

白头翁属药用植物的 HPLC 指纹特征 与化学分类研究

李海燕¹, 李宏博¹, 郝宁¹, 许永男², 朴钟云^{1*}

(1. 沈阳农业大学园艺学院, 辽宁 沈阳 110866;

2. 沈阳药科大学 SK Chemicals 药物研究室, 辽宁 沈阳 110016)

[摘要] 目的:建立白头翁属5种药用植物皂苷类成分的HPLC指纹特征图谱,为这5种药用植物的鉴定及亲缘关系评价提供依据。方法:采用HPLC测定白头翁属药用植物的指纹图谱,依据获得的色谱数据对各样品进行分析与鉴定。结果:建立了白头翁属5种药用植物中皂苷类成分的HPLC指纹图谱,这5种药用植物均显示了其共性和各自的指纹特征;确立10个色谱峰为共有峰。运用系统聚类将14份样品聚成4类:第Ⅰ、Ⅱ、Ⅳ类分别为朝鲜白头翁、蒙古白头翁和白头翁;第Ⅲ类由兴安白头翁、细叶白头翁组成。朝鲜白头翁与兴安白头翁、蒙古白头翁与细叶白头翁之间的化学亲缘关系较远。结论:聚类结果与传统分类结果有较好的一致性。HPLC化学图谱可用于白头翁属植物的分类和鉴别研究,并为白头翁属植物指纹图谱研究和质量控制提供重要参考。

[关键词] 白头翁属; HPLC 指纹图谱; 聚类分析

白头翁属 *Pulsatilla* Adans 为毛茛科,多年生草本植物。全世界约43种,主产欧、亚两大洲,我国有11种,主要分布在辽宁、吉林、黑龙江、内蒙古、新疆等地^[1]。我国白头翁属植物研究主要集中于化学成分和药理活性方面。白头翁属植物中的化学成分主要为三萜皂苷类,分别属于羽扇豆烷型和齐墩果烷型^[2-4, 7-8]。现代药理研究表明,白头翁属植物不仅具有传统的清热解毒、凉血止痢作用,还有抗微生物、抗蔗糖酶、抗肿瘤等功效,近年研究还发现朝鲜白头翁所含的某些活性成分对治疗老年性痴呆(阿尔茨海默病, Alzheimer's disease, AD)效果显著^[5, 8-10]。药典收载该属植物白头翁 *P. chinensis* 为中药白头翁的基原植物^[5]。该属的其他几个种也可作为白头翁入药^[6]。由于目前国内白头翁药材主要靠采挖野生植株,难以用形态学方法准确鉴定药材来源,如朝鲜白头翁与兴安白头翁、细叶白头翁和蒙古白头翁,其形态较为类似,易于混淆。因此,利用化学成分的特征鉴别白头翁物种、探讨白头翁

属植物种间亲缘关系具有重要意义。高效液相色谱(HPLC)能够直观显示生物体中的化学信息,并可用于化学分类研究。本研究旨在建立白头翁属5种14份样品药材的HPLC指纹图谱,根据其化学图谱的特征探讨白头翁属物种之间的亲缘关系和分类地位,并为该属药用植物的指纹鉴定和质量控制提供参考依据。

1 材料

试验所用材料于2009年4-7月采自我国东北地区和内蒙古自治区,共14份样品,其编号、类群及采集地等见表1。

Agilent1100 高效液相色谱仪(包括在线真空脱气机、四元泵、VWD 检测器、及 HP Chemstation 色谱工作站);旋转蒸发器 RE-52A(上海亚荣生化仪器厂);KQ-400DV 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);JA5003A 电子天平;粉碎机;BS124S 电子天平(赛多利斯科学仪器有限公司);真空泵。

白头翁皂苷 B₄对照品,购于上海融禾医药科技有限公司;乙腈,色谱纯,购自 Fisher 公司;无水乙醇、甲醇均为国产分析纯。

2 方法

2.1 色谱条件

色谱柱: Symmetry[®] C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250

[稿件编号] 20101029005

[基金项目] 中韩合作项目(SK2007005)

