

八角莲的 TLC 鉴别和 HPLC 指纹图谱研究*

陆雪萍, 梅双喜, 彭玲芳, 陆礼和, 李小辉[△]

(云南白药集团创新研发中心 / 云南省药物研究所 / 云南省中药和民族药新药创制企业重点实验室, 云南 昆明 650111)

摘要: 目的 建立八角莲 TLC 鉴别方法和 HPLC 指纹图谱, 为其质量控制提供专属性更好的测试方法。
方法 采用乙酸乙酯超声提取制备供试品溶液, 以氯仿-甲醇-水(9:1:0.1)作为展开系统, 展距 13cm, 10%硫酸乙醇溶液为显色剂; 采用 HPLC 法, Thermo Accclaim™ 120 C₁₈(4.6×250 mm, 5 μm)色谱柱, 乙腈-0.05%磷酸水溶液为流动相, 梯度洗脱, 流速为 1.0mL/min, 检测波长为 203nm, 柱温 36℃; 采用中药色谱指纹图谱评价系统进行相似度分析。
结果 建立了八角莲药材的 TLC 鉴别方法和 HPLC 指纹图谱, 确定 11 个共有色谱峰, 方法学验证结果符合指纹图谱相关要求。
结论 该方法简单、可靠, 可用于八角莲药材的鉴别和质量控制。

关键词: 八角莲; 薄层色谱; HPLC 指纹图谱; 质量控制

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-2723(2016)04-0030-05

DOI: 10.19288/j.cnki.issn.1000-2723.2016.04.007

八角莲为小檗科植物八角莲 *Dysosma versipellis* (Hance) M. Cheng 的根茎。别名鬼臼, 是我国传统的民间常用药之一, 具有清热解毒、祛痰散结的功效。临床用于治疗流行性出血热、乙型脑炎、腮腺炎、痈肿疮、咽喉肿痛、跌打损伤、风湿痹痛、毒蛇咬伤及抗癌等, 特别用于食道癌、子宫癌^[1]。以鬼臼之名始载于《神农本草经》。但历代本草记载多有混淆之处, 近代植物学者又将鬼臼之名用于桃儿七。该药材作为民族药收载于《云南省药材标准》第 1 册(2005 年版)8 页, 药材质量标准只有简单的薄层鉴别和浸出物测定^[2]。八角莲是云南省药物研究所研制的“金品”痛舒胶囊、肿痛气雾剂等产品的重要原料之一^[3], 为了有效地控制其质量, 笔者对其 TLC 鉴别方法和 HPLC 指纹图谱进行了较为系统的研究。

1 仪器和材料

AgiLent 1260 高效液相色谱仪(AgiLent, Germany, 配有真空脱气机、自动进样器、四元泵、DAD 检测器)。LABOROTA 4000 型旋转蒸发仪(Heidolph, Germany); METTLER-TOLEDO AG-285 型电子分析天平(METTLER-TOLEDO(上海)有限公

司生产); SK8200HP 超声波清洗器(上海科导超声仪器有限公司); ZF-90 多功能暗箱式紫外投射仪(上海宝山顾村电光仪器厂); 可调式封闭电炉(FL-北京光明医疗仪器有限公司); 薄层色谱展开缸(上海信谊仪器厂); 默克薄层层析硅胶 G 板(默克化工技术上海有限公司); 青岛海洋高效 G 板和普通 G 板(青岛海洋化工厂分厂); Milli-Q® Advantage A10® system 超纯水机(美国 Millipore 公司); 乙腈为色谱纯(Merck KGaK); 水为自制超纯水; 甲醇、乙醇、乙酸乙酯、氯仿、硫酸等试剂均为分析纯。

芦丁(批号: 100080-201408, 中国食品药品检定研究院)、山奈酚(批号: 110753-200212, 中国药品生物制品检定所)、槲皮素(批号: 110753-200212, 中国药品生物制品检定所)、鬼臼毒素(批号: 110753-200212, 中国药品生物制品检定所)、α-足叶草脂素(赛纳斯特化学(上海))、异槲皮苷、紫云英苷(贵州迪大科技责任有限公司)、Podoverine A、Dysoverine D、Dysoverine A 和山奈酚-3-O-芸香糖苷(实验室自制)。

八角莲(10 批: BJJL-001, BJJL-002, BJJL-003, BJJL-004, BJJL-005, BJJL-006, BJJL-007, BJJL-008,

* 基金项目: 云南省科技领军人才培养计划项目(2014HA001)

