

加样回收率供试液,按上述色谱条件测定,结果平均回收率为97.4%,RSD为1.7%。

2.11 样品的测定:取同一产地大麦及其麦芽和麦芽的不同炮制品(炒麦芽、焦麦芽)各5g,制备供试品溶液,按上述色谱条件测定麦黄酮,测定结果见表1。

表1 大麦、生麦芽、炒麦芽、焦麦芽中

麦黄酮的测定结果 ($n=3$)

Table 1 Determination of tricin in barley, raw malt, torrefied malt, and ustulated malt ($n=3$)

样品	麦黄酮/(mg·g ⁻¹)	样品	麦黄酮/(mg·g ⁻¹)
大麦	0.003 1	炒麦芽	0.006 7
生麦芽	0.005 6	焦麦芽	0.009 0

3 讨论

实验前曾对麦芽的提取方式、提取溶剂及其用量和提取时间进行过考察,结果表明用10倍量的甲醇回流提取3h为佳。

大麦芽制成生麦芽后麦黄酮的质量分数上升至原来的1.8倍左右;但是生麦芽经炮制后,麦黄酮显著上升,炒麦芽中麦黄酮质量分数为生麦芽的1.2倍,焦麦芽中麦黄酮质量分数是生麦芽的1.6倍左右。研究结果对从化学成分角度解释大麦、生麦芽、炒麦芽和焦麦芽生物活性的差异提供了科学依据。

Reference:

- [1] Watanabe M. Antioxidative phenolic compounds from Japanese barnyard millet (*Echinochloa utilis*) grains [J]. *J Agric Food Chem*, 1999, 47: 4500-4505.

骨碎补超微饮片的 HPLC 指纹图谱研究

李顺祥^{1,2,3,4}, 张志光^{3,4}, 龙 勉⁵, 蔡光先^{1,2}

- (1. 湖南省中医药研究院, 湖南 长沙 410006; 2. 湖南中医学院, 湖南 长沙 410007; 3. 湖南师范大学, 湖南 长沙 410081; 4. 湖南农业大学, 湖南 长沙 410128; 5. State University of New York, Stonybrook NY 11794, USA)

摘要:目的 研究骨碎补超微饮片的 HPLC 指纹图谱,考察其有效成分,为骨碎补超微饮片的质控提供可靠方法。方法 色谱柱为大连依利特公司 Hypersil BDS C₁₈ (200 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相为甲醇-0.1%磷酸水溶液梯度洗脱;柱温为 25℃;体积流量为 1.0 mL/min;检测波长为 283 nm。结果 初步建立了骨碎补超微饮片的 HPLC 指纹图谱,标定了 8 个共有峰。结论 利用 HPLC 指纹图谱可以比较全面的控制骨碎补超微饮片的内在质量。

关键词:骨碎补超微饮片;指纹图谱;高效液相色谱

中图分类号:R282.7; R286.02

文献标识码:B

文章编号:0253-2670(2005)11-1634-04

HPLC fingerprint of *Ultramicro Rhizoma Drynariae*

LI Shun-xiang^{1,2,3,4}, ZHANG Zhi-guang^{3,4}, LONG Mian⁵, CAI Guang-xian^{1,2}

- (1. Hunan Academy of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410006, China; 2. Hunan College of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410007, China; 3. Hunan Normal University, Changsha 410081, China; 4. Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China; 5. State University of New York, Stonybrook NY 11794, USA)

Abstract: Objective To study *Ultramicro Rhizoma Drynariae* (herbal pieces prepared for decoction) and determine its constituents and content by HPLC fingerprint. **Methods** Chromatographic column: Hypersil BDS C₁₈ (200 mm×4.6 mm, 5 μm); mobile phase: methanol-0.1% phosphoric acid in water in a gradient elution; column temperature: 25℃; flow rate: 1.0 mL/min; wavelength: 283 nm. **Results** The fingerprint of *Ultramicro Rhizoma Drynariae* was established and eight common peaks were displayed in the fingerprint. **Conclusion** The methods and data can be used to control the quality of *Ultramicro Rhizoma Drynariae*.

