

峰以及可以确定归属的3个色谱峰进行了比较研究。从湖北恩施产何首乌采用黑豆汁蒸制不同时间各饮片的HPLC图谱分析可以看出,随炮制时间的延长,3种单体成分中大黄素、大黄素甲醚峰面积逐渐升高,二苯乙烯苷峰面积逐渐降低,而炮制后保留时间4.5~6.5 min出现了一组新的色谱峰。并且随炮制时间由12、24 h延长32 h,这组谱峰峰面积占总峰面积的百分数逐渐增加,至48 h不再增加。

从广东德庆产何首乌采用黑豆汁蒸32 h、清蒸32 h和黑豆汁高压蒸12 h前后各饮片的HPLC图谱分析可知,炮制后保留时间介于4.5~6.5 min也有新的色谱峰产生。同时,大黄素、大黄素甲醚峰面积占总峰面积的百分数升高,二苯乙烯苷降低。各种炮制方法都显示类似的变化。提示与辅料黑豆汁无关。

曾试用甲醇-0.1%磷酸为流动相进行梯度洗脱,但样品分析时基线不平,影响相对峰面积的准确计算,且与甲醇-水系统比较,分离无明显改善。因此

选择甲醇-水梯度洗脱。在供试品溶液的制备中,曾比较了醋酸乙酯、70%乙醇、甲醇回流提取,或甲醇超声提取。结果显示以甲醇回流提取图谱重现性较好,提供的色谱峰数量多,相应色谱峰峰面积大。因此,采用甲醇回流提取制备供试品溶液。采用DAD检测器确定检测波长为280 nm。

试验结果显示,两个产地的何首乌经炮制后既有已知成分量的变化,更存在内在成分质的改变。而炮制后新产生组分的化学结构及其与功效改变的关系,值得进一步研究。

References:

- [1] Ch P (中国药典) [S]. Vol 1. 2000.
- [2] Kimura Y. Effect of stilbene components of roots of *Polygonum* ssp. On liver injury in peroxidized oil-fed rats [J]. *Planta Med*, 1983, 49 (1): 51-53.
- [3] Qi A D. Studies on extraction technology of 2,3,5,4'-stilbene glucoside and the effect of progress on its content from *P. multiflorum* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2002, 33 (7): 609-610.
- [4] Tianjin Bureau of Health. *Cut Regulations of Chinese Materia Medica* (中药饮片切制规范) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1975.

枳壳生饮片的HPLC指纹图谱研究

王少军¹, 曹 君², 杨武亮², 龚千锋², 王跃生¹, 杨世林¹

(1. 中药固体制剂制造技术国家工程研究中心, 江西 南昌 330077; 2. 江西中医学院, 江西 南昌 330006)

枳壳为芸香科植物酸橙 *Citrus aurantium* L. 及其栽培变种的干燥未成熟果实, 具有理气宽中、行滞消胀功效。枳壳生饮片作用较强, 偏于行气宽中除胀。目前我国市场上主流枳壳商品为江枳壳, 湘枳壳, 川枳壳, 分别产于江西、湖南、四川。枳壳来源复杂, 质量参差不齐, 加之市场上不断出现伪劣枳壳药材, 有必要对枳壳饮片建立较全面的质量控制手段。本实验对10批主流枳壳生饮片进行高效液相色谱分析, 建立了枳壳生饮片的特征峰, 为枳壳饮片的鉴别及质量进一步评价提供了一定的科学依据。

1 仪器与试药

Agilent 1100 高效液相色谱仪, Agilent 1100 柱温箱, DAD 检测器, Agilent 1100 色谱工作站, Mettler AE 240 电子天平, KQ318T 型超声波清洗器。HPLC 级甲醇购于 Merck 公司, 甲醇、磷酸、醋酸乙酯为分析纯, 水为重蒸水。新橙皮苷对照品(自制,

