

## HPLC 指纹图谱结合多指标含量测定的八角莲质量评价研究

崔誉文<sup>1\*</sup>, 何昊<sup>1</sup>, 张丽<sup>2</sup>, 李玉泽<sup>2</sup>, 黄文丽<sup>2</sup>, 张化为<sup>2</sup>, 宋小妹<sup>2</sup><sup>1</sup>西安医学院药学院, 西安 710021;<sup>2</sup>陕西中医药大学陕西省秦岭中草药应用开发工程技术研究中心/陕西省中药基础与新药研究重点实验室, 咸阳 712046

**摘要:**建立八角莲 HPLC 指纹图谱,并同时测定 5 种化学成分的含量,为其质量评价提供依据。采用 Thermo HypURITY C<sub>18</sub> 色谱柱(250 mm×4.6 mm,5 μm),以甲醇(A)-0.4% 磷酸水溶液(B)为流动相,梯度洗脱,柱温 30 ℃,体积流量 1.0 mL/min,检测波长 290 nm,进样量 10 μL,建立了八角莲的 HPLC 指纹图谱。16 批样品指纹图谱中有 28 个共有峰,相似度较好,经与对照品比照确认了 8 个成分,对(+)-tanegool-7'-methylether、4'-去甲基鬼臼毒素、槲皮素、鬼臼毒素、山柰酚 5 种化学成分进行了定量分析,5 个化学成分在各自范围内线性关系良好( $r^2 \geq 0.999 0$ ),精密度、重复性、稳定性均符合定量要求;加样回收率在 98.7%~99.6%,RSD 小于 3%。所建立的方法简便、稳定、可靠,HPLC 指纹图谱结合多指标成分含量测定可用于八角莲药材质量的评价。

**关键词:**八角莲;HPLC;指纹图谱;聚类分析;含量测定

中图分类号:R282.5

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2020)12-2051-11

DOI:10.16333/j.1001-6880.2020.12.009

## Study on quality evaluation of *Dysosma versipellis* by HPLC fingerprint combined with multi-index content determination

CUI Yu-wen<sup>1\*</sup>, HE Hao<sup>1</sup>, ZHANG Li<sup>2</sup>, LI Yu-ze<sup>2</sup>, HUNAG Wen-li<sup>2</sup>, ZHANG Hua-wei<sup>2</sup>, SONG Xiao-mei<sup>2</sup><sup>1</sup>School of Pharmacy, Xi'an Medical University, Xi'an 710021, China;<sup>2</sup>School of Pharmacy, Shaanxi University of Chinese Medicine, Shaanxi Qinling Chinese Herbal Medicine Application Development Engineering Technology Research Center/Shaanxi Provincial Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine and New Drug Research, Xianyang 712046, China

**Abstract:** To provide the scientific basis for the quality evaluation of *Dysosma versipellis*, its HPLC fingerprints was established, and the contents of five components were simultaneously determined. The analyses were performed on Thermo HypURITY C<sub>18</sub> column (250 mm×4.6 mm, 5 μm), and the mobile phase comprised of MeOH (A) - 0.4% phosphoric acid aqueous solution (B) with the gradient elution at a flow rate of 1.0 mL/min. The detection wavelength was set at 290 nm; the column temperature was maintained at 30 ℃ and the injection volume was 10 μL. The HPLC fingerprint with twenty-eight common peaks of *D. versipellis* in 16 batches of sample was established, and the similarities of samples were good. Eight components were identified by comparison with the reference substances. Five components, namely, (+)-tanegool-7'-methylether, 4'-demethylpodophyllotoxin, quercetin, podophyllotoxin, kaempferol were analyzed quantitatively. The linear relationship of five components was good ( $r^2 \geq 0.999 0$ ). The precision, repeatability and stability were all in line with quantitative requirements. The average recoveries ( $n = 6$ ) of five components were between 98.7% and 99.6%, and the RSD were less than 3%. The established method is simple, stable and reliable, and can be expected for the quality control of *D. versipellis*.

**Key words:** *Dysosma versipellis*; HPLC; fingerprints; cluster analysis; content determination八角莲为八角莲属八角莲(*Dysosma versipellis*(Hance) M. Cheng ex Ying)的干燥根及根茎,在陕西又名八角七,是传统民间草药“太白七药”之一<sup>[1]</sup>。八角莲主要分布在湖北、广西、广东、江西、四川、贵州、陕西等地,具有清热解毒、祛瘀止痛、化痰散结的功效,主治痈肿疔疮、跌打损伤、毒蛇咬伤、

收稿日期:2020-05-06 接受日期:2020-10-23

基金项目:陕西省重点研发计划(2019ZDLSF04-03-02);陕西中医药大学学科创新团队项目(2019-YL12);陕西省高层次人才支持计划配套科研项目(05041904)

