

[饮片炮制]

HPLC指纹图谱应用于炙甘草的炮制研究

崔淑芬^{1,2}, 张信青¹, Frank S C Lee³, 王小如^{2,3}

(1. 深圳职业技术学院应用生物技术系, 广东 深圳 518055; 2. 厦门大学化学化工学院现代分析科学教育部重点实验室, 福建 厦门 361005; 3. 国家海洋局第一海洋研究所青岛现代分析技术及中药标准化重点实验室, 山东 青岛 266061)

关键词: 炙甘草; 炮制; HPLC指纹图谱

摘要: 目的: 应用 HPLC 指纹图谱规范炙甘草的炮制。方法: 采用反相高效液相色谱法, DENALIC₁₈ 色谱柱 (VYDAC 238DE5415, 120A, 5 μm, 4.6 mm × 150 mm), 以 3% (v/v) HAc 溶液和甲醇为流动相, 梯度洗脱, 柱温 40 °C, 检测波长 252 nm。结果: 炙甘草的 HPLC 指纹图谱有 20 个共有峰。传统炒制法炮制的炙甘草样品有一部分峰的重现性 RSD 值 > 3%; 烘制法炮制的样品重现性有 2 个共有峰相对峰面积比的 RSD > 3%; 微波法炮制的样品重现性符合指纹图谱的要求, 20 个共有峰相对峰面积比的 RSD 值均小于 3%。结论: 烘制和微波加热的炮制方法, 可控性强, 样品的指纹图谱重现性高, 可以作为替代传统炒制工艺的新工艺。

中图分类号: R283

文献标识码: A

文章编号: 1001-1528(2007)11-1636-03

中药炮制是根据中医药理论, 依照辨证施治的用药需要和药物自身性质, 以及调剂、制剂的不同要求, 而采取的一项制药加工技术。目前, 中药饮片的炮制缺乏标准操作规程的现象还相当突出^[1~3]。加强炮制工艺规范化和饮片质量标准化研究, 是实现饮片生产产业化, 提高中药饮片质量的重要环节。采用指纹图谱技术对中药的炮制工艺及成品稳定性进行监控是指纹图谱研究的一个新方向^[4]。

甘草为豆科多年生草本植物, 别名美草、蜜甘(《本经》)、蜜草、落草(《别录》)、国老(陶弘景)、灵通(《记事珠》)等。处方名众多, 其中甘草、生草指生甘草, 为原药材除去杂质, 洗净, 润透切片, 生用入药者。生甘草偏于清热解毒。炙草又名炙甘草、蜜甘草、蜜炙甘草, 为生甘草片用蜂蜜拌匀, 再炒至不黏手取出摊晾, 然后入药者。蜜甘草偏于润肺和中。甘草的炮制方法, 古代有多种, 现代临床主要使用生甘草片和炙甘草片。炙甘草的炮制方法主要是炒制法, 我们另外建立了烘制和微波两种方法, 并采用指纹图谱技术, 对上述 3 种炙甘草的炮制方法进行了比较, 探索炙甘草饮片规范化的质量标准及炮制工艺。

1 仪器与材料

高效液相色谱仪: Agilent1100 (四元梯度泵, 在

线真空脱气机, DAD 检测器, HP-A. 09. 01 化学工作站)。

电子天平: METTCEr AE100S₅ Grant X14 超声清洗机 (Grant instruments (Cambridge) Ltd)。低速大容量多管离心机, 购自上海安亭科学仪器厂。奥立龙 pH 计 (Orion Research Inc)。超纯水机 (Labconce corporation)。PALL NO. DOA-P181-BN 超滤机。1011-2 型电热鼓风干燥箱 (上海实验仪器厂)。SANYO IC-14FL 电磁炉 (大连三洋家用电器有限公司)。格兰仕微波炉。LD-101B 型方形调节式中药切片机 (温岭市大海药材机械厂)。LD-06A 型高速中药粉碎机 (温岭市大海药材机械厂)。滤膜 (美国 Millipor Corporation, 孔径 0.45 μm)。

对照品甘草酸单铵盐由中国亿利资源集团公司李秉经理提供, 甘草苷 (96.4%) 由厦门大学傅博强博士制备。提取样品所用溶剂为分析纯。HPLC 流动相所用甲醇为色谱纯 (Merck), 乙酸为分析纯。水为超纯水, 自制。甘草炮制用蜜为枣花蜜。