面积归一化测得质量分数为99.34%), 柚皮苷对照品(批号0722-200108)、橙皮苷对照品(批号0721-200010)均购自中国药品生物制品检定所。枳壳原药材分别购于江西新干、江西樟树、湖南连桥、四川荷花池药材市场, 经江西中医学院中药鉴定教研室刘庆华鉴定为枳壳。枳壳生饮片为本课题组自制, 见表1。

表1 枳壳生饮片名称及产地

Table 1 Names and habitats of *Fructus Aurantii* raw drugs

编号	样品名	产地
1	湖南生饮片-1	湖南沅江
2	湖南生饮片-2	湖南沅江
3	四川生饮片-1	四川江津
4	四川生饮片-2	四川江津
5	四川生饮片-3	四川江津
6	新干生饮片-1	江西新干
7	新干生饮片-2	江西新干
8	新干生饮片-3	江西新干
9	樟树生饮片-1	江西樟树
10	樟树生饮片-2	江西樟树

收稿日期: 2005-01-21

作者简介: 王少军(1979—), 男, 陕西渭南人, 硕士研究生, 主要从事中药质量标准及天然药物化学研究。E-mail: wangsj@jzjt.com

2 方法与结果

2.1 液相色谱分析条件:色谱柱为 Hypersil C₁₈柱 (200 mm×4.6 mm, 5 μm);检测波长为 320 nm;体积流量为 1.0 mL/min;柱温为 30 ℃;进样量为 10 μL;流动相为 A(甲醇)-B(磷酸水溶液, pH 3), 梯度洗脱 0~25 min, A-B (32:68); 25~60 min, A 由 32% 升至 58%; 60 min 以后, 100% A。

2.2 供试品溶液的制备:枳壳原药材浸润, 切薄片。取枳壳生饮片粉末(40 目)约 0.5 g, 精密称定, 置 100 mL 圆底烧瓶中, 加醋酸乙酯 50 mL 超声提取 30 min, 趁热滤过, 滤液置 100 mL 蒸发皿中, 加热挥干, 用甲醇溶解, 药液置 10 mL 容量瓶中, 加甲醇至刻度, 用 0.45 μm 滤膜滤过, 即得。

2.3 参照物溶液的制备:精密称取柚皮苷对照品适量, 用甲醇溶液稀释成 0.250 mg/mL 的溶液, 作为参照物溶液。另精密称取橙皮苷对照品适量, 用甲醇溶液稀释成 0.109 mg/mL 的溶液, 精密称取新橙皮苷对照品适量, 用甲醇溶液稀释成 0.246 mg/mL 的溶液, 作定性用。

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度试验:取江西新干生饮片-1 制备供试品溶液, 连续进样 5 次, 每次进样 10 μL, 所得各共有峰的相对峰面积的 RSD 均小于 1.0%, 各共有峰的相对保留时间的 RSD 均小于 0.5%。

2.4.2 稳定性试验:取江西新干生饮片-1 制备供试品溶液, 分别在 0、6、12、24、36、48 h 测定, 所得各共有峰的相对峰面积的 RSD 均小于 2.0%, 各共有峰的相对保留时间的 RSD 均小于 1.0%。

2.4.3 重现性试验:取江西新干生饮片-1 5 份, 制备供试品溶液, 进样 10 μL, 所得各共有峰的相对峰面积的 RSD 均小于 2.5%, 各共有峰的相对保留时间的 RSD 均小于 1.0%。

2.5 枳壳生饮片 HPLC 指纹图谱及技术参数:取 10 批枳壳生饮片制备供试品溶液, 进样, 记录样品在 60 min 的色谱图。以柚皮苷对照品为参照峰, 结果 10 批药材有 11 个特征指纹峰, 鉴定了 3 个特征指纹峰, 即 1 号为柚皮苷, 2 号为橙皮苷, 3 号为新橙皮苷。参照峰标为 S, 其他峰依次为 2、3...11。各特征指纹峰的峰面积及相对峰面积积分值、保留时间及相对保留时间均具有较好的重现性。特征指纹峰的平均相对保留时间依次为 1.000、1.064、1.147、1.510、1.977、2.470、3.185、3.293、3.497、3.712、5.265, RSD 均低于 0.5%, 符合《中药注射剂指纹图谱研究的技术要求》(暂行)中关于药材部分的要求。特征指纹峰的相对峰面积积分值及相对保留时间见表 2、表 3, 色谱图见图 1。

