

- [3] 徐叔云 1 药理实验方法学 [M] 1 第 2 版, 北京: 人民卫生出版社, 1991
- [4] 丁永芳, 叶言等 1 注射用银杏叶 (冻干) 对实验性脑缺血的保

- 护作用 [J] 1 时珍国医国药, 2003 14: 2011
- [5] 芮菁, 韩晶, 唐元泰 1 不同来源灯盏花素注射液 / 生物活性 0 质量的比较研究 [J] 1 中国药品标准, 2007, 4 211

黄草类石斛的薄层色谱鉴别研究

徐蓓¹, 杨莉², 陈崇崇², 王峥涛^{1,2,3}, 徐珞珊¹ (1 中国药科大学生药学研究室, 南京 210038; 21 上海中医药大学中药研究所教育部中药标准化重点实验室, 上海 201203; 31 上海中医药大学中药研究所上海市复方中药重点实验室, 上海 201203)

摘要 目的: 建立黄草类石斛的薄层色谱 (TLC) 定性鉴别方法。方法: 采用薄层色谱法, 考察不同基源石斛及商品药材中专属成分联苳类化合物毛兰素 (erianin)、石斛酚 (giganol)、枸唇石斛素 (moscatilin) 和 3, 4'-O-二羟基-2, 2'-甲氧基联苳 (tristin) 的薄层色谱行为, 对石斛药材进行定性鉴别。结果: 通过 21 种不同基源的石斛及 11 批商品石斛的薄层色谱鉴别, 证明此方法专属性强, 操作简单, 重复性好, 为石斛的鉴别提供了一种准确、有效的新方法。结论: 本方法可用于黄草类石斛的鉴别, 为中药石斛的质量标准研究提供科学依据。

关键词: 石斛; 联苳类化合物; 薄层色谱法; 鉴别; 质量控制

中图分类号: 92112 文献标识码: A 文章编号: 1009-3656(2010)-2-99-5

Studies on Identification of *Caulis Dendrobii* by Thin Layer Chromatography

Xu Bei¹, Yang Li², Chen Chongchong², Wang Zhengtao^{1,2,3}, Xu Luoshan¹ (1 Department of Pharmacology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210038, China; 2 The MOE Key Laboratory for Standardization of Chinese Medicines, Institute of Chinese Materia Medica, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201210, China; 3 The Shanghai Key Laboratory for Compound Chinese Medicines, Institute of Chinese Materia Medica, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201210, China)

Abstract Objective To establish a new qualitative method for identification of *Caulis Dendrobii* by Thin Layer Chromatography (TLC). Methods The specific compounds four benzenyl erianin, giganol, moscatilin and tristin were studied by TLC in different *Dendrobium* species. Results The newly established method was successfully applied to qualitative analysis of benzenyls in twenty-one samples of *Dendrobium* species and eleven batches of commercial herbs and it proved to be specific, simple and reliable. Conclusion The developed qualitative method by TLC is useful for quality control on *Caulis Dendrobii*.

Key words: *Caulis Dendrobii*; benzenyls; TLC; identification; quality control

石斛来源于金钗石斛 *Dendrobium nobile* Lindl.、铁皮石斛 *Dendrobium candidum* Wall. ex Lindl. 或马鞭石斛 *Dendrobium fimbriatum* Hook. f. var. *oculatum* Hook. f. 及其近似种的新鲜或干燥茎^[1], 应用历史悠久, 在《神农本草经》中被列为上品, 具有滋阴清热、生津益胃、润肺止咳的功效, 用于热病伤津、口干烦渴、病后虚热等多种病症。近年来市场上供应的商品石斛根据加工情况, 主要分为 / 枫斗 0 和 / 黄草 0 两大类。枫斗主要是选用茎细、柔嫩、多汁的石斛, 商品常被加工呈螺旋形或弹簧状。