实验所用生甘草片由内蒙亿利资源集团提供。

2 方法与结果

2.1 甘草供试品溶液的制备

炒制法制备炙甘草: 称取生甘草片 10 份各 20 g, 加炼蜜 5 g (炼蜜加水 1.5 mL), 拌匀, 闷透, 置锅

收稿日期: 2006-12-25

基金项目: 国家自然科学基金 2003 重点项目 (20235020)

作者简介: 崔淑芬 (1969 ~), 女, 副教授, 博士, 主要从事中草药及海洋药物研究, 电话: 0755-26019263, 13692201107, E-mail: shufencui@163.com。

内文火炒至色泽金黄,不黏手时取出,放凉。粉碎过 60 目筛。

烘制法制备炙甘草:称取生甘草片 9 份各 20 g,加炼蜜 5 g(炼蜜加水 1.5 mL),拌匀,闷润 30 h,90 烘制 4 h,取出,放凉。粉碎过 60 目筛。

微波法制备炙甘草:称取生甘草片 9 份各 20 g,加炼蜜 5 g(炼蜜加水 1.5 mL),拌匀,闷润 30 h,320 W 微波加热 6 min,取出,放凉。粉碎过 60 目筛。

精密称取已过 60 目筛烘干至恒重的蜜炙甘草或甘草药材粉末 0.1 g,置具塞三角瓶中,用 50% 甲醇 10 mL 冷浸 10 h,置超声仪中提取 30 min。提取液离心 5 min(离心机转速 3 500 r/min),取上清液水浴蒸干,用 50% 甲醇定容至 1 mL,过 0.45 μ L 的微孔滤膜,备用。

2.2 对照品溶液的配制

以甲醇为溶剂,分别配制下列浓度的对照品溶液:2.0 mg/mL 甘草酸,2.0 mg/mL 甘草苷。

2.3 HPLC 色谱条件

二极管阵列检测器(DAD),DENALIC₁₈反相色谱柱(VYDAC 238DE5415,120A,5 μ m,4.6 mm \times 150 mm),柱温 40 ,进样量 20 μ L,检测波长 252 nm。梯度洗脱,流动相 A:3% (v/v) HAC 溶液 B:MeOH。甘草药材梯度洗脱程序见表 1。炙甘草的梯度洗脱程序基本同甘草药材,只是最后的梯度延长 5 min,分析时间为 90 min。

表 1 甘草药材 HPLC 指纹图谱洗脱程序

| 时间 /min | A /% | B /% | 流速 /mL/min |
|---------|------|------|------------|
| 0 | 90 | 10 | 0.5 |
| 15 | 75 | 25 | 0.5 |
| 35 | 49 | 51 | 0.5 |
| 85 | 10 | 90 | 0.5 |

2.4 甘草药材和炙甘草的典型指纹图谱

从 HPLC 结果来看,甘草经过蜜炙后,炙甘草中甘草酸和甘草苷的峰面积大小和蜜炙前的差别并不大,但是其它成分的相对峰面积比与生甘草相比有一定差距,炙甘草中很多原有的共有峰消失了,10 批生甘草的 HPLC 共有峰有 32 个(见图 1),而蜜炙甘草的 HPLC 共有峰只有 20 个,所得典型指纹图谱见图 2,相同分析条件下测定甘草酸对照品溶液,所得色谱图见图 3。甘草酸作为甘草中的主要有效成分,其含量在甘草的有效成分中是最高的,同时也为了增加指纹图谱相对峰面积比的准确性,因此将甘草酸作为甘草指纹图谱的参照物,计算其它共有指纹峰的相对峰面积和相对保留时间。

