

#### 4 讨论

康肾口服液以人参、黄芪为君药, 两药为辛、温之品, 入脾肾二经, 补肾健脾, 固本涩精; 山药、白术等健脾生精化源为臣药, 重在补后天之本, 以助先天之本; 淫羊藿、芡实、金樱子温阳固本升清, 涩精, 以不致精微外泄; 地龙、红花化瘀通经络, 共为佐药, 使脾肾之络气通畅, 又能升轻而降浊; 甘草调和诸药, 又能缓和诸药阳热过甚, 兼有气血双补之功; 以上诸药密切配合, 旨在补肾健脾, 兼而活血, 使正气自复, 淤血自除, 肾病得愈。康肾口服液对氯化汞致家兔急性肾病模型血清尿素氮及肌酐水平影响<sup>[4-5]</sup>的研究结果显示: 造模成功, 大剂量康肾口服液组和尿毒清颗粒组可显著降低造模所致家兔血清尿素氮水平升高( $P<0.01$ ), 中剂量康肾口服液组可明显降低血清肌酐水平的升高( $P<0.05$ ), 小剂量康肾口服液组仅有降低血清尿素氮水平的趋势( $P>0.05$ ), 得出高、中剂量康肾口服液组对家兔急性病模型血清尿素氮水平降低作用为好; 高、中剂量康肾口服液组和尿毒清颗粒组可明显降低造模所致家兔血清肌酐

水平的升高( $P<0.05$ ), 低剂量康肾口服液组仅有降低血清肌酐水平的趋势( $P>0.05$ ), 得出高、中剂量康肾口服液组对家兔急性肾病模型血清肌酐水平降低作用为好。本实验为临床提供了应用依据。

#### REFERENCES

- [1] JIANG W G, CHU P Z G, FANG J A, et al. Protective effects of flavonoid of *Drynaria fortunei* in ARF rats with mercuric chloride [J]. Chin J Integr Tradit West Med(中国中西医结合杂志), 2006, 7(2): 75-79.
- [2] XIAO J R, QIU S H, WU H J, et al. Experimental research on Shenfukang to the effect of nephropathy model induced by mercuric chloride [J]. J Hunan Coll Tradit Chin Med(湖南中医药大学学报), 2004, 24(1): 21-23.
- [3] BIN J Y, YU L X, MA X E. The effects of individually ventilated cage and open-environment on growth of rats and mice [J]. Prog Vet Med(动物医学进展), 2007, 28(2): 32-36.
- [4] YANG H B, XU Z F, LIU W, et al. Protective effect of lycopene on renal damage caused by chlorinated mercury in rats [J]. China Public Health(中国公共卫生), 2011, 27(10): 1279-1280.
- [5] LIU M, MA X, LI Y Q, et al. Vasoconstrictive mechanism of mercuric chloride in rabbit aorta [J]. J Xi'an Jiaotong Univ (Med Sci)(西安交通大学学报: 医学版), 2003, 24(4): 315-317.

收稿日期: 2012-10-17

## 肉豆蔻药材个体差异程度研究

袁子民, 胡娜, 王静, 刘欢, 贾天柱\* (辽宁中医药大学, 辽宁 大连 116600)

**摘要:** 目的 研究同批次肉豆蔻个体所含化学成分的差异程度。方法 采用高效液相色谱指纹图谱, 色谱柱为 Diamonsil C<sub>18</sub>(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为甲醇-水, 梯度洗脱, 流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 柱温: 30 °C; 检测波长: 274 nm。结果 建立同批肉豆蔻药材 10 个种仁的指纹图谱, 有 15 个共有峰, 种仁间个体相似度在 95% 以上的有 3 个, 在 90%~95% 之间有 4 个, 在 90% 以下的有 3 个。结论 相同批次肉豆蔻个体所含化学成分存在一定差异, 本实验为肉豆蔻药材的质量控制提供科学的依据。