黄草是指凡是不适合加工枫斗的石斛属植物的茎, 通常茎较为粗大, 坚实, 色黄。/ 黄草 0 一名在历代本草中未见记载, 陶弘景《神农本草经集注》6 (据 5 本草纲目 6 转引) 载称: / 今用石斛出始兴。生石生, 细实。以桑灰汤沃之, 色如金, 0, 可见黄草一名因植物干后呈色黄而得名。常用的药用黄草石斛品种主要有: 细叶石斛 *Dendrobium hookeri*、长苏石斛 *Dendrobium brymerianum*、黄花石斛 *Dendrobium kanzhuanthum*、束花石斛 *Dendrobium chrysanthum*、兜唇石斛 *Dendrobium laphyllum*、球花石斛 *Dendrobium thyrsoiflorum*、翅梗石斛 *Dendrobium trigonopu*、景洪石斛

基金项目: 国家药典委员会《中国药典 2010 年版一部标准研究课题》(YS2174): 石斛药材 5 中国药典 2010 年版一部标准研究。

作者简介: 徐蓓, 女, 硕士研究生。学科及研究方向: 生药学、中药活性成分和质量标准研究。联系电话: (021) 51322506 E-mail: cpuy@

D1exile 叠鞘石斛 *D laurantiacum var dannaeanum*、短棒石斛 *D1capillipes*、报春石斛 *D1primulinum* 等。近年来,由于野生石斛资源紧缺,5中国药典 6 2005 年版进一步扩大药用石斛的种类,所收载的石斛品种几乎涵盖了所有石斛属植物。但在质量控制方面,2005年版药典仅就性状及显微鉴别方法进行描述,而众所周知兰科植物的主要鉴别依据为花,单一从茎的性状和显微特征对石斛的基源鉴定存在较大困难;另外,由于商品石斛规格繁多,基源复杂,常为多种石斛的混合品,仅从性状和显微鉴别方面,很难准确鉴别石斛的真伪,因此有必要对中药石斛定性鉴别方法进一步研究,以判断药用石斛的真伪,保证其药效及用药安全。

薄层色谱法是目前常用的定性鉴别方法,因其简便、直观、选择性高、适用性强等优点在中国药典鉴别项中被广泛应用。因此,本实验拟采用薄层色谱法对 21 种不同来源的石斛属植物及两种近似种流苏金石斛和石豆兰的薄层色谱行为进行系统研究。联苳类化合物在石斛属植物中普遍分布,是中药石斛的专属性成分,杨莉^[2]等人从 31 种石斛属植同时测定五种联苳类化合物,仅在重唇石斛中未检测出该类成分,其他石斛中均有检出;现代药理研究表明联苳类化合物具有抗肿瘤^[3],抗氧化和抗血小板聚集^[4]等活性,可作为石斛质量控制研究的指标成分。目前,石斛的薄层色谱鉴别报道有金钗石斛

野生品和栽培品间鉴别^[5]和叠鞘石斛鉴别^[6]等方面的应用,另有见运用于鉴别其伪品石豆兰^[7]的报道,但以上研究均未能解决多来源石斛的真伪鉴别的难题。因此本实验选择联苳类化合物内为黄草类石斛薄层鉴别的指标成分,建立同时分析石斛中 4 种主要联苳类成分)))毛兰素、石斛酚、杓唇石斛素和 *Tristin* 的薄层色谱法,并对 11 批商品石斛药材进行了真伪鉴别,结果显示该方法简单、可靠、重复性好,可用于石斛药材的质量控制,为石斛药材 2010 年版药典的质量标准研究奠定基础。

1 仪器与试剂

硅胶 G 高效板 10 cm @20 cm (HPTLC2Fertigo2 platten NanoDURASIL20 200 @100,德国 MN,批号 503073);双槽展开缸;薄层色谱仪 (LNCMAT20, REPROSTAR 3, 瑞士 CAMAG);电子分析天平 (Mettler AE200);超声仪 KQ250DB 数控超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司)。

