

天南星及炮制品制天南星和胆南星水提取物 HPLC 特征图谱比较研究

杨紫莹^{1,2}, 王芳静^{1,2}, 金传山^{1,2*}, 张亚中^{1,3*}, 于杰^{4,5}, 唐传华^{4,5}, 许凤清^{1,2}, 翟宏焱³

1. 安徽中医药大学, 安徽 合肥 230012
2. 安徽省高校科研创新平台团队, 中药饮片产地加工与炮制一体化关键技术研究创新团队, 安徽 合肥 230012
3. 安徽省食品药品检验研究院, 安徽 合肥 230051
4. 安徽省万生中药饮片有限公司, 安徽 阜阳 236112
5. 安徽省中药饮片炮制加工工程研究中心, 安徽 阜阳 236112

摘要: 目的 建立天南星及炮制品制天南星和胆南星水提取物的 HPLC 特征图谱, 为鉴别天南星及炮制品制天南星和胆南星及其质量控制提供科学依据。方法 采用 HPLC 法, 色谱柱为 Agilent C₁₈ (200 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为 0.2% 乙酸水溶液-0.2% 乙酸乙腈溶液, 梯度洗脱, 对天南星及炮制品制天南星和胆南星的水提取物进行研究, 运用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2012)”、SPSS 23.0 和 SIMCA 14.1 软件进行相似度分析、聚类分析和主成分分析 (PCA)。结果 建立了天南星及炮制品制天南星和胆南星水提取物的 HPLC 特征图谱, 天南星、制天南星和胆南星各有 19、20 和 13 个共有峰, 指认出 F1 (黄嘌呤)、F3 (尿嘧啶)、F4 (次黄嘌呤)、F5 (尿苷)、F6 (鸟苷)、F7 (腺苷)、F14 (夏佛塔苷)、F16 (异夏佛塔苷)。天南星、制天南星和胆南星各自的相似度均在 0.8 以上且各聚为一类, 天南星与炮制品制天南星和胆南星之间的相似度均在 0.4 以下, 天南星的主成分有 F16 (异夏佛塔苷)、F14 (夏佛塔苷)、F17、F15; 制天南星有 F16 (异夏佛塔苷) 和 F1 (黄嘌呤); 胆南星有 F3 (尿嘧啶)、F2、F5 (尿苷)、F1 (黄嘌呤)。结论 该方法可有效鉴别天南星及炮制品制天南星和胆南星, 并为其质量控制提供一定的科学依据。

关键词: 天南星; 炮制; 制天南星; 胆南星; HPLC; 特征图谱; 鉴别; 质量控制; 相似度分析; 聚类分析; 主成分分析; 黄嘌呤; 尿嘧啶; 次黄嘌呤; 尿苷; 鸟苷; 腺苷; 夏佛塔苷; 异夏佛塔苷

中图分类号: R283.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)03-0639-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.03.013

Comparative study on HPLC characteristic chromatogram of water extracts of *Arisaematis Rhizoma* and its processed products

YANG Zi-ying^{1,2}, WANG Fang-jing^{1,2}, JIN Chuan-shan^{1,2}, ZHANG Ya-zhong^{1,3}, YU Jie^{4,5}, TANG Chuan-hua^{4,5}, XU Feng-qing^{1,2}, ZHAI Hong-Yan³

1. Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012, China
2. Anhui Innovative Team from Colleges for Scientific Research's Platform, Innovative Team in Researching Key Technologies Concerning Integration of Processing Chinese Medicine Decoction Pieces in Producing Area, Hefei 230012, China
3. Anhui Institute for Food and Drug Control, Hefei 230051, China
4. Anhui Wansheng Traditional Chinese Medicine Decoction Pieces Co., Ltd., Fuyang 236112, China
5. Anhui Research Center for Processing Engineering of Traditional Chinese Medicine Decoction Pieces, Fuyang 236112, China

Abstract: Objective To establish and analyze the HPLC characteristic chromatogram for water extracts of *Arisaematis Rhizoma* (AR) and its processed products, *Arisaematis Rhizoma Preparatum* (ARP) and *Arisaema Cum Bile* (ACB). The research provided reliable method and scientific basis for their quality control. **Methods** The separation was performed on an Agilent C₁₈ (200 mm × 4.6 mm, 5 μm) column with gradient elution of 0.2% acetic acid water and 0.2% acetic acid acetonitrile. The similarity was analyzed

收稿日期: 2019-08-19

基金项目: 安徽省重大科技专项 (17030801017)

作者简介: 杨紫莹 (1995—), 在读硕士, 研究方向为中药质量标准规范化研究。Tel: 18119615977 E-mail: 1105709694@qq.com

*通信作者 金传山 Tel: 13355512699 E-mail: jcs4@sohu.com

张亚中 Tel: 13956985695 E-mail: yazhongzhang@hotmail.com

with software “Similarity Evaluation System for Chromatographic Fingerprint of TCMs (Version 2012)”. The cluster analysis was performed by SPSS 23.0. The principal component analysis was performed by SIMCA 14.1. **Results** HPLC characteristic chromatogram for water extracts of AR, ARP, and ACB were established. There were 19, 20 and 13 common peaks in AR, ARP and ACB, respectively. A total of eight characteristic peaks were identified as F1 (xanthine), F3 (uracil), F4 (hypoxanthine), F5 (uridine), F6 (guanosine), F7 (adenosine), F14 (schaftoside), and F16 (isoschaftoside), respectively. The intragroup similarities of AR, ARP, and ACB were all above 0.8 and each was clustered into one type, and the intergroup similarities among AR and its processed products were all below 0.4. The main components of AR were F16 (isoschaftoside), F14 (schaftoside), F17 and F15. The main components of ARP were F16 (isoschaftoside) and F1 (xanthine). The main components of ACB were F3 (uracil), F2, F5 (uridine) and F1 (xanthine). **Conclusion** The method can effectively identify AR, ARP and ACB, and provide a scientific basis for their quality control.

