

柴胡属19种植物挥发油的气相色谱 ——相对保留值的指纹分析

洪筱坤 王智华 郭济贤* 李颖*

(上海中医学院; *上海医科大学)

提要 本文首次利用气相色谱的定性参数——相对保留值建立了柴胡属19种植物挥发油的GC指纹谱,并根据指纹谱中色谱峰的重叠率和八强峰进行分析对比研究。结果表明同属不同种植物的指纹谱、重叠率和八强峰各不相同。因此,本文认为该法可以为植物品种的鉴定以及为新种的确立提供有益的信息,并为GC在分析复杂组分的样品方面开拓了新的应用。本法优点:简单易行、无需标准品、色谱峰利用率高、可比性强。

关键词 柴胡;挥发油;气相色谱;气相色谱—指纹谱

柴胡是一种常用中药,为伞形科植物北柴胡(*Bupleurum Chinense* DC.)和狭叶柴胡(*B. sorzonerifolium* Willd)的干燥根。中医临床用于解表退热,治疗感冒、疟疾和疏肝解郁。其主要有效成分为挥发油和皂甙。目前临床应用的柴胡注射液即系挥发油制剂,用以治疗流感、疟疾、肺炎等疾病的发热均收到良好的效果。柴胡皂甙具有镇痛、解热、止咳、安定和镇静等广泛的中枢神经抑制作用,并有抗炎和降低胆固醇的功效。

鉴于中药柴胡的广泛应用以及柴胡属植物品种的繁多(已鉴定的不下36种⁽¹⁾,至今还有新种发现),因此,在临床用药及制剂工作中经常发现柴胡属其它品种植物的混入,更有其生药外形相似而不易鉴别的,甚至有毒的大叶柴胡(*B. longeradiatum* Turcz)也曾误作北柴胡入药而造成中毒死亡的事故。

为保证临床用药安全和疗效稳定,在组织货源、制剂生产及研究时均需进行生药品种的鉴定。最近有报道柴胡属十个品种的薄层指纹分析⁽²⁾,为柴胡属植物品种的鉴别提供了一定的参考信息。

目前,气相色谱法(GC)已普遍地应用于植物挥发油的分析、并为挥发油类生药品种的鉴别提供了有益的依据^(3,4)。但是,GC法对被分离组分的定性需标准品对照,在标准品不足的情况下,仅少数几个色谱峰可被鉴定,使色谱峰的利用率不高。针对此不足,本研究采用GC法制备了柴胡属19种植物挥发油的色谱图,利用相对保留值这一参数,将色谱图衍生为GC—相对保留值指纹谱,借此探求同属不同种植物之间的异同点,试图为GC在生药品种鉴定方面的应用开创新的领域。

实验部分

一. 植物样品

多枝柴胡(*Bupleurum polycloxum* Y. Li et S. L. Pan) 云南省会泽县; 韭叶柴胡(*B. kunmingense* Y. Li et S. L. Pan) 云南昆明市; 泸西柴胡(*B. luxiensense* Y. Li et S. L. Pan) 云南省泸西县; 空心柴胡(*B. longicaule* Wall. ex DC. var. *franchetii* de Boiss)

云南省昆明市;丽江柴胡(*B. rockii* wolff) 云南省丽江市;窄竹叶柴胡(*B. marginatum* Wall. ex DC. var. *stenophyllum*(wolff)Shan et li) 云南省昆明市;小柴胡(*B. hamiltonii* Belak) 云南省楚雄州;北柴胡(*B. chinense* DC.) 甘肃省康县;柴首柴胡(*B. chuishou* shan et sheh) 四川省汶川县;汶川柴胡(*B. wenchuanse* Shan et Y. Li) 四川省汶川县;马尔康柴胡(*B. malconense* Shan et Y. Li) 四川省汶川县;大叶柴胡(*B. longeradiatum* Turcz.) 黑龙江省尚志县;大苞柴胡(*B.euphorbioides* Nakai) 吉林省安图县长白山;竹叶柴胡(*B. marginatum* Wall. ex DC.) 云南省西双版纳州;黑柴胡(*B. smithii* Wolff) 青海省湟中县;小叶黑柴胡(*B. smithii* Wolff var. *parvifolium* Shan et Y.Li) 青海省大通县;红柴胡(*B. scorzonifolium* Willa.) 江苏省徐州市;青海柴胡(*B. qinghaiense* Y. Li et Guo sp. nov.) 青海省同仁县;线叶柴胡(*B. angustissimum* (Franch) Ditagawa) 青海省湟源县。上述植物品种均由上海医科大学李颖教授、郭济贤副教授鉴定。