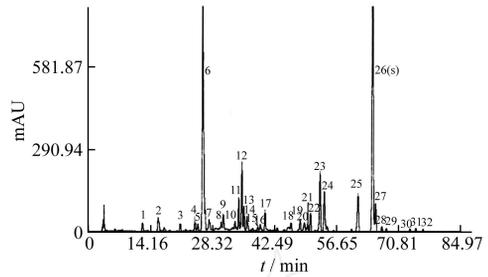


图 1 甘草药材高效液相指纹图谱

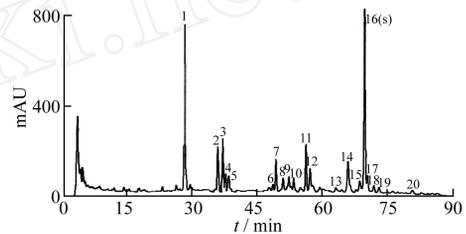


图 2 炙甘草高效液相指纹图谱

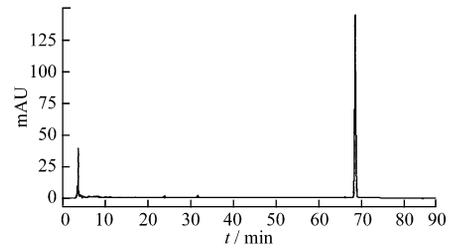


图 3 甘草酸对照品色谱图

对 10 批炙甘草(炒制法)进行了非共有峰面积的分析,各批样品中非共有峰面积占总峰面积的百分比为 3.67%~9.32%,符合指纹图谱的要求。

2.5 稳定性试验

取同一份供试液,间隔 2 h 进样,记录各共有峰保留时间及积分面积,结果如表 2,在 10 h 内供试品溶液稳定性良好。

2.6 精密度试验

取同一份供试液于一个工作日内连续进样 5 次,记录各共有峰保留时间及积分面积,结果见表 3,说明该方法整个仪器系统精密度良好。

2.7 不同炮制方法制备的炙甘草 HPLC 指纹图谱重现性比较

对炒制法、烘制法和微波法制备的炙甘草进行重现性分析,所得结果见表 4。从结果来看,炒制法炮制的炙甘草有一部分峰的重现性没有达到指纹图谱的要求,RSD 值 > 3%。烘制法炮制的样品重现性除 2 个共有峰相对面积比 > 3% 外,其余 18 个共有峰的重现性良好,其整体重现性明显好于炒制法。微波法炮制中药是新兴的一种便捷、快速的加热方法。微波加热速度快,节约能源,而且干净无污染,

表 2 炙甘草指纹图谱稳定性分析结果

| 共有峰峰号 | 相对峰面积比 RSD / % | 保留时间 RSD / % |
|-------|----------------|--------------|
| 1 | 0.19 | 0.45 |
| 2 | 0.84 | 0.40 |
| 3 | 0.40 | 0.43 |
| 4 | 1.94 | 0.43 |
| 5 | 3.05 | 0.42 |
| 6 | 2.36 | 0.12 |
| 7 | 2.50 | 0.53 |
| 8 | 1.57 | 0.39 |
| 9 | 3.51 | 0.42 |
| 10 | 3.28 | 0.40 |
| 11 | 0.81 | 0.68 |
| 12 | 1.47 | 0.68 |
| 13 | 1.47 | 0.68 |
| 14 | 0.71 | 0.40 |
| 15 | 1.20 | 0.42 |
| 16(S) | 0.00 | 0.43 |
| 17 | 1.70 | 0.40 |
| 18 | 1.62 | 0.39 |
| 19 | 1.34 | 0.50 |
| 20 | 1.53 | 0.43 |

表 3 炙甘草指纹图谱精密度分析结果

| 共有峰峰号 | 相对峰面积比 RSD / % | 保留时间 RSD / % |
|-------|----------------|--------------|
| 1 | 0.19 | 0.44 |
| 2 | 0.72 | 0.41 |
| 3 | 0.40 | 0.41 |
| 4 | 1.84 | 0.45 |
| 5 | 2.65 | 0.38 |
| 6 | 2.00 | 0.12 |
| 7 | 2.45 | 0.23 |
| 8 | 1.52 | 0.33 |
| 9 | 3.06 | 0.40 |
| 10 | 3.21 | 0.37 |
| 11 | 0.91 | 0.69 |
| 12 | 1.43 | 0.61 |
| 13 | 1.38 | 0.78 |
| 14 | 0.67 | 0.38 |
| 15 | 1.21 | 0.45 |
| 16(S) | 0.00 | 0.41 |
| 17 | 1.58 | 0.37 |
| 18 | 1.56 | 0.38 |
| 19 | 1.32 | 0.49 |
| 20 | 1.50 | 0.43 |

是很有前途的中药炮制加热方式。我们优选了一种贴近甘草传统炒制工艺效果的微波加热工艺,对微波法制备的炙甘草进行重现性分析,实验结果表明,微波法炮制的炙甘草样品重现性良好,其整体重现性明显好于炒制法、也要优于烘制法。

