

去,各细胞、组织透明,果皮细胞不易观察清楚。关于脱色剂及脱色方法的选择还有待研究。

笔者首次对山茱萸微粉进行细胞破壁率的测定,通过细胞脱色,以山茱萸粉末完整的石细胞作为特征计数物,采用细胞计数法考察超微粉碎对山茱萸微粉细胞破壁率的影响。

通过对稀甘油、水合氯醛等分散溶媒的对比分析,发现采用水合氯醛试液处理后观察的山茱萸细粉显微图像较为清晰,因此选择水合氯醛作为分散介质。

影响破壁率检测精确度的主要因素是回归方程的精确性和未破壁细胞计数的精确性。对于回归方程,由于称样量的误差可以忽略,每个计数单位内细胞平均数的精确性是最主要的影响因素。通过直观分析法得出,混悬液浓度为主要因素,观察倍数和展开面积次之,最佳条件是混悬液浓度为 $30\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$,目镜 $10\times$,物镜 $10\times$ 。

超细粉碎工艺对于不同质地的中药材,粉碎效果不同;关于细胞破壁率与粒径的相关性正在研究中,其内在的规律有待考察。

目前仅见关于花粉与孢子类中药的单一细胞破壁率计算方法,且未设定统一标准。拟通过对植物中药细胞破壁率的系统研究,探讨其内在规律,建立细胞破壁率测定的统一标准,对药物、食品、

化妆品等行业产品的研究与开发具有重要意义。

REFERENCES

- [1] Ch.P(2005)Vol I (中国药典 2005 年版.一部)[S]. 2005: 198.
- [2] ZHANG G J. Modern Identification Technique of Traditional Chinese Medicine (现代中药鉴别技术) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2000: 54.
- [3] CAI G X, YANG Y H, LI Y. Progress in Studies on micropowders of traditional Chinese medicine[J]. Sci Tech Review (科技导报), 2007, 26(10): 50-53.
- [4] YUAN D M, LUAN X J, JU Q B, et al. A study on quantitative microscopic method applied to the identification of chinese material medica [J]. Liaoning J Tradit Chin Med (辽宁中医杂志), 2006, 33(4): 459-460.
- [5] XU G J, XU L S. Microscopical Identification of Chinese Medicinal Materials powder(中药材粉末显微鉴定) [M]. 1st.ed. Beijing: People's Medical Publishing House, 1986: 142.
- [6] SHANG X D, LI M R, WANG N, et al. Determination of sporoderm-broken rate of ganoderma iucidum by hemocytometer measurement [J]. Acta Edulis Fungi (食用菌学报), 2005, 12(2): 37-40.
- [7] LI Y, LIU Q P, HUANG Y G, et al. Study on a new method for sssaying the rate of broken pollen hull [J]. Forestry Sci Tech(林业科技), 2004, 29(6): 47-48.
- [8] JIANG Q H, QU Y J, WANG R X, et al. Microscopic quantitative study on saiga tatarica in "Lingyang Qing Fei Pill" [J]. J Chin Med Mater (中药材), 2004, 27(2): 90-91.
- [9] ZHANG Q L. The introduction of method for wall-broken rate of pollen [J]. Jiangsu Pharm Clin Res (江苏药学与临床研究), 1999, 7(1): 44-45.

收稿日期: 2008-11-13

黄连厚朴乙醇分提和合提提取物的指纹图谱比较

孟斌, 张振秋* (辽宁中医药大学药学院, 辽宁 大连 116600)

摘要: 目的 以指纹图谱方式, 研究黄连和厚朴乙醇合提和分提提取物中化学成分的差异。方法 采用常规制备方法得黄连和厚朴醇提合提和分提的提取物, 采用 HPLC 考察并确定最佳的检测波长, 最佳色谱柱等色谱条件, 并采用最佳色谱条件对黄连厚朴配伍不同制备方法的提取物进行测定, 比较不同提取物的指纹图谱的差异。结果 不同提取物中化学成分组成存在差异, 且提取物中主要化学成分的提取率也存在差异。结论 黄连厚朴醇提合提和醇提分提提取物中主要化学成分组成存在差异。