收稿日期: 2016-04-03

作者简介: 陆雪萍(1987-), 女, 广西阳朔人, 助理工程师, 主要从事天然药物化学方面的研究。

[△]通信作者: 李小辉, E-mail: airalone@163.com

BJL-009, BJL-010), 采自云南省文山州, 经云南省药物研究所邱斌高级工程师鉴定, 标本保存于云南省药物研究所标本室。

2 方法和结果

2.1 TLC 鉴别

《云南省药材标准》第1册(2005年版)八角莲【鉴别】项中采用了薄层色谱法, 以鬼臼毒素、山奈酚作为对照品进行八角莲的鉴别。为了使鉴别的专属性更强, 本研究拟以八角莲对照药材及八角莲中的3个主要指标性成份鬼臼毒素、山奈酚、槲皮素作为对照物质进行薄层色谱鉴别研究。

2.1.1 溶液制备

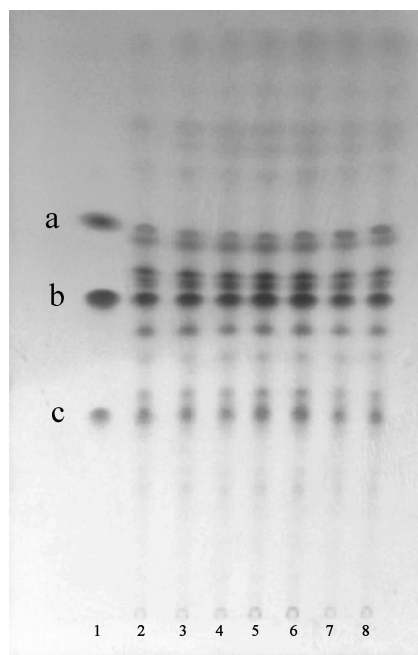
供试品溶液的制备: 取八角莲药材粉末 1.0 g, 加乙酸乙酯 25 mL, 超声处理 30 min, 滤过, 滤液作为供试品溶液。

对照药材溶液的制备: 取八角莲对照药材 1.0 g, 按“供试品溶液的制备”方法制成对照药材溶液。

对照品溶液的制备: 取鬼臼毒素、山奈酚、槲皮素对照品, 加甲醇制成每 1 mL 各含 0.5 mg 的混合溶液作为对照品溶液。

2.1.2 鉴别

吸取供试品溶液、对照药材溶液和对照品溶液各 5 μ L, 分别点于同一硅胶 G 薄层板(德国默克公司)上, 以氯仿-甲醇-水(9:1:0.1)作为展开系统, 展开 13 cm, 取出, 晾干, 喷以 10% 硫酸乙醇溶液, 置 105 $^{\circ}$ C 加热至斑点显色清晰。结果表明, 供试品与对照药材在相应位置显示相同的斑点, 如图 1 所示。



1. 对照品: a 鬼臼毒素, b 山奈酚, c 槲皮素;
2. 对照药材; 3~8. 6 批供试品药材

图 1 八角莲薄层色谱图

2.2 八角莲药材部分特征峰的化学指认

取八角莲供试品溶液(BJL-001)及混合对照品溶液进样, 根据对照品的保留时间可以对八角莲药材的部分色谱特征峰进行指认, 峰 1 为芦丁, 峰 2 为异槲皮苷, 峰 3 为山奈酚-3-O-芸香糖苷, 峰 4 为紫云英苷, 峰 5 为槲皮素, 峰 6 为 α -足叶草脂素, 峰 7 为山奈酚, 峰 8 为鬼臼毒素, 峰 9 为 Podoverine A, 峰 10 为 Dysoverine D, 峰 11 为 Dysoverine A, 见图 2。