二. 样品的制备

分别取上述 19 种植物 300 g, 进行水蒸汽蒸馏提取挥发油, 配成 1% 乙醚溶液, 备用。

三. 仪器及色谱条件

仪器 GC-RIA(日本岛津); 色谱柱; Chromosorb W AW DMCS 10% PEG-20 M; 柱温: 170°C; 进样温度: 220°C; 载气: N₂ 40 ml/min; 检测器: FID; 灵敏度: 1; 衰减: 2; 进样量: 0.5 μl; 分析时间: 60 min; 定量方法: 面积归一化法。

四. 指纹谱的建立

GC 分析中常采用相对保留值定性, 参照物可以是外加的, 也可以是样品中的一个组分。由于植物挥发油的组成复杂, 其色谱峰相当密集, 难以插入一个合适的参照物。为此, 本研究选择一个在 19 种植物挥发油中均存在的组分作为参照峰, 它的出峰时间也较近中心, 又与其邻近组分能较好地分离。参照峰的确定方法如下: 在 19 种样品中分别加入相同的标准品, 分别求出其与待定参照峰的相对保留值 α , 然后选择 α 值一致的峰作为 19 种植物的共有组分。在建立某样品的指纹谱时, 指定该峰为参照峰(即 $\alpha=1$), 将样品中各组分的相对保留值按大小排列成行, 并在每个 α 值项下标出该组分的相对百分含量, 这样即得某样品的 GC—相对保留值指纹谱。如将同属不同种植物的指纹谱依次纵向排列, 随即可进行比较分析。指纹谱的表示方式可有两种: 列表式和条图。前者较详细, 后者较简洁。

结果与讨论

一. 本研究利用气相色谱法所得之每个组分的相对保留值和其百分含量两个参数, 建立了柴胡属 19 种植物挥发油的 GC 指纹谱, 借此探求同属不同种植物挥发油与其指纹谱之间的关系。实验结果表明, 19 种植物的指纹谱各不相同, 即没有两个不同的品种具有相同的指纹谱(见表 1)。试比较表 1 中北柴胡、大叶柴胡和青海柴胡的指纹谱以及表 2 中列出的上述三种植物挥发油中的八强峰, 可明显地看出三者之间的差异。其中, 北柴胡是药用柴胡, 大叶柴胡系有毒柴胡, 青海柴胡为新发现的品种, 由此可见, 通过指纹谱的分析, 既可避免有毒植物的误用, 又有利于新种的发现。

为此, 本研究提议, 在植物分类鉴定的基础上, 可以建立各种植物的标准指纹谱, 包括同种植物不同产地及不同物候期的指纹谱, 以供今后生药品种鉴定时的参考。尤其是对一些无法以生药外形进行鉴别的样品, 本法提供了较大的可靠性和适应性。

二. 由指纹谱可知, 柴胡属 19 种植物挥发油在测定条件下总计出峰 68 个, 其中小叶黑柴胡

Tab 1. GC-FPS of species of *Bupleurum* genus

Sample No.	Relative retention value																					
	0.046	0.052	0.057	0.062	0.066	0.070	0.081	0.086	0.093	0.098	0.109	0.118	0.130	0.140	0.147	0.155	0.166	0.173	0.184	0.195	0.209	
	Content (%)																					
1		0.11	0.23		0.24	0.38			0.87	1.32		1.04	0.52					1.62		4.12		
2		5.40		18.4				0.30	0.90	7.80		3.90	1.20					1.40	7.80			
3		35.2	21.6		5.60			1.30	0.30	0.70	0.50	0.70	0.50					4.40		0.80	1.40	
4		0.52	0.60		0.40		0.30	0.20	0.20	0.80	0.40	2.90		1.10				15.2			5.10	
5			6.13	5.70	7.19			0.80	2.05	5.02		2.77		0.83				1.71	1.46		0.65	
6			0.47		2.36			0.12	0.05	0.37	0.39	3.50		0.35				1.11	2.10			
7				1.70	2.30			2.10	3.40		0.90							0.90				
8			2.30		2.04			0.38	0.64	0.30	0.33		2.30	1.16							1.68	1.10
9	0.90			0.04	0.22		0.09	0.21		0.53	0.20	5.60		0.80		1.20		5.40				1.80
10				0.88	0.69		0.10	0.53				3.66		1.06								2.14
11		1.87		1.65		1.17	0.49	0.66	0.57	0.31	2.52		0.91					3.61			2.81	1.21
12	21.3			2.17	18.7			0.17		3.39	2.19		1.42					1.51	5.06			
13						4.36						2.50	3.37							13.4		
14	4.15		13.3	7.97	2.90			0.07	0.60	0.13	0.75	0.96	0.95					7.76				2.31
15			0.31	0.58		2.95	1.60	0.65	0.05	4.74				0.81				1.61		4.65		
16	6.32	21.8		7.87	1.71	6.77	3.51	0.01	0.44	0.14	0.43	0.70	0.86					5.41		3.38	1.81	
17	7.57	0.14		0.39		1.64	12.2	0.91		1.52	1.52	1.35		0.45						10.1		
18	4.90	3.10		17.3	0.23	2.25			0.27	0.08	0.82	0.25	1.56					6.40		6.09	7.49	
19		11.7		20.6	6.90	1.30				2.00	0.70	1.96		8.37				3.00		2.80	0.90	
Peak number	6	7	7	12	6	16	8	3	13	11	14	13	17	10	8	4	3	13	7	12	10	10

