



基于 UPLC 指纹图谱相似度的侧柏炭烘制工艺研究

单鸣秋, 陈超, 姚晓东, 丁安伟*

(南京中医药大学 江苏省方剂研究重点实验室, 江苏 南京 210046)

[摘要] 目的:建立侧柏炭烘制工艺方法,为中药炭药的炮制工艺研究提供新的思路。方法:采用恒温干燥箱为加热设备,从 200 ℃至 250 ℃间隔 10 ℃共 6 个温度,每个温度下分别烘制 20,30,40 min,共得到 18 份样品;采用超高效液相色谱法(UPLC),以侧柏炭标准饮片为参照,分析各样品指纹图谱相似度。结果:230 ℃ 20 min,230 ℃ 30 min,240 ℃ 20 min 3 份样品的相似度最大,均大于 0.96。结论:考虑到指纹图谱相似度,并结合外观性状,确定侧柏炭烘制温度以 230 ℃ 20 min 为宜。

[关键词] 侧柏炭;烘制;指纹图谱相似度;超高效液相色谱法

制炭是我国中药的传统炮制技术,可以改变药物固有性能,具有增强收敛止血、固涩止泻之功。从最早有文字记载制炭药物的文献《五十二病方》至今,炭药的应用已有 2 000 多年的历史。目前中药制炭的方法主要有炒炭和煨炭^[1],其中又以炒炭法最为常用。但是现在炒炭工艺研究多为采用某单一成分为指标进行优选,而且炒炭过程需要随时搅拌,产生大量烟雾与灰尘,污染严重并不易控制质量。烘法亦是传统炮制方法之一,主要是通过升高环境温度间接加热药物,其时间和温度稳定可控,而且清洁无污染。本研究利用烘箱,以侧柏炭标准饮片为对照,指纹图谱相似度为指标,考察烘制侧柏炭最佳工艺,以期对中药炭药的炮制研究提供新的思路与方法。

1 材料

Waters Acquity 超高效液相色谱系统(UPLC); Waters Masslynx 色谱工作站;101A 型数显鼓风干燥箱(鹤壁市天弘仪器有限公司);FA1104N 型电子天平(0.1 mg,上海民桥医疗器械有限公司);KQ-500B 型超声清洗仪(昆山市超声仪器有限公司);EPED-T 型超纯水器(南京易普易达科技发展有限公司)。

侧柏叶购于河南辉县,经南京中医药大学中药鉴定学教研室吴启南教授鉴定,为柏科植物侧柏

Platycladus orientalis (L.) Franco 的干燥枝鞘及叶。甲醇与三氟乙酸为色谱纯,水为 2 次蒸馏水。

2 样品制备

取侧柏叶 18 份,每份 50 g,置洁净方盘内,在鼓风干燥箱加热至所示温度后置于其中,即得 18 份烘制样品,见表 1。

表 1 18 份样品的烘制工艺

No.	温度/℃	时间/min	No.	温度/℃	时间/min
S1	200	20	S10	230	20
S2	200	30	S11	230	30
S3	200	40	S12	230	40
S4	210	20	S13	240	20
S5	210	30	S14	240	30
S6	210	40	S15	240	40
S7	220	20	S16	250	20
S8	220	30	S17	250	30
S9	220	40	S18	250	40

另取侧柏叶 50 g,由南京中医药大学中药炮制学教研室丁安伟教授照 2005 年版《中国药典》一部“侧柏叶”项下“侧柏炭”炮制方法^[1]炒制标准饮片。具体操作为侧柏叶 50 g,炒制温度为 280 ℃,炒制时间为 5 min,炒至表面焦褐色,断面焦黄色。

3 方法

3.1 色谱条件

Waters BEH C₁₈ 柱(2.1 mm × 50 mm, 1.7 μm); 流动相 0.05% 三氟乙酸水溶液(A)-甲醇(B)梯度洗脱:0.00 ~ 0.60 min, 95% ~ 70% A; 0.60 ~ 7.60 min, 70% ~ 55% A; 7.60 ~ 8.60 min, 55% ~ 50% A; 8.60 ~ 12.60 min, 50% ~ 15% A; 12.60 ~ 15.60 min,