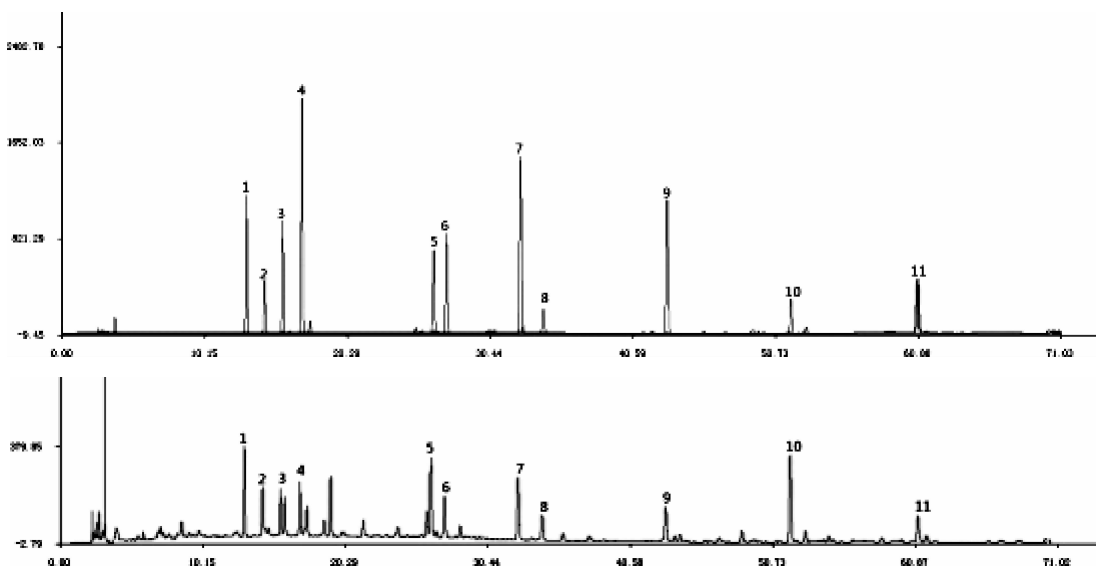


图 2 混合对照品(上图)和八角莲药材(下图)的 HPLC 图谱

2.3 HPLC 指纹图谱研究

2.3.1 色谱条件

色谱柱为 Thermo Acclaim™120 C18 (4.6×250 mm, 5 μ m), 流动相为乙腈(A)-0.05%磷酸水溶液(B)为流动相, 梯度洗脱(0~65 min, 13%~65% A; 65~67 min, 65%~13% A; 67~70 min, 13% A), 流速为 1.0 mL/min, 检测波长为 203 nm, 柱温 36℃, 进样量为 10 μ L, 检测时间 70 min。

2.3.2 对照品溶液的制备

分别称取芦丁、山萘酚、槲皮素、鬼臼毒素、 α -足叶草脂素、异槲皮苷、紫云英苷、Podoverine A、Dysoverine D、Dysoverine A 和山奈酚-3-O-芸香糖苷适量, 加入甲醇制成每毫升含上述对照品 0.1 mg 的混标溶液, 摇匀, 备用。

2.3.3 供试品溶液的制备

取八角莲粉末 1.0 g, 精密称定, 精密加入 65% 乙醇 50 mL, 称定重量, 置 80℃ 水浴加热回流提取 1 h, 放冷, 称重, 补足减失重量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.3.4 方法学验证

2.3.4.1 精密度试验

取同一份供试品(BJL-001)溶液, 在上述色谱条件下重复进样 6 次, 记录指纹图谱。以 10 号峰为内参比峰, 其它各个峰与其比较获得相对保留时间与相对峰面积。各色谱峰相对保留时间 RSD $\leq$ 0.36%, 相对峰面积 RSD $\leq$ 0.38%, 表明仪器精密度

良好。

2.3.4.2 稳定性试验

取同一份供试品(BJL-001)溶液, 在上述色谱条件下分别于 0、2、4、8、24、48 h 进样, 记录指纹图谱。以 10 号峰为内参比峰, 其它各个峰与其比较获得相对保留时间与相对峰面积。各主要色谱峰相对保留时间 RSD $\leq$ 0.1%, 相对峰面积 RSD $\leq$ 2.31%, 表明供试品溶液在 48 h 内基本稳定。

2.3.4.3 重复性试验

取同一批八角莲药材(BJL-001)6 份, 精密称定, 按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液, 在上述色谱条件下进样, 记录指纹图谱。以 10 号峰为内参比峰, 其它各个峰与其比较获得相对保留时间与相对峰面积。各主要色谱峰相对保留时间 RSD $\leq$ 0.08%, 相对峰面积 RSD $\leq$ 2.05%, 表明供试品溶液的制备方法重复性良好。