试剂均为分析纯 (国药集团化学试剂有限公司),其中石油醚沸点为 60~90 e;超纯水为 MilliQ 处理水 (Millipore Col)。毛兰素、石斛酚、杓唇石斛素和 *Tristin* 均自制 (纯度达 98% 以上)。实验分析用石斛样品来自不同基源石斛,经杨莉副研究员鉴定,以及近年来市场销售的商品石斛由吴立宏副研究员收集,凭证样品保存在上海中医药大学中药研究所内。样品来源见表 1~2。

表 1 不同基源石斛属 (*Dendrobium*) 植物

序号	名称	采集地	序号	名称	采集地
1	细叶石斛 <i>D1hancockii</i>	南京,江苏	12	鼓槌石斛 <i>D1drysolotzum</i>	思茅,云南
2	长苏石斛 <i>D1brymerianum</i>	孟连,云南	13	金钗石斛 <i>D1nobile</i>	南靖,云南
3	黄花石斛 <i>D1dikanthum</i>	思茅,云南	14	密花石斛 <i>D1densiflorum</i>	思茅,云南
4	束花石斛 <i>D1drysanthum</i>	思茅,云南	15	肿节石斛 <i>D1pendulum</i>	思茅,云南
5	兜唇石斛 <i>D1aphyllum</i>	孟连,云南	16	矮石斛 <i>D1belatulum</i>	南靖,云南
6	球花石斛 <i>D1thyrsiflorum</i>	思茅,云南	17	大苞鞘石斛 <i>D1wardianum</i>	孟连,云南
7	翅梗石斛 <i>D1trigonopus</i>	思茅,云南	18	晶帽石斛 <i>D1crystallinum</i>	孟连,云南
8	景洪石斛 <i>D1exile</i>	景洪,云南	19	钩状石斛 <i>D1aduncum</i>	勐腊,云南
9	叠鞘石斛 <i>D1aurantiacum var dannaeanum</i>	思茅,云南	20	流苏金石斛 <i>Flickingeria fimbriata</i>	屏边,云南
10	短棒石斛 <i>D1capillipes</i>	昆明,云南	21	石豆兰 <i>Bulbophyllum repans</i>	天峨,广西
11	报春石斛 <i>D1primulinum</i>	孟连,云南			

表 2 不同来源商品石斛

编号	收集地	产地	编号	收集地	产地
P02	河北,安国药材市场	云南	P13	江苏,徐州彭祖大药房	贵州
P03	重庆,石柱药材市场	四川	P14	上海,雷允上药房	四川
P05	四川,西部药都药材市场	四川	P15	上海,胡庆余药房云南	
P10	江苏,扬州大德生药房	未知	P16	上海,养和堂药房云南	
P11	黑龙江,哈尔滨健康药房	未知	P19	江苏,南京金陵药业	泰国
P12	云南,丽江药材市场	未知			

2 方法及结果

2.1 薄层色谱鉴别方法

2.1.1.1 薄层色谱条件 薄层板: 10 cm @20 cm 高效硅胶 G薄层板; 展开剂: 石油醚∶乙酸乙酯 (6B 4); 点样仪器: CAMAG Linomat 6 全自动薄层点样器; 点样量: 对照品溶液 1 μL; 石斛样品溶液 2 μL; 带宽: 8 mm, 间距: 3 mm。

2.1.1.2 对照品溶液的制备 精密称取毛兰素、石斛酚、杓唇石斛素和 Tristin 对照品适量, 分别加甲醇制成每 1 mL 各含 0.12 mg 的混合溶液, 作为对照品溶液。

2.1.1.3 供试品溶液的制备 取本品粉末 (过三号筛) 约 1 g 置具塞锥形瓶中, 加入甲醇 50 mL, 超声提取 (功率 250 W, 频率 40 kHz) 45 min, 放置至室温, 取续滤液 25 mL, 回收溶剂, 残渣加甲醇溶解并转移至 5 mL 容量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 作为供试品溶液。

