

北柴胡地上茎不同分枝对根中皂苷类成分量及根产量的影响

雷天莉, 任宇豪[#], 李 敬, 刘蓬蓬, 王 晶, 贾凌云^{*}, 路金才^{*}

沈阳药科大学中药学院, 辽宁 沈阳 110016

摘要: 目的 研究北柴胡 *Bupleurum chinense* 地上茎不同分枝对根中皂苷类成分量及根产量的影响。方法 采用 HPLC 和紫外分光光度法测定北柴胡地上茎不同分枝植株根中柴胡皂苷 a、柴胡皂苷 d 及柴胡总皂苷的量, 并统计分析其生长特征参数。结果 地上茎不分枝与 2 个分枝的北柴胡根中皂苷类成分量及根产量均最高; 随着地上茎分枝数的增多, 根中皂苷类成分量及根的产量均呈下降趋势。结论 地上茎不同分枝会对北柴胡根中皂苷类成分量及根产量产生影响。

关键词: 北柴胡; 茎不同分枝数; 柴胡皂苷 a; 柴胡皂苷 d; HPLC

中图分类号: R282.21 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2014)13-1920-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.13.021

Effect of different stem branches of *Bupleurum chinense* on saikosaponins content in its roots and root yield

LEI Tian-li, REN Yu-hao, LI Jing, LIU Peng-peng, WANG Jing, JIA Ling-yun, LU Jin-cai

School of Traditional Chinese Materia Medica, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China

Abstract: Objective To evaluate the effect of different stem branches of *Bupleurum chinense* on saikosaponins content in roots and its root yield. **Methods** The contents of saikosaponin a, saikosaponin d, and total saikosaponins in the roots of *B. chinense* were determined by HPLC and UV-vis spectrophotometry. And parameters of growth characteristics were analyzed. **Results** The contents of saikosaponin a, saikosaponin d, and total saikosaponins in the roots of *B. chinense* and its root yield were the highest when the *B. chinense* stem had no branch or two branches. And with the increase of stem branch's numbers, the content of saikosaponins in the roots of *B. chinense* and its root yield decreased. **Conclusion** Different stem branches have a significant effect on the content of saikosaponins in the roots of *B. chinense* and its root yield.

Key words: *Bupleurum chinense* DC.; stem branch numbers; saikosaponin a; saikosaponin d; HPLC

北柴胡 *Bupleurum chinense* DC. 为伞形科柴胡属多年生草本植物, 以其地下根入药, 是《中国药典》2010 年版收载的柴胡主要来源之一^[1]。北柴胡在我国已有两千多年的药用历史, 具有疏散退热、疏肝解郁、升举阳气的功效, 常用于感冒发热、寒热往来、胸胁胀痛等疾病^[2], 属于大宗常用中药材。目前, 随着对野生北柴胡资源开发利用的扩大, 国内外需求迅速增加, 野生资源濒临枯竭。我国北方一些省区已经开始进行人工种植栽培北柴胡, 但是, 人工种植北柴胡常存在栽培技术不规范、质量参差不齐等问题, 已严重

影响到药品质量的稳定性和临床用药的准确性。导致北柴胡质量差异的原因很多, 如产地、种质资源、播种时间等, 近几年有关影响北柴胡质量因素及栽培方面的研究已有相关报道^[3-8]。在田间管理时发现北柴胡地上茎有分枝现象, 即直接从主茎基部产生数目不定的分枝, 而地上茎不同分枝数对其质量的影响还未见相关报道, 因此本实验采用 HPLC 法、紫外分光光度法对地上茎不同分枝数的北柴胡根中主要活性成分柴胡皂苷 a、d 及柴胡总皂苷进行定量分析, 并统计分析其生长特征参数, 为北柴胡田间规范化管理种植提供一定的指导依据。

收稿日期: 2014-02-08

基金项目: 辽宁省科学技术计划项目 (2012010400-401); 国家级大学生创新创业训练计划项目 (201210163028); 辽宁省科技厅本溪特色产业基地科技计划项目 (2013226050)

作者简介: 雷天莉 (1989—), 女, 硕士, 研究方向为中药资源的研究与开发。Tel: 18604018736 E-mail: 965932824@qq.com

*通信作者 路金才 Tel: (024)23986500 E-mail: jincailu@126.com

贾凌云 Tel: 15940165833 E-mail: jialingyun2003@126.com

#共同第一作者 任宇豪 (1992—), 男, 学士, 中药资源与开发专业。Tel: 18809895993 E-mail: 641019991@qq.com

1 仪器与材料

Lab Alliance-Series III 型高效液相色谱仪, Model 500 型紫外检测器 (美国 Alliance 公司), UV-2600A 型紫外可见分光光度计 (上海尤尼柯仪器有限公司), Sartorius-CP2250 十万分之一电子天平 (北京塞多利斯天平有限公司), KQ 5200E 型数控超声清洗机 (昆山市超声仪器有限公司), AF-08A 型密封型摇摆式粉碎机 (25 000 r/min, 浙江温岭市奥力中药器械有限公司), SZ-93 双重蒸馏水器 (上海亚荣生化仪器厂)。