[通信作者] * 朴钟云,教授,博士生导师, Tel: (024) 88487143, E-mail: zypiao@gmail.com

[作者简介] 李海燕,博士研究生,主要从事药用植物栽培生理研究, Tel: (024) 88487143, E-mail: cjmin820518@126.com

mm $5\ \mu\text{m}$); 流动相为水(A)和乙腈(B); 梯度洗脱条件为 0 ~ 8 min (90% ~ 77% A), 8 ~ 25 min (77% ~ 71% A), 25 ~ 40 min (71% ~ 60% A), 40

~ 50 min (60% ~ 50% A), 50 ~ 75 min (50% ~ 10% A), 75 ~ 80 min (10% ~ 0% A); 检测波长 210 nm; 柱温 35℃; 流速 0.5 mL · min⁻¹。

表 1 白头翁属植物样品

No.	类群	采集地	备注
S1	朝鲜白头翁 <i>Pulsatilla koreana</i>	沈阳农业大学药用植物园	野生移栽型
S2	朝鲜白头翁 <i>P. koreana</i>	沈阳农业大学药用植物园	栽培型
S3	朝鲜白头翁 <i>P. a koreana</i>	沈阳农业大学药用植物园	栽培型
S4	朝鲜白头翁 <i>P. koreana</i>	吉林省延边朝鲜族自治州	野生型
S5	朝鲜白头翁 <i>P. koreana</i>	辽宁省宽甸满族自治县	野生型
S6	朝鲜白头翁 <i>P. koreana</i>	辽宁省清源满族自治县	野生型
S7	朝鲜白头翁 <i>P. koreana</i>	辽宁省新宾满族自治县	野生型
S8	兴安白头翁 <i>P. dahurica</i>	黑龙江省哈尔滨市	野生型
S9	蒙古白头翁 <i>P. ambigua</i>	吉林省延边朝鲜族自治州	野生型
S10	兴安白头翁 <i>P. dahurica</i>	沈阳农业大学药用植物园	栽培型
S11	蒙古白头翁 <i>P. ambigua</i>	黑龙江省哈尔滨市	野生型
S12	细叶白头翁 <i>P. turczaninowii</i>	内蒙古自治区卓资县	野生型
S13	兴安白头翁 <i>P. dahurica</i>	黑龙江省哈尔滨市	野生型
S14	白头翁 <i>P. chinensis</i>	辽宁省沈阳市	野生型

2.2 对照品和供试品溶液的制备

精密称取 4.0 mg 白头翁皂苷 B₄对照品,置于 10 mL 量瓶中,用适量甲醇溶解,定容至刻度并摇匀,制成浓度为 0.4 g · L⁻¹对照品贮备液。

称取 1.000 g 样品 S1 的粗粉,加入 80% 乙醇 20 mL,于 50℃,80 W 功率条件下超声 40 min,抽滤,洗涤,合并滤液。提取液经浓缩回收溶剂后,用甲醇定量转移至 25 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,定容。吸取时过 0.45 μm 滤膜。

2.3 方法学验证

2.3.1 精密度试验 取 2.2 中供试品溶液在 2.1 液相色谱条件下,连续进样 5 次,测定各共有指纹峰的保留时间和峰面积,以白头翁皂苷 B₄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 0.038% ~ 0.97%,相对峰面积的 RSD 在 1.7% ~ 2.8%,表明仪器精密度良好。

2.3.2 稳定性试验 取 2.2 中供试品溶液分别于制备后 0, 8, 16, 24, 48 h 进样,测定各共有指纹峰的保留时间和峰面积,以白头翁皂苷 B₄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 0.043% ~ 0.83%,相对峰面积的 RSD 在 1.5% ~ 3.0%,说明样品在 48 h 内是稳定的,符合指纹图谱的检测要求。