\*通信作者 Tel:86-018821676868; E-mail: polaris\_101025@163.com

咽喉肿痛、瘰疬<sup>[1,2]</sup>。八角莲以鬼臼之名始载于《神农本草经》,但因其外观和药性与桃儿七、窝儿七相似,故历代草本记载常有混淆之处。八角莲以木脂素类和黄酮类成分为主,如4'-去甲基鬼臼毒素、鬼臼毒素、山柰酚、槲皮素等<sup>[3-6]</sup>。研究表明,八角莲具有抗肿瘤、抗病毒、抗菌消炎等药理作用<sup>[7-12]</sup>。值得注意的是,八角莲有毒,若使用不当可导致中毒,表现为恶心、呕吐、呼吸急促,严重可导致死亡<sup>[13-15]</sup>。临床上八角莲可用于流行性出血热、尖锐湿疣等治疗,表现出较好的药理作用<sup>[16,17]</sup>。笔者通过文献检索发现,目前对八角莲质量控制标准研究尚不完整,对其化学成分的测定方法和指纹图谱研究尚浅。因此,为进一步完善八角莲质量评价体系,本研究参考相关研究<sup>[18-20]</sup>,通过建立八角莲 HPLC 指纹图谱,测定其5个化学成分的含量,以期为八角莲的质量评价提供科学依据。

## 1 仪器与材料

### 1.1 仪器

Waters e2695 型高效液相色谱仪(美国 Waters 公司);舒美 KQ-500DE 型超声波清洗仪(昆山市超声仪器有限公司);KEWE 电热恒温水浴锅(北京科伟永兴有限公司);GB204 电子分析天平(瑞士梅特勒托利多公司,精度 0.01 mg);101-A4 型电热鼓风干燥箱(上海捷呈实验仪器有限公司);DYF-200A 型高速万能粉碎机(上海比朗仪器有限公司)。

### 1.2 试剂

对照品(+)-tanegool-7'-methylether、山柰酚葡萄糖苷、4'-去甲基鬼臼毒素、鬼臼毒素葡萄糖苷、槲皮素、鬼臼毒素、鬼臼毒酮、山柰酚均由本课题组自制,纯度经高相液相色谱按面积归一化法测定均大于 98%,符合定量要求。甲醇、磷酸均为色谱纯(天津市科密欧化学试剂有限公司);其余所用试剂均为分析纯(天津市天力化学有限公司);实验水为娃娃哈哈纯净水;八角莲药材由课题组采挖或购买于四川、广西、湖北、贵州、云南等省区。经陕西中医药大学王继涛高级实验师鉴定为小檗科植物八角莲 *Dysosma versipellis* (Hance) M. Cheng ex Ying 的干燥根及根茎。各产地药材鲜品采收或购买后 50 °C 烘干,除去杂质,备用。16 批药材样品来源见表 1。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

Thermo HyPURITY C<sub>18</sub> 色谱柱(250 mm × 4.6

表 1 八角莲药材样品来源

Table 1 Sources information of 16 samples

编号 No.	采集地 Origin	采集时间 Date
B1	广西	2018.10
B2	贵州	2018.10
B3	湖北	2018.10
B4	湖北	2018.10
B5	四川	2018.10
B6	贵州	2018.10
B7	广西	2018.09
B8	四川	2018.10
B9	贵州	2019.10
B10	湖南	2019.10
B11	广西	2019.10
B12	四川	2019.10
B13	湖北	2019.10
B14	云南	2019.09
B15	湖北	2019.10
B16	湖北	2019.10

mm, 5 μm; 流动相: 流动相甲醇(A)-0.4% 磷酸水溶液(B), 梯度洗脱(0 ~ 13 min, 35% → 40% A; 13 ~ 20 min, 40% → 43% A; 20 ~ 40 min, 43% → 45% A; 40 ~ 50 min, 45% → 49% A; 50 ~ 55 min, 49% → 54% A; 55 ~ 56 min, 54% → 60% A; 56 min ~ 70 min, 60% A; 70 ~ 80 min, 60% → 70% A); 流速: 1.0 mL/min; 柱温: 30 °C; 检测波长: 290 nm; 进样量: 10 μL。八角莲化学对照品及供试品 HPLC 色谱图见图 1。

### 2.2 溶液的制备

#### 2.2.1 对照品溶液的制备

精密称取(+)-tanegool-7'-methylether、山柰酚葡萄糖苷、4'-去甲基鬼臼毒素、鬼臼毒素葡萄糖苷、槲皮素、鬼臼毒素、鬼臼毒酮、山柰酚的对照品适量, 置同一量瓶中, 用 80% 甲醇溶解并定容成质量浓度分别为 0.154、0.103、0.754、0.840、0.219、5.04、0.146、0.446 mg/mL 的混合溶液, 即得。

#### 2.2.2 供试品溶液的制备

精密称取八角莲药材粉末(过 5 号筛)1.0 g, 置 100 mL 具塞锥形瓶中, 精密加入 80% 甲醇 25 mL, 称重, 超声(250 W, 60 kHz)45 min, 放冷, 再称重, 用 80% 甲醇补足减失的量, 摇匀, 经 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液作为供试品溶液, 即得。