Continued

Sample No.	Relative retention value (α)																				
	0.222	0.229	0.252	0.274	0.291	0.310	0.321	0.350	0.370	0.397	0.423	0.459	0.478	0.497	0.535	0.550	0.602	0.660	0.715	0.737	0.788
	Content (%)																				
1	1.46	3.36	3.51		2.29	2.37	1.86	0.11							5.72	0.26	14.6	5.21			1.81
2	8.30	1.60	2.30	1.60	0.80	1.90	1.30	0.80	0.30	0.61					2.20	0.40	10.9	0.90			1.80
3		0.80	1.30	2.40	1.70		4.20	0.50						0.20	0.05	0.60			0.20		
4		4.00	4.20	3.80	2.80									0.40	2.10	22.6	0.70				2.10
5	13.5	1.19	3.55	3.55	2.04	2.04	0.65	0.60	0.77						2.12	0.30	2.65	1.99			
6		6.40	1.32	2.05	1.66		6.70	0.29							1.80	6.20	0.70				0.80
7	4.80	2.66		0.60	0.20	0.50	0.30	0.60						0.70	0.50	4.10	1.70				0.60
8	0.94	4.00	3.73	3.40	0.95	4.84	0.80	1.37					0.02		3.40	4.90	1.79				
9		3.35	6.11		0.90	2.30	0.40	0.40						1.20	0.30	13.8	3.00				4.20
10		2.30	0.62	1.50	1.57	1.84	0.73	4.22	1.12	0.96	0.53	0.31	0.31	5.27	0.53	11.2	4.47				2.92
11		18.3	1.71	9.19	3.59	3.87	1.97	1.11	1.73	3.07	1.81	0.22	0.44	0.37	1.21	0.26	2.97	0.45			
12				1.50	1.47	0.88								0.92	2.72	7.22					1.33
13				1.94	2.58									0.85	0.15	2.39	3.33				0.73
14				3.59	3.87									0.85	0.15	2.39	3.33				1.97
15				5.29	2.49	0.60	0.48							2.30	1.82	1.06	2.82			4.01	1.00
16				7.16	3.97	3.47								0.87	0.03	3.22				2.13	3.77
17				4.92	3.29	4.85	2.67							2.58	11.7	2.05					4.47
18				12.0	9.66		2.95							1.00	4.37	0.91					3.56
19				0.70	4.30	12.5	4.90							2.90	2.10						0.50
Peak number	5	13	14	12	14	6	10	13	10	13	10	16	4	7	8	12	19	14	4		16