2.3.4 重复性试验 取 2.2 中供试品溶液 5 份,按

供试品溶液制备方法制备供试品溶液,分别进样,测定各共有指纹峰的保留时间和峰面积,以白头翁皂苷 B₄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 0.057% ~ 0.42%,相对峰面积的 RSD 在 1.8% ~ 3.0%,说明该方法重复性良好,符合指纹图谱的检测要求。

2.3.5 样品分析 将 14 份白头翁属植物样品的供试液,按 2.1 项下色谱条件进样分析,记录色谱图,同时用对照品溶液进样以确定白头翁皂苷 B₄的峰位。

2.3.6 数据处理 将分析所得的 14 个样品 HPLC 色谱图导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004 A 版》。以样品 1 号作为指定参照图谱,经色谱峰匹配,采用中位数法生成对照图谱。

以各色谱峰的相对峰面积为变量,运用 DPS 软件中的 Q 型聚类法,选择类平均法(UPGMA)和欧氏距离平方(squared euclidean distance),对各样品进行聚类分析,得出树形图。

3 结果

3.1 不同植物来源的白头翁属植物样品 HPLC 图谱直观分析

按 2.1 项下色谱条件对 14 份白头翁属药用植物样品进行了检测,样品中所有成分的色谱峰在 80 min 之内出完,见图 1。由图 1 可见,样品 S1 ~ S7 的各峰峰面积有所不同,但其 HPLC 图谱整体面貌相

似; 样品 S8, S10, S12, S13 的整体图谱相似; S9 和 S11 峰型相似, S14 自成一类。从色谱峰数目看, 最多的是样品 S12(细叶白头翁), 为 49 个, 其次是样品 S9, S11, 分别为 47 和 46。样品 S1-S7 平均色谱峰数为 39 个, S8 和 S13 所检测到的色谱峰最少, 为 33 个。

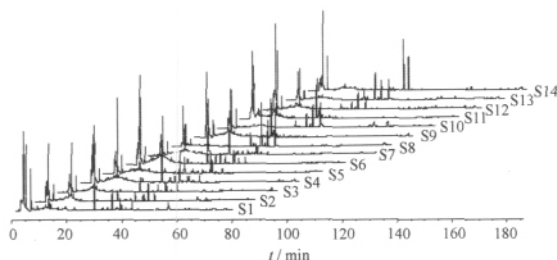


图1 14份白头翁属植物样品的HPLC图谱

3.2 白头翁属药用植物的HPLC指纹图谱及技术参数

3.2.1 白头翁属药用植物的HPLC指纹图谱及共有峰的标定 将分析所得的14个样品HPLC色谱图导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统2004A版》, 以样品S1作为参照图谱, 进行色谱峰匹配, 匹配数据显示其中10个峰是所有样品共有的, 分别为第1, 2, 6, 12, 20, 26, 28, 30, 51, 52号峰, 见图2。通过与对照品图谱比较, 30号峰被鉴定为白头翁皂苷 B_4 。白头翁属植物除上述10个共有色谱峰以外, 第24, 25, 29, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37号色谱峰的积分面积也较大, 表明其为白头翁属植物主要的化学成分。