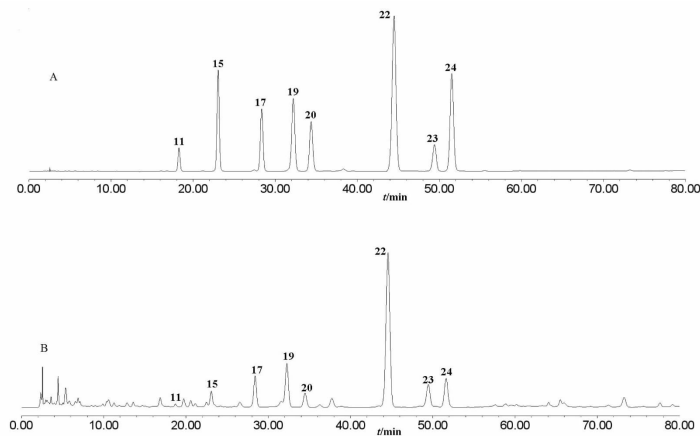


图1 混合对照品(A)及供试品(B)的HPLC色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of mixed reference substances (A) and samples (B)

注:11. (+)-Tanegool-7'-methylether;15. 山柰酚葡萄糖苷;17. 4'-去甲基鬼臼毒素;19. 鬼臼毒素葡萄糖苷;20. 槲皮素;22. 鬼臼毒素;23. 鬼臼毒酮;24. 山柰酚。Note:11. (+)-Tanegool-7'-methylether;15. Kaempferol-3-O-β-D-glucoside;17. 4'-demethylpodophyllotoxin;19. Podophyllotoxin-4-O-β-D-glucoside;20. Quercetin;22. Podophyllotoxin;23. Podophyllotoxone;24. Kaempferol.

## 2.3 指纹图谱

### 2.3.1 方法学考察

#### 2.3.1.1 精密度试验

分别取八角莲(B8)样品溶液,按“2.1”项下色谱条件分别连续进样6次,记录峰面积值,均以鬼臼毒素为参比峰,测得八角莲28个共有峰的相对保留时间RSD均小于1%,相对峰面积的RSD均小于3%,表明仪器精密度良好。

#### 2.3.1.2 稳定性试验

分别取八角莲(B8)样品溶液,在室温放置0、2、4、8、12、24 h后分别按“2.1”项下色谱条件进样,记录峰面积值,以鬼臼毒素为参比峰,测得八角莲28个共有峰的相对保留时间RSD均小于1%,相对峰

面积的RSD均小于3%,表明供试品溶液在室温放置24 h内稳定。

#### 2.3.1.3 重复性试验

分别取八角莲(B8)样品,按照“2.2.2”项下的方法分别平行制备6份供试品溶液,按照“2.1”项下色谱条件进样,记录峰面积值,以鬼臼毒素为参比峰,测得八角莲28个共有峰的相对保留时间RSD均小于1%,相对峰面积的RSD均小于3%,表明该方法的重复性良好。

### 2.3.2 指纹图谱建立

取16批八角莲不同产地的药材样品,每份约1.0 g,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录HPLC色谱图,

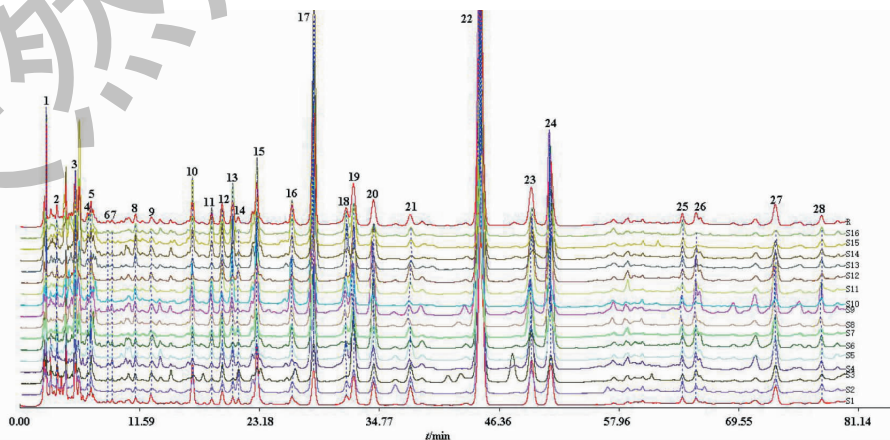


图2 16批次八角莲的指纹图谱

Fig. 2 HPLC fingerprints of 16 batches of the root of *D. versipellis*



续表 2(Continued Tab. 2)