关键词: 黄连; 厚朴; 配伍; 指纹图谱

中图分类号: R284.2; R284.1 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2009)09-0734-03

Fingerprint Comparison of the Extraction of *Rhizoma Coptidis* and *Cortex Magnoliae Officinalis* Extracted by Ethanol Together and Single

MENG Bin, ZHANG Zhenqiu* (College of Pharmacy, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Liaoning Dalian 116600, China)

作者简介: 孟斌, 女, 科员
E-mail: zhangzhenqiu@sina.com

Tel: 13998868609

E-mail: bear_love_fox@126.com

*通信作者: 张振秋, 男, 教授

Tel: (0411)87586058

ABSTRACT: OBJECTIVE To study on the differences of chemical composition between extraction of *Rhizoma Coptidis* and *Cortex Magnoliae* extracted by ethanol together and single, with fringerprint technology. **METHODS** The extracts of *Rhizoma Coptidis* and *Cortex Magnoliae* extracted by ethanol together and single under the same process. The comparison was done under the different wavelengths and different brand columns, HPLC method determined the extract's fingerprint within the range of optimized conditions. **RESULTS** The ratio of compositions and its main chemical substances are different between the two extracts, and the extract rate of the main chemical substances are different, too. **CONCLUSION** There are some chemical substances and composition's ratio differences in the extracts of *Rhizoma Coptidis* and *Cortex Magnoliae Officinalis* by ethanol together and single.

KEY WORDS: *rhizoma coptidis*; *cortex magnoliae officinalis*; combination; fingerprint

黄连、厚朴两味药为经典古方连朴饮中的君药和臣药，古代医书《普济方》中也有由两药配伍组成的方剂黄连厚朴汤。方中黄连清热燥湿，厚朴行气化湿，两药合用，苦降辛开，使气行湿化，湿去热清，为治湿热霍乱的良方，临床以呕吐腹泻，胸膈满闷，不思饮食为主要症状^[1]。目前指纹图谱对中药有效部位提取物和单味药材的质量控制等方面的研究和应用较为广泛，而复方配伍由于药物间的相互作用使得化学成分更加复杂多变，因此研究和报道较少^[2-4]。为对两药配伍进行深入研究，笔者用乙醇分提和合提两种方法对黄连和厚朴进行提取，并对两种提取物进行指纹图谱比较，以探讨两药不同提取方法提取物化学组成成分的差异。

1 仪器和试药

1.1 仪器

Agilent 1100 型高效液相色谱仪(安捷伦科技有限公司); AS3120A 超声提取器; 2140 型电子分析天平, METTLER AB135-S 十万分之一电子天平(瑞士)。

1.2 试药

姜制黄连购于河北安国，姜制厚朴购于四川成都杏林连锁药房，经辽宁中医药大学李峰教授鉴定，姜制黄连为毛茛科植物黄连(*Rhizoma Coptidis*)的干燥根茎;姜制厚朴(*Cortex Magnoliae Officinalis*)为木兰科植物厚朴的干燥干皮。乙腈为色谱纯，水为重蒸馏水；其他试剂均为分析纯。

2 方法和结果

2.1 黄连和厚朴不同提取物的制备

2.1.1 两药醇提合提提取物的制备 取黄连药材粗粉 10 g，厚朴药材粗粉 20 g，两药合并，加 70%乙醇 10 倍量，回流提取 3 次，每次 1 h，过滤，合并滤液，减压浓缩至干，备用。

2.1.2 两药醇提分提提取物的制备 取与“2.1.1”项下提取物制备相同的量的药材，分别加 70%乙醇 10 倍量，回流提取 3 次，每次 1 h，过滤，合并滤液，减压浓缩至干，合并两味药材的提取物，备用。