3 讨论

在供试液的制备方面,首先进行了冷浸、回流、索式提取、超声提取等提取方法的比较,最后以冷浸时间、提取溶媒中甲醇的浓度和超声提取时间作为

表 4 3种炮制方法制备的炙甘草 HPLC-*FP*图谱的重现性

| 共有峰峰号 | 炒制法 | | 烘制法 | | 微波法 | |
|-------|---------------|----------------|---------------|----------------|---------------|----------------|
| | 相对峰面积 RSD / % | 相对保留时间 RSD / % | 相对峰面积 RSD / % | 相对保留时间 RSD / % | 相对峰面积 RSD / % | 相对保留时间 RSD / % |
| | (n=5) | (n=5) | (n=5) | (n=5) | (n=5) | (n=5) |
| 1 | 0.45 | 0.53 | 0.08 | 0.42 | 0.08 | 0.42 |
| 2 | 1.95 | 0.39 | 0.43 | 0.43 | 0.36 | 0.40 |
| 3 | 0.93 | 0.42 | 0.23 | 0.45 | 0.19 | 0.40 |
| 4 | 4.33 | 0.40 | 2.07 | 0.40 | 1.58 | 0.40 |
| 5 | 8.27 | 0.40 | 1.91 | 0.53 | 1.63 | 0.40 |
| 6 | 6.48 | 0.42 | 2.91 | 0.39 | 2.34 | 0.43 |
| 7 | 5.75 | 0.43 | 1.34 | 0.42 | 0.91 | 0.39 |
| 8 | 4.23 | 0.45 | 3.35 | 0.40 | 2.86 | 0.50 |
| 9 | 6.23 | 0.4 | 1.54 | 0.40 | 1.47 | 0.39 |
| 10 | 7.53 | 0.43 | 3.02 | 0.40 | 2.26 | 0.42 |
| 11 | 1.88 | 0.43 | 0.44 | 0.39 | 0.31 | 0.40 |
| 12 | 3.40 | 0.40 | 0.71 | 0.50 | 0.55 | 0.40 |
| 13 | 3.40 | 0.39 | 0.91 | 0.43 | 1.06 | 0.40 |
| 14 | 1.66 | 0.50 | 0.51 | 0.68 | 0.42 | 0.39 |
| 15 | 2.79 | 0.43 | 0.73 | 0.45 | 1.06 | 0.50 |
| 16(S) | 0.00 | 0.68 | 0.00 | 0.40 | 0.00 | 0.43 |
| 17 | 3.93 | 0.68 | 0.96 | 0.43 | 0.86 | 0.68 |
| 18 | 4.49 | 0.68 | 2.18 | 0.39 | 1.89 | 0.53 |
| 19 | 2.85 | 0.42 | 0.88 | 0.50 | 1.58 | 0.39 |
| 20 | 3.34 | 0.12 | 1.15 | 0.43 | 1.72 | 0.42 |

考察因素,采用均匀设计法对甘草有效成分提取工艺进行了研究^[5],制定了本实验的提取工艺。

甘草中有效成分很多,为尽可能的使甘草成分达到较好的分离效果,对实验条件进行了一系列优化。流动相方面,试验了乙腈-水、乙腈-醋酸水、乙腈-甲醇-水等,发现当流动相中有乙腈时黄酮类化合物甘草苷等保留时间短的成分分离较好,但是对甘草酸等出峰较晚的成分分离效果不佳。综合考虑,反复试验,最后选择用 3% HAC-H₂O 和 MeOH 作为流动相。

洗脱程序方面,试验了等度洗脱、不同梯度洗脱,发现因甘草中的成分出峰时间跨度较大,等度洗脱时间过长,且分离效果不佳;换用不同的梯度洗脱程序后确定应用表 1 梯度洗脱程序,所有峰可在 90 min 内出完,且分离效果较好。

柱温试验了 20、30、40 ,发现当柱温较低的时候整体出峰时间拖后,且分离效果不好,最后应用 40 柱温。

酸的比例方面试验了 1%、2%、3%的乙酸,《中国药典》在对甘草酸进行定量的时候应用的是 1%的乙酸,但通过预试验发现 1%的乙酸对于整体的图谱分离度并不理想,而且发现有酸比例越高整体