峰号 No.	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10	B11	B12	B13	B14	B15	B16	RSD (%)
13	0.46	0.46	0.46	0.46	0.46	0.46	0.46	0.46	0.46	0.46	0.46	0.46	0.46	0.46	0.46	0.46	0.082
14	0.47	0.47	0.47	0.47	0.47	0.47	0.47	0.47	0.47	0.47	0.47	0.47	0.47	0.47	0.47	0.47	0.073
15	0.51	0.51	0.51	0.51	0.51	0.51	0.51	0.52	0.51	0.51	0.51	0.51	0.51	0.51	0.51	0.51	0.17
16	0.59	0.59	0.60	0.59	0.59	0.59	0.59	0.59	0.59	0.59	0.59	0.59	0.59	0.59	0.59	0.59	0.34
17	0.64	0.64	0.64	0.64	0.64	0.64	0.64	0.64	0.64	0.64	0.64	0.64	0.64	0.64	0.64	0.64	0.052
18	0.71	0.71	0.71	0.71	0.71	0.71	0.71	0.71	0.71	0.71	0.71	0.71	0.71	0.71	0.71	0.71	0.054
19	0.72	0.72	0.72	0.72	0.72	0.72	0.72	0.72	0.72	0.72	0.72	0.72	0.72	0.72	0.72	0.72	0.033
20	0.77	0.77	0.77	0.77	0.77	0.77	0.77	0.77	0.77	0.77	0.77	0.77	0.77	0.77	0.77	0.77	0.12
21	0.85	0.85	0.85	0.85	0.85	0.85	0.85	0.85	0.85	0.85	0.85	0.85	0.85	0.85	0.85	0.85	0.021
22	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.00
23	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	1.11	0.034
24	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	0.11
25	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	0.15
26	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	0.17
27	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	0.17
28	1.7	1.7	1.7	1.7	1.7	1.7	1.7	1.7	1.7	1.7	1.7	1.7	1.7	1.7	1.7	1.7	0.17

表 3 八角莲共有峰的相对峰面积

Table 3 Relative retention area of common peak

峰号 No.	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10	B11	B12	B13	B14	B15	B16	RSD (%)
1	0.062	0.011	0.023	0.011	0.033	0.033	0.042	0.033	0.033	0.033	0.033	0.011	0.042	0.093	0.062	0.022	62.5
2	0.11	0.023	0.033	0.022	0.053	0.042	0.062	0.053	0.053	0.053	0.053	0.022	0.073	0.170	0.320	0.033	104.9
3	0.11	0.092	0.044	0.053	0.062	0.011	0.11	0.11	0.062	0.11	0.12	0.093	0.053	0.28	0.21	0.12	65.4
4	0.033	0.011	0.013	0.011	0.023	0.033	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023	0.011	0.042	0.093	0.073	0.053	84.0
5	0.033	0.033	0.033	0.042	0.023	0.042	0.042	0.042	0.033	0.042	0.042	0.033	0.033	0.073	0.053	0.073	38.2
6	0.00	0.00	0.00	0.000	0.00	0.011	0.00	0.00	0.011	0.011	0.00	0.00	0.011	0.011	0.022	0.012	74.1
7	0.011	0.00	0.00	0.011	0.00	0.00	0.00	0.00	0.011	0.011	0.00	0.032	0.011	0.011	0.011	0.011	88.7
8	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.033	0.011	0.042	0.011	0.011	0.042	0.062	0.042	0.042	77.3
9	0.023	0.011	0.023	0.011	0.011	0.033	0.011	0.011	0.023	0.011	0.022	0.011	0.011	0.042	0.042	0.033	58.4
10	0.11	0.033	0.023	0.011	0.022	0.023	0.033	0.085	0.033	0.15	0.042	0.011	0.033	0.11	0.41	0.062	136.0
11	0.011	0.011	0.00	0.011	0.022	0.023	0.023	0.042	0.033	0.092	0.033	0.011	0.022	0.062	0.21	0.033	135.8
12	0.042	0.033	0.022	0.042	0.033	0.062	0.073	0.053	0.033	0.052	0.054	0.033	0.062	0.12	0.15	0.11	62.4
13	0.023	0.033	0.00	0.033	0.022	0.011	0.040	0.062	0.022	0.22	0.050	0.011	0.20	0.062	0.35	0.19	124.4
14	0.011	0.00	0.023	0.011	0.011	0.011	0.033	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.022	0.011	0.011	44.7
15	0.21	0.072	0.023	0.052	0.043	0.043	0.11	0.17	0.11	0.35	0.11	0.022	0.11	0.13	0.54	0.17	98.4
16	0.022	0.043	0.033	0.011	0.033	0.052	0.052	0.084	0.072	0.23	0.062	0.011	0.052	0.12	0.35	0.085	113.8
17	0.13	0.39	0.07	0.55	0.14	0.18	0.22	0.28	0.19	1.0	0.082	0.090	0.98	1.3	0.80	0.67	88.5
18	0.033	0.033	0.00	0.052	0.022	0.011	0.042	0.062	0.054	0.14	0.062	0.00	0.23	0.052	0.11	0.12	94.6

续表 3 (Continued Tab. 3)