2.2 供试品溶液的制备

分别取不同制备方法的提取物，置 100 mL 量瓶中，加甲醇适量，超声处理 30 min，取出，用甲醇稀释到刻度，经 0.45 μm 微孔滤膜滤过，即得。

2.3 色谱条件

色谱柱：Agilent Eclipse XDB-C₁₈ (250 mm×4.6 mm，5 μm)；流动相：以乙腈-0.3%磷酸三乙胺梯度洗脱，梯度变化及流速见表 1；柱温：20 ℃；检测波长：225 nm；进样量 20 μL。

表 1 梯度变化表

Tab 1 Mobile phase gradient

时间/min	乙腈/%	0.3%磷酸三乙胺/%	流速/mL·min ⁻¹
0	10	90	0.4
12	15	85	0.6
25	20	80	0.8
35	27	73	0.8
42	33	67	0.8
50	63	37	0.8

2.4 不同检测波长的比较

选择 225 nm、345 nm 两个通用波长，黄连的最大吸收波长 254 nm，厚朴的最大吸收波长 290 nm 四个波长，采用 UV 检测器对指纹图谱的四个检测波长进行选择，结果表明，检测波长 225 nm 处，所得各色谱峰具有代表性，信息量较大，且各色谱峰分离度也较好。

2.5 色谱柱的选择

实验选择了以下 3 种色谱柱：Agilent Eclipse XDB-C₁₈ (250 mm×4.6 mm，5 μm)；Phenomsil BDS-C₁₈ (250 mm×4.6 mm，5 μm)；DiamonsilTM-C₁₈ (200 mm×4.6 mm，5 μm)。在 225 nm 进行检测，比较所得色谱图，从中选择了 Agilent Eclipse XDB-C₁₈ (250 mm×4.6 mm，5 μm)，该色谱柱不仅分离效果好，且峰形尖锐，以含量最大的峰(峰 11)计理论板数不小于 6 000。

2.6 柱温的选择

实验选择了 20 ℃、25 ℃、30 ℃、35 ℃ 4 个不同温度对柱温进行考察。发现 20 ℃时，样品中

各成分的分离度较好,而 25 ℃、30 ℃和 35 ℃时,出峰时间提前,温度升高,流动相比比例调节依然达不到最佳分离效果。因此,选择 20 ℃为黄连、厚朴药对的 HPLC 指纹图谱的柱温。

2.7 方法学考察

2.7.1 提取物室温放置的稳定性试验 取“2.1.1”项下的提取物,于室温下放置 9 个月,分别于 0, 1, 2, 3, 6, 9 月按照“2.2”项下的方法制备供试品溶液,按照“2.3”项下的方法进样,记录指纹图谱。结果表明,各主要色谱峰相对保留时间和相对峰面积比值无明显变化,RSD 均小于 3%,结果表明提取物在室温下放置 9 个月内稳定。

2.7.2 进样溶液室温放置的稳定性试验 取“2.1.1”项下的提取物,按照“2.2”项下的方法制备供试品溶液,并在室温下按照“2.3”项下的方法分别于 0, 2, 4, 6, 8, 12 h 进样,记录指纹图谱。结果表明,各主要色谱峰相对保留时间和相对峰面积比值无明显变化,RSD 均小于 3%,结果表明进样溶液在室温下放置 12 h 内稳定。

2.7.3 重复性试验 分别取黄连药材粗粉 10 g,厚朴药材粗粉 20 g 共 6 份,按“2.1.1”项下的方法制备提取物,并按照“2.2”项下的方法制备供试品溶液,记录指纹图谱。结果表明,各主要色谱峰相对保留时间和相对峰面积比值无明显变化,RSD 均小于 3%,结果表明提取物重复性良好。