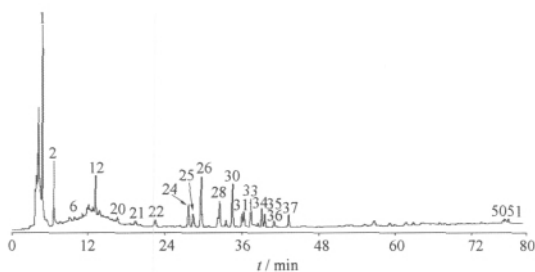


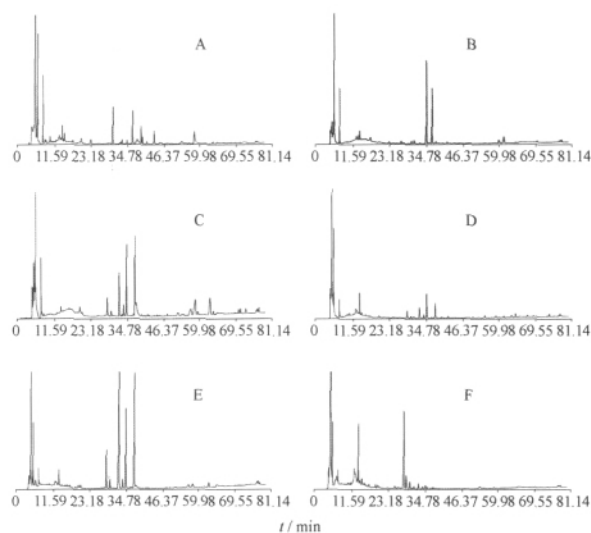
图2 白头翁属植物的典型HPLC指纹图谱

3.2.2 共有峰保留时间及峰面积的比值确定 以白头翁皂苷 B_4 为参照, 把各色谱峰保留时间与同一图谱中白头翁皂苷 B_4 保留时间的比值作为各色谱峰的相对保留时间。各共有峰峰号(相对保留时间)分别为: 1(0.143~0.144), 2(0.195~0.197), 3

(0.291~0.292), 4(0.385~0.386), 5(0.474~0.487), 6(0.845~0.871), 7(0.936~0.952), 8(0.999~1.012), 9(2.225~2.239), 10(2.245~2.248)。精密吸取对照品溶液20 μ L, 按上述色谱条件测定, 以所得的白头翁皂苷 B_4 峰面积作为1, 计算各样品图谱中色谱峰的峰面积比值。各共有峰的峰号(峰面积比值)分别为: 1(1.185~4.965), 2(0.603~2.853), 3(0.318~1.526), 4(0.647~3.055), 5(0.440~2.442), 6(0.354~5.855), 7(0.268~5.507), 8(0.268~5.681), 9(0.211~1.003), 10(0.323~1.320)。

3.3 白头翁属的不同种植物HPLC图谱的比较

白头翁属不同种植物的HPLC图谱见图3。相对保留时间比对结果, 不同供试物种存在特殊的色谱峰, 如S9和S11特有的第24号峰($t_R=0.807$), S8, S9, S10, S11, S12, S13的第25号峰($t_R=0.825\sim0.830$), S1-S7和S14的第32号峰($t_R=1.050\sim1.058$), S1-S7独有的第34($t_R=1.132\sim1.135$), 35($t_R=1.152\sim1.156$)和37号($t_R=1.258\sim1.262$)峰。结果表明, 白头翁属不同种植物的HPLC图谱差别明显, 可用于白头翁属药用植物的真伪鉴别。



A. 朝鲜白头翁(S1); B. 白头翁(S14); C. 兴安白头翁(S10); D. 细叶白头翁(S12); E. 兴安白头翁(S8); F. 蒙古白头翁(S11)。

图3 白头翁属不同种植物的HPLC图谱

3.4 白头翁属植物的HPLC图谱的聚类分析

根据各色谱峰的相对峰面积进行系统聚类, 结

果见图4。聚类距离在2.72时样品S1~S7号聚为第Ⅰ类,聚类紧凑,表明其HPLC化学图谱相似性很高,包括野生移栽的朝鲜白头翁、二年生和三年生的栽培型朝鲜白头翁,以及采自吉林延边、辽宁宽甸、清源和新宾的野生朝鲜白头翁;样品S9与S11聚为第Ⅱ类,均为蒙古白头翁;样品S8、S10、S12和S13共聚为第Ⅲ类,其中S8、S10和S13为兴安白头翁,S12为细叶白头翁。S12与S8、S10、S13 3个样品的植物学特征虽然不同,但其HPLC图谱相似性较高,显示其化学亲缘关系近;S14单独聚成第Ⅳ类。