**关键词:** 肉豆蔻; 种仁; 指纹图谱; 个体差异

中图分类号: R282.5

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2013)11-1189-03

### Study on the Individual Differences among the Seed Kernels of Nutmeg

YUAN Zimin, HU Na, WANG Jing, LIU Huan, JIA Tianzhu\* (Liaoning University of TCM, Dalian 116600, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To study the differences of chemical components among different seed kernels of nutmeg in the same batch. **METHODS** HPLC fingerprint method was used with Diamonsil C<sub>18</sub> column(4.6 mm×150 mm, 5 μm). The mobile phase consisted of methanol-water, a gradient eluting agent, at the flow rate of 1.0 mL·min<sup>-1</sup>. The column temperature was 30 °C,

基金项目: 国家自然科学基金项目(81274084)

作者简介: 袁子民, 男, 博士, 副教授 Tel: (0411)87586010  
Tel: (0411) 87586499 E-mail: jiatianzhu51@yahoo.com.cn

E-mail: yuanzmin@163.com

\*通信作者: 贾天柱, 男, 硕士, 教授

and the detective wavelength was 274 nm. **RESULTS** The fingerprints of ten seed kernels of nutmeg in the same batch were established which consisted of 15 common peaks. The similarity of 3 seed kernels of nutmegs was more than 95%, of 4 seed kernels of nutmegs between 90% and 95%, and three less than 90%. **CONCLUSION** There are some differences among different seed kernels of nutmeg in the same batch. This method could provide a scientific basis for the quality controlling of nutmeg.

**KEY WORDS:** nutmeg; seed kernels; fingerprint; individual differences

肉豆蔻为肉豆蔻科植物肉豆蔻 *Myristica fragrans* Houtt. 的干燥成熟种仁, 具有行气、止泻等药理作用<sup>[1]</sup>, 主产于马来西亚、印度尼西亚等国, 本国药材多以进口为主。本实验在前期相关研究<sup>[2-3]</sup>中发现, 相同批次药材分次取样进行挥发油、去氢二异丁香酚含量测定, 结果重现性存在较大差异, 这是否与肉豆蔻种仁间个体本身所含化学成分的差异有关, 值得进一步深入研究。因此, 本实验以同批次肉豆蔻药材的单个种仁为研究对象, 采用高效液相色谱法结合指纹图谱技术<sup>[4]</sup>, 建立同批次肉豆蔻药材单个种仁的指纹图谱并进行相似度评价, 为研究肉豆蔻药材种仁所含化学成分的差异、建立其指纹图谱以及控制质量标准提供科学依据。

## 1 仪器与试剂

### 1.1 仪器

Agilent1100 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司, Chemstation system 工作站)。

### 1.2 试剂

去氢二异丁香酚对照品(中国药品生物制品检定所, 批号: 11838-201102, 纯度>98%); 甲醇为色谱纯, 水为重蒸水; 肉豆蔻药材(浙江中医药大学饮片厂提供, 产地: 印度尼西亚, 批号: 090414, 由辽宁中医药大学贾天柱教授鉴定为肉豆蔻科植物肉豆蔻 *Myristica fragrans* Houtt 的干燥成熟种仁)。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

色谱柱为 Diamonsil TM(钻石) $C_{18}$ (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5  $\mu$ m); 柱温: 30  $^{\circ}$ C; 检测波长: 274 nm。流动相: A 相为甲醇, B 相为水; 梯度洗脱程序: 0~5 min, A: 60% $\rightarrow$ 62.5%; 5~10 min, A: 62.5% $\rightarrow$ 65%; 10~25 min, A: 65% $\rightarrow$ 70%; 25~35 min, A: 70% $\rightarrow$ 78%; 35~45 min, A: 78% $\rightarrow$ 80%; 45~50 min, A: 80% $\rightarrow$ 85%; 50~60 min, A: 85% $\rightarrow$ 90%。进样量 10  $\mu$ L。谱图采集时间为 65 min。

### 2.2 对照品溶液的制备

取去氢二异丁香酚对照品适量, 精密称定, 加甲醇制成每 1 mL 含去氢二异丁香酚 30  $\mu$ g 的溶

液, 即得。

### 2.3 供试品溶液的制备

取肉豆蔻药材单个种仁粉末(20 目过筛)0.2 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 25 mL, 密塞, 称定重量, 超声处理(250 W, 30 kHz)30 min, 取出, 放冷, 再称定重量, 用甲醇补足至 25 mL, 摇匀, 用 0.45  $\mu$ m 微孔滤膜滤过, 即得。