柴胡皂苷 a、d 对照品 (四川省维克奇生物科技有限公司, 质量分数均 >98%, 批号分别为 121128 和 121220), 芦丁对照品 (中国食品药品检定研究院, 批号 100080-200707), 乙腈、甲醇 (色谱纯, 天津市康科德科技有限公司), 水为双重蒸馏水, 其余试剂均为分析纯。二年生北柴胡样品采自沈阳药科大学药用植物园实验基地, 其地上茎不同分枝以直接从主茎基部产生的分枝数为考察指标, 经沈阳药科大学中药资源教研室路金才教授鉴定为北柴胡 *Bupleurum chinense* DC.。采集地位于东经 116° 5', 北纬 41° 45', 海拔 40 m, 年降水量 750 mm。供试土壤基本理化性状: pH 5.56, 有机质 46.23 g/kg, 速效氮 248 mg/kg, 速效磷 90.48 mg/kg, 速效钾 20.68 mg/kg, 种植密度 100 株/m²。

2 方法与结果

2.1 HPLC 法测定柴胡皂苷 a、d

2.1.1 色谱条件 Alltech C₁₈ 柱 (150 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈 (A)-水 (B), 梯度洗脱: 0~15 min, 35%~40% A; 15~22 min, 40%~45% A; 22~35 min, 45%~48% A; 体积流量 1.0 mL/min; 检测波长 210 nm; 进样量 10 μL; 柱温 30 °C; 在上述选定条件下, 理论塔板数按柴胡皂苷 a 峰计不低于 10 000, 柴胡皂苷色谱峰与相邻色谱峰的分度大于 1.5, 拖尾因子在 0.95~1.05。色谱图见图 1。

2.1.2 对照品溶液的制备 取柴胡皂苷 a、d 对照品各 10 mg, 精密称定, 置 10 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 即得柴胡皂苷混合对照品储备液 (柴胡皂苷 a、d 的质量浓度分别为 0.980 g/L 和 1.004 g/L)。

2.1.3 供试品溶液的制备 取样品粉末 (过四号筛) 约 0.5 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入体积分数为 5% 浓氨甲醇溶液 25 mL, 密塞, 称定质量, 30 °C 水温超声处理 (功率 200 W, 频率 40 kHz)

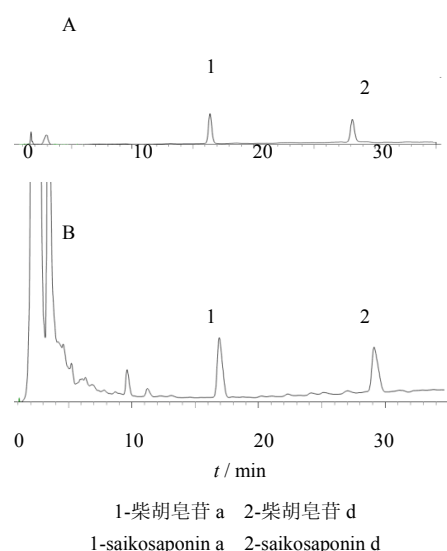


图1 对照品 (A) 与样品 (B) 的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC of reference substance (A) and sample (B)

30 min, 放冷, 再称定质量, 用 5% 的浓氨甲醇补足减失的质量, 摇匀, 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, 加甲醇至刻度, 摇匀, 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

2.1.4 标准曲线的绘制 分别精密量取 “2.1.2” 项下的混合对照品储备液 0.25、0.50、1.00、1.25、2.50 mL, 分别置 5 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 得含柴胡皂苷 a、d 的对照品溶液。在上述色谱条件下分别进样 10 μL, 以峰面积为纵坐标 (Y), 溶液质量浓度为横坐标 (X), 绘制标准曲线。结果柴胡皂苷 a 在质量浓度 0.049~0.980 g/L 内, 柴胡皂苷 d 在质量浓度 0.050~1.004 g/L 内线性关系良好, 其回归方程分别为: $Y=2 \times 10^6 X+20\ 375$, $r=0.999\ 3$; $Y=3 \times 10^6 X-41\ 700$, $r=0.999\ 4$ 。