Key words: *Arisaematis Rhizoma*; processing; *Arisaematis Rhizoma Preparatum*; *Arisaema Cum Bile*; HPLC; characteristic chromatogram; identification; quality control; similarity analysis; cluster analysis; principal component analysis; xanthine; uracil; hypoxanthine; uridine; guanosine; adenosine; schaftoside; isoschaftoside

中药天南星 *Arisaema Rhizoma* 为天南星科天南星属植物天南星 *Arisaema erubescens* (Wall.) Schott、异叶天南星 *A. heterophyllum* Bl. 或东北天南星 *A. amurense* Maxim. 的干燥块茎^[1], 其气微辛, 味麻辣。天南星具有强烈的刺激性作用, 一般不可内服, 外用治痈肿、蛇虫咬伤^[2-5]。临床多用其炮制品制天南星和胆南星, 前者用于燥湿化痰、祛风止痉、散结消肿, 后者用于清热化痰、息风定惊^[6-7]。天南星及炮制品制天南星和胆南星功效的差异可能是由于其物质基础(黄酮类、苷类、生物碱类等)存在差异^[8-13]。本实验采用 HPLC 法建立了天南星、制天南星及胆南星水提物的 HPLC 特征图谱, 并对其进行了聚类分析和主成分分析(PCA), 为天南星及炮制品制天南星和胆南星的鉴别及质量控制提供科学依据。

1 仪器、试剂与药材

1.1 仪器

Agilent Technologies 1290 高效液相色谱仪, 配备 DAD 检测器, 美国安捷伦公司; ML204 分析天平(精度为 0.1 mg)、XP26 分析天平(精度为 0.001 mg), Mettler Toledo 公司; Elma D-78224 型超声仪, 35/130 kHz 230 V, 德国 Elma 公司; Millipore Simplicity-185 型超纯水仪, 美国 Millipore 公司; 116B 摇摆式六两装高速中药粉碎机, 瑞安市永历制药机械有限公司; HH 数显恒温水浴锅, 常州国宇仪器制造有限公司。

1.2 对照品及试剂

对照品黄嘌呤(批号 AJ0722MA14, 质量分数 $\geq 98\%$)、尿嘧啶(批号 T14A8X33880, 质量分数 $\geq 98\%$)、次黄嘌呤(批号 TM0313XC13, 质量分数 $\geq 98\%$)、尿苷(批号 TM0313XA13, 质量分数 $\geq 98\%$)、

鸟苷(批号 AJ0609NA14, 质量分数 $\geq 98\%$)、腺苷(批号 Z23S7J21814, 质量分数 $\geq 99\%$)、夏佛塔苷(批号 HA0828XA13, 质量分数 $\geq 98\%$)、异夏佛塔苷(批号 M24A7519951, 质量分数 $\geq 98\%$)均由上海源叶生物科技有限公司提供; 质谱级甲醇购自美国 Fisher Scientific 公司; 超纯水为实验室专用超纯水机制备。

1.3 药材

天南星药材来源于全国 6 个省份, 共 8 批; 制天南星来源于全国 7 个省份, 共 10 批, 胆南星来源于全国 6 个省份, 共 12 批。全部样品均由安徽省万生中药饮片有限公司提供, 样品经安徽中医药大学刘守金教授鉴定为天南星科植物天南星 *Arisaema erubescens* (Wall.) Schott、异叶天南星 *Arisaema heterophyllum* Bl. 和东北天南星 *Arisaema amurense* Maxim. 的干燥块茎及炮制品制天南星和胆南星, 样品来源信息见表 1。

2 方法与结果

2.1 供试品溶液制备

取药材粉末过(4号筛)约 1 g, 精密称定, 置 250 mL 锥形瓶中, 加入纯水 100 mL, 称定质量, 超声提取 1 h (功率 500 W, 频率 40 kHz), 冷至室温并加纯水补足减失的质量, 滤过, 精密吸取续滤液 50 mL, 水浴蒸干, 残渣加纯水溶解, 转移至 10 mL 量瓶中, 加水定容, 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 即得供试品溶液。

2.2 对照品溶液制备

精密称取黄嘌呤、尿嘧啶、次黄嘌呤、尿苷、鸟苷、腺苷、夏佛塔苷、异夏佛塔苷对照品适量, 分别置于 10 mL 量瓶中, 加甲醇溶解, 定容, 摇匀, 即得母液。分别吸取上述 8 个对照品母液适量, 至