峰号 No.	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10	B11	B12	B13	B14	B15	B16	RSD (%)
19	0.12	0.085	0.14	0.092	0.22	0.054	0.14	0.15	0.11	0.20	0.21	0.12	0.13	0.053	0.34	0.18	50.2
20	0.10	0.053	0.044	0.044	0.072	0.17	0.054	0.072	0.16	0.062	0.062	0.062	0.053	0.19	0.13	0.062	58.1
21	0.085	0.053	0.033	0.022	0.053	0.033	0.053	0.033	0.022	0.023	0.044	0.033	0.045	0.022	0.073	0.052	45.8
22	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	0.00
23	0.23	0.090	0.13	0.11	0.16	0.052	0.32	0.18	0.090	0.14	0.22	0.16	0.26	0.022	0.16	0.19	49.8
24	0.20	0.16	0.062	0.17	0.17	0.57	0.14	0.22	0.46	0.17	0.21	0.12	0.20	0.42	0.35	0.21	57.2
25	0.021	0.022	0.011	0.02	0.011	0.022	0.033	0.022	0.022	0.033	0.022	0.011	0.043	0.044	0.054	0.063	52.6
26	0.011	0.011	0.011	0.033	0.033	0.043	0.022	0.033	0.052	0.011	0.022	0.043	0.011	0.043	0.022	0.022	58.2
27	0.081	0.052	0.034	0.072	0.054	0.085	0.085	0.12	0.12	0.054	0.10	0.062	0.093	0.10	0.022	0.033	43.2
28	0.012	0.023	0.012	0.011	0.012	0.022	0.022	0.033	0.054	0.054	0.022	0.011	0.033	0.033	0.062	0.033	56.8

### 2.3.4 相似度评价

将各个批次的八角莲指纹图谱分别导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012版)”软件,对各批次样品的指纹图谱与对照图谱进行相似度评

价。八角莲与对照图谱的相似度除 B10(湖南)、B14(湖北)、B15(湖北)外,其他均在 0.9 以上。结果见表 4。

表 4 八角莲样品与生成的对照图谱的相似度

Table 4 Similarity of 16 batches of samples

样品 Sample	相似度 Similarity	样品 Sample	相似度 Similarity
B1	0.962	B9	0.963
B2	0.990	B10	0.877
B3	0.944	B11	0.990
B4	0.976	B12	0.957
B5	0.973	B13	0.907
B6	0.937	B14	0.845
B7	0.975	B15	0.808
B8	0.992	B16	0.956

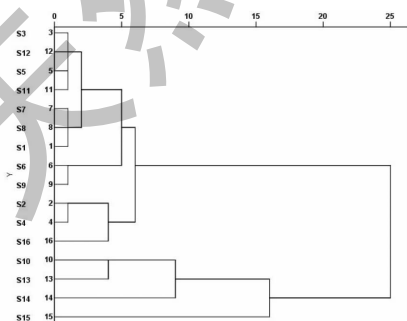


图 4 16 批药材指纹图谱聚类分析的树状图

Fig. 4 Dendrogram of fingerprint clustering analysis of 16 batches of samples

### 2.3.5 系统聚类分析

分别将 16 批八角莲样品的 HPLC 指纹图谱中各自的共有峰的峰面积数据导入 SPSS19.0 统计分析软件,采用组间联接法,以欧式平方距离对样品进行聚类分析结果见图 4。由图 4 可知,16 批八角莲大致分为两类, I 类包括 S1 ~ S9、S11、S12、S16,各个批次的样品相似度较高(0.937 ~ 0.992),产地包括湖北、广西、贵州、四川、云南, II 类包括 S10、S13 ~ S15,各个批次的样品相似度较低(0.808 ~ 0.907),产地包括湖南、湖北、云南。

## 2.4 含量测定

### 2.4.1 线性关系考察

将“2.2.1”项下混合对照品溶液,以80%甲醇水溶液依次稀释0、2、4、8、16、32倍,制成系列混合对照品溶液,吸取上述混合对照品溶液,按“2.1”项

下色谱条件进行分析。以色谱峰峰面积( $Y$ )为纵坐标,对照品质量浓度( $X, \mu\text{g/mL}$ )为横坐标,得5种成分的回归方程。结果表明,5种成分线性关系良好(见表5)。

表5 5种成分线性关系结果

Table 5 Results of linear ranges of 5 constituents

序号 No.	成分 Component	回归方程 Regression equation	$R$	线性范围 Linear range ( $\mu\text{g/mL}$ )
1	(+)-Tanegool-7'-methylether	$Y = 5.334 \times 10^6 X - 2.042 \times 10^3$	1.000 0	4.81 ~ 154
2	4'-去甲基鬼臼毒素 4'-Demethylpodophyllotoxin	$Y = 5.533 \times 10^6 X + 2.139 \times 10^3$	0.999 9	23.6 ~ 754
3	槲皮素 Quercetin	$Y = 1.118 \times 10^7 X - 8.470 \times 10^3$	1.000 0	6.84 ~ 219
4	鬼臼毒素 Podophyllotoxin	$Y = 3.103 \times 10^6 X - 3.322 \times 10^4$	1.000 0	157 ~ 5 040
5	山柰酚 Kaempferol	$Y = 1.488 \times 10^7 X - 3.749 \times 10^3$	0.999 9	13.9 ~ 446

### 2.4.2 精密度试验

取同一供试品溶液(B8),按“2.1”项下色谱条件连续进样6次,记录峰面积值,测得(+)-tanegool-7'-methylether、4'-去甲基鬼臼毒素、槲皮素、鬼臼毒素、山柰酚峰面积的RSD( $n=6$ )均小于3%,表明仪器精密度良好。