2.1.1.4 展开及显色 取石油醚∶乙酸乙酯 (6B 4) 约 15 mL 置双槽展开箱中, 预平衡 15 min, 展开, 取出, 晾干, 展距 8 cm。均匀喷洒 10% 硫酸乙醇溶液至硅胶板面完全润湿为止, 于 105℃ 加热至斑点清晰。对照品的保留值在 0.12~0.16 之间。

2.2 结果

结果见图 1~3。

3 结果与讨论

3.1 结果

薄层鉴别结果表明, 石斛酚和 Tristin 在常见药用石斛中均能检出, 如细叶石斛、长苏石斛、黄花石斛、束花石斛、兜唇石斛、球花石斛、翅梗石斛、景洪石斛、叠鞘石斛、短棒石斛和报春石斛; 而在石斛属其它植物如密花石斛、肿节石斛、晶帽石斛、大苞鞘石斛和钩状石斛等非药用石斛中不含或只含石斛酚; 在流苏金石斛和石豆兰等近似属伪品石斛中不含石斛酚和 Tristin。杓唇石斛素在部分常用药用石斛中含有, 如束花石斛、叠鞘石斛、兜唇石斛等, 在其余石斛中及伪品石斛中未能检出。毛兰素仅在鼓槌石斛中含有, 其它种石斛中均不含。联苕类成分在金钗石斛中的较少, 同文献中报道一致。商品药材均含有石斛酚和 Tristin, 少数药材含有石斛酚、杓唇石斛素和 Tristin 3 种成分, 伪品药材均不含上述四种成分。进一步用所建的方法对 5 个不同产地鼓槌石斛的薄层色谱行为进行考察, 发现均含有毛兰素和杓唇石斛素, 但是毛兰素的含量较高, 斑点清晰, 而石斛酚和 Tristin 则表现出不同含量差异, 有的能检测到, 有的几乎观察不到 (见图 4)。

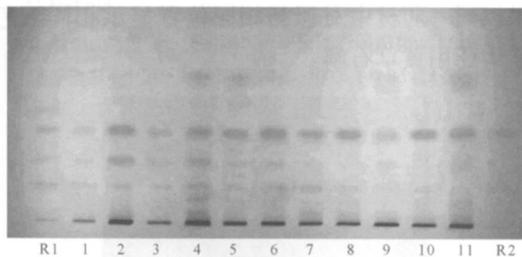


图1 不同基源黄草类石斛 TLC 色谱图 (I)

R1. 对照品; 自上而下: 毛兰素、石斛酚、杓唇石斛素和 Tristin; R2. 上为石斛酚, 下为 Tristin; 1. 细叶石斛; 2. 长苏石斛; 3. 黄花石斛; 4. 束花石斛; 5. 兜唇石斛; 6. 球花石斛; 7. 翅梗石斛; 8. 景洪石斛; 9. 叠鞘石斛; 10. 短棒石斛; 11. 报春石斛

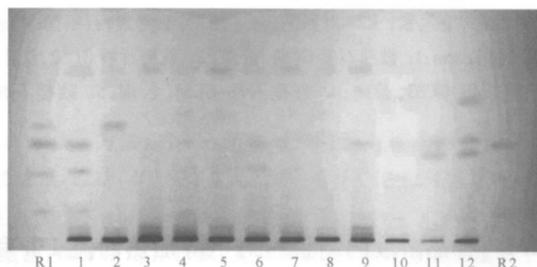


图2 不同基源黄草类石斛及伪品石斛 TLC 图 (II)

R1. 对照品; 自上而下: 毛兰素、石斛酚、杓唇石斛素和 Tristin; R2. 上为石斛酚, 下为 Tristin; 1. 束花石斛; 2. 鼓槌石斛; 3. 金钗石斛; 4. 密花石斛; 5. 肿节石斛; 6. 矮石斛; 7. 晶帽石斛; 8. 大苞鞘石斛; 9. 钩状石斛; 10. 流苏金石斛; 11. 石豆兰; 12. 伪品石斛