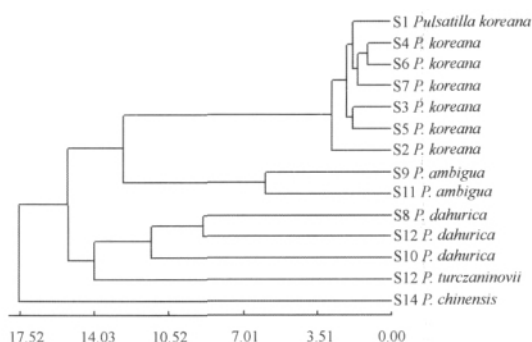


图4 白头翁属植物的系统聚类分析图

4 讨论

白头翁属植物的鉴别和分类主要依赖于植物地上部形态特征,缺乏从试验数据中获取分类依据的方法。通过优化HPLC色谱条件建立了白头翁属药用植物的HPLC指纹特征图谱,优化的色谱条件下得到的色谱图化学信息更丰富,基线平稳,各主要色谱峰保留时间适中、分离度较好,具有很好的稳定性、重复性和可行性。

用所建立的白头翁属不同种植物的HPLC指纹图谱特征,有效地区分了朝鲜白头翁、兴安白头翁、白头翁、细叶白头翁和蒙古白头翁,对白头翁类药材的鉴别具有重要意义。

白头翁属植物的皂苷是其进行化学分类的特征性成分,朝鲜白头翁、兴安白头翁、白头翁、细叶白头翁和蒙古白头翁的HPLC图谱存在明显差别。第24号峰为蒙古白头翁特有峰,可以作为蒙古白头翁与其他4种的差异峰。第32号峰是朝鲜白头翁和白头翁共有的特征峰,可以作为区分兴安白头翁、细叶白头翁和蒙古白头翁的依据。第34、35、37号峰为朝鲜白头翁独有的色谱峰,可作为区分朝鲜白头

翁和其他4种的差异峰。细叶白头翁和兴安白头翁二者的HPLC图谱相似性较高,提示具有一致的皂苷类成分,共聚为第Ⅲ类,尽管二者的叶片形态有明显差异。白头翁与其他4种的HPLC图谱存在明显差异,聚类图中单独成为第Ⅳ类,且其主要化学成分白头翁皂苷B₄的含量明显高于其他种。该结果表明白头翁与其他种存在较远的亲缘关系。

研究表明HPLC指纹图谱不仅可用于植物种类、品种鉴别研究^[11-14],在中药材质量控制方面也发挥了重要作用^[15-16]。白头翁属植物的HPLC图谱不仅能反映不同物种所含单体皂苷的种类多少或有无,也可作为化学分类的重要依据。同时由峰面积大小可以准确计算各个皂苷单体的含量,为筛选出高皂苷含量的优良种质提供指导。