[稿件编号] 20100519007

[基金项目] 国家“十一五”科技攻关项目(2006BAI09B006-02)

[通信作者] *丁安伟,教授,博士生导师, Tel: (025) 85811523, E-mail: awding105@163.com

[作者简介] 单鸣秋,讲师,在读博士, Tel: 15951802806, E-mail: shanmingqiu@163.com



15% ~ 5% A; 15.60 ~ 17.60 min, 5% ~ 95% A; 17.60 ~ 19.60 min, 95% A; 流速 0.2 mL · min⁻¹; 检测波长 375 nm; 柱温 30 °C; 进样量 2 μL。

3.2 对照品溶液的制备

取槲皮素对照品适量,加甲醇制成每 1 mL 含 50 μg 的对照品溶液。

3.3 供试品溶液的制备

取侧柏炭粉末 5 g,精密称定,置于 50 mL 锥形瓶中,加甲醇 25 mL,密塞,超声 1 h,冷却后过滤,将滤渣用少量甲醇洗涤,洗涤液与滤液合并,转移至 50 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,0.45 μm 微孔滤膜滤过,即得。

3.4 方法学考察

3.4.1 检测波长的选择 经过对样品的全波长扫描,发现在小于 360 nm 波长下,色谱图基线噪音大,甚至出现严重的基线漂移现象;在大于 390 nm 波长下,信号强度低,峰数不完全;结合槲皮素与其他成分的紫外吸收,以 375 nm 处检测的图谱信息量较多,峰形较好且各色谱峰的分度度较好,溶剂干扰少,基线较平稳。

3.4.2 标准饮片的测定 取侧柏炭标准饮片供试品溶液 2 μL 注入液相色谱仪,按 3.1 项下色谱条件测定,记录色谱图。在色谱图中,共确定了 16 个主要色谱峰,以槲皮素色谱峰(9 号峰)的保留时间和色谱峰面积为 1,计算其他各色谱峰的相对保留时间和相对共有峰面积值。

3.4.3 精密度试验 精密吸取同一侧柏炭标准饮片供试品溶液,按照 3.1 项下的色谱条件连续进样 6 次,记录指纹图谱。其中主要色谱峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均小于 3%,表明仪器性能良好。

3.4.4 重复性试验 取侧柏炭标准饮片 6 份,精密称定,按照 3.2 项下的方法制备,3.1 项下的色谱条件进样,记录色谱图。其中主要色谱峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均小于 3%,表明供试品溶液的制备方法重复性良好。

3.4.5 稳定性试验 精密吸取同一侧柏炭标准饮片供试品溶液,按照 3.1 项下的色谱条件,分别在 0,2,4,6,8,12 h 时进样,记录色谱图。其中主要色谱峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均小于 3%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

3.4.6 样品测定 分别精密吸取 18 份侧柏炭烘制

饮片供试品溶液 2 μL,注入液相色谱仪,按照 3.1 项下的色谱条件测定。

4 结果

以侧柏炭标准饮片指纹图谱作为参照,主要色谱峰的保留时间和相对峰面积作为共有模式,采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004A)版》软件,根据夹角余弦,对各样品色谱图的原始数据文件进行分析。各样品的指纹图谱见图 1,计算结果见表 2。

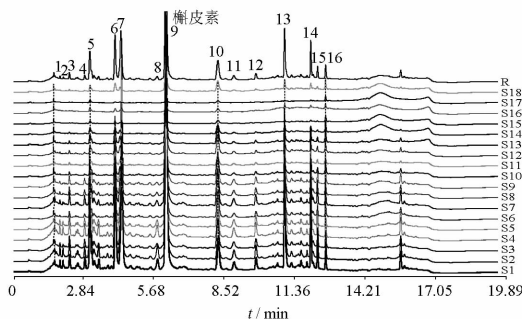


图 1 18 份烘制样品和标准饮片的 UPLC 指纹图

表 2 18 份样品的指纹图谱相似度计算

No.	相似度	No.	相似度
S1	0.594	S10	0.961
S2	0.826	S11	0.963
S3	0.849	S12	0.907
S4	0.939	S13	0.964
S5	0.882	S14	0.869
S6	0.910	S15	0.882
S7	0.952	S16	0.184
S8	0.937	S17	0.218
S9	0.941	S18	0.184