2.3.5 指纹图谱的建立及其相似度评价

2.3.5.1 八角莲化学指纹图谱的建立

10 批八角莲按确定的方法制备供试品溶液, 各取 10 μ L 分别进样, 按确定的色谱条件进行 HPLC 分析, 记录其指纹图谱。运用中国药典委员会“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004A 版”对 10 批样品的指纹图谱进行分析, 设定 S1 为参照图谱, 进行多点校正, 自动匹配, 建立了八角莲药材指纹图谱, 结果见图 3, 其中 R 为指纹图谱共有模式。共确定了 11 个共有峰, 编号 1~11。

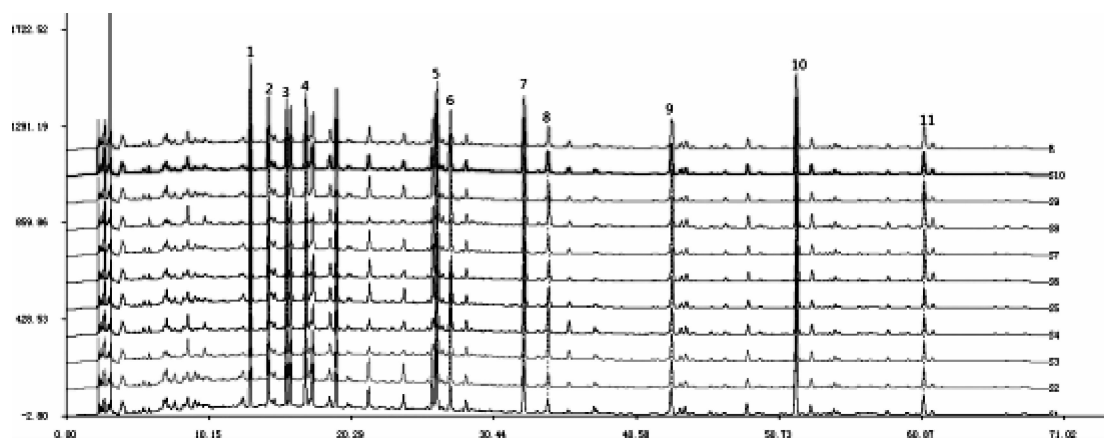


图 3 不同批次八角莲药材 HPLC 指纹图谱

2.3.5.2 相似度评价

将 10 批样品色谱数据导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2004 A 版)软件, 以特征指纹图谱共有模式为对照, 计算各批次样品的相似度。相似度

可以体现不同批次样品间各成分在种类及其相对量上的整体相似程度。分析结果表明, 不同批次八角莲药材指纹图谱相似度均大于 0.95, 见表 1, 说明不同批次八角莲药材中化学成分相似度较高。

表1 10批八角莲样品特征图谱与对照指纹图谱的相似度

	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	对照指纹图谱
S1	1.000	0.994	0.961	0.960	0.977	0.979	0.978	0.958	0.979	0.980	0.988
S2	0.994	1.000	0.947	0.952	0.982	0.971	0.976	0.936	0.980	0.971	0.982
S3	0.961	0.947	1.000	0.995	0.955	0.953	0.965	0.982	0.953	0.982	0.978
S4	0.960	0.952	0.995	1.000	0.965	0.952	0.969	0.972	0.958	0.985	0.980
S5	0.977	0.982	0.955	0.965	1.000	0.986	0.994	0.951	0.996	0.989	0.992
S6	0.979	0.971	0.953	0.952	0.986	1.000	0.995	0.971	0.994	0.989	0.992
S7	0.978	0.976	0.965	0.969	0.994	0.995	1.000	0.969	0.997	0.994	0.997
S8	0.958	0.936	0.982	0.972	0.951	0.971	0.969	1.000	0.955	0.984	0.976
S9	0.979	0.980	0.953	0.958	0.996	0.994	0.997	0.955	1.000	0.987	0.993
S10	0.980	0.971	0.982	0.985	0.989	0.989	0.994	0.984	0.987	1.000	0.998
对照指纹图谱	0.988	0.982	0.978	0.980	0.992	0.992	0.997	0.976	0.993	0.998	1.000

3 讨论

《云南省药材标准》第1册(2005年版)中八角莲的鉴别采用甲苯-乙酸乙酯-甲酸-甲醇(8:5:0.8:0.1)为展开剂,5%磷钼酸溶液显色,该法存在斑点过于集中、分离效果不佳的问题。在薄层鉴别方法改进实验中,我们考察了多种展开剂、展距、显色剂,最终确定以氯仿-甲醇-水(9:1:0.1)作为展开系统,展距13 cm,10%硫酸乙醇溶液为显色剂,所得到的薄层色谱图斑点清晰,分离良好。此外,改进了供试品溶液的制备方法,用乙酸乙酯取代了文献中的无水乙醇,改善了色谱图的分离效果。

