

# Study on TLC Identification and HPLC Fingerprint of *Adenophora radix*

Lihe Lu<sup>1</sup>, Xinzhou Yang<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Yunnan Institute of Materia Medica, Kunming Yunnan

<sup>2</sup>Institute of Technology, Dehong Teachers' College, Mangshi Yunnan

Email: lulihe@126.com

Received: Jul. 9<sup>th</sup>, 2019; accepted: Jul. 24<sup>th</sup>, 2019; published: Jul. 31<sup>st</sup>, 2019

## Abstract

**Objective:** To identify *Adenophora radix* with TLC and to establish HPLC fingerprint of *Adenophora radix* to provide better specificity test method for the quality control. **Methods:** Pharmacopoeia TLC method. HPLC Thermo Acclaim™ 120 C<sub>18</sub> (4.6 × 250 mm, 5 μm) was used with acetonitrile-0.5% 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 30°C. Similarity evaluation system for chromatographic fingerprint of TCM was applied to analyze different batches of *Adenophora radix* samples. **Results:** TLC identification was carried out on 9 batches of medicinal materials, and 9 batches of HPLC fingerprints were established. Three common chromatographic peaks were determined. The results of methodological verification met the related requirements of fingerprints. **Conclusion:** This method is simple and reliable, and can be used for the identification and quality control of *Adenophora radix*.

## Keywords

*Adenophora radix*, Thin Layer Chromatography, HPLC Fingerprint, Quality Control

# 南沙参TLC鉴别和HPLC指纹图谱研究

陆礼和<sup>1</sup>, 杨新周<sup>2</sup>

<sup>1</sup>云南省药物研究所, 云南 昆明

<sup>2</sup>德宏师范高等专科学校理工系, 云南 芒市

Email: lulihe@126.com

收稿日期: 2019年7月9日; 录用日期: 2019年7月24日; 发布日期: 2019年7月31日

## 摘要

**目的:** 对南沙参进行TLC (薄层色谱)鉴别并建立HPLC (高效液相)指纹图谱方法, 为其质量控制提供专属

**文章引用:** 陆礼和, 杨新周. 南沙参 TLC 鉴别和 HPLC 指纹图谱研究[J]. 化学工程与技术, 2019, 9(4): 343-348.

DOI: 10.12677/hjct.2019.94049

性更好的测试方法。方法: TLC采用药典方法; HPLC色谱柱Thermo Acclaim™ 120 C<sub>18</sub> (4.6 × 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈-0.5%磷酸水溶液, 梯度洗脱, 流速为1.0 mL/min, 检测波长为203 nm, 柱温30℃; 采用中药色谱指纹图谱评价系统对不同批次样品进行相似度分析。结果: 对9批药材进行了TLC鉴别和建立了9批药材HPLC指纹图谱, 确定3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, 可用于南沙参药材的鉴别和质量控制。

## 关键词

南沙参, 薄层色谱, HPLC指纹图谱, 质量控制

Copyright © 2019 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 引言

南沙参为桔梗科植物轮叶沙参 *Adenophora tetraphylla* (Thunb.) Fisch 或沙参 *Adenophora stricta* Miq. 干燥根。春、秋二季采挖, 除去须根, 洗后趁鲜刮去粗皮, 洗净, 干燥。养阴清肺, 益胃生津, 化痰, 益气。用于肺热燥咳, 阴虚劳嗽, 干咳痰黏, 胃阴不足, 食少呕吐, 气阴不足, 烦热口干[1]。现代研究证明, 南沙参含有生物碱类、β-谷甾醇及其衍生物、三萜类、多糖类、磷脂类、糖苷类等多种活性成分, 并具有免疫调节、抗辐射、抗衰老、清除自由基、保肝等多种药理作用[2]。截至目前, 该药材收载于《中国药典》第1部(2015版) 244~245页, 药材质量标准只有简单的薄层鉴别和浸出物测定, 且关于南沙参栽培种植、资源调查、与其他沙参的鉴别比较、化学成分、药理作用的研究较多[3]-[8], 但南沙参指纹图谱的研究报道较少。为保证其质量的稳定性, 加强资源利用与开发, 本实验对9批次的南沙参药材, 采用药典方法进行了TLC鉴别, 并建立了HPLC指纹图谱研究, 确定了3个共有色谱峰, 建立了南沙参指纹图谱共有模式, 为南沙参的质量控制及科学评价, 提供试验依据。

## 2. 材料

南沙参, 批号: 160901、160902、161010、161011、170319、170320、170811、170812、171002 购自云南宗顺生物有限公司, 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; 产地见表1; 南沙参对照药材, 中国食品药品检定研究院, 批号 121499-201605。蒲公英萜酮, 中国食品药品检定研究院, 批号 112006-201702。

