

# 不同炮制方法的山楂药材指纹特征

★ 张俐伟 付玉梅 (江中药业股份有限公司 南昌 330077)

关键词: 山楂; 指纹图谱; 炮制方法

中图分类号: TQ 460.7 文献标识码: A

山楂 (*Fructus Crataegi*) 为蔷薇科山楂属植物山里红 *Crataegus pinnatifida* Bge. var. major N.E.Br. 或山楂 *C. rinnatifida* Bge. 的干燥成熟果实。用于肉食积滞, 胃脘胀满, 泻痢腹痛, 瘀血经闭, 产后瘀阻, 心腹刺痛, 疝气疼痛, 高脂血症<sup>[1]</sup>。山楂化学成分主要为有机酸和黄酮类。山楂味酸、甘; 微温; 入脾胃、肝经。临床上常用山楂的炮制品, 其规格有生山楂、炒山楂、焦山楂和山楂炭等。不同炮制品的疗效和应用亦不同, 如散瘀止痛用生品, 消食化积用炒制品等。现代研究表明, 山楂炮制后, 其化学成分如有机酸、黄酮、磷脂和微量元素等的含量均发生了变化, 从而改变了山楂的药理作用和临床疗效。为探讨炮制前后化学成分的变化, 现对不同炮制的山楂药材进行 HPLC 指纹图谱研究, 建立一个准确、可靠的实验方法, 为不同炮制的山楂药材其临床药理分析提供科学依据。本研究是建立在文章《不同产地的山楂药材指纹图谱研究》基础上<sup>[2]</sup>, 进

形, 无色或浅黄色。③草酸钙针晶束存在于粘液细胞中。④导管多为具缘纹孔及网纹导管。⑤纤维细长少见。

(5) 脚板山药: 粉末灰白色。①淀粉粒众多, 脐点点状, 人字状, 层纹不明显。②导管多为梯纹和网纹。③纤维无色, 多散在, 微弯曲。④草酸钙方晶直径 3~7  $\mu\text{m}$ 。

## 4 理化鉴别

(1) 取粉末各 4 g, 分别加入 20 mL 甲醇, 回流 45 分钟, 过滤, 回收甲醇, 浓缩为 1:1.5 备用。取上述各样品的甲醇提取液, 点于硅胶 GF-254 板上, 于 366 nm 紫外光灯下观察, 结果为: 山药紫色, 参薯灰蓝色, 木薯暗紫色, 番薯亮蓝色, 山薯蓝色荧光。

(2) 取山药与脚板山药粗粉各 5 g 加水 3~5 倍量煮沸, 滤过, 取滤液 1 mL 加 5% NaOH 液 2 滴再加稀  $\text{CaSO}_4$  液 2 滴, 山药显蓝紫色, 脚板山药不显

一步对方法优化, 使用优化后的方法研究不同炮制的山楂药材之间的指纹图谱差异。

## 1 实验材料

1.1 仪器 美国 Waters 高效液相色谱仪 (2996 PDA 二极管阵列检测器, 515 泵, Empower 工作站); Waters in line Degasser AF 脱气机; 中药小型粉碎机 (上海淀久中药机械制造有限公司); 万用电炉 DL-1 (北京中兴伟业仪器有限公司); Milli-Q 超纯水仪; Mettler Toledo AB204-N 分析天平。

1.2 药材及试剂 不同来源山楂药材 (山东、安徽、山西、河南、河北、广西) 由江中药业股份有限公司采购, 经江中药业股份有限公司质监部鉴定。乙腈 (色谱纯); 磷酸 (分析纯); 水 (双蒸并过 Milli-Q 超纯水仪); 大孔吸附树脂 (南开大学); 金丝桃苷对照品 (中国药品生物制品检定所)。

## 2 实验方法

2.1 色谱条件 色谱柱: 以十八烷基硅烷键合硅胶

色; 取滤液 1 mL 加费林试液 1 mL 在水浴中加热 3 分钟, 山药有红色沉淀产生, 脚板山药无红色沉淀生成, 取滤液滴于滤纸上, 滴加 1% 茛三酮丙酮液, 加热后山药显紫色, 脚板山药显浅灰紫色。

(3) 山药与脚板山药粉末各取少量滴加浓  $\text{HNO}_3$  1 mL, 山药显鲜黄色, 脚板山药显淡黄色。

(4) 取山药与木薯粉末各加 3 倍量水, 振荡数分钟, 滤过, 滤液加入少许对二甲基苯甲醛及盐酸。取滤液点于滤纸上, 立即在紫外光灯 ( $\lambda = 365 \text{ nm}$ ) 下观察, 山药显紫罗蓝色荧光, 而木薯则无。

(5) 取山药与木薯粉末各 0.5 g 于试管中, 加稀盐酸数滴, 试管中悬挂一条三硝基苯酸试纸, 用软木塞塞紧, 置温水浴中, 10 分钟后山药管试纸不变色, 而木薯管试纸显砖红色。

(收稿日期: 2006-02-14)