表 1 样品信息

Table 1 Information of samples

编号	品种	产地	批号	药材基原	编号	品种	产地	批号	药材基原
AR-1	天南星	河南	201901		ARP-8	制天南星	河南	20180501	天南星
AR-2	天南星	河南	201901		ACB-3	胆南星	安徽	20190322	异叶天南星
AR-3	异叶天南星	四川	201812		ACB-4	胆南星	安徽	20190408	异叶天南星
AR-4	异叶天南星	安徽	201810		ACB-5	胆南星	安徽	20190416	异叶天南星
AR-5	异叶天南星	安徽	201810		ACB-6	胆南星	贵州	20180926	天南星
AR-6	天南星	江苏	201812		ACB-7	胆南星	江苏	20180709	天南星
AR-7	东北天南星	辽宁	201812		ACB-8	胆南星	江苏	20180814	天南星
AR-8	东北天南星	河北	201903		ACB-9	胆南星	甘肃	20190402	东北天南星
ARP-1	制天南星	四川	20180625	异叶天南星	ACB-10	胆南星	甘肃	20190313	东北天南星
ARP-2	制天南星	四川	20180316	异叶天南星	ACB-11	胆南星	四川	20180914	异叶天南星
ARP-3	制天南星	江西	20180807	天南星	ACB-12	胆南星	四川	20180927	异叶天南星
ARP-4	制天南星	安徽	20190314	异叶天南星	ACB-3	胆南星	安徽	20190322	天南星
ARP-5	制天南星	贵州	20180716	天南星	ACB-4	胆南星	安徽	20190408	天南星
ARP-6	制天南星	贵州	20180721	天南星	ACB-5	胆南星	安徽	20190416	天南星
ARP-7	制天南星	江苏	20190108	天南星	ACB-6	胆南星	贵州	20180926	天南星

5 mL 量瓶中，配成混合对照品溶液，黄嘌呤、尿嘧啶、次黄嘌呤、尿苷、鸟苷、腺苷、夏佛塔苷、异夏佛塔苷对照品的质量浓度分别为 21.7、20.5、28.8、21.4、23.6、27.4、19.3、23.7 μg/mL。

2.3 色谱条件

Agilent C₁₈ 色谱柱 (200 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为 0.2% 乙酸水溶液 (A)-0.2% 乙酸乙腈溶液 (B), 梯度洗脱: 0~6 min, 98% A; 6~25 min, 90% A; 25~45 min, 85% A; 45~65 min, 83% A; 65~75 min, 98% A; 检测波长为 275 nm; 体积流量 0.8 mL/min; 柱温 35 °C; 进样体积 10 μL, 理论塔板数以尿苷计不低于 7 000。

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度考察 精密吸取 ARP-1 号样品 6 次, 每次 10 μL, 按照“2.3”项下色谱条件进行测定, 记录色谱图, 并计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积, 结果表明, 各共有峰相对保留时间 RSD 值为 0.06%~0.40%, 相对峰面积 RSD 值为 0.19%~1.66%, 说明该仪器精密度良好。

2.4.2 重复性考察 取 ARP-1 号样品 6 份, 按照“2.1”项下制备方法进行处理, 再按照“2.3”项下色谱条件进行测定, 记录所得色谱图, 并计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积, 结果表明, 各共有峰相对保留时间 RSD 值为 0.11%~0.79%, 相对峰面积的 RSD 值为 0.29%~2.92%, 说明该测定

方法重复性良好。

2.4.3 稳定性考察 取 ARP-1 号样品, 按照“2.1”项下制备方法进行处理, 分别在制备后 0、2、4、6、12、24 h 精密吸取 10 μL, 按照“2.3”项色谱条件进行测定, 记录色谱图, 并计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积, 结果表明, 各共有峰的相对保留时间 RSD 值为 0.07%~2.33%, 相对峰面积 RSD 值为 0.25%~1.92%, 说明该供试品溶液在 24 h 内较为稳定。

2.5 天南星及炮制品制天南星和胆南星水提物 HPLC 特征图谱的建立及分析

2.5.1 天南星水提物 HPLC 特征图谱的建立 精密吸取天南星供试品溶液和混合对照品溶液 10 μL, 按照“2.3”项色谱条件进行测定并记录色谱图, 结果见图 1, 保留时间为 7.32 min 的尿苷色谱峰分离较好, 峰型较为稳定, 相对峰面积较大, 且各样品中均含此峰, 故将此峰作为参照峰。通过“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2012)”建立天南星水提物的 HPLC 特征图谱, 天南星水提物的 HPLC 特征图谱共有峰为 19 个, 其中 8 个特征峰分别为黄嘌呤、尿嘧啶、次黄嘌呤、尿苷、鸟苷、腺苷、夏佛塔苷、异夏佛塔苷。

2.5.2 制天南星水提物 HPLC 特征图谱的建立 精密吸取制天南星供试品溶液 10 μL, 按照“2.3”项色谱条件进行测定并记录色谱图, 结果见图 2, 制

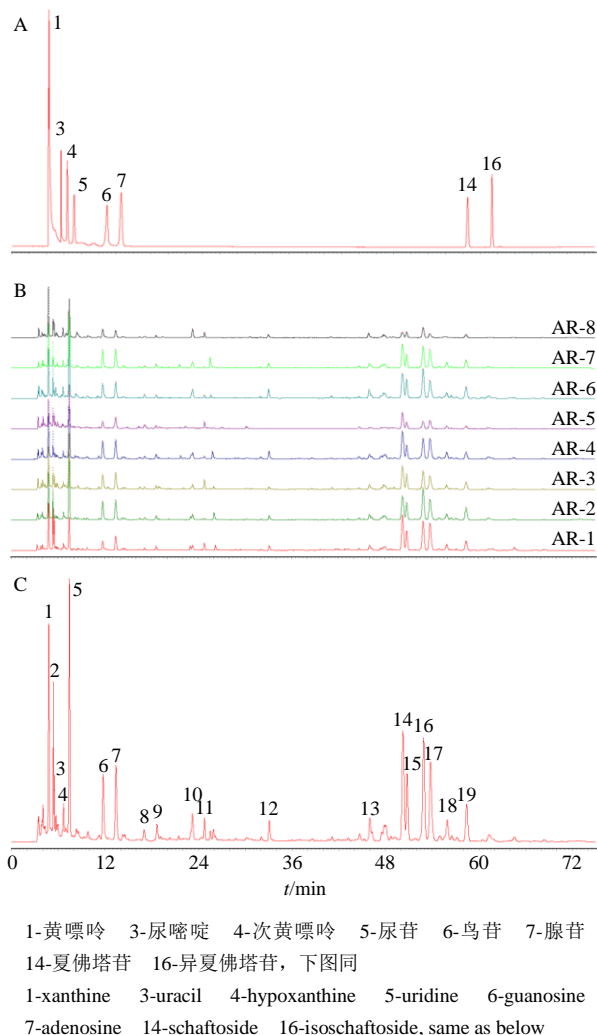


图 1 混合对照品 (A)、天南星水提取物 HPLC 特征图谱 (B) 及其共有峰模式图 (C)