本研究结果表明HPLC指纹图谱不仅可用于白头翁属物种鉴别、种间亲缘关系和分类研究,还将为白头翁属种质资源的开发利用及其质量控制提供重要参考。

【参考文献】

- [1] 中国科学院植物研究所. 中国高等植物图鉴[M]. 北京: 科学出版社, 2001, 442.
- [2] 付云明. 朝鲜白头翁化学成分的研究[D]. 石家庄: 河北医科大学, 2007.
- [3] Bang S C, Kim Y, Lee J H, et al. Triterpenoid saponins from the roots of *Pulsatilla koreana* [J]. J Nat Prod, 2005, 68(2): 268.
- [4] Xu T H, Xu Y J, Han D, et al. Triterpenoid Saponins from *Pulsatilla cernua* (Thunb.) Bercht. et Opiz [J]. J Integrative Plant Biology, 2006, 49(2): 202.
- [5] 中国药典. 一部[S]. 2010.
- [6] 国家中医药管理局. 中华本草[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999, 3: 239.
- [7] 张庆文, 叶文才, 赵守训, 等. 朝鲜白头翁的三萜皂苷研究[J]. 药学报, 2000, 35(10): 756.
- [8] 李勇, 林翠英. 白头翁属植物化学成分及活性研究概述[J]. 天津中医药, 2005, 22(6): 526.
- [9] 许永男, 关颖丽, 刘建宇, 等. 朝鲜白头翁的化学成分研究[C]. 第九届全国中药和天然药物学术研讨会大会报告及论文集, 2007.
- [10] Han C K, Park Y H, Jin D Q, et al. SK-PC-B70M from *Pulsatilla koreana* improves scopolamine-induced impairments of memory consolidation and spatial working memory [J]. Brain research, 2007, 1184(12): 254.
- [11] 袁菊红, 彭峰, 冯照, 等. 应用HPLC图谱进行石蒜属种间关系与分类研究[J]. 西北植物学报, 2007, 27(11): 2195.

- [12] 张雪辉,陈建民. 高效液相色谱-系统聚类分析方法在风轮菜属药材分类中的应用[J]. 中国中药杂志, 2003, 28 (9): 812.
- [13] 石晋丽,刘勇,肖培根. 缬草属药用植物极性成分的 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中国中药杂志, 2005, 30 (6): 426.
- [14] 范晓磊,万定荣,叶丛进. 卷柏属药用植物的 HPLC 指纹特征研究[J]. 中国中药杂志, 2007, 32(20): 2102.
- [15] 刘义全,于能江,杨学东. 络石藤高效液相色谱指纹图谱研究[J]. 中国中药杂志, 2009, 34(6): 727.
- [16] 张家辉,杨蕊,邓洪平. 缙云黄芩 HPLC 指纹图谱的建立及其不同部位活性成分含量研究[J]. 中国中药杂志, 2009, 34 (19): 2485.

Study on HPLC fingerprint characteristics and chemotaxonomy of *Pulsatilla* medicinal plants

LI Haiyan¹, LI Hongbo¹, HAO Ning¹, XU Yongnan², PIAO Zhongyun^{1*}

(1. College of Horticulture, Shenyang Agricultural university, Shenyang 110866, China;

2. SK Chemicals Lab of Materia Medica, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

[Abstract] **Objective:** To establish HPLC characteristic fingerprints of the saponins in *Pulsatilla* medicinal plants, and provide the basis for authentication and classification of *Pulsatilla* species. **Method:** The HPLC profiles were determined at 35°C on a Symmetry C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm 5 μm) eluted with water (A) and acetonitrile (B) as mobile phases in a linear gradient elution with the flowrate of 0.5 mL · min⁻¹. The elution program was as follows: 0-8 min, 90% A to 77% A, 8-25 min, changed to 71% A, 25-40 min, to 60% A, 40-50 min, to 50% A, 50-75 min, to 10% A, 75-80 min, to 0% A. The detection wavelength was set at 210 nm. **Result:** The different species of *Pulsatilla* showed different HPLC fingerprints, but with 10 common peaks. A cluster analysis of 14 accessions indicated that they were divided into four groups: all accessions from *P. koreana* were classified into group I, *P. ambigua* in group II, *P. dahurica* and *P. turczaninowii* in group III, and *P. chinensis* in group IV, respectively. The significant differences between *P. koreana* and *P. dahurica*, and between *P. turczaninowii* and *P. ambigua* were observed. **Conclusion:** The results obtained were in agreement with the traditional taxonomic study. The method was rapid and precise, not only can be used to classify and authenticate *Pulsatilla* species, but also provides important references for HPLC fingerprints and quality control of *Pulsatilla* medicinal plants.

[Key words] *Pulsatilla adans*; HPLC fingerprint; cluster analysis

doi: 10.4268/cjcm20111116

[责任编辑 丁广治]