表 2 分提和合提指纹图谱中主要出峰的积分面积及其比值

Tab 2 The area of main chromatographic peak and the ratio of the extraction of *Rhizoma Coptidis* and *Cortex Magnoliae* extracted by ethanol together and single

峰位	峰 3	峰 4	峰 7	峰 9	峰 10	峰 11	峰 12	峰 13	峰 14
合提	1 559.5	699.2	808.2	1 924.0	2 377.8	8 925.0	733.4	1 722.8	1 181.6
分提	1 300.2	676.8	786.9	2 103.7	2 449.3	8 736.1	828.6	1 976.5	1 099.5
比值	1.199	1.033	1.027	0.914 6	0.970 8	1.022	0.885 1	0.871 6	1.075 0

3 讨论

从本实验结果可以看出,黄连和厚朴相同投料量的情况下,两药分别醇提再合并的制备方法下各化学成分的含量与两药合提基本相同,有少数峰峰面积略高于两药合提,两药合并醇提制备有新成分的产生,这说明黄连与厚朴两药在共同提取的过程中化学成分发生了转化,这可能与两药之间产生的相互作用有关。由两药合并醇提而产生的新成分具体是何物质,是否有药理作用,还需要通过进一步的实验证明。

2.8 结果

黄连和厚朴不同制备方法的提取物指纹图谱见图 1。从整体角度判断,以两药醇提合提提取物指纹图谱中的主要出峰为基准(见图中 1~13 号峰),与两药分提提取物的图谱做比较,发现两药分提比两药合提的指纹图谱中少了 1 号峰和 5 号峰,但两提取物的各峰的保留时间基本相同,可以初步断定不同制备方法的提取物中的化学成分并不完全相同。

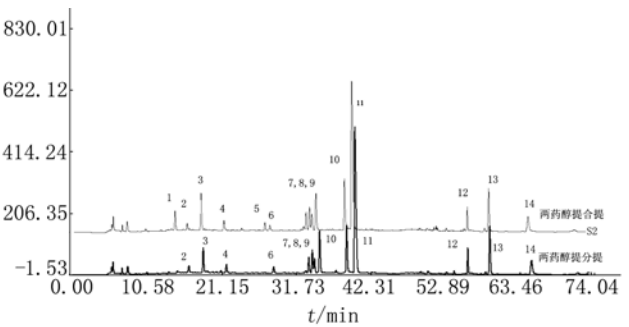


图 1 黄连厚朴醇合和醇分提取物指纹图谱
Fig 1 Fingerprint chromatogram of the extraction of *Rhizoma Coptidis* and *Cortex Magnoliae* extracted by ethanol together and single

以两药分提的提取物图谱为基准,将合提和分提图谱中的主要共有峰的积分面积作比较,结果见表 2。由表可知,合提提取物中指纹图谱主要出峰的积分面积除峰 9,峰 12,峰 13 小于分提提取物,峰 3 大于分提提取物,其余峰积分面积与分提提取物基本相等。

REFERENCES

[1] HA X B. Chatting “Lian Po Yin” [J]. J Benef Vead Drug Inform Med Advices(开卷有益·求医问药), 2003, (9): 21.
[2] LI X, YIN L, DUAN J A, et al. Fingerprint comparison of effective parts of Ermiao wan categorized formula in anti-gouty syndrome of damp and heat [J]. Chin J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2008, 33(16):1971-1975.
[3] WU R L, XU S M, FENG S, et al. Fingerprint analysis of bioactive components of chinese angelica, astragalus root and their composites by highperformance liquid chromatography [J]. Chin J Anal Lab(分析试验室), 2007, 26(10): 93-96.
[4] LUO Y, YANG J, ZHANG Q R, et al. Influence of compatibility with radix astragali on the main chemical constituents of herb epimedii [J]. Chin J Infor Tradit Chin Med(中国中医药信息杂志), 2006, 13(12): 46-48.

收稿日期: 2008-09-16