结果发现,以标准饮片为对照,烘制 230 °C 20 min,230 °C 30 min,240 °C 20 min 3 份样品的相似度最大,均大于 0.96,说明从内在成分整体质量上来看与标准饮片最为接近。结合 2005 年版《中国药典》一部侧柏炭“表面焦褐色,内部焦黄色”的要求^[1],确定烘制侧柏炭的最佳工艺为 230 °C 20 min。

为了对本工艺进行验证,又另取同批侧柏叶 3 份,每份 50 g,按照最佳工艺烘制,并按照前法制备供试品溶液进行 UPLC 指纹图谱测定。结果 3 份样品与标准饮片的相似度均大于 0.95,表明本工艺稳



定、可靠,重复性好。

5 讨论

目前,UPLC多应用于代谢组学分析及其他一些生化领域,在天然产物的分析方面运用也逐渐兴起,因为在这些领域深入研究需要更高的分析精度。本实验中所采用色谱条件由前期相关研究中HPLC指纹图谱梯度洗脱条件^[2],采用Acquity UPLC Columns Calculator软件转换并经过适当优化得来。

利用烘法,通过加热烘箱内环境间接烘烤药物而使其温度缓和上升的特点,在制炭方面由于具有炮制温度和时间稳定可控,饮片在加热过程中受热均匀等优势,避免了炒制时药物受热不均而且温度变化剧烈的弊端,同时具有清洁、无污染等特点,因此适用于大规模和自动化生产的需要,可以作为制炭方法的有益补充。

目前炮制工艺的研究,多以其中主要成分含量

的高低作为评价指标进行优选。这种方法虽然简单易行,但是现在大多数中药尚未搞清其中有效成分,如此操作缺乏理论依据;而且中药发挥作用的特点是多成分-多途径-多靶点,以单一成分为指标未免以偏概全。整体性是中药指纹图谱的基本属性之一,它强调多个成分以相对稳定的比例及位置顺序的完整性,实现对内在质量的综合评价和整体物质的全面控制。指纹图谱相似度的优势就在于可以比较供试品之间亲疏程度的相似性。因此,以标准饮片为对照,相似度为指标进行炮制工艺研究,更能客观反映中药饮片的全貌,也为炮制学研究提供了新的思路。

[参考文献]

- [1] 中国药典.一部[S].2005:149.
- [2] 单鸣秋,姚晓东,丁安伟.侧柏炭的HPLC指纹图谱研究[J].中成药,2009,31(12):1808.

Baking method of *Platycladi Cacumen Carbonisatum* based on similarity of UPLC fingerprints

SHAN Mingqiu, Chen Chao, YAO Xiaodong, DING Anwei*

(Key Laboratory for Modern Research of Traditional Chinese Medical Formulae of Jiangsu Province, Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210046, China)

[Abstracts] **Objective:** To establish a baking method of *Platycladi Cacumen Carbonisatum* for providing a new idea to Carbonic Herbs' research. **Method:** Samples were prepared in an oven for different time at different temperatures separately. Then the fingerprints of the samples were determined by UPLC. According to the standard fingerprint, the similarities of the samples' fingerprints were compared. **Result:** The similarities of 3 samples, which were baked at 230 °C for 20 min, 30 min and at 240 °C for 20 min, were above 0.96. **Conclusion:** According to the similarities of the fingerprints and in view of the appearances, *Platycladi Cacumen Carbonisatum* should be baked at 230 °C for 20 min.

[Key words] *Platycladi Cacumen Carbonisatum*; baking technics; similarity of fingerprints; UPLC

doi: 10.4268/cjcm20101708

[责任编辑 周驰]