2.1.5 精密度考察 精密吸取同一混合对照品溶液, 按 “2.1.1” 项下色谱条件连续进样 6 次, 记录色谱图, 计算柴胡皂苷 a 和柴胡皂苷 d 峰面积的 RSD 分别为 1.09% 和 1.48%, 表明仪器精密度良好。

2.1.6 重复性试验 精密称取同一北柴胡样品 (地上茎不分枝), 按 “2.1.3” 项下方法平行制备 6 份, 按 “2.1.1” 项下色谱条件进样分析, 记录色谱图, 计算柴胡皂苷 a 和柴胡皂苷 d 质量分数的 RSD 分别为 1.23% 和 1.52%, 表明方法重复性良好。

2.1.7 稳定性试验 取同一供试品溶液,于配制后0、2、4、6、8、12 h,按“2.1.1”项下色谱条件进样分析,记录色谱图,计算柴胡皂苷a和柴胡皂苷d峰面积的RSD分别为1.88%和1.83%。表明供试品溶液在12 h内基本稳定。

2.1.8 加样回收率试验 取已测定的北柴胡样品(地上茎不分枝)0.25 g,精密称定,共6份,精密加入等量的柴胡皂苷a和柴胡皂苷d对照品。按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液,按“2.1.1”项下色谱条件测定,计算。结果柴胡皂苷a和柴胡皂苷d的平均加样回收率为100.5%和100.7%,RSD分别为1.96%和1.68%。

2.1.9 样品测定 分别精密吸取不同供试品溶液10 μ L,注入液相色谱仪进行测定,采用外标一点法计算不同分枝的北柴胡样品中柴胡皂苷a和柴胡皂苷d的质量分数,结果见表1。

2.2 紫外分光光度法测定柴胡总皂苷的量^[9]

2.2.1 供试品溶液的制备 按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液。

2.2.2 对照品溶液的制备 取柴胡皂苷a对照品适量,精密称定,加甲醇制成质量浓度为0.45 g/L的对照品溶液,摇匀,即得。

2.2.3 标准曲线的制备 分别取柴胡皂苷a对照品溶液0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2 mL置10 mL刻度试管中,在电热恒温水浴箱中于40 $^{\circ}$ C水浴蒸干。蒸干后加入体积分数1%对二甲氨基苯甲醛乙醇溶液0.1 mL,70 $^{\circ}$ C水浴中温热10 min取出。冷却后加入磷酸4 mL,摇匀,于70 $^{\circ}$ C水浴中反应30 min,取出,冷却后,在535 nm波长处测定吸光度(A)值,以 A 值为纵坐标(Y),柴胡皂苷a对照品质量为横坐标(X),绘制标准曲线,

得到柴胡总皂苷的回归方程为: $Y=1.492\ 4\ X+0.072\ 4$, $r=0.999\ 4$ 。表明柴胡总皂苷在90~540 μ g内线性关系良好。

2.2.4 精密度考察 取同一对照品溶液(柴胡皂苷a 0.450 g/L)0.4 mL,按“2.2.3”项下的方法重复操作6次,测定 A 值,计算RSD为0.34%,表明仪器精密度符合要求。

2.2.5 重复性试验 取同一供试品(地上茎不分枝),按“2.1.3”项下方法平行制备6份供试品溶液,精密吸取0.1 mL,按“2.2.3”条下方法操作,计算总皂苷量。结果总皂苷的平均质量分数为1.98%,RSD为1.76%,表明方法的重复性良好。

2.2.6 稳定性试验 取同一供试品溶液0.1 mL,按“2.2.3”项下方法操作后,分别于0、1、2、4、6、8 h测定 A 值,RSD为2.54%,表明样品在8 h内稳定。

2.2.7 加样回收率试验 取已测定总皂苷量的样品(地上茎不分枝)6份,每份约0.25 g,精密称定,精密加入适量柴胡皂苷a对照品。按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液,精密吸取0.1 mL,按“2.2.3”项下方法进行测定,计算,结果平均回收率为100.6%,RSD为1.47%。

2.2.8 样品的测定 分别精密吸取供试品溶液0.1 mL,按“2.2.3”项下方法操作,依据标准曲线计算柴胡总皂苷的量,结果见表1。

2.3 地上茎不同分枝对北柴胡生长发育指标的影响

随着地上茎分枝数的增加,北柴胡株高、单株根鲜质量、干质量有明显差异,地上茎分枝 ≤ 2 的北柴胡根鲜质量和干质量明显高于3个以上分枝的根鲜质量和干质量,见表2。

表1 地上茎不同分枝样品中柴胡皂苷a、d及柴胡总皂苷的量($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Table 1 Contents of saikosaponin a, d, and total saikosaponin by different branch numbers ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