Fig. 1 Chromatogram of mixed reference substances (A), HPLC specific chromatogram of water extract (B), and common peak mode pattern (C) of AR

天南星水提取物的 HPLC 特征图谱共有峰为 20 个, 其中 8 个特征峰分别为黄嘌呤、尿嘧啶、次黄嘌呤、尿苷、鸟苷、腺苷、夏佛塔苷、异夏佛塔苷。

2.5.3 胆南星水提取物 HPLC 特征图谱的建立 精密吸取胆南星供试品溶液 10 μ L, 按照“2.3”的色谱条件进行测定并记录色谱图, 结果见图 3, 其共有峰为 13 个, 其中 7 个特征峰分别为黄嘌呤、尿嘧啶、次黄嘌呤、尿苷、鸟苷、腺苷、夏佛塔苷。

2.5.4 天南星及炮制品制天南星和胆南星水提取物的 HPLC 特征图谱相似度分析 将天南星、制天南星和胆南星水提取物的图谱数据分别导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2012 版”软件, 生成相对应的对照图谱, 并计算各色谱图组内的相似度, 结果

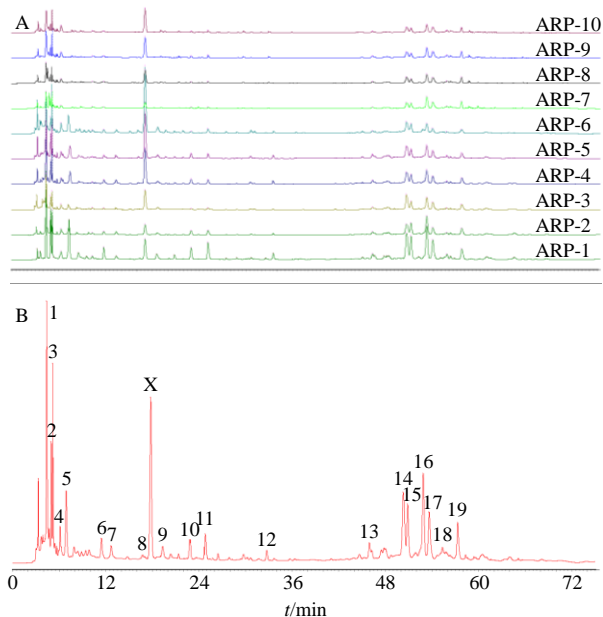


图 2 制天南星水提取物 HPLC 特征图谱 (A) 及其共有峰模式图 (B)

Fig. 2 HPLC specific chromatogram of water extracts (A) and common peak mode pattern (B) of ARP

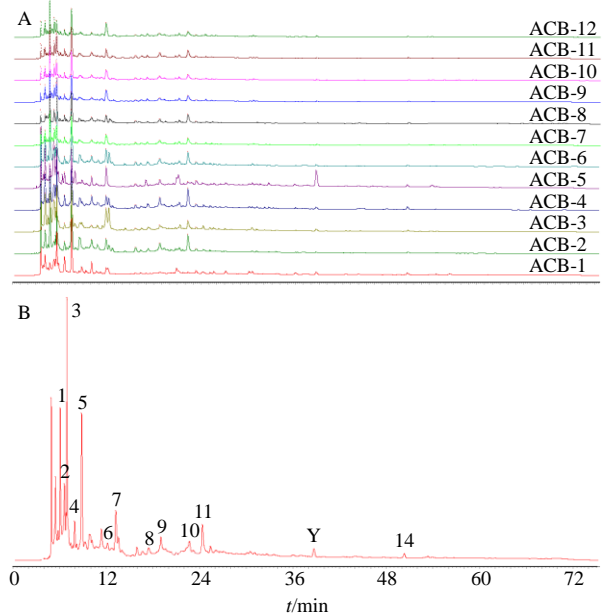


图 3 胆南星水提取物 HPLC 特征图谱 (A) 及其共有峰模式图 (B)

Fig. 3 HPLC specific chromatogram of water extracts (A) and common peak mode pattern (B) of ACB

见表 2。天南星之间的相似度在 0.9 以上, 制天南星之间的相似度均在 0.8 以上, 胆南星之间的相似度均在 0.8 以上, 说明天南星及炮制品的产地之间的差异不大。再将制天南星、胆南星图谱与天南星对照图谱导入该软件, 进行组间相似度分析, 结果见表 3, 制天南星、胆南星与天南星之间相似度均在

0.4 以下, 差异十分明显。

2.5.5 天南星及炮制品制天南星和胆南星水提取物 HPLC 特征图谱的专属性分析 将天南星共有峰模

表 2 天南星及炮制品制天南星和胆南星水提取物 HPLC 特征图谱组内相似度

Table 2 Intragroup similarity of HPLC specific chromatogram of water extract parts of AR and processed products ARP and ACB