Continued

Sample No.	Relative retention value (α)																	Peak Number			
	0.838	0.875	0.915	1.00	(tr)	1.07	1.16	1.20	1.25	1.34	1.44	1.54	1.59	1.70	1.80	1.96	2.07		2.20	2.35	2.55
	Content(%)																				
1	0.88			21.6	22.97		2.39		2.72		5.14	1.48			5.08		2.13	3.30	1.72		32
2		0.20		4.30	20.27			1.86		3.10			0.80		3.00		1.30	0.85	1.12		32
3	0.10		0.06	1.75	20.25		0.03			0.30											30
4				9.60	19.96			1.27		0.56					2.90		3.10		3.00		32
5	2.03			5.91	20.34		4.03				2.96		1.01		2.41		4.90	5.21	4.56		32
6			1.50	15.0	20.64		2.90	10.1			2.10	3.70		16.0		1.70	1.10	3.20			31
7				7.20	20.07		1.60		1.70		4.30			2.00		0.90	1.60	1.90			28
8				25.0	20.16		2.10	2.58			6.07	4.40	4.86	4.81		1.61	1.69	2.00	0.33		32
9			0.37	20.4	20.29		4.40			0.90	5.20		0.32	5.10		2.50	3.10	3.10			34
10				15.4	20.41		1.02	3.51		0.31	2.47	1.31	1.24	4.61		2.61	3.36	2.07			32
11			1.30	8.56	20.15		2.55		2.59	1.69			8.06	4.75		3.84		3.33			35
12				1.76	21.42		0.60		0.60		0.67		0.62	0.74		0.48				0.44	
13				9.93	21.83		2.28			0.24	2.52		0.42	3.19		2.06	1.36	1.12			26
14	0.82			14.8	22.41			0.40	0.37		1.79			1.79	0.39	0.56	0.71				37
15				3.29	22.45		3.89				5.67		18.3	4.50			7.55		2.23		33
16				5.66	22.27		0.44		0.25	0.14	1.23	0.32		1.87		0.22	0.39	0.27			41
17				5.20	22.32		0.35	1.29			2.21		3.19	2.10		2.54	1.09	1.88			35
18				2.24	22.42		0.27		0.48		0.75	0.46		1.39		1.12	0.71	1.04			33
19	1.70			2.10	22.02		0.20		0.50		0.70	0.30		1.20							30
Peak number	6	1	4	19	11	12	9	11	6	18	7	11	1	18	1	16	14	14	3		

1. *Bupleurum chinense* DC.;
2. *B. polycolorum* Y. Li et S. L. Pan;
3. *B. angustissimum* (Franch.) Dittagawa;
4. *B. marginatum* Wall. ex DC. var. *stenophyllum* (Wolff) shan et Li;
5. *B. luridense* Y. Li et S.L.Pan;
6. *B. rockii* Wolff;
7. *B. kunningense* Y. Li et S.L.Pan;
8. *B. hamiltonii* Belak;
9. *B. longicaule* Wall. ex DC. var. *franchetii* de Boiss;
10. *B. chaitshou* Shan et Sheh;
11. *B. scorzonnerifolium* Willa;
12. *B. wenchuanse* Shan et Y. Li;
13. *B. malconense* Shan et Y. Li;
14. *B. smithii* Wolff;
15. *B. euphorbioides* Nakai;
16. *B. smithii* Wolff var. *parvifolium* Shan et Y. Li;
17. *B. marginatum* Wall. ex DC;
18. *B. longiradiatum* Turcz;
19. *B. qinghaiense* Y. Li et Guo sp. nov.

出峰最多, 达 41 个, 马尔康柴胡峰数最少, 为 26 个。

在指纹谱中 α 值为 0.66 和 1 的两个峰, 系 19 种植物挥发油所共有的组分, 可以作为柴胡属植物挥发油的特征峰; α 值为 1.440 和 1.800 的两个峰, 为 18 种植物所共有; α 值为 0.130 的峰是 17 种植物所有; α 值为 0.070, 0.788 和 2.07 三个峰系 16 种植物所有。

上述这些峰可以作为该属植物的重要特征峰, 具有一定的鉴别意义。

三. 指纹谱中色谱峰的重叠率与八强峰的比较

重叠率的计算是以北柴胡的指纹谱为基准, 将北柴胡出峰数与欲对比样品的出峰数之和作分母, 两者相互重叠的共有峰数之两倍作分子, 以此分别求出 18 种植物挥发油色谱峰的重叠率, 如表 3 所示。重叠率从质的角度来说明其它 18 种植物与北柴胡的相关性。例如黑柴胡的重叠率高达 78.3%, 而空心柴胡仅为 48.5%, 由此可知, 前者与北柴胡较相似, 后者则差异较大。又例如小叶黑柴胡是黑柴胡的变种, 其两者之间的重叠率达 80%, 是否可从重叠率的大小来揭示其亲缘的程度尚待进一步研究。