“2.2.2”项下的方法平行制备6份供试品溶液,按照“2.1”项下色谱条件进样,记录峰面积值,测得(+)-tanegool-7'-methylether、4'-去甲基鬼臼毒素、槲皮素、鬼臼毒素、山柰酚的平均含量分别为0.824、6.16、0.807、31.6、1.80 mg/g,峰面积的RSD( $n=6$ )均小于3%,表明该方法的重复性良好。

### 2.4.3 稳定性试验

取同一供试品溶液(B8),分别于0、4、8、12、16、20、24 h按“2.1”项下色谱条件进样,记录峰面积值,测得(+)-tanegool-7'-methylether、4'-去甲基鬼臼毒素、槲皮素、鬼臼毒素、山柰酚峰面积的RSD( $n=6$ )均小于3%,表明供试品溶液在24 h内稳定性良好。

### 2.4.5 加样回收率试验

精密称取已知含量(B8)的样品粉末6份,每份约0.5 g,精密称定,分别加入一定量对照品,按照“2.2.1”项下的方法制备,按“2.1”项下色谱条件进样测定,计算回收率。结果(+)-tanegool-7'-methylether、4'-去甲基鬼臼毒素、槲皮素、鬼臼毒素、山柰酚的平均回收率分别为98.2%、99.5%、99.4%、99.6%、98.7%,RSD均小于3%(见表6)。

### 2.4.4 重复性试验

精密称取同一批次(B8)的药材粉末6份,按照

表6 回收率试验结果

Table 6 Results of recovery test

化合物 Compound	取样量 Sample weight (mg)	原有量 Original amount (mg)	加入量 Added amount (mg)	测得量 Found amount (mg)	回收率 Recovery rate (%)	平均回收率 Average recovery (%)	RSD (%)
(+) -Tanegool-7'- methylether	500.3	0.412	0.420	0.821	97.4	98.2	1.07
	500.4	0.412	0.420	0.827	98.8		
	500.1	0.412	0.420	0.833	100.1		
	500.0	0.412	0.420	0.824	98.1		
	500.2	0.412	0.420	0.822	97.6		
4'-去甲基鬼臼毒素 4'-Demethylpodophyllo- toxin	500.3	0.412	0.420	0.821	97.4	99.5	0.341
	500.3	3.08	3.08	6.15	99.7		
	500.4	3.08	3.08	6.13	99.0		

续表 6 (Continued Tab. 6)

化合物 Compound	取样量 Sample weight(mg)	原有量 Original amount(mg)	加入量 Added amount(mg)	测得量 Found amount(mg)	回收率 Recovery rate(%)	平均回收率 Average recovery(%)	RSD (%)
槲皮素 Quercetin	500.1	3.08	3.08	6.16	100.0		
	500.0	3.08	3.08	6.14	99.4		
	500.2	3.08	3.08	6.15	99.7		
	500.3	3.08	3.08	6.14	99.4		
	500.3	0.404	0.410	0.814	100.0	99.4	0.430
	500.4	0.404	0.410	0.811	99.3		
鬼臼毒素 Podophyllotoxin	500.1	0.404	0.410	0.812	99.5		
	500.0	0.404	0.410	0.811	99.3		
	500.2	0.404	0.410	0.813	99.8		
	500.3	0.404	0.410	0.809	98.8		
	500.3	15.8	15.8	31.5	99.4	99.6	0.330
	500.4	15.8	15.8	31.6	100.0		
山柰酚 Kaempferol	500.1	15.8	15.8	31.5	99.4		
	500.0	15.8	15.8	31.5	99.4		
	500.2	15.8	15.8	31.5	99.4		
	500.3	15.8	15.8	31.6	100.0		
	500.3	0.902	0.910	1.79	97.7	98.7	0.810
	500.4	0.902	0.910	1.80	98.8		
	500.1	0.902	0.910	1.80	98.9		
	500.0	0.902	0.910	1.80	98.9		
	500.2	0.902	0.910	1.79	97.8		
	500.3	0.902	0.910	1.81	99.9		

## 2.4.6 样品含量测定

分别精密称取不同批次的八角莲样品约 1.0 g, 每个样品平行 2 份, 按“2.2.2”项下方法制备供试

品溶液, 以“2.1”项下的色谱条件进样测定, 计算各样品中 (+)-tanegool-7'-methylether、4'-去甲基鬼臼毒素、槲皮素、鬼臼毒素、山柰酚的含量。结果见表 7。

表 7 样品含量测定结果 ( $n=2$ )Table 7 Results of the samples content determination ( $n=2$ ) (mg/g)

样品 Sample	(+)-Tanegool- 7'-methylether	4'-去甲基鬼臼毒素 4'-Demethyl podophyllotoxin	槲皮素 Quercetin	鬼臼毒素 Podophyllotoxin	山柰酚 Kaempferol	总和 Total
B1	0.330	2.94	1.39	32.1	1.70	38.5
B2	0.370	11.0	0.813	41.2	1.74	55.1
B3	0.248	3.28	0.932	69.3	1.09	74.9
B4	0.295	27.2	1.11	70.8	3.18	102.6
B5	0.698	6.17	1.59	62.0	2.78	73.2
B6	0.943	7.33	3.54	58.2	8.54	78.6
B7	0.438	4.50	0.575	29.6	1.08	36.2
B8	0.836	6.15	0.818	31.6	1.82	41.2
B9	1.42	8.56	3.67	66.1	7.92	87.7
B10	1.58	17.2	0.510	24.3	1.10	44.7
B11	0.880	7.88	1.02	44.5	2.39	56.6