样品	相似度	样品	相似度	样品	相似度
AR-1	0.944	ARP-3	0.955	ACB-3	0.939
AR-2	0.988	ARP-4	0.992	ACB-4	0.954
AR-3	0.983	ARP-5	0.976	ACB-5	0.841
AR-4	0.988	ARP-6	0.867	ACB-6	0.983
AR-5	0.950	ARP-7	0.966	ACB-7	0.926
AR-6	0.985	ARP-8	0.973	ACB-8	0.924
AR-7	0.992	ARP-9	0.948	ACB-9	0.919
AR-8	0.904	ARP-10	0.885	ACB-10	0.911
ARP-1	0.904	ACB-1	0.882	ACB-11	0.934
ARP-2	0.904	ACB-2	0.961	ACB-12	0.879

式图分别与制天南星、胆南星的共有峰模式图进行镜像比较, 结果见图 4, 再将鉴别各样品主要特征峰总结为表 4。与天南星相比, 制天南星新增 1 个峰, 为 X 号峰 (见图 2, 16.388 min); 胆南星新增了 1 个峰, 为 Y 号峰 (见图 3, 38.345 min), 缺失

表 3 天南星及炮制品制天南星和胆南星水提取物 HPLC 特征图谱组间相似度

Table 3 Intergroup similarity of HPLC specific chromatogram of water extract parts of AR and processed products ARP and ACB

样品	相似度	样品	相似度	样品	相似度
ARP-1	0.239	ARP-9	0.051	ACB-7	0.091
ARP-2	0.218	ARP-10	0.060	ACB-8	0.103
ARP-3	0.331	ACB-1	0.274	ACB-9	0.103
ARP-4	0.201	ACB-2	0.301	ACB-10	0.080
ARP-5	0.182	ACB-3	0.186	ACB-11	0.080
ARP-6	0.158	ACB-4	0.277	ACB-12	0.087
ARP-7	0.047	ACB-5	0.196		
ARP-8	0.047	ACB-6	0.296		

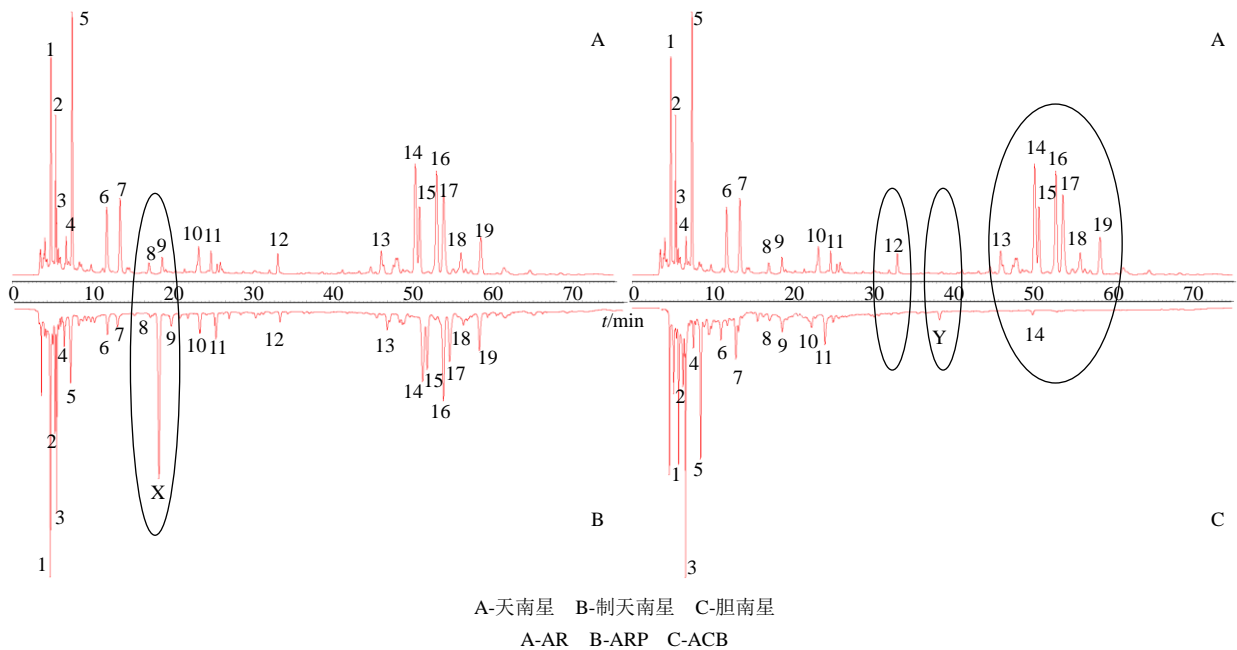


图 4 天南星与制天南星、胆南星的水提取物 HPLC 特征图谱镜像图

Fig. 4 Mirror image of HPLC specific chromatogram of water extracts for AR, ARP and ACB

表 4 各样品主要特征峰比较

Table 4 Comparison of main characteristic peaks of each sample

编号	t/min	AR	ARP	ACB	编号	t/min	AR	ARP	ACB	编号	t/min	AR	ARP	ACB
X	16.388	-	√	-	13	48.688	√	√	-	17	53.783	√	√	-
12	33.018	√	√	-	15	50.783	√	√	-	18	55.778	√	√	-
Y	38.345	-	-	√	16 (异夏佛塔昔)	52.899	√	√	-	19	58.267	√	√	-