Tab 2. Eight strong peaks of seven plant species

Sample No.*	Peak strong in order															
	1		2		3		4		5		6		7		8	
	%	α	%	α	%	α	%	α	%	α	%	α	%	α	%	α
1	21.62	1	14.62	0.660	5.72	0.535	5.21	0.715	5.14	1.44	5.08	1.80	4.12	0.195	3.51	0.2742
4	22.6	0.660	15.2	0.173	9.6	1	5.1	0.209	4.2	0.256	4.2	0.366	4.0	0.229	3.8	0.291
14	14.84	1	13.35	0.057	9.19	0.247	7.97	0.062	7.76	0.173	4.15	0.046	3.87	0.291	3.59	0.274
16	21.81	0.052	7.87	0.062	7.16	0.247	6.77	0.070	6.32	0.046	5.66	1	5.41	0.173	3.97	0.274
17	12.22	0.081	11.68	0.660	10.14	0.195	7.57	0.046	5.2	1	4.92	0.229	4.85	0.274	3.29	0.247
18	17.32	0.062	11.99	0.247	9.66	0.274	7.49	0.209	6.4	0.184	6.09	0.195	4.9	0.046	4.37	0.660
19	20.6	0.062	12.5	0.247	11.7	0.052	8.37	0.155	6.9	0.070	4.9	0.310	4.3	0.247	3.0	0.173

* See table 1.

Tab 3. The overlap of 18 plant species from *Bupleurum chinense* DC.

Sample No*	Overlap rate	Sample No*	Overlap rate	Sample No*	Overlap rate
2	56.3	8	59.4	14	78.3
3	64.5	9	48.5	15	61.5
4	59.6	10	59.4	16	74
5	62.5	11	68.6	17	62.7
6	63.5	12	50.8	18	75.8
7	66.7	13	58.6	19	74.2

* See table 1.

八强峰则是根据色谱图中每个峰的相对百分含量, 选出含量较高的八个峰, 试以从量的角度比较 19 种植物挥发油组分的差异性。表 2 是任选七种植物的八强峰, 其中小叶黑柴胡尽管是黑柴胡的变种, 但它们的八强峰也有显著的差异。

重叠率和八强峰系由指纹谱衍生而来的, 它们可进一步被用来比较同属不同种之间的异同。本研究结果表明这两个特性在柴胡属不同种植物挥发油之间是各不相同的, 具有一定的鉴别意义。

四. 指纹谱具有下列优点:

(一) 由于指纹谱是以相对保留值为基础的数据谱系, 而相对保留值仅决定于组分的性

质、柱温和固定相性质,与固定液用量、柱长、柱径、填充情况及流速无关。这样,抵消了某些操作因素的影响,使在给定的实验条件下,样品各组分的相对保留值为其样品所特有。又由于参照峰为19种植物的共有组分,使 α 值的精度提高了。因此,在作比较分析时,可比性和准确性更符合分析的要求。

(二) 色谱图上的峰利用率为100%。

(三) 在利用指纹谱对同属不同种植物作比较分析时,无需标准品定性对照。

总之,指纹谱法的优点是简单易行,可使在标准品不足的情况下,充分利用色谱图所提供的信息,并能为生药品种的鉴别提供参考的依据。预期在不断完善的基础上,将为GC在分析复杂组分样品(例如挥发油)时,开创一个新的方法。

参 考 文 献

1. 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志. 第55卷. 第一分册. 北京: 科学出版社, 1979: 215.
2. 林明美, 等. 柴胡的薄层指纹分析. 药物分析杂志 1987; 7: 13.
3. 方洪钜, 等. 挥发油的气相色谱分析. 中草药 1982; 10: 34; 11: 43; 12: 45.
4. 洪筱坤, 等. 气相色谱法在中草药及其成药分析中的应用. 药物分析杂志 1986; 6: 371.

THE FINGERPRINT SPECTRUM ANALYSIS OF GC RELATIVE RETENTION VALUES FOR ESSENTIAL OIL OF 19 SPECIES OF *BUPLEURUM* GENUS

XK Hong, ZH Wang, JX Guo* and Y Li*

(Shanghai College of Traditional Chinese Medicine, Shanghai; *Shanghai Medical University, Shanghai)

ABSTRACT It is for the first time that the fingerprint spectrum of essential oil of 19 species of *Bupleurum* genus is established by GC relative retention times, and according to the overlap ratio of peaks and eight strong peaks in the fingerprint spectrum, their comparative study is achieved. The results point out that the fingerprint spectrum, overlap ratio and eight strong peaks are different from each other in various species of the same genus. Hence, this method provides useful informations for identification of plant species and verification of new species. It is a development for application of GC in sample analysis of complex components. This method has some advantage as follows: easy to operate, standard compound unnecessary, high utilization ratio for chromatographic peaks and good comparison.

Key words Chaihu (*Bupleurum chinense* DC.); Essential oil; Gas chromatography; GC-fingerprint spectrum