### 2.4 仪器精密度试验

精密吸取同一供试品溶液 10  $\mu$ L, 连续进样 6 次, 以 10 号峰去氢二异丁香酚为参照峰, 计算 1~15 号共有指纹峰的相对峰面积和相对保留时间, 结果 RSD 值均<2%, 同时计算各指纹图谱相似度, 结果均>95%, 表明仪器精密度良好。

### 2.5 重复性试验

精密称取同一个种仁肉豆蔻粉末 6 份, 分别按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 精密吸取各供试品溶液 10  $\mu$ L, 注入高效液相色谱仪, 测定指纹图谱。以 10 号峰去氢二异丁香酚为参照峰, 计算 1~15 号共有指纹峰的相对峰面积和相对保留时间, 结果 RSD 值均<2%, 同时计算各指纹图谱相似度, 结果均>95%, 表明方法重复性良好。

### 2.6 稳定性试验

精密吸取同一供试品溶液 10  $\mu$ L, 分别在 0, 2, 4, 6, 8, 12 h 进样记录相应指纹图谱, 以 10 号峰去氢二异丁香酚为参照峰, 计算 1~15 号共有指纹峰的相对峰面积和相对保留时间, 结果 RSD 值均<2%, 同时计算各指纹图谱相似度, 结果均>95%, 表明供试品溶液在 12 h 内, 稳定性良好。

### 2.7 样品测定及指纹图谱的建立

按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件, 对 10 个同批次肉豆蔻药材的单个种仁分别进行测定, 记录指纹图谱, 采用国家药典委员会中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004)A 版, 经多点校正、数据匹配, 以中位数生成对照指纹图谱并进行数据处理, 计算相似度。以 10 号峰去氢二异丁香酚为参照确定 15 个共有峰为肉豆蔻药材单个种仁指纹图谱的特征峰。10 个单个种仁与对照指纹图谱相似度分别为:

90.8%、90.9%、96.0%、84.0%、85.1%、80.9%、94.9%、98.2%、90.9%、97.8%。结果见图 1~3。

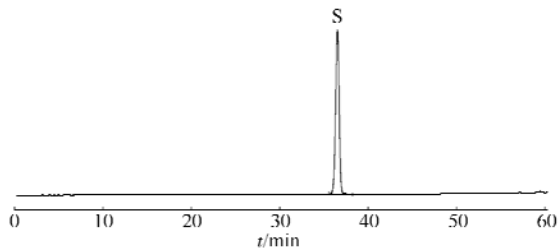


图 1 去氢二异丁香酚色谱图

Fig 1 HPLC chromatogram of dehydrodiisoeugenol

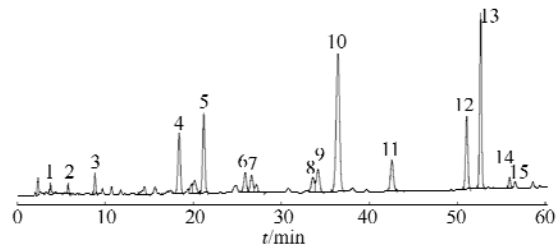


图 2 单个肉豆蔻种仁样品指纹色谱图

Fig 2 The fingerprint chromatogram of a seed kernel of nutmeg

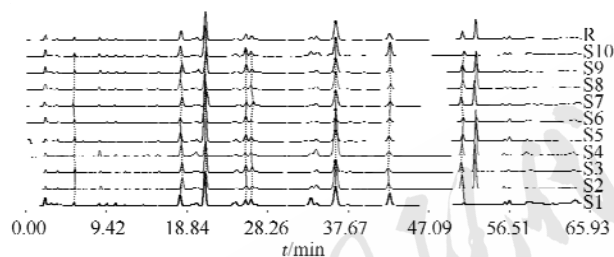


图 3 10 个单个肉豆蔻药材种仁指纹图谱

Fig 3 The fingerprint chromatograms of ten seed kernels of nutmeg

### 3 讨论

采用以往研究中甲醇-乙腈-水(25:35:40)为流动相的等度洗脱<sup>[3]</sup>建立肉豆蔻指纹图谱,发现色谱峰之间未达到最佳分离。因此本实验经流动相筛选,采用甲醇-水梯度洗脱,有利于各色谱峰的分离,所建立的色谱条件重复性好,可用于肉豆蔻药材指纹图谱的分析测定。