Table 1. Producing area

表 1. 产地表

编号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9
产地	贵州	贵州	云南	云南	河北	河北	四川	四川	山东
批号	160901	160902	161010	161010	170319	170320	170811	170812	171002

Thermo UltiMate3000 系列高效液相色谱仪(LPG-3400 四元泵、WPS-3000 SL 自动进样仪、TCC-3000 柱温箱、DAD-3000 二极管阵列检测器和 Dionex Chromeleon 工作站); 超声波清洗器 SK8200 HP (上海科导超声仪器有限公司); METTLER-TOLEDO AG-285 型电子分析天平(METTLER-TOLEDO (上海)有限公

司生产); ZF-90 多功能暗箱式紫外投影仪(上海宝山顾村电光仪器厂); 薄层色谱展开缸(上海信谊仪器厂); 青岛海洋普通 G 板(青岛海洋化工厂分厂)。

乙腈为色谱纯(Merck 公司); 重蒸水(由 Milli-Q 纯水制备系统制备), 其他试剂为分析纯。

### 3. 实验过程

#### 3.1. TLC 鉴别

《中国药典》第 1 部(2015 年版)南沙参【鉴别】项中采用了薄层色谱法, 以蒲公英萜酮作为对照品进行南沙参的鉴别。本实验采用药典方法, 对不同产地的南沙参进行了 TLC 鉴别。

##### 3.1.1. 溶液制备

供试品溶液制备: 取各产地药材粉末 2 g, 加入二氯甲烷 60 mL, 超声处理 30 分钟, 滤过, 滤液蒸干, 残渣加二氯甲烷 1 mL 使溶解, 作为供试品溶液。

对照品溶液制备: 取蒲公英萜酮对照品, 加二氯甲烷制成每 1 mL 含 0.2 mg 的溶液, 作为对照品溶液。

对照药材溶液制备: 南沙参对照药材 2 g, 同法(同供试品溶液制备方法)制成对照药材溶液。

##### 3.1.2. 鉴别

照薄层色谱法(2015 版中国药典通则 0502)试验, 吸取上述三种溶液各 5  $\mu$ L, 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 以正己烷 - 丙酮 - 甲酸(25:1:0.05)为展开剂, 置用展开剂预饱和 20 分钟的展开缸内, 展开, 取出, 晾干, 喷以 2% 香草醛硫酸溶液, 在 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。

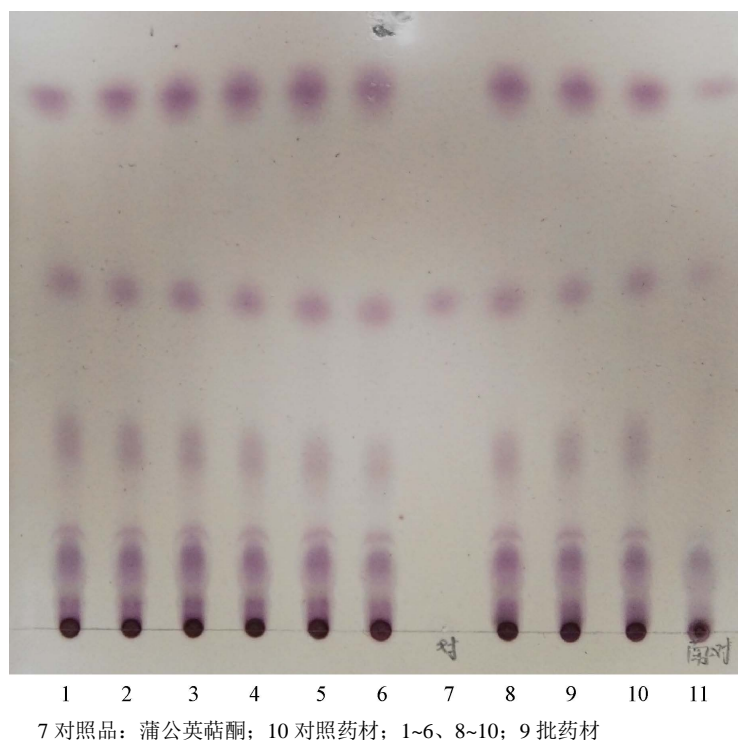


Figure 1. TLC of *Adenophora radix*

图 1. 南沙参薄层色谱图

## 3.2. HPLC 指纹图谱研究

### 3.2.1. 色谱条件

色谱柱为 Thermo Acclaim TM<sup>120</sup> C<sub>18</sub> (4.6 × 250 mm, 5 μm), 流速为 1.0 ml/min, 柱温为 30℃, 进样量为 10 μl, 检测波长为 203 nm, 梯度洗脱(A)乙腈-0.5%磷酸溶液(B) (见表 2), 检测时间 60 min。