在HPLC指纹图谱研究中,参照文献[4-7]选择乙腈-0.5%磷酸为流动相;采用二极管阵列检测器在200~400 nm波长范围内进行三维图谱扫描,八角莲药材的主要峰的光谱图显示其最大吸收均为末端吸收,为了使各组分达到吸收强、干扰小的目的,检测波长选择在203 nm处;比较了不同温度25、30、35、36、37℃对八角莲化学成分的分离效果,结果表明,柱温在36℃条件下测定,主成分的峰能达到有效分离;考察了0.8 mL/min、1.0 mL/min、1.2 mL/min 3个流速对八角莲药材指纹图谱的影响,流速在1.0 mL/min时,指纹图谱基线平稳,各主成分峰之间的分离效果好,因此选择流速为1.0 mL/min;供试品溶液制备比较了回流和超声提取方法,结果表明回流提取的主成份峰的面积比回流提取大,且设备要求简单,方便;同时考察了不同浓度乙醇溶液提取制备供试品溶液,结果表明采用65%乙醇制备供试品溶液,其主成分峰面积最大,因此选择65%乙醇提取样品。

八角莲药材中的化学成分主要包括木脂素类和黄酮类,如鬼臼毒素及其衍生物、山柰酚和槲皮素等,具有抗肿瘤、抗病毒、抗炎及免疫调剂等作用^[8-15]。该类化合物也是我所“金品”系列产品的活性成分,我们建立的八角莲TLC鉴别和HPLC指纹图谱,可用于药材的质量控制,保证药品质量的均一和安全稳定。

参考文献:

- [1] 冯艳. 八角莲的研究进展 [J]. 中药材, 2006, 29 (3): 308-309.
- [2] 云南省食品药品监督管理局. 《云南省中药材标准》第一册(2005年版)[M]. 云南: 云南美术出版社, 2005: 8.
- [3] 云南省药物研究所. 云南省药物研究所制药厂金品系列药品临床推介[J]. 云南中医中药杂志, 2004, 25(5): 50.
- [4] 肖昌钱, 杨淑贞, 单文, 等. HPLC 比较不同产地生药八角莲中鬼臼类成分含量 [J]. 中国现代应用药学杂志, 2009, 26(8): 659-661.
- [5] 张丽艳, 万明香, 何顺志, 等. HPLC 法测定贵州产八角莲属药材中鬼臼毒素的含量 [J]. 药物分析杂志, 2009, 29 (2): 202-204.
- [6] 罗君, 张丽艳, 万明香, 等. RP-HPLC 法测定八角莲属植物中槲皮素及山柰酚的含量 [J]. 中国中药杂志, 2010, 35 (22): 3021-3023.
- [7] 俞培忠, 姚莉韵, 王丽平. HPLC 法测定4种八角莲中鬼臼毒素的含量[J]. 上海医科大学学报, 1998, 25(6): 452-453.
- [8] 高秀红, 刘明川, 金林红, 等. 黔产八角莲化学成分的研究 [J]. 时珍国医国药, 2011, 22(4): 871-873.
- [9] 石磊岭, 魏鸿雁, 夏提古丽·阿不利孜, 等. 八角莲的化学成分研究[J]. 中国医药指南, 2012, 10(28): 55.

- [10] 夏提古丽·阿不利孜,贾晓光,熊元君,等. 八角莲的研究进展[J]. 新疆中医药,2010,28(3):69-72.
- [11] 赵立春,何颖,岳桂华,等. 八角莲属药用植物化学成分及生理活性研究进展 [J]. 中国民族民间医药,2009,18(13):37-39.
- [12] 秦小波. 中国八角莲属植物的研究进展 [J]. 资源开发与市场,2012,28(11):1018-1019,1043.
- [13] 张艳君,冯川. 八角莲活性成分鉴别及其抗癌活性研究 [J]. 吉林医药学院学报,2013,34(4):241-244.
- [14] 张敏,施大文. 八角莲类中药抗单纯疱疹病毒作用的初步研究[J]. 中药材,1995,18(6):306-307.
- [15] 吕敏,苏艳芳,郭增军,等. 八角莲属植物化学成分及生物活性研究概况[J]. 西北药学杂志,2006,22(3):152-153.
- (编辑:徐建平)