Key words: *Ultramicro Rhizoma Drynariae* (herbal pieces prepared for decoction); fingerprint; HPLC

骨碎补为水龙骨科植物槲蕨 *Drynaria fortunei* (Kunze) J. Sm 的干燥根茎,具有补肾强骨、续伤止

痛的作用^[1]。但市售骨碎补药材有 12 种之多^[2]。本实验对相同植物来源的 10 批不同地区的商品骨碎

收稿日期:2005-03-24

基金项目:国家“十五”科技攻关项目(2001BA701A43);湖南省卫生厅中医药科研基金课题(24303);湖南省教育厅科研课题(04C452)

作者简介:李顺祥(1964—),男,湖南省衡山县人,研究员,博士,湖南省中医药研究院中药研究所副所长,湖南省中药新药研究与开发重点实验室主任,从事天然资源研究、中药新药研究。Tel/Fax: (0731) 8807173 E-mail: lishunxiang@hotmail.com

补药材制成微米级细胞破壁的超微饮片进行测定,并进行方法学考察,初步建立了指纹图谱,为骨碎补标定了8个共有指纹峰,其中柚皮苷为对照品。并且比较了8个植物来源种的骨碎补药材指纹差别。

1 仪器与试剂

岛津 LC—10A 高效液相色谱仪(配有 LC—10Avp 输液泵,SPD—10Avp 紫外检测器,柱温箱)。柚皮苷对照品(批号:722-200005,供测定用,中国药品生物制品检定所),甲醇为色谱纯,水为双蒸水,其余试剂为分析纯。10批商品骨碎补药材购自湖南、四川、重庆、广东、广西、江西、福建、陕西等地,经湖南省中医药研究院中药研究所生药室谢昭明研究员鉴定,分别加工成超微饮片。

2 方法与结果

2.1 供试品溶液的制备:分别精密称取骨碎补超微饮片粉末约 1.0 g (共 10 批),精密称定,于圆底烧瓶中,加甲醇 40 mL,加热回流 3 h,滤过,滤液转移至 50 mL 量瓶中,用甲醇洗涤药渣及容器,洗液滤入同一量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,0.45 μm 微孔滤膜滤过,即得。

2.2 对照品溶液的制备:分别精密称取在 110 ℃干燥至恒重的柚皮苷对照品约 5 mg,置 50 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,即得。

2.3 色谱条件:色谱柱为大连依利特公司 Hypersil BDS C₁₈ 柱(200 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相为甲醇(A)-0.1%磷酸水(B),二元梯度洗脱,洗脱程序:A: 0 min 0%, 5 min 5%, 30 min 30%, 45 min 50%, 55 min 60%, 70 min 50%;柱温为 25 ℃;体积流量为 1.0 mL/min;检测波长为 283 nm。该条件下骨碎补的各色谱峰均获得较好的分离,见图 1。

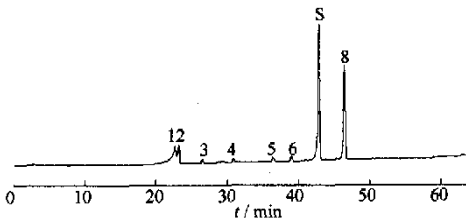


图1 骨碎补超微饮片的 HPLC 指纹图谱

Fig.1 HPLC fingerprint of Ultramicro Rhizoma Drynariae

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度试验:取同一份骨碎补超微饮片的供试品溶液连续进样 5 次,比较共有指纹峰的相对保留时间和相对峰面积,结果表明各共有指纹峰的相对保留时间和相对峰面积基本一致, RSD<2%,符

合指纹图谱的检测要求^[3]。

2.4.2 稳定性试验:取同一份骨碎补超微饮片供试品溶液,分别在制备后 1、2、4、8、12、24 h 进样,比较各共有指纹峰的相对保留时间和相对峰面积,结果表明各共有指纹峰的相对保留时间和相对峰面积基本一致, RSD<2%,表明样品溶液在 24 h 内稳定,符合指纹图谱的检测要求^[3]。

2.4.3 重现性试验:取同一批骨碎补超微饮片样品 5 份,制备供试品溶液,比较各共有指纹峰的相对保留时间和相对峰面积,结果表明各共有指纹峰的相对保留时间和相对峰面积基本一致, RSD<2%,符合指纹图谱的检测要求^[3]。

2.5 指纹图谱的建立

2.5.1 共有指纹峰的标定:采用相对保留时间标定共有指纹峰,以柚皮苷为参照物(S),将各色谱峰保留时间与同一图谱中参照物的保留时间比较,其比值为各色谱峰的相对保留时间。分别计算 10 批骨碎补样品的指纹图谱中各色谱峰的相对保留时间和峰面积,其中 8 个色谱峰为榧藤共有(表 1),因此,标定它们为共有指纹峰。其共有指纹峰的相对保留时间为:峰 1 (0.527 6)、峰 2 (0.540 3)、峰 3 (0.619 3)、峰 4 (0.745 0)、峰 5 (0.850 1)、峰 6 (0.910 1)、峰 7 (1.000 0)、峰 8 (1.084 2)。