分枝数	质量分数 / %		
	柴胡皂苷 a	柴胡皂苷 d	柴胡总皂苷
不分枝	0.35 $\pm$ 0.03	0.33 $\pm$ 0.02	2.42 $\pm$ 0.02
2	0.38 $\pm$ 0.03	0.31 $\pm$ 0.03	2.39 $\pm$ 0.04
3	0.28 $\pm$ 0.04*	0.18 $\pm$ 0.03**	2.23 $\pm$ 0.05*
4	0.26 $\pm$ 0.05*	0.29 $\pm$ 0.04**	2.13 $\pm$ 0.01**
6	0.18 $\pm$ 0.04**	0.14 $\pm$ 0.06**	1.89 $\pm$ 0.04**
≥ 7	0.16 $\pm$ 0.04**	0.12 $\pm$ 0.03**	1.32 $\pm$ 0.03**

与地上茎不分枝北柴胡比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$, 下同

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs no branches of *B. chinense*, same as below

表 2 地上茎不同分枝北柴胡生长特征 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 2 Growth characteristics of *B.chinense* by different branch numbers ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

分枝数	株高 / cm	根鲜质量 / g	根干质量 / g
不分枝	86.33±3.21	1.86±0.22	0.64±0.07
2	86.00±13.12	1.73±0.19	0.60±0.05
3	56.67±3.12**	1.44±0.43*	0.49±0.13*
4	60.33±6.81**	1.15±0.24**	0.38±0.09**
6	79.67±5.86	1.23±0.25**	0.42±0.07**
≥7	75.48±5.03	1.22±0.11**	0.40±0.05**

3 讨论

本实验首次考察了北柴胡地上茎不同分枝数对其地下根的皂苷类成分和产量的影响。结果表明,地上茎 2 个分枝植株同不分枝植株相比,其根中柴胡皂苷 a、d 及总皂苷的量没有显著性变化;随着地上茎分枝数的增加,柴胡皂苷 a、d 及总皂苷的量呈降低趋势,同不分枝植株相比,存在显著差异,此外,在研究中还发现,当分枝数达到或者超过 7 个时,其柴胡皂苷 a 和柴胡皂苷 d 的量(0.28%)会低于《中国药典》2010 年版规定标准(0.30%)。北柴胡地上茎不同分枝对其生长特征的影响是地上茎不分枝和 2 个分枝北柴胡的单株根鲜质量和干质量都相对较高。初步分析,这可能与北柴胡地上茎分枝数增加后,不利于叶片通风透光,而且群体密度增大,营养消耗过多,从而使单株生产力降低^[10],导致地下皂苷类成分及根产量下降。

本研究表明,北柴胡地上茎 3 个及以上分枝其根中柴胡皂苷 a、柴胡皂苷 d 及柴胡总皂苷的量降低,产量也有所降低。但对于北柴胡地上茎不同分枝数在其大规模种植植株中所占的比例,以及其对地下黄酮类成分及地上成分的影响,还未做全面系统的比较,本课题组将对其进行进一步探讨,为北柴胡在田间规范化管理种植提供参考依据。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [2] 牛向荣. 柴胡药理作用研究概述 [J]. 中国药师, 2009, 12(9): 1310-1312.
- [3] 于英, 王秀全, 刘霞, 等. 摘花序、打顶对北柴胡生育形状及根部产量的影响 [J]. 吉林农业大学学报, 2003, 25(3): 303-306.
- [4] 卫冰, 李晓坤, 杨云, 等. 不同产地及不同采收期北柴胡中柴胡总皂苷的含量测定 [J]. 辽宁中医杂志, 2012, 39(12): 2464-2466.
- [5] 谭玲玲, 蔡霞, 胡正海. 不同产地北柴胡中柴胡皂苷的测定 [J]. 中草药, 2009, 40(12): 1993-1995.
- [6] 郝建平, 赵瑒, 高可青, 等. 北柴胡试管植株与种子植株生长发育性状比较 [J]. 中草药, 2013, 44(20): 2910-2915.
- [7] 黄春燕, 蔡少君, 蔡燕兰. 不同产地柴胡有效成分的含量测定 [J]. 临床医学工程, 2010, 17(11): 43-44.
- [8] Yang C M, Zhao Y K, Wei J H, *et al.* Factors affecting embryogenic callus production and plant regeneration in anther culture of *Bupleurum chinense* [J]. *Chin Herb Med*, 2011, 3(3): 214-220.
- [9] 曾珍, 王晶, 路金才, 等. 不同干燥和炮制方法对北柴胡皂苷类化合物的影响 [J]. 沈阳药科大学学报, 2012, 29(8): 650-655.
- [10] 华福平, 李晓亮, 张毅. 河南省夏播花生主要数量性状与产量的相关和通径分析 [J]. 中国种业, 2010, 1(4): 42-44.