了 7 个峰, 分别为 12 号峰 (33.018 min)、13 号峰 (47.688 min)、15 号峰 (50.783 min)、16 号 (异夏佛塔苷, 52.899 min)、17 号峰 (53.783 min)、18 号峰 (55.778 min)、19 号峰 (58.267 min)。

2.5.6 天南星及炮制品制天南星和胆南星的聚类分析 将天南星、胆南星及制天南星的水提物色谱图导入 SPSS 23.0 中, 采用质心聚类法和平均欧式距离法进行系统聚类, 结果如图 5 所示, 聚类距离为 10 时, 除 AR-5 号样品, 生品天南星聚为一类, 制天南星和胆南星各自聚为一类。

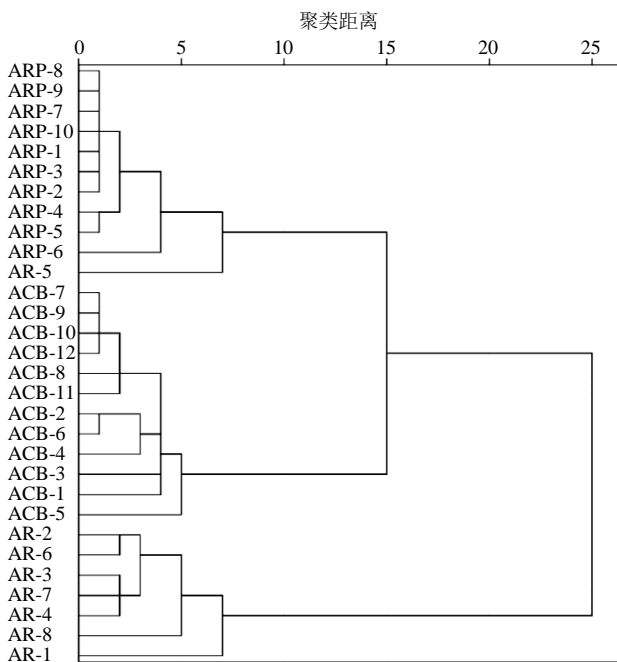


图 5 天南星及不同炮制品制天南星和胆南星的聚类树状图
Fig. 5 Cluster tree of AR and different processed products ARP and ACB

2.5.7 天南星及炮制品制天南星和胆南星的 PCA 将天南星及炮制品制天南星和胆南星的色谱图数据导入 SPSS 23.0 软件中, 以主成分的特征值及贡献率为依据, 以天南星及炮制品制天南星和胆南星水提物特征图谱中的共有峰为变量, 进行 PCA, 结果如表 5 所示, 再将天南星及炮制品制天南星和胆南星的色谱图数据导入 SIMCA 14.1 软件中, 得到二维投影图, 结果见图 6, 天南星共有 4 个主成分, 依次为 F16、F14、F17、F15, 其中 F16 和 F14 为异夏佛塔苷和夏佛塔苷, F16 (异夏佛塔苷) 的特征值为 7.195, 贡献率为 44.969%, F14 (夏佛塔苷) 的特征值为 4.043, 贡献率为 25.272%, 这 4 个主成分累计, 说明这 4 个主成分可表达全部天南星化学成分信息的 94.926%, 只有 5.074% 的信息丢失。其

表 5 天南星及炮制品制天南星和胆南星特征值
Table 5 Characteristic value table of AR and processed products ARP and ACB

主成分	特征值	贡献率/%	累积贡献率/%
AR-16	7.195	44.969	44.969
AR-F14	4.043	25.272	70.241
AR-F17	2.500	15.627	85.868
AR-F15	1.449	9.059 0	94.926
ARP-F16	11.621	72.632	72.632
ARP-F1	3.154	19.710	92.343
ACB-F3	7.632	47.697	47.697
ACB-F2	3.861	24.132	71.829
ACB-F5	2.486	15.537	87.366
ACB-F1	1.109	6.933	94.299

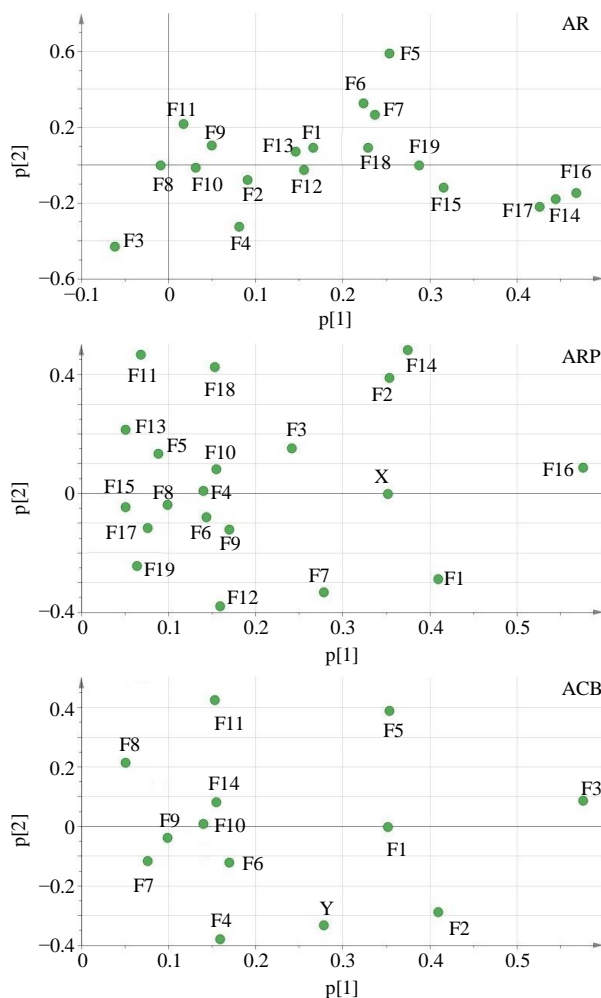


图 6 天南星及炮制品制天南星和胆南星水提物二维投影图
Fig. 6 2-D projection of water extract for AR and processed products ARP and ACB