3 讨论

考察了超声提取法、加热回流法、索式提取法 3 种提取方法的提取效果, 结果表明超声提取法提取时间短, 各特征指纹峰的相对丰度较好, 故选用超声提取法。考察了甲醇、醋酸乙酯、氯仿提取效果, 结果发现醋酸乙酯的提取效果最好。然后考察了醋酸乙酯超声提取 15、30、45 min 的提取效果, 分析比较后发现超声提取 30 min 相对丰度为好。

用 DAD 检测器检测 220、260、280、300、320、360 nm 波长, 结果表明枳壳提取液在 320 nm 波长下吸收强度大, 相对丰度合适, 故选用 320 nm 为指纹图谱的测定波长。考察了 60、80、120 min 图谱, 结果表明, 所有的指纹峰在 60 min 内出现, 故确定时间为 60 min。根据对柱温在 20、25、30 ℃的色谱图进行比较, 发现没有明显差异, 为保持一致性选用 30 ℃。分别进样 5、10、20 μL, 由于枳壳提取液紫外吸收较强, 进样 10 μL 峰高合适, 基本可满足分析要求。考察了体积流量 0.8、1.0 mL/min, 发现体流

表 2 特征指纹峰的相对峰面积积分值

Table 2 Relative peak area integral values of characteristic fingerprint peaks

编号	特征指纹峰峰面积相对积分值										
	S	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	1.000	0.050	0.705	1.291	0.430	0.410	1.584	0.218	0.525	1.657	0.346
2	1.000	0.048	0.699	1.303	0.431	0.392	1.610	0.223	0.525	1.665	0.346
3	1.000	0.359	0.915	0.227	0.118	0.237	0.309	0.148	0.370	0.503	0.348
4	1.000	0.364	0.907	0.227	0.115	0.236	0.307	0.144	0.363	0.501	0.347
5	1.000	0.360	0.915	0.227	0.118	0.277	0.309	0.143	0.356	0.509	0.348
6	1.000	0.085	1.044	0.698	0.263	0.159	0.674	0.097	0.219	0.606	0.107
7	1.000	0.087	1.050	0.701	0.267	0.162	0.671	0.096	0.219	0.612	0.104
8	1.000	0.081	1.050	0.705	0.268	0.163	0.674	0.095	0.217	0.615	0.105
9	1.000	0.076	0.829	0.791	0.281	0.322	0.650	0.060	0.286	0.504	0.080
10	1.000	0.078	0.831	0.792	0.283	0.325	0.647	0.059	0.281	0.474	0.079

表 3 特征指纹峰的相对保留时间
Table 3 Relative retent time of characteristic fingerprint peaks

编号	特征指纹峰的相对保留时间										
	S	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	1.000	1.063	1.147	1.510	1.977	2.471	3.187	3.295	3.498	3.714	5.270
2	1.000	1.064	1.147	1.511	1.979	2.474	3.190	3.297	3.500	3.715	5.276
3	1.000	1.063	1.146	1.509	1.975	2.467	3.180	3.289	3.489	3.707	5.258
4	1.000	1.063	1.146	1.509	1.975	2.469	3.182	3.290	3.490	3.708	5.261
5	1.000	1.063	1.146	1.510	1.978	2.472	3.187	3.295	3.495	3.715	5.271
6	1.000	1.064	1.146	1.506	1.973	2.464	3.177	3.286	3.493	3.706	5.250
7	1.000	1.064	1.146	1.509	1.976	2.469	3.184	3.293	3.501	3.713	5.259
8	1.000	1.064	1.147	1.509	1.977	2.470	3.185	3.293	3.501	3.714	5.261
9	1.000	1.064	1.147	1.511	1.978	2.474	3.189	3.297	3.501	3.716	5.275
10	1.000	1.064	1.147	1.511	1.977	2.472	3.187	3.295	3.499	3.713	5.272
RSD/%	0	0.045	0.044	0.073	0.071	0.097	0.102	0.085	0.113	0.082	0.142