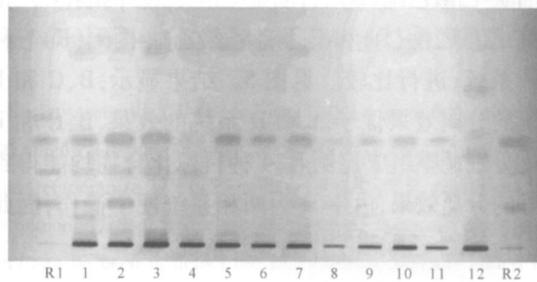


图3 不同来源商品石斛薄层色谱图

R1. 对照品; 自上而下: 毛兰素、石斛酚、杓唇石斛素和 Tristin; R2. 上为石斛酚, 下为 Tristin; 1. 束花石斛; 2. 商品石斛 P5, 四川; 3. 商品石斛 P13, 贵州; 4. 商品石斛 P12, 丽江; 5. 商品石斛 P19, 泰国; 6. 商品石斛 P02, 四川; 7. 商品石斛 P10, 未知; 8. 商品石斛 P11, 未知; 9. 商品石斛 P14, 四川; 10. 商品石斛 P15, 云南; 11. 商品石斛 P16, 云南; 12. 伪品石斛 P03, 四川

综上所述, 建议将黄草类石斛分为金钗石斛、鼓槌石斛和其他黄草石斛分别进行定性鉴别。其中, 金钗石斛可针对其专属的生物碱石斛碱建立相应的薄层色谱法; 鼓槌石斛以毛兰素为指标成分建立薄层鉴别方法; 其它黄草石斛可选择石斛酚和 Tristin 作为薄层鉴别指标建立其他黄草石斛的薄层鉴别方法。

结果以同一药材中对照品相同位置显示相同颜色,判断为药用黄草石斛。

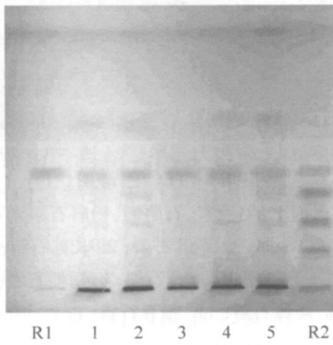


图 4 鼓槌石斛薄层色谱图

R1 对照品, 毛兰素; R2 对照品, 自上而下: 毛兰素、石斛酚、杓唇石斛素和 *Tristin*; 1 鼓槌石斛 GCS1 云南; 2 鼓槌石斛 GCS2 江苏; 3 鼓槌石斛 GCS3 云南; 4 鼓槌石斛 GCS4 云南; 5 鼓槌石斛 GCS5 南京

312 讨论

31211 样品溶液的制备 对甲醇加热回流 1 h 和甲醇超声 0.5 h 的薄层色谱效果进行比较后确提取方法为超声处理, 再分别对甲醇、乙酸乙酯和二氯甲烷 3 种不同溶剂提取进行考察, 确定提取溶剂, 最后选择甲醇超声处理 45 min。

31212 展开剂的选择 分别考察石油醚: 丙酮 (A)、石油醚: 乙酸乙酯 (B)、石油醚: 乙酸乙酯: 丙酮 (C)、正己烷: 乙酸乙酯 (D) 和正己烷: 乙酸乙酯: 丙酮 (E) 五种展开系统, 进行比较。见图 5。结果显示, B、C 和 E 系统的分离效果优于 A 和 D 系统的效果, B、C 和 E 系统分别调整组成比例后, 4 种目标化合物均能得到较好的分离效果, 由于 B 为两相系统便于操作, 因此选用石油醚: 乙酸乙酯作为展开系统。