中, 异夏佛塔苷和夏佛塔苷的累积贡献率为 70.241%, 是天南星最重要的成分群, 其所包含的

信息可以用来表征天南星的质量优劣。制天南星共有 2 个主成分 F16 和 F1, 分别指认为异夏佛塔苷和黄嘌呤, 第 1 主成分 F16 (异夏佛塔苷) 特征值为 11.621, 贡献率高达 72.632%, F1 (黄嘌呤) 的特征值 3.154, 贡献率为 19.710%, 累积贡献率为 92.343%, 异夏佛塔苷的贡献率极高, 基本能用于制南星的质量控制; 胆南星有 4 个主成分, 依次为 F3、F2、F5、F1, 第 1 主成分 F3 (尿嘧啶) 特征值为 7.632, 贡献率为 47.697%, 累积贡献率高达 94.299%, 其中 F2、F5、F1 被指认为尿嘧啶、尿苷和黄嘌呤, 累积贡献率为 70.167%, 能很好地反映出胆南星的信息。

3 讨论

3.1 色谱条件的优选

本实验分别考察了不同的提取时间、提取方法、色谱柱、检测波长、流动相、柱温及洗脱梯度, 其中提取方法比较了超声、水煎和回流, 实验结果表明这 3 种提取方法差异不大, 故选择较为便捷的超声提取进行提取, 提取溶剂考察了不同比例的甲醇、不同比例的乙醇和纯水, 实验结果表明, 纯水提取出的色谱峰较多且峰型较好, 最终得出最佳提取条件为超声 1 h, 最佳色谱条件为采用 Agilent C₁₈ 色谱柱 (200 mm×4.6 mm, 5 μm)。流动相为 0.2% 冰乙酸水溶液-0.2% 冰乙酸乙腈溶液, 检测波长为 275 nm; 体积流量 0.8 mL/min, 柱温 35 °C, 进样体积 10 μL。

3.2 生南星及炮制品制天南星和胆南星 HPLC 特征图谱的分析

通过本实验可知, 天南星及炮制品制天南星和胆南星的色谱峰在数目和峰面积上均存在明显的区别, 制天南星在 16.388 min 附近比天南星多了 1 个色谱峰 X, 该色谱峰较为稳定且峰面积较大; 胆南星与天南星相比, 在 38.345 min 附近多了 1 个色谱峰 Y, 缺失了 7 个峰, 分别为 12 号峰 (33.018 min)、13 号峰 (48.688 min)、15 号峰 (50.783 min)、16 号 (异夏佛塔苷, 52.899 min)、17 号峰 (53.78 min)、18 号峰 (55.788 min)、19 号峰 (58.267 min)。相关研究表明天南星在浸泡、煮制、发酵等炮制的过程中, 化学成分有所变化, 不仅存在着量变, 也有部分发生了质变^[14], 制南星和胆南星的炮制过程中分别添加了生姜、白矾和胆汁, 新增成分可能是由于辅料的添加, 胆汁的主要成分为胆烷酸类成分^[15], 仅有紫外末端吸收, 本实验采用的检测波长为 270

nm, 因此推测胆南星中新增的 Y 成分不是辅料胆汁中所含的成分, 可能是胆南星炮制过程中内在成分之间转化产生新的成分。制天南星所用的辅料为生姜和白矾, 将生姜与白矾按照《中国药典》2015 年版“制天南星”项下的炮制方法中辅料的炮制过程进行处理, 将炮制过程中的生姜白矾水倒入蒸发皿中, 水浴蒸干, 残渣加纯水溶解, 过 0.45 μm 微孔滤膜, 按照“2.3”项下色谱条件进样, 实验结果为辅料溶液的色谱图中并未比对出 X 成分, 表明制天南星中新增的 X 成分并非为辅料中的成分, 有可能为炮制过程中内在成分的转化或辅料与天南星相互反应产生的新成分, 本课题组将进一步利用 UPLC-Q-TOF/MS 分析制天南星和胆南星的新增成分, 为探索天南星炮制过程中的化学物质变化提供科学依据。

3.3 对天南星及炮制品制天南星和胆南星的鉴别分析及质量控制标准的建议

《中国药典》2015 年版关于天南星及炮制品制天南星的质量控制指标仅涉及水分、灰分、白矾限量及总黄酮含量, 胆南星检查项和含量测定项均无规定, 导致市场上天南星及其炮制品的质量参差不齐。HPLC 特征图谱的研究为评价天南星及其炮制品的质量提供了科学依据, 也为其提供了一种鉴别方法^[16]。在鉴别方面, 与天南星相比, 制天南星和胆南星各多了一个成分, 这些成分可以较好地将绝大部分天南星及其炮制品进行区分, 16.388 min 附近的色谱峰为制天南星所特有, 38.345 min 的色谱峰为胆南星特有, 故可凭借这 2 个色谱峰区分出天南星及其炮制品; 同时夏佛塔苷和异夏佛塔苷为天南星及伪品 (虎掌南星) 之间最主要的区别之一^[17], 因此异夏佛塔苷亦可用于鉴别天南星与伪品。