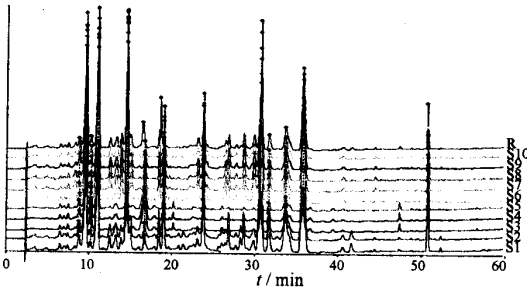


图 1 枳壳生饮片共有模式及重叠图
Fig. 1 Common mode and overlapped diagrams
of *Fructus Aurantii* raw drugs

量 1.0 mL/min 为好。本实验考察了乙腈-磷酸水、甲醇-磷酸水,甲醇-磷酸水峰形好。研究过等度洗脱的可行性,结果分离度、峰形等均不如梯度洗脱理想,因此选用梯度洗脱。甲醇-磷酸水先后用 40 多个不同梯度洗脱,结果本实验中所用的梯度最佳。

本实验建立了枳壳生饮片液相指纹图谱,系统地反映了其黄酮类成分的全貌,可作为枳壳生饮片的质量控制方法之一。对枳壳主流产地生饮片进行了 10 批分析,色谱图的整体相貌是相同的,但是不同产地枳壳药材的指纹图谱在非共有峰及特征指纹峰的相对比较大小上还是有较大差别的。如 2 号特

征峰橙皮苷相对峰面积积分值在四川枳壳 3 批生饮片中高达 0.359 以上,而江西樟树、江西新干、湖南生饮片则低于 0.087;4 号特征峰相对峰面积积分值在湖南 2 批生饮片中达到 1.291 以上,江西樟树、新干产地在 0.700 左右,而四川产地则在 0.220 左右;7 号特征峰相对峰面积积分值在湖南产地达到 1.580 以上,江西樟树、新干产地在 0.650 左右,四川产地则低于 0.310。说明枳壳产地不同,其药材指纹图谱也有较大差异。但特征指纹峰的相对保留时间一致,这样可根据相对保留时间鉴别枳壳生饮片。

用药典委员会颁布的中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004A 版 1.0 版通过对 10 批样品的数据处理,得到了相关系数,按样品编号用平均数表示依次为 0.936、0.936、0.841、0.845、0.844、0.975、0.977、0.975、0.982、0.974,用中位数表示依次为 0.904、0.904、0.827、0.832、0.830、0.957、0.961、0.957、0.993、0.991。说明选用的特征指纹峰是恰当的。据此,制定了真伪鉴别相似度值的标准,即相关系数用中位数和均值表示不得低于 0.800,特征指纹峰的相对保留时间 RSD 小于 2%。但特征指纹峰的相对峰面积积分值差异较大,建议在临床应用中根据具体适应症选用固定产地药材。

《中草药》投稿特别注意事项

1. 实验性论文需要单位介绍信(注明:论文内容真实,作者排名无争议,无一稿两投,无泄密)。
2. 创新性论文优先发表,新化合物免收版面费。
3. 图题、表题、图注、表注需中英文双语表示。
4. 文后参考文献译成英文。
5. 本刊不收审稿费,但刊用稿件要收取版面费。
6. 投稿时请留下联系方式(电话和 E-mail)。