Table 2. Mobile phase gradient mode

表 2. 流动相梯度表

时间(min)	0	10	23	28	33	41	46	50	55	60
流动相 A (%)	45	55	59	62	62	78	85	85	45	45
流动相 B (%)	55	45	41	38	38	22	15	15	55	55

### 3.2.2. 供试品溶液的制备

取南沙参粉末(过五号筛)约 2.0 g, 精密称定, 精密加入甲醇 50 ml, 称定重量, 放置过夜, 置 80℃ 水浴上保持微沸 1 小时, 放冷, 滤过, 浓缩至干, 精密加入 5 mL 甲醇, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

### 3.2.3. 方法学验证

#### 1) 精密度试验

取同一份供试品(批号 160901)溶液, 在上述色谱条件下重复进样 6 次, 记录指纹图谱。以 3 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 小于 0.35%, 相对峰面积 RSD 小于 3.00%, 表明仪器精密度良好。

#### 2) 稳定性试验

取同一份供试品(批号 160901)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 3 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 小于 0.45%, 相对峰面积 RSD 小于 2.15%, 表明供试品溶液在 48 h 内基本稳定。

#### 3) 重复性试验

取同一批供试品(批号 160901) 6 份, 精密称定, 按“3.2.2”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 3 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 小于 0.21%, 相对峰面积 RSD 小于 2.60%, 表明供试品溶液的制备方法重复性良好。

### 3.2.4. 指纹图谱的建立及其相似度评价

#### 1) 南沙参化学指纹图谱的建立

9 批南沙参按“3.2.2”项下方法制备供试品溶液, 各取 10 μL 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 9 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, 建立了南沙参药材指纹图谱, 结果见图 2, 其中 R 为指纹图谱共有模式。共确定了 3 个共有峰。

#### 2) 相似度评价

将 9 批样品色谱数据导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2004A 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, 不同批次南沙参药材指纹图谱相似度除 S9 批外均大于 0.95, 见表 3, 说明不同批次南沙参药材中化学成分相似度较高。