实验中对指纹谱图的测定波长进行了考察,选择代表性波长 260, 274, 300 nm 进行检测,结果显示,在 300 nm 波长下指纹图谱色谱峰较少,在 274, 260 nm 波长下,色谱峰信息相差不大,但在 274 nm 波长下部分色谱峰吸收较强,故选择 274 nm 为指纹图谱的测定波长。

本实验建立了同批 10 个单个肉豆蔻药材种仁的指纹图谱,有 15 个共有峰,种仁间个体相似度在 95% 以上的有 3 个,在 90%~95% 之间有 4 个,

在 90% 以下的有 3 个; 10 个单个肉豆蔻药材种仁共有峰的相对峰面积波动较大,表明同批次肉豆蔻个体间所含化学成分存在一定差异,因此在肉豆蔻相关研究中应加大取样量,粉碎混匀后进行研究,以降低肉豆蔻种仁本身个体差异带来的影响<sup>[5]</sup>。

肉豆蔻种仁间所含化学成分的个体差异可能与药材来源、产地加工、采收时间及生长条件等很多因素有关。如药材来源:肉豆蔻多以进口为主,可能大批量进口混货,再小批量分装销售,造成同批次药材的差异;产地加工、采收时间:一般在 5~7 月及 10~12 月采摘成熟果实,除去果皮,剥去假种皮,将种仁用 45 °C 低温慢慢烤干或晒干<sup>[6]</sup>;或早晨摘取成熟果实,剖开果皮,剥去假种皮,再敲脱壳状的种皮,取出种仁用石灰乳浸 1 d 后,缓火焙干<sup>[7]</sup>;生长条件:肉豆蔻树苗定植后 6~7 年开花结果,10 年后产量增多,25 年达盛果期,结果期为 60~70 年<sup>[6]</sup>,因此不同树龄所产生的肉豆蔻种仁可能存在化学成分的差异。另外即便同株肉豆蔻树的肉豆蔻果实由于所受阳光照射时间<sup>[8]</sup>、生长的位置的不同,也会造成种仁的个体差异。具体主要原因还需原产地采样,用同株树上的样品进一步深入研究。

### REFERENCES

- [1] Ch.P(2010)Vol I (中国药典 2010 年版.一部) [S]. 2010: 212.
- [2] YUAN Z M, ZHAO L, WANG J. Study on quality standards of nutmeg [J]. Lishizhen Med Mater Med Res(时珍国医国药), 2012, 23(9): 2322-2323.
- [3] YUAN Z M, JIAN T Z, ZHANG Y Q. Primary study on fingerprint of nutmeg in different areas [J]. Chin J Inf TCM(中国中医药信息杂志), 2008, 15(9): 41-42.
- [4] DU Y, LI Y, ZHANG X F. HPLC fingerprint study of Hawthorn leaf from Chengde [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2012, 29(10): 908-910.
- [5] ZHANG N P, LIN R C, LIU B L. Discussion on the evaluation methods of quality factor of the effect of Chinese herbal medicine [J]. Res Inf Tradit Chin Med(中医药研究与信息), 2000, 2(6): 11-14.
- [6] The Editorial Committee of Chinese Herbs, State Administration of Traditional Chinese Medicine. Chinese Herbs(中华本草) [M]. Vol VII. Shanghai: Shanghai Science and Technology Publishers, 1999: 1599.
- [7] Jiangsu New Medical College. The Dictionary of Chinese Traditional Medicines (中药大辞典) [M]. Vol I. Shanghai: Shanghai Science and Technology Publishers, 1977: 984.
- [8] LU S P, SUI X X, SUN Q, et al. Biological functions of secondary metabolism of medicinal plants and influences of ecological environment [J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2006(6): 1027-1032.

收稿日期: 2013-01-09