续表 7 (Continued Tab. 7)

样品 Sample	(+)-Tanegool- 7'-methylether	4'-去甲基鬼臼毒素 4'-Demethyl podophyllotoxin	槲皮素 Quercetin	鬼臼毒素 Podophyllotoxin	山柰酚 Kaempferol	总和 Total
B12	0.321	4.14	1.38	66.4	2.04	74.3
B13	0.390	17.7	0.467	26.3	1.33	46.2
B14	1.18	23.5	1.79	26.9	2.92	56.3
B15	2.56	9.33	0.782	17.0	1.52	31.2
B16	0.551	11.4	0.521	24.8	1.37	38.6

## 2.4.7 耐用性试验

### 2.4.7.1 色谱柱考察

精密称取样品(编号:B8)适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,分别设置色谱柱 Thermo HypURITY C<sub>18</sub> 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm)、Waters SunFire C<sub>18</sub>(150 mm × 4.6 mm, 5 μm)、Inertsil ODS-3 C<sub>18</sub>(250 mm × 4.6 mm, 5 μm),再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算样品含量,详见表 8。结果表明,色谱柱发生一定程度变化时,本方法能满足试验要求,耐用性良好。

### 2.4.7.2 流速考察

精密称取样品(编号:B8)适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,流速分别设置为 0.8、1.0、1.2 mL/min,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算样品含量,结果见表 8。由表 8 可

知,流速发生一定程度变化时,本方法能满足试验要求,耐用性良好。

### 2.4.7.3 检测波长考察

精密称取样品(编号:B8)适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,检测波长分别设置为 285、290、293 nm 进样测定,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算样品含量,详见表 8。结果表明,检测波长发生一定程度变化时,本方法能满足试验要求,耐用性良好。

### 2.4.7.4 柱温考察

精密称取样品(编号:B8)适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,柱温分别设置为 20、25、30 °C,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算样品含量,详见表 8。结果表明,柱温发生一定程度变化时,本方法能满足试验要求,耐用性良好。

表 8 耐用性试验结果

Table 8 Results of content determination of samples

色谱条件 Chromatographic condition	设置条件 Setting condition	(+) -Tanegool- 7'-methylether			4'-去甲基鬼臼毒素 4'-Demethyl podophyllotoxin			槲皮素 Quercetin			鬼臼毒素 Podophyllotoxin			山柰酚 Kaempferol		
		含量 Content (mg/g)	平均值 Average (mg/g)	RSD (%)	含量 Content (mg/g)	平均值 Average (mg/g)	RSD (%)	含量 Content (mg/g)	平均值 Average (mg/g)	RSD (%)	含量 Content (mg/g)	平均值 Average (mg/g)	RSD (%)	含量 Content (mg/g)	平均值 Average (mg/g)	RSD (%)
色谱柱 Column	Thermo HypURITY C <sub>18</sub>	0.836	0.836	0.420	6.15	6.15	0.0939	0.815	0.817	0.187	31.5	31.5	0.183	1.81	1.81	0.319
	Waters SunFire C <sub>18</sub>	0.832			6.14			0.818			31.4			1.82		
	Inertsil ODS-3 C <sub>18</sub>	0.839			6.15			0.817			31.5			1.81		
流速 Flow rate	0.8 mL/min	0.832	0.835	0.366	6.14	6.15	0.0939	0.811	0.817	0.696	31.5	31.5	0.183	1.81	1.81	0.319
	1.0 mL/min	0.834			6.15			0.819			31.5			1.82		
	1.2 mL/min	0.838			6.15			0.822			31.6			1.82		
波长 Wavelength	285 nm	0.836	0.836	0.420	6.15	6.15	0.0938	0.815	0.817	0.187	31.5	31.5	0.00	1.82	1.82	0.317
	290 nm	0.832			6.15			0.818			31.5			1.82		
	293 nm	0.839			6.16			0.817			31.5			1.81		
柱温 Column temperature	20 °C	0.837	0.836	0.183	6.15	6.15	0.163	0.813	0.815	0.245	31.4	31.5	0.183	1.82	1.82	0.634
	25 °C	0.836			6.14			0.817			31.5			1.81		
	30 °C	0.834			6.16			0.815			31.5			1.80		