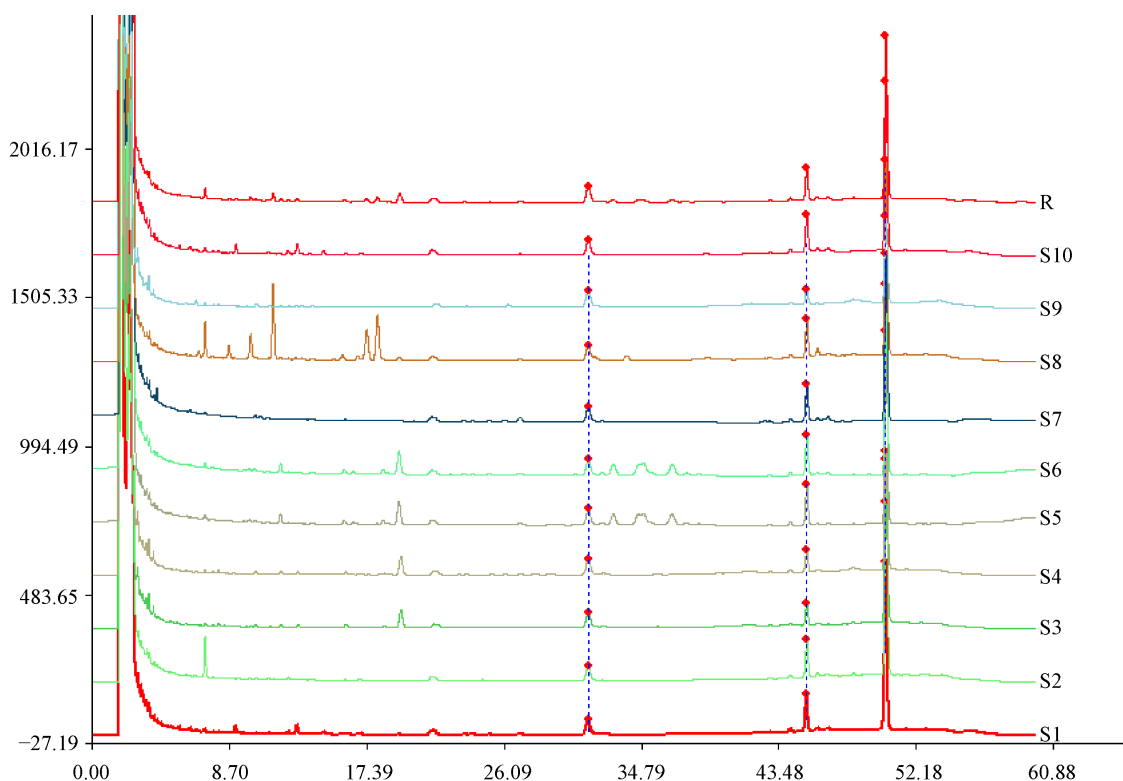


Figure 2. HPLC fingerprint of 9 batches of *Adenophora radix* samples

图 2. 9 批次南沙参药材 HPLC 指纹图谱

Table 3. Similarity evaluation results of 9 batches of medicinal materials

表 3. 9 批药材样品相似度评价结果

	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	对照指纹图谱
S1	1	1	0.978	0.976	0.984	0.979	0.984	0.979	0.889	0.984
S2	1	1	0.977	0.975	0.983	0.979	0.983	0.977	0.887	0.983
S3	0.978	0.977	1	1	0.97	0.958	0.97	0.964	0.877	0.97
S4	0.976	0.975	1	1	0.967	0.956	0.967	0.962	0.875	0.967
S5	0.984	0.983	0.97	0.967	1	0.99	1	0.993	0.903	1
S6	0.979	0.979	0.958	0.956	0.99	1	0.989	0.98	0.888	0.989
S7	0.984	0.983	0.97	0.967	1	0.989	1	0.993	0.903	1
S8	0.979	0.977	0.964	0.962	0.993	0.98	0.993	1	0.909	0.993
S9	0.889	0.887	0.877	0.875	0.903	0.888	0.903	0.909	1	0.903
对照指纹图谱	0.984	0.983	0.97	0.967	1	0.989	1	0.993	0.903	1

#### 4. 讨论

TLC 鉴别中参照药典方法进行 9 批南沙参检测, 结果显示 9 批南沙参的斑点与对照药材斑点基本完全重合。在 HPLC 指纹图谱研究中, 参照文献[9] [10]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, 南沙参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℃对南沙参化学成分的分离效果, 结果表明, 柱温在 30℃条件下, 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 个流速对南沙参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; 供试品溶液制备方法比较了回流和超声提取, 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。

应用国家药典委员会 - 中药指纹图谱相似度评价系统(2004A)软件对 9 批南沙参的共有峰进行确定, 结果表明保留时间分别为 32.397 min、45.747 min、50.750 min 的三个色谱峰, 在 9 批南沙参中均存在; 9 批南沙参的指纹图谱拟合图也对 9 批南沙参中的共有峰进行了标注, 确定了三个色谱峰作为共有峰。不同批次南沙参药材指纹图谱相似度除 S9 批(0.90)外均大于 0.95。从 TLC 检测和 HPLC 指纹图谱结果看出, 不同产地南沙参化学成分有差异, 但总体差异不大。我们建立的李沙参 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] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 第 1 部. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 224-245.
- [2] 王瑞, 曹慧, 李学红, 刘世武. 中药南沙参配方颗粒成型工艺研究[J]. 潍坊学院学报, 2015, 15(2): 20-22.
- [3] 刘彩虹. 南沙参的栽培技术[J]. 药材栽培, 2000(9): 43.
- [4] 张春雷, 阎凤君, 刘忆萍, 等. 我省南沙参资源理当开发利用[J]. 吉林中医药, 1997(4): 42.
- [5] 孙黎明. 南沙参与杏叶沙参的比较鉴别[J]. 中国民族民间医药, 2010, 19(6): 42.
- [6] 孙亚凤. 南沙参与北沙参的鉴别应用[J]. 光明中医, 2011, 26(11): 2348-2349.
- [7] 魏巍, 吴疆, 郭章华. 南沙参的化学成分和药理作用研究进展[J]. 药物评价研究, 2011, 34(4): 298-300.
- [8] 徐谦, 李振麟, 赵彦敏, 蔡芷辰, 钱士辉. 南沙参的化学成分[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(7): 58-61.
- [9] 王海波, 刘勇, 邸学, 杨洋, 邢艳萍. 远志 HPLC 多指标指纹图谱研究[J]. 中草药, 2018, 41(2): 378-380.
- [10] 陆雪萍, 梅双喜, 彭玲芳, 陆礼和, 李小辉. 八角莲的 TLC 鉴别和 HPLC 指纹图谱研究[J]. 云南中医学院学报, 2016, 39(4): 30-34.

### 知网检索的两种方式:

1. 打开知网首页: <http://cnki.net/>, 点击页面中“外文资源总库 CNKI SCHOLAR”, 跳转至: <http://scholar.cnki.net/new>, 搜索框内直接输入文章标题, 即可查询; 或点击“高级检索”, 下拉列表框选择: [ISSN], 输入期刊 ISSN: 2161-8844, 即可查询。
2. 通过知网首页 <http://cnki.net/>顶部“旧版入口”进入知网旧版: <http://www.cnki.net/old/>, 左侧选择“国际文献总库”进入, 搜索框直接输入文章标题, 即可查询。

投稿请点击: <http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱: [hjct@hanspub.org](mailto:hjct@hanspub.org)