表 1 10 批骨碎补超微饮片的相对保留时间
Table 1 Relative retent time of ten batches of Ultramicro Rhizoma Drynariae

批号	相对保留时间							
	1	2	3	4	5	6	S	8
1	0.527 8	0.540 5	0.619 6	0.719 6	0.853 7	0.914 0	1.000 0	1.084 2
2	0.527 2	0.540 8	0.618 8	0.720 0	0.841 4	0.913 8	1.000 0	1.084 5
3	0.526 7	0.540 1	0.619 4	0.720 7	0.841 7	0.914 1	1.000 0	1.084 6
4	0.526 5	0.540 2	0.620 0	0.718 7	0.854 4	0.906 3	1.000 0	1.083 8
5	0.526 8	0.539 7	0.618 8	0.720 0	0.841 4	0.913 8	1.000 0	1.084 5
6	0.527 8	0.540 6	0.619 4	0.719 9	0.853 7	0.906 5	1.000 0	1.084 4
7	0.528 7	0.540 8	0.619 5	0.720 8	0.853 0	0.913 9	1.000 0	1.084 3
8	0.528 4	0.539 8	0.619 5	0.719 1	0.853 8	0.905 8	1.000 0	1.083 8
9	0.527 3	0.540 8	0.618 7	0.718 9	0.853 6	0.906 1	1.000 0	1.083 6
10	0.528 3	0.539 4	0.619 4	0.718 9	0.854 1	0.906 5	1.000 0	1.084 7
平均值	0.527 6	0.540 3	0.619 3	0.745 0	0.850 1	0.910 1	1.000 0	1.084 2

2.5.2 共有指纹峰的相对峰面积:以图谱中柚皮苷为参照物,将各共有指纹峰峰面积与同一图谱中参照物的峰面积比较,其比值为各共有指纹峰的相对峰面积。根据《中药注射剂指纹图谱研究的技术要求》的规定^[3],单峰峰面积占总峰面积<10%时,峰面积比值不作要求,仅需标定相对保留时间。把所有的峰面积全部标定,见表 2。

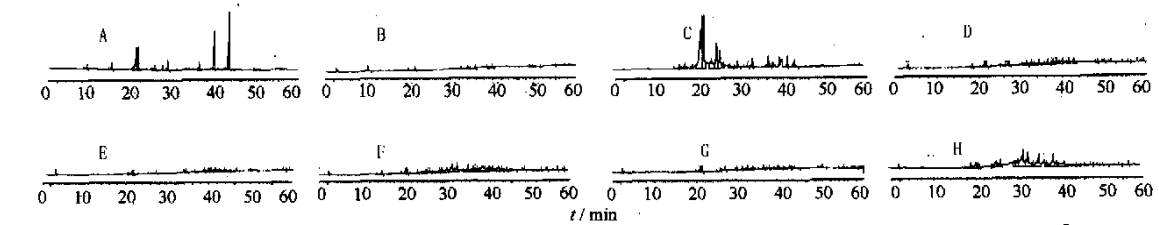
2.6 骨碎补超微饮片中柚皮苷的测定^[1]:精密量取

表 2 10 批骨碎补超微饮片共有指纹峰的相对峰面积
Table 2 Relative common peak area of ten batches of *Ultramicro Rhizoma Drynariae*

批号	相对峰面积							
	1	2	3	4	5	6	S	8
1	0.274 7	0.215 2	0.020 4	0.039 0	0.015 2	0.0180	1.000 0	1.053 2
2	0.277 6	0.214 1	0.021 0	0.039 9	0.016 1	0.018 5	1.000 0	1.068 1
3	0.267 8	0.210 2	0.021 2	0.040 3	0.015 3	0.018 9	1.000 0	0.051 0
4	0.276 3	0.213 8	0.021 2	0.039 7	0.016 2	0.018 7	1.000 0	1.065 9
5	0.265 3	0.210 3	0.020 9	0.039 6	0.015 4	0.018 4	1.000 0	1.077 8
6	0.267 2	0.210 2	0.020 2	0.040 2	0.015 8	0.018 9	1.000 0	1.067 0
7	0.268 4	0.210 7	0.020 9	0.039 6	0.015 4	0.019 0	1.000 0	1.076 8
8	0.277 2	0.214 5	0.020 6	0.039 4	0.015 9	0.018 2	1.000 0	1.065 7
9	0.276 1	0.211 4	0.020 4	0.039 0	0.015 2	0.018 4	1.000 0	1.061 0
10	0.268 4	0.203 9	0.020 1	0.040 6	0.015 1	0.018 6	1.000 0	1.056 3
平均值	0.271 9	0.211 4	0.020 7	0.039 7	0.015 6	0.018 6	1.000 0	1.064 1