为填充剂;检测波长:265 nm;柱温:30 ℃;进样量:20  $\mu$ L;流动相为:0.3% 磷酸-乙腈-四氢呋喃,梯度洗脱。

**2.2 炮制方法** 现代山楂炮制方法主要沿承了古代的炒制法。2000 年版《中国药典》收载的炮制方法有净制、炒黄和炒焦。净山楂,(北山楂片)除去杂质及脱落的核;炒山楂,取净山楂片至锅内,用文火加热,炒至颜色变深,取出放凉;焦山楂,取净山楂片至锅内,用中火加热,炒至表面焦褐色,内部黄褐色,取出放凉。山楂炭,见于 1963 年版《中国药典》,以后的药典对山楂炭均无记载。在《全国中药炮制规范》中有山楂炭的记载:取山楂片至锅内,用武火加热炒至表面焦黑色,内部焦褐色,取出凉透。

**2.3 供试品的制备** 精密称取山楂药材(30~65 目)1 g,置 100 mL 平底烧瓶中,加水 50 倍,直火加热回流提取 1 小时,放冷过滤,药渣中再加 30 倍水,回流提取 0.5 小时,过滤,合并滤液,移至 100 mL 量瓶中,加蒸馏水定容至刻度。取 50 mL 该提取液过大孔吸附树脂柱,吸附后,先用 120 mL 的水洗,再用 100 mL 的 70% 乙醇洗脱,收集乙醇洗脱液。乙醇洗脱液在水浴上蒸干,残渣用水溶解至 25 mL 量瓶中,加水稀释至刻度,即为供试品。

**2.4 参照品的制备** 精密称取金丝桃苷对照品 5 mg,置 10 mL 量瓶中,加甲醇溶解定容至刻度,摇匀,即为母液,精密量取 1 mL 置于 5 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,即得(每毫升含金丝桃苷 0.1 mg)。

### 3 结果

**3.1 稳定性实验** 取山楂药材供试品溶液分别在 0、2、4、8、12 小时不同的时间点进行检测,考察各色谱峰相对峰面积和相对保留时间比值,其 RSD% 为 0.75/5.95, 1.43/1.52, 2.43/2.35, 2.43/3.73, 1.98/1.25, 1.81/4.75, 0.95/11.1, 0.88/1.84, 0.74/1.96, 0.54/4.79, 0.41/5.10, 0/0, 0.06/3.14 表明稳定性较好。

**3.2 精密度实验** 取山楂药材供试品溶液连续进样 5 次进行检测,考察各色谱峰相对峰面积和相对保留时间比值。其 RSD% 为 0.60/4.63, 0.63/1.72, 0.69/2.04, 0.77/1.88, 0.80/3.43, 0.61/0.86, 0.45/4.19, 0.40/13.7, 0.39/2.11, 0.26/1.44, 0.25/4.10, 0.20/10.0, 0/0, 0.04/2.15, 表明精密度良好。

**3.3 重现性实验** 精密称取山楂药材粉(30~65 目)5 份,每份约 1.0 g,再按前述 2.2 方法制备样,

分别进样检测。考察各色谱峰相对峰面积和相对保留时间比值,其 RSD% 分别为 0.66/4.60, 1.26/1.76, 2.28/2.77, 2.43/3.26, 1.92/4.05, 1.81/0.99, 1.16/3.81, 0.97/14.2, 0.88/2.71, 0.72/2.49, 0.54/2.78, 0.41/2.78, 0.41/10.0, 0/0, 0.06/3.29, 表明重现性良好。

**3.4 特征共有峰研究** 比较生北山楂与生南山楂色谱图,北山楂色谱图中色谱峰数比南山楂色谱图中色谱峰数多 3 至 4 个峰,所以以北山楂色谱分析对象,确立生北山楂其共峰 14 个,其中以 13 号金丝桃苷为对照峰。

**3.5 不同炮制的山楂研究** 北生山楂与南生山楂进行炒、焦、炭炮制后,通过色谱图比较,结果表明:不同炮制南山楂之间以及北山楂之间差异很明显,炮制时间越长,化学成分的数量都大量减少;但在保留时间约为 8 分钟左右,其共同有一成分却与之相反,其含量逐渐增高;另外,北山楂炭色谱中在保留时间约 28 分钟处比其它多一个色谱峰。

### 4 讨论

本文在文章《不同产地山楂指纹图谱的比较研究》研究基础上优化方法,再对不同炮制的南山楂与北山楂其化学成分的差异进行指纹图谱研究。优化以下条件后,色谱峰达到很高的分离效果,且缩短了分析时间,原分析时间为 90 分钟,现分析时间为 60 分钟。本研究通过以下方式优化条件:

**4.1 色谱柱的选择** 原以 Agilent ODS  $C_{18}$  (4.6 nm $\times$ 250 nm 5  $\mu$ m) 色谱柱为分析柱,有部分峰与峰之间未达到完全分离,本文以另一十八烷基硅键合硅胶为填充剂的色谱柱为分析柱后,其色谱峰基本都达到基线分离,且峰与峰之间分离度达到 2.5 以上。

**4.2 流动相的优化** 原流动相为乙腈-0.3% 磷酸,进行优化后为:以 0.3% 磷酸-乙腈-四氢呋喃作为流动相,在该流动相下的分离效果很好。

**4.3 检测波长的优化** 由于色谱柱不同,其分离出的色谱峰峰数不同,通过优化波长,更能体现其分离效果,所以由原先的检测波长 250 nm 优化为 265 nm。

### 参考文献

- [1] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中华人民共和国药典, (一部) [S]. 北京: 化学工业出版社, 2005, 22
- [2] 张俐伟, 付玉梅, 廖群. 不同产地山楂指纹图谱的比较研究 [J]. 江西中医学院学报, 2005, 17(6), 49~50

(收稿日期:2006-01-25)