### 3 讨论

本研究对八角莲检测的色谱条件进行了选择及优化,分别考察了甲醇/水、乙腈/水、甲醇/磷酸水、乙腈/磷酸水不同比例洗脱溶剂对 HPLC 色谱图的影响,结果显示甲醇-0.4% 磷酸水为较优溶剂;并结合全波长扫描,结果显示 290 nm 下色谱峰的数量较多,峰面积较大且分离度较好,故选择 290 nm 作为检测波长;另对提取方式(回流和超声),提取溶剂(水、乙醇、甲醇)等对实验结果影响进行了考察,发现以甲醇超声(250 W, 60 kHz)提取效果最优。该方法简洁方便,易于操作,还可减少对色谱仪的损耗,准确测定八角莲药材中的 5 个指标成分。

指纹图谱中 28 个共有峰相对保留时间的 RSD 值均小于 1.0%,表明本文建立的指纹图谱研究方法为一种稳定的共有模式,可以作为八角莲药材品质评价的方法。16 批样品相对峰面积 RSD 值较大,说明各批样品间组分含量差异较大,提示八角莲的品质与其产地密切相关,需对八角莲化学成分进行含量测定,阐明药材品质与产地之间的关系,为临床使用八角莲提供依据。

从相似度分析结果可知,相似度除 B10(湖南)、B14(湖北)、B15(湖北)外,其他均在 0.9 以上,说明不同产地的八角莲药材存在差异,但是其质量具有一致性。同时从聚类分析结果可知,16 批八角莲药材聚为两类,区域特征不明显,与相似度分析结果相一致,说明八角莲药材质量稳定。

从含量测定结果可知,不同产地的八角莲药材的主要化学成分有鬼臼毒素、4'-去甲基鬼臼毒素、山柰酚,各个成分含量差异较大,说明不同产地八角莲药材质量差异较大,这可能与药材的生长环境差异和不同采收时期有关,单纯测定 1~2 种成分的含量不能有效反应药材的质量,需要对八角莲的多种成分同时测定,才能全面的反应其内在质量。

八角莲是我国特有的濒危药用植物,已列入国家三级保护植物,同时也是秦岭“太白七药”中重要的代表药物之一,在民间药用历史悠久,然而其质量标准尚未完整制定。本研究建立了八角莲指纹图谱研究,并对其 5 种成分进行了含量测定,为今后八角莲质量标准的制定提供一定依据。

### 参考文献

1 Song XM, Liu HJ. Research and Application of “Qi-Medicines” in Taibai Mountains(太白七药研究与应用)[M].

Beijing: People's Medical Publishing House, 2011: 239-244.

2 Qin XB. Advances in research on plant of *Dysosma* in China [J]. Resour Dev Mark(资源开发与市场), 2012, 28: 1018-1019.

3 Zheng Y. Studies on the chemical constituents of *Dysosma versipellis*[D]. Shanghai: Shanghai Jiao Tong University(上海交通大学), 2015.

4 Jiang F, Tian HY, Zang JL, et al. Chemical constituents from *Dysosma versipellis*[J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2011, 42: 634-639.

5 Gao XM, Liu MC, Jin LH, et al. Study on chemical constituents from rootstalk of *Dysosma versipellis* grown in Guizhou [J]. Lishizhen Med Mater Med Res(时珍国医国药), 2011, 22: 871-873.

6 Peng LF, Lu LH, Yang LG, et al. A new biflavone from *Dysosma versipellis*[J]. Acta Pharm Sin(药学报), 2016, 51: 128-1284.

7 Xu X, Gao X, Jin L, et al. Antiproliferation and cell apoptosis inducing bioactivities of constituents from *Dysosma versipellis* in PC3 and Bcap-37 cell lines [J]. Cell Division, 2011, 6: 14.

8 Li J, Feng J, Luo C, et al. Absolute configuration of podophyllotoxone and its inhibitory activity against human prostate cancer cells [J]. Chin J Nat Med, 2015, 13: 59-64.

9 Zhang L, Wang J, Liu L, et al. Synthesis and antiproliferative activity of novel all trans retinoic acid podophyllotoxin conjugate towards human gastric cancer cells [J]. Molecules, 2017, 22: 628.

10 Varghese E, Samuel SM, Abotaleb M, et al. The “yin and yang” of natural compounds in anticancer therapy of triple-negative breast cancers [J]. Cancers, 2018, 10: 346.

11 Yao LY, Wang LP. Isolation of effective constituents from the hydrophilic fraction of *Dysosma versipellis* and their antiviral activity on CB<sub>1,6</sub>V and HSV-1 Virus [J]. Acta Univ Med Second Shanghai(上海第二医科大学学报), 1999, 19: 234-237.

12 Tan XM, Yu LY, Zhou YQ. Isolation, identification and antimicrobial activities of endophytic fungi of *Dysosma versipellis* (Hance) M. Cheng [J]. Chin Pharm J(中国药杂志), 2014, 49: 363-366.

13 Gao S, Yu JY, Gao J, et al. Incorrect administration of *Podophyllum* Chinese herbs and clinical treatment of related poisoning [J]. Henan Tradit Chin Med(河南中医), 2016, 36: 161-162.

14 Liu CX, Zhang CN, He T, et al. Study on potential toxic material base and mechanisms of hepatotoxicity induced by *Dysosma versipellis* based on toxicological evidence chain (TEC) concept [J]. Ecotox Environ Safe, 2020, 190(1): 11073.