在质量控制方面, 通过 PCA 可知异夏佛塔苷与夏佛塔苷为天南星的第 1 主要成分和第 2 主要成分, 同时, 异夏佛塔苷为制天南星的第 1 主要成分, 虽然在制天南星的 PCA 中未获得夏佛塔苷, 但是夏佛塔苷仍为贡献率第 3 的化学成分。与此同时药理学实验表明, 夏佛塔苷和异夏佛塔苷具有抗缺血、保护神经细胞的作用, 可对抗戊四唑引起的惊厥, 同时夏佛塔苷对肿瘤的抑制呈一定的量效关系^[18-19], 因此这 2 个成分能很好地反映天南星及制天南星的品质; PCA 结果表明胆南星中的主成分为 F3 (尿嘧啶)、F2、F5 (尿苷)、F1 (黄嘌呤), 累积贡献率高达 94.299%, 其中 F2 的成分未能指认出, 还需

进一步探索研究,但尿嘧啶、尿苷和黄嘌呤的累积贡献率依旧达到了 70.167%,同时药理学研究表明核苷类成分具有广泛的生理活性,是生物细胞维持生命活动的基本组成元素,参与 DNA 代谢过程,具有抗肿瘤、抗病毒、基因治病、免疫调节、改善脑细胞代谢、镇静中枢神经、抗血小板凝集、抗心律失常和抗惊厥等多种生物活性^[20-24],因此这 3 个成分亦能够很好地反映胆南星的质量优劣。为了更好地控制天南星及其炮制品的质量,建议将夏佛塔苷和异夏佛塔苷纳入天南星和制天南星的质量评价体系之中,将尿嘧啶、尿苷和黄嘌呤纳入胆南星的质量评价体系之中,为天南星及其炮制品的质量评价及其质量标准的完善提供科学依据。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] 王卫,毛善虎,单雪莲,等. 基于 ROS/NF- κ B 信号通路的天南星凝集素致炎机制及炮制对蛋白的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2018, 33(5): 64-70.
- [3] 吴紫君,冯碧川,沈志滨,等. 天南星科有毒中药及其炮制品的急性毒性试验研究 [J]. 广东药科大学学报, 2018, 146(3): 56-59.
- [4] 王卫,王奎龙,单雪莲,等. 有毒中药的炮制解毒技术及共性解毒机制 [J]. 南京中医药大学学报, 2017, 33(5): 448-462.
- [5] 王志强. 天南星化学成分与药理作用研究进展 [J]. 药物评价研究, 2009, 32(2): 144-149.
- [6] 吴鲁东. 天南星及其炮制品的质效评价 [D]. 广州: 广东药学院, 2014.
- [7] 张学华,张群,王蓓. 制天南星、胆南星、生天南星临床如何区别应用 [J]. 中医杂志, 2008, 49(7): 663-663.
- [8] 王帅,包永睿,杨欣欣,等. 中药东北天南星生物碱类成分提取纯化工艺研究 [J]. 时珍国医国药, 2015, 26(10): 2343-2345.
- [9] 居羚,池玉梅,吴皓,等. 超高效液相-高分辨串联质谱分析天南星化学成分 [J]. 亚太传统医药, 2016, 12(5): 45-49.
- [10] 汪荣斌,王存琴,刘晓龙. 天南星(虎掌南星)的化学成分和药理作用研究 [J]. 长春中医药大学学报, 2010, 26(4): 590-592.
- [11] 张玉凤,杨美娜,庞靖祥,等. 基于栅藻延迟发光的制天南星、胆南星药性研究 [J]. 中草药, 2018, 49(23): 5573-5579.
- [12] 蔡宇忆. 胆南星的质量标准提高研究 [D]. 广州: 广东药科大学, 2016.
- [13] 陈士林,刘昌孝. 中药饮片标准汤剂 [M]. 北京: 科学出版社, 2018.
- [14] 李瑶. 胆南星炮制前后成分变化及质量标准研究 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2018.
- [15] 陈云,郁红礼,吴皓,等. 发酵对胆南星中胆汁酸类成分的影响及胆南星中 3 种游离胆汁酸含量测定研究 [J]. 中国中药杂志, 2018, 43(22): 99-103.
- [16] 林坤河,韦建华,邓超澄,等. 炮制对天南星化学成分及药理作用的影响研究概况 [J]. 广西中医药, 2018, 41(4): 73-75.
- [17] 罗芬,陆丹,池玉梅,等. 天南星药材的 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 中国中药杂志, 2011, 36(23): 3302-3305.
- [18] 李春娜,刘洋洋,李朋收,等. 东北天南星化学成分及药理作用 [J]. 吉林中医药, 2015, 35(3): 293-296.
- [19] 吴鲁东. 天南星及其炮制品的质效评价 [D]. 广州: 广东药学院, 2014.
- [20] Kinahan J J, Kowal E P, Grindey G B. Biochemical and antitumor effects of the combination of thymidine and 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine against leukemia L1210 [J]. *Cancer Res*, 1981, 41(2): 445-451.
- [21] Lee J, Chuang T H, Redecke V, et al. Molecular basis for the immunostimulatory activity of guanine nucleoside analogs: Activation of Tolllike receptor7 [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(11): 6646-6651.
- [22] 王锐. 嘧啶核苷的研究进展 [J]. 生物技术通讯, 2007, 18(3): 184-187.
- [23] 肖维强,黄炳雄,王晓蓉,等. HPLC 法测定龙眼肉中的几种核苷类物质 [J]. 食品科学, 2007, 28(1): 234-237.
- [24] 张元杰,钱正明,陈肖家,等. HPLC 法同时测定补益中药中尿苷、腺嘌呤、鸟苷和腺苷的含量 [J]. 药物分析杂志, 2010, 30(1): 39-42.