Study on TLC Identification and HPLC Fingerprint of *Dysosma versipellis*

LU Xueping, MEI Shuangxi, PENG Lingfang, LU Lihe, LI Xiaohui

(Yunnan Baiyao Group Innovation and R&D Center/Yunnan Institute of Materia Medica/Yunnan Province Company
Key Laboratory for TCM and Ethnic Drug of New Drug Creation, Kunming 650111, China)

ABSTRACT: **Objective** To establish the TLC identification method and HPLC fingerprint of *Dysosma versipellis* to provide better specificity test method for the quality control. **Methods** The sample solution was prepared by ultrasonic extraction with ethyl acetate, and the chloroform-methanol-water (9:1:0.1) was used as an expansion system, and the development of 13cm, 10% sulfuric acid ethanol solution was used as the chromogenic reagent; Thermo Acclaim™ 120 C₁₈ (4.6×250 mm, 5μm) was used with acetonitrile-0.05% phosphoric acid water solution as mobile phase in a gradient mode at the flow rate of 1.0 mL/min. The detection wavelength was 203 nm and the temperature of column was set at 36°C. Similarity evaluation system for chromatographic fingerprint of TCM was applied to analysis different batches of *Dysosma versipellis* samples. **Results** The TLC identification method and HPLC fingerprint of *Dysosma versipellis* was established, eleven mutual peaks which separation in good condition were selected as the fingerprint peaks in 10 batches sample. **Conclusion** This method is simple and reliable, can be used for the identification and quality control of *Dysosma versipellis*.

KEY WORDS: *Dysosma versipellis*; thin layer chromatography; HPLC fingerprint; quality control

(上接第 29 页)

- [8] 张明,张涛,吕卓,等. 桂枝茯苓软胶囊质量标准研究[J]. 陕西中医,2014,35(9):1249-1250,1254.
- [9] 陈伟民,潘琳琳,陈丽岚,等. 润肺合剂的薄层色谱鉴别方法研究[J]. 嘉兴学院学报,2014,26(6):112-115.
- [10] 张义生,梁惟俊,范彦博,等. 调脂康口服液的薄层色谱鉴别[J]. 中国医院药学杂志,2012,32(7):556-558.
- [11] 贺涛,谭亚芹,韩雪梅. 蒿芩清胆颗粒的薄层色谱鉴别[J]. 中华中医药学刊,2008,26(9):1995-1997.
- [12] 罗音久,曾忠良. 脑生片中阿魏酸薄层色谱鉴别展开剂的选择[J]. 时珍国医国药,2009,20(4):973.
- [13] 郑国华,沈雪梅,唐国涛. 保和口服液薄层色谱研究[J]. 时珍国医国药,1999,10(6):447-448.
- [14] 国家药典委员会. 中国药典(一部)[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:96-97.
- [15] 李耀荣,徐青青,莫玉芳,等. 益气通鼻颗粒中白术鉴别方法探讨[J]. 药物鉴定,2009,18(24):32-33.
- [16] 陈海云,吴珺,袁易,等. 肠胃清口服液的薄层色谱鉴别[J]. 中国药业,2012,21(1):28-29.
- (编辑:徐建平)

Study on the TLC Identification Method for Tianma Xuanyunning Tablets

CAO Rui¹, CAO Linlin², GUO Dongyan¹, LIU Xiaoli¹

(1. Shaanxi University of Traditional Chinese Medicine, Xianyang 712046, China;

2. Pharmaceutical Factory of Shaanxi University of Traditional Chinese Medicine, Xianyang 712046, China)

ABSTRACT: **Objective** To establish a TLC identification method for the Tianma Xuanyunning Tablets, and to provide the basis for improving the quality standard of the preparation. **Methods** Twelve kinds of Chinese medicine crop, such as *Gastrodia elata*, *Radix paeoniae alba* and *Uncaria*, *Alisma Orientals* in this prescription were identified by TLC. **Results** In the chromatograms of the tested products, the same color spots were shown in the corresponding position of the chromatograms for the control article or the crude drugs as control, and there was no interference in the negative control. **Conclusion** The method is simple, sensitive and specific for the quality control of Tianma Xuanyunning Tablets.

KEY WORDS: Tianma Xuanyunning Tablets; TLC; quality control