹特征”为依据，选取了 40 个色谱峰组成柴胡的指纹图谱，如图 1 中 40 min 以后的峰很少被选择主要是因为其不构成指纹特征，而且在 40 min 以后柱温已经很高，可能一些高沸点的脂肪酸出来，他们并不属于柴胡挥发油的成分，所以没有必要把他们选择在内。2、4、33 号峰为柴胡挥发油主要药效成分的色谱峰，故被选入；而 16～19 号峰虽为“小峰”，但在各个样品中均有出现，且在不同样品中峰的大小也各有差别，也构成了“指纹特征”，故也被选入。

5.3 通过聚类分析把柴胡分成了 6 类：从质量评价结果来看，1、2、9、16 号的柴胡样品质量最好，这与柴胡作为柴胡道地药材产地相符；22 号样品收集时是按照大叶柴胡收集的，但经形态学鉴定为伪品，可能是掺了其他杂根的北柴胡，经聚类分析和相似度分析为不合格品。12、13、15、6 号是柴胡的地上部分（茎叶），也被鉴定出来，说明柴胡地上部分含挥发油少，且成分与根部成分差异大，在提取挥发油时不宜入药。而 18、25 号分别被分成了单独的两类，其原因是它们分属柴胡的 2 个种属：锥叶柴胡和黑柴胡，所以其成分种类以及多少可能与别种的差异较大，但是并不能说其是劣品。本研究仅收集了 25 批柴胡药材，如能收集更多药材，采取分析方法获取更多化学信息，则对柴胡挥发油的质量评价会更加科学。

References:

[1] Sun Y, Zhu A. Application of *Radix Bupleuri* at all times in China [J]. *J Shandong Coll Tradit Chin Med* (山东中医学院学报), 1994, 18 (6): 421.

[2] Xia X H, Mo M X. Study on Chaihu Injection of ten years [J]. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 1992, 14 (2): 36.

[3] Hong N. SPSS *for Windows Statistical Tutorial* (SPSS for Windows 统计教程) [M]. Beijing: Electronic Industry Publishing House, 2000.