分离度越好的趋势,故在综合考虑分离度和柱子的 pH 适应度后,确定在水相中添加 3% 的乙酸。

炙甘草是甘草主要的一种炮制品,也是药典收载的中药品种。对于甘草的蜜炙,传统的炒制法费时费力,手工操作的影响因素较多,不适合大生产。因此,本试验通过严格按照甘草蜜制方法炒制的 10 批样品建立了炙甘草的指纹图谱,以此指纹图谱为质量控制标准,通过正交试验的方法对烘制法和微波法的条件进行了优化^[6],得到本实验的炮制工艺,重现性比传统炒制法高,更适合工业生产。

致谢:本研究样品收集得到内蒙亿利资源集团的王志明经理的帮助。

参考文献:

[1] 陈吉炎,陈黎,安志斌,等. 中药饮片质控乏力的原因与对策

[J]. 中药材, 2003, 26(1): 43-46

[2] 富同义. 中药饮片质量亟待规范 [J]. 中国新医药, 2003, 2(4): 74.

[3] 孙生,齐红梅,李秀霞. 中药饮片及其炮制品目前存在的问题 [J]. 天津药学, 2001, 13(2): 30-38

[4] 张信青,蒋孟良,崔淑芬,等. 浅谈指纹图谱在中药饮片质量控制中应用的可行性 [J]. 中医药导报, 2005, 11(3): 55-58

[5] 张信青,崔淑芬,许柏球,等. 应用均匀设计法优选甘草有效成分的提取条件 [J]. 中医药导报, 2005, 11(7): 4-6

[6] 张信青. 蜜甘草高效液相指纹图谱研究 [D]. 长沙:湖南中医药大学, 2005.

不同产地枳壳饮片炮制前后挥发油 GC-MS 分析

龚千锋, 钟凌云, 曹君, 易炳学, 周道根
(江西中医学院, 江西 南昌 330004)

关键词: 枳壳饮片; 炮制; 挥发油; GC-MS

摘要: 目的: 采用气相色谱-质谱联用方法对不同产地枳壳饮片炮制前后挥发油进行化学成分的定性定量分析。方法: 采用水蒸气蒸馏法从枳壳中提取挥发油。用峰面积归一化法测定各组分的相对百分含量, 并用气相色谱-质谱法对其化学成分进行鉴定。结果: 从 4 个主产地的枳壳生品及炮制品中共鉴定出 192 个化合物, 4 个品种枳壳炮制后均有新化合物产生, 除四川枳壳外, 其余产地枳壳总化合物成分减少, 同时有部分化合物经炮制后含量发生变化。结论: GC-MS 联用适用于枳壳挥发油的化学成分分析, 为枳壳饮片质量评价提供了一定的科学依据。

中图分类号: R283

文献标识码: A

文章编号: 1001-1528(2007)11-1639-06

枳壳来源于芸香科植物酸橙 *Citrus aurantium* L. 及其栽培变种的干燥未成熟果实。具有理气宽中, 行气消胀之功效, 临床上常用于胸胁气滞, 胀满疼痛, 食积不化, 痰饮内停; 胃下垂, 脱肛, 子宫脱垂等症^[1]。枳壳的来源广泛, 市场上主流商品有“江枳壳”、“湘枳壳”、“川枳壳”^[2]。其主要成分除了橙皮苷、新橙皮苷、柚苷、几种甲氧基黄酮及生物碱外, 还含有挥发油类成分^[3], 虽然目前有部分关于枳壳挥发油类成分研究的文献报道^[4], 但对于不同产地及炮制前后挥发油类成分的异同及变化的系统研究报道较少, 而这对于控制枳壳生品及炮制品的

质量具有积极意义。本实验针对不同产地的主流商品枳壳炮制前后的挥发油类成分采用气相色谱-质谱联用分析, 拟为枳壳生品及炮制品的质量标准控制提供科学依据。

1 仪器与药材

1.1 仪器 Agilent 6890N GC-5973N MS 气相色谱-质谱联用仪。

1.2 药材 枳壳药材分别采自江西新干, 湖南沅江, 四川江津及江西樟树, 经江西中医学院植物药组中药鉴定教研室诸小兰教授鉴定为芸香科植物酸橙 *Citrus aurantium* L. 及其栽培变种的干燥未成熟

收稿日期: 2006-12-27

基金项目: “十五”科技攻关项目(课题编号: 2001BA701A55-26)

作者简介: 龚千锋(1952~), 男, 教授, 从事中药饮片质量标准及炮制机理研究, 电话: 0791-7118852, E-mail: gongqf2002@163.com。