配制好的柚皮苷对照品溶液,2.5、5、10、15、20 μL 进样,测定峰面积。以柚皮苷进样量为横坐标,峰面积响应值为纵坐标,绘标准曲线,得回归方程: $Y=790.96 X+13\ 232.04$, $r=0.999\ 5$ 。结果表明柚皮苷在 0.250~2.000 μg 与峰面积呈良好的线性关系。精密吸取对照品溶液 10 μL ,供试品溶液 10 μL ,分别注入高效液相色谱仪,测定峰面积,计算,即得。10 批不同来源骨碎补超微饮片中的柚皮苷测定结果见表 3。

2.7 相似度计算:采用中南大学“计算机辅助相似性评价系统”进行相似度计算。



A-榧蕨(永州) B-中华榧蕨(陕西) C-石莲姜榧蕨(重庆) D-川滇榧蕨(云南) E-栎中榧蕨(海南)
F-团叶榧蕨(广西贺州) G-崖姜蕨(广东肇庆) H-大叶骨碎补(广西)

A-*D. fortunei* (Yongzhou city) B-*D. baronii* (Shaanxi) C-*D. propinqua* (Chongqing city) D-*D. delavayi* (Yunnan)
E-*D. quercifolia* (Hainan) F-*D. bonii* (Hezhou city) G-*Pseudodrynaria coronans* (Zhaoqing city) H-*Davallia formosana* (Guangxi)

图 2 不同植物来源的骨碎补指纹图谱

Fig. 2 Fingerprints of Gusuibu from different origins

3 讨论

3.1 超微饮片是我院研制的一种微米级新型中药饮片,因其原药材的形状、显微特征已不存在,采用指纹图谱技术来控制其质量具有较强的专属性。

3.2 本实验所用的对照品为柚皮苷,参照《中国药典》中骨碎补的测定方法制备供试品溶液,参照文献报道^[4,5],选择乙腈-水(2:98~26:74)二元梯度洗

有关参数设置如下:预处理;数据压缩,5 000×11,压缩层数 2;数据平滑,使用移动窗口多项式最小二乘拟合平滑;数据平移,三标准峰平移;谱峰处理;谱峰识别,所有指纹图谱同一阈值 0.02;自动谱峰匹配。相似度计算结果见表 4。

2.8 不同植物来源的骨碎补的指纹图谱:见图 2。

表 3 10 批不同来源骨碎补中柚皮苷测定结果
Table 3 Naringin in ten batches of *Ultramicro Rhizoma Drynariae* from different origins

批号	产地	柚皮苷/%	批号	产地	柚皮苷/%
1	湖南永州	0.60	6	广东	0.76
2	湖南双牌县	0.77	7	江西	0.59
3	湖南怀化	0.62	8	广西防城	0.59
4	宁远	0.13	9	福建	0.51
5	郴州永兴	0.61	10	重庆南川	0.38

表 4 骨碎补相似度计算(全谱)结果
Table 4 Similarity count of ten batches of *Ultramicro Rhizoma Drynariae*

批号	相关系数		相合系数	
	中位数	均值	中位数	均值
1	0.970 4	0.980 9	0.972 4	0.979 4
2	0.983 1	0.994 3	0.986 0	0.994 9
3	0.969 9	0.980 7	0.971 9	0.979 1
4	0.990 7	0.963 8	0.991 0	0.968 7
5	0.977 4	0.961 4	0.979 8	0.966 3
6	0.986 4	0.962 3	0.988 6	0.968 4
7	0.963 4	0.990 7	0.969 0	0.992 1
8	0.988 0	0.994 7	0.987 2	0.993 6
9	0.920 6	0.964 2	0.930 1	0.968 3
10	0.938 1	0.976 9	0.940 1	0.974 8

脱的分离效果比较好,保留时间也适合。供试品溶液紫外扫描显示在 230、270、283 nm 有较强的吸收,平行试验结果得出采用参照柚皮苷的最大吸收波长之一 283 nm 为检测波长时,各峰的吸收较均衡,故被选用。