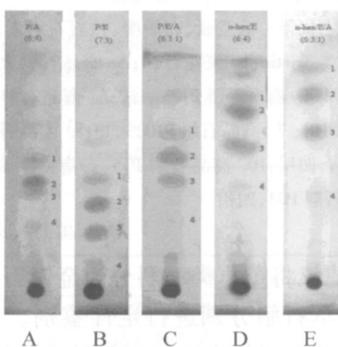


图 5 展开剂的选择

A1 石油醚: 丙酮 (6B4); B1 石油醚: 乙酸乙酯 (7B3); C1 石油醚: 乙酸乙酯: 丙酮 (6B3B1); D1 正己烷: 乙酸乙酯 (6B4); E1 正己烷: 乙酸乙酯: 丙酮 (6B3B1); 1 毛兰素; 2 石斛酚; 3 杓唇石斛素; 4 *Tristin*。

31213 显色剂的选择 分别考察 1% 香草醛硫酸试液和 10% 硫酸乙醇试液两种显色剂在 254 nm 下和日光下检视。结果显示, 10% 硫酸乙醇显色后白光下斑点明显易于观察。

31214 薄层板选择 在选定的条件下, 分别运用于国产高效硅胶 G 预制板、国产普通硅胶 G 预制板、进口高效硅胶 G 预制板、进口普通硅胶 G 预制板和自制板, 表明在高效硅胶板中的分离效果优于普通硅胶板, 其中进口高效板斑点清晰, 条带无扩散, 分离效果最好; 在伪品药材定性鉴别中常含强的干扰, 建议使用进口高效硅胶 G 板, 选择合适的点样量张开能达到满意效果。手铺板分离效果差, 斑点不清晰, 无法进行定性鉴别。建议选择高效硅胶 G 板进行薄层定性鉴别。

31215 影响因素考察 用不同浓度的硫酸水溶液来控制薄层板的相对湿度, 观察展开剂在 5 种不同湿度下的展开情况。结果显示湿度范围在 32% ~ 72% 时, 均能获得较好的分离效果; 湿度越大, 展开 R_F 有增大的趋势。湿度为 88% 时, 影响展开效果, 因此控制薄层板湿度在 32% ~ 72% 为佳, 见图 6。另外分别在室温 (20 °C) 及 4 °C 环境下考察温度对展开条件的影响, 结果表明温度影响较小。

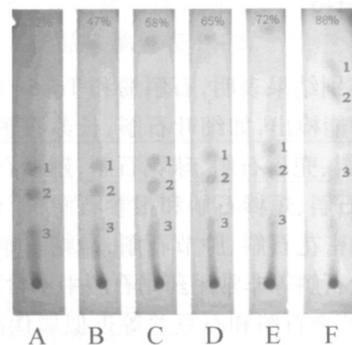


图 6 相对湿度的影响

A1 相对湿度 32%; B1 相对湿度 4%; C1 相对湿度 58%; D1 相对湿度 6%; E1 相对湿度 72%; F1 相对湿度 88%; 1 石斛酚; 2 杓唇石斛素; 3 *Tristin*。

本实验基于课题组大量的研究基础上, 首次利用四种联苜类成分对石斛属植物和常见伪品进行薄层色谱的研究和分析, 所建立的薄层色谱定性鉴别方法准确、可靠、适用性强, 可以此对石斛药材进行科学的质量控制。

参考文献

[1] 中国药典 1 一部 [S] 2005 621
[2] Yang L, Wang Z T, Xu L S. Simultaneous determination of phe