3.3 对 10 批不同商品的骨碎补超微饮片进行了柚皮苷的测定,结果表明骨碎补超微饮片因原料品种

与产地的不同,其有效成分也有较大的差异。

3.4 同名异物(种)的指纹图谱研究主要考察市场品种的有效性,资源的可替代性,以及为药材的真伪鉴别、化学分类学做些铺垫。对槲蕨科槲蕨属的槲蕨、中华槲蕨、石莲姜槲蕨、川滇槲蕨、栎叶槲蕨、团叶槲蕨、崖姜蕨属崖姜、骨碎补科骨碎补属的大叶骨碎补8个药材骨碎补来源品种的测定显示8个种的成分有相同性;从成分种类及含量也存在较大差异,槲蕨中成分全面,活性成分含量,从分子水平证明《中国药典》收录的品种是正确的。

3.5 相似度计算结果表明,4组相似度的参数均在0.9以上,说明建立的指纹图谱相似度较好^[3]。

References:

- [1] Ch P (中国药典) [S]. Vol 1. 2000.
- [2] Li S X, Long M, Zhang Z G. Research progress of Gusuibu (*Rhizoma Drynariae*) [J]. *Chin J Inf Tradit Chin Med* (中国中医药信息杂志), 2002, 9 (11): 75-78.
- [3] State Drug Administration. Technic request of fingerprint research of Chinese traditional medicine injection (Temporary) [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2000, 31 (10): 671-675.
- [4] Li S X. Study on the kidney tonic components of Gu-sui-bu (*Drynaria fortunei* J. Sm) [A]. *Dissertation of Doctor Degree of Hunan Agricultural University* (湖南农业大学博士学位论文) [D]. Changsha: Hunan Agricultural University, 2003.
- [5] Li S X, Zhang Z G, Long M. Determination of naringin in Gusuibu (*Rhizoma Drynariae*) from different places [J]. *Cent South Pharm* (中南药学), 2003, 1 (2): 103-104.

柱前衍生化 RP-HPLC 法分析龟板中氨基酸

李惠芬, 骆 达, 张庆伟, 朱丽丽, 李 黎

(天津医科大学药学院 中药分析国家重点实验室, 天津 300070)

摘 要:目的 采用柱前衍生化 RP-HPLC 法对龟板中 13 种氨基酸进行分析。方法 用 6 mol/L HCl 水解提取龟板中总氨基酸,以异硫氰酸苯酯(PITC)为柱前衍生化试剂,采用外标法,梯度洗脱的方式分析。结果 13 种氨基酸在 40 min 内均可得到很好的分离,回收率(除甘氨酸外)为 91.68%~106.26%,RSD 为 0.718%~4.386%。结论 所建立的方法分离效果好、灵敏、准确、简便,且采用普通的 C₁₈ 色谱柱,可广泛用于含有多种氨基酸样品的分析。

关键词: 龟板; 氨基酸; 异硫氰酸苯酯衍生; 高效液相色谱

中图分类号: R286.02

文献标识码: B

文章编号: 0253-2670(2005)11-1637-03

Determination of amino acid in *Chinemys reevesii* by pre-column derivatization RP-HPLC

LI Hui-fen, LUO Da, ZHANG Qing-wei, ZHU Li-li, LI Jun

(State Key Laboratory of Chinese Materia Medica Analysis, College of Pharmacy, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China)

Abstract: **Objective** To determine the content of 13 amino acids in *Chinemys reevesii* by pre-column derivatization RP-HPLC. **Methods** To extract total amino acids by the method of hydrolysis in 6 mol/L HCl and use phenylisothiocyanate (PITC) as the derivating agent with external standard method to analyze them by gradient elution. **Results** Thirteen kinds of amino acids can be separated well in 40 min, the average recoveries were 91.68%—106.26%, and RSD 0.718%—4.386%. **Conclusion** The method is sensitive, accurate, simple, and reliable for the determination of amino acids in many other samples even by common C₁₈ column.

Key words: *Chinemys reevesii* (Gray); amino acid; PITC derivatization; HPLC

龟板是乌龟 *Chinemys reevesii* (Gray) 的干燥腹甲,味甘咸,性微寒,归肝、肾、心经,具有滋阴潜阳、益肾强骨、养血、补心等功能。龟板中含有丰富的氨基酸。以往分析氨基酸多采用氨基酸分析仪,价格昂

贵,用途单一。本法采用 RP-HPLC 梯度洗脱及 PITC、TAG 柱前衍生技术^[1,2],使用普通 C₁₈ 分析柱,采用外标法,对龟板中 13 种氨基酸成分进行了分析,取得了满意的结果。

收稿日期: 2005-03-25

基金项目: 天津市科委技术发展计划重点项目(023617011)

作者简介: 李惠芬(1946—),女,教授,研究方向为中药分析,现为天津医科大学药学院仪器分析中心主任,国家中医药管理局中药分析重点实验室主任。Tel: (022)23529243 E-mail: lihuifen@tjmu.edu.cn