- nols (benzyl phenanthrene and fluorenone) in Dendrobium species by high performance liquid chromatography with diode array detection [J] J Chromatogr A, 2006, 11(4): 23022371
- [3] 马国祥, 徐国钧, 徐珞珊, 等 1 鼓槌石斛及其化学成分的抗肿瘤活性作用 [J] 1 中国药科大学学报, 1994, 25(3): 18821891
- [4] Chen C C, Wu L G, Ko F N, et al Antiplatelet aggregation principles of Dendrobium loddigesii [J] 1 J Nat Prod, 1994, 57(9): 1271212741
- [5] 王昌华, 范俊安, 任凌燕, 等 1 金钗石斛组培品与野生品的薄层鉴别研究 [J] 1 时珍国医国药, 2003, 14(8): 242271
- [6] 杨莉, 叠鞘石斛中联苯类成分的定性定量分析 [J] 1 中国药学杂志, 2007, 42(21): 1620216231
- [7] 樊宝和, 曹谷珍 1 石斛及其伪品石仙桃的鉴别 [J] 1 时珍国医国药, 2002, 13(4): 2241

液质联用分析鉴定罗格列酮的检测方法研究

矫筱蔓, 董宇, 王晓黎, 战祥友 (辽宁省食品药品检验所, 沈阳 110023)

摘要 目的: 建立降糖类中成药中非法添加化学药品罗格列酮的检测方法。方法: 用十八烷基键合硅胶为填充剂色谱柱(柱头加装相同规格填料的预柱); 以 20 mmol/L 醋酸铵 0.1% 冰醋酸溶液-乙腈 (40B60) 为流动相; 质谱仪装配电喷雾电离源 (ESI), 源电压 5 KV, 毛细管温度 275℃, 毛细管电压 15 V, 鞘气流速 11.05 L/min, 辅助气流速 0.115 L/min, 正离子检测, 采取一级全扫描及二级全扫描方式, 质量范围 100~1000。结果与结论: 该方法选择性强, 灵敏度高, 可以作为分析检测中成药中非法添加罗格列酮的检测方法。

关键词: 液质联用; 罗格列酮; 中药降糖制剂

中图分类号: 92112 **文献标识码:** A **文章编号:** 1009-3656(2010)-2-103-4

Study on the method for Determination of Rosiglitazone by HPLC/MS

Jiao Xiaoman, Dong Yu, Zhan Xiangyou, Wang Xiaoli (Liaoning Institute for food and Drug Control, Shenyang 110023)

Abstract Objective In order to establish a method for the detection of Rosiglitazone illegally added into Chinese medicine. Method C₁₈ Column (with the precolumn added the same filler); Mobile phase 20 mmol/L ammonium acetate 0.1% glacial acetic acid solution-acetonitrile (40B60); HPLC/MS (ESI), source voltage 5 KV, capillary temperature 275 (C, capillary voltage 15 V, sheath gas flow rate 11.05 L/min, auxiliary gas flow rate 0.115 L/min, positive ion detection, adopt first class and second class scan mode, mass range 100~1000. Conclusion The method is selective and sensitive and can be used to detect the Rosiglitazone illegally added into Chinese medicine.

Key Words HPLC/MS; Rosiglitazone; TCM Antidiabetics

随着制剂工艺的不断发展和中药研制水平的提高, 现代中药具有临床应用广, 毒副作用小等特点而备受广大患者的青睐。但近年来, 一些不法生产家和中小医院为追求疗效和经济利益而在中药制剂和中药保健品中非法添加化学药品, 如在补肾壮阳药中加入西地那非, 在降血糖药中加入苯乙双胍、格列本脲等^[1], 若患者在不知情的情况下长期、大量服用这些所谓的

“纯中药制剂”, 极易引发危险, 严重危害到广大人民群众的生命安全。罗格列酮为噻唑烷二酮类 δ 型糖尿病治疗药, 通过提高靶组织对胰岛素的敏感性而有效地控制血糖^[2]。长期服用罗格列酮可增高心血管疾病的风险^[3]。本文参考《中国药典 2010 年版二部附录 X 质谱法》^[4] 的有关要求, 拟建立专属性检测方法, 可快速、准确地对中药降糖药中非法掺入的罗格列酮进行定性分析。罗格

作者简介: 矫筱蔓, 女, 主管药师。学科及研究方向: 生化药品、化学药品检验。联系电话: 13190077365。