

有峰消失,新的峰出现;原有峰信号减弱和增强的现象。这个结果提示我们红花黄色素类成分受热后,一些成分结构被破坏产生了新的化合物,并随着温度的提高,新产生的成分又遭破坏;也有的成分随着温度的升高被破坏的量也加大或形成新的化合物量加大,从而导致原有的峰信号减弱或增强。

3.3 反映在终产品指纹图谱中 HSYA峰的前后两个峰,即相对保留时间为 0.84~0.86和 1.19时出现的峰受温度影响较大,室温时相对峰面积为 0.053 525 ±0.004, 0.018 244 ±0.001, 100℃时相对峰面积为 0.464 785 ±0.070, 0.776 157 ±0.068, 115℃时相对峰面积为 0.380 261 ±0.057, 1.545 459 ±0.083。该结果显示随着温度的升高, HSYA峰面积就越小,结构被破坏的程度就越大,说明该物质对热很不稳定;而相对保留时间为 0.84~0.86时出现的峰,在温度升到 100℃时峰面积增大,说明该物质的形成增多,但再升到 115℃时峰面积减少,新产生的物质又受到破坏,说明该物质在 100℃以下稳定, 100℃以上不稳定;相对保留

时间为 1.19时出现的峰,从室温~115℃峰面积一直在增大,该物质的形成增多,说明该物质对热非常稳定。这 3种物质的结构转化是否有内在的联系,新形成的物质是否具有相同的生理活性有待于进一步深入的研究。

参考文献:

- [1] 臧宝霞,金 鸣.羟基红花黄色素 A对血小板活化因子的拮抗作用[J].药学报,2002,37(9):696-699.
- [2] 金 鸣,吴 伟.红花总黄色素体外抑制血小板激活因子受体结合作用的研究[J].中国药学杂志,2001,36(3):167-169.
- [3] 吴冬青,林 敏.红花黄色素稳定性研究[J].河西学院学报,2003,19(5):32-36.
- [4] 许 钢.天然红花黄色素稳定性研究[J].食品工业科技,2000,21(1):16-18.
- [5] Urano S, Ikura M, Hlklchl K, et al. Constitution Of two coloring matters In The Flower Petals Of Carthamus Tinctorius L[J]. Tetrahedron Letters, 1982, 23(49): 5163-5166.

川楝子色谱指纹图谱的研究

盛云华, 安 毅, 王新宏, 金若敏^{*}
(上海中医药大学,上海 201203)

关键词:川楝子; HPLC; 色谱指纹谱

摘要:目的:建立不同产地川楝子药材的色谱指纹谱,为其质量综合评价提供依据。方法:采用 RP-HPLC梯度洗脱技术进行分离分析,色谱柱:Inertsil ODS-3 C₁₈柱;流动相:乙腈-水梯度洗脱;检测波长:270 nm;柱温:25℃;流速:1.0 mL/min;进样量:20 μL。结果:建立了川楝子的色谱指纹谱,制定了控制川楝子质量的技术参数,其中标示 39个峰为其特征指纹。结论:不同产地川楝子药材在组分的分布上差异不大,但在成分的比例和量上差异较大。同一产地川楝子在组分的分布和含量上差异较小。该法重现性好,简单,易行,可为川楝子的质量控制提供依据。

中图分类号:R284.1

文献标识码:A

文章编号:1001-1528(2009)02-0168-04

Chromatography fingerprint of the constituents of *Melia toosendan* Sieb

SHENG Yun-hua, AN Rui, WANG Xin-hong, JIN Ruomin^{*}

(Shanghai University of TCM, Shanghai 201203, China)

KEY WORDS: *Melia toosendan* Sieb; HPLC; chromatography fingerprint

ABSTRACT: **AIM:** To establish the chromatography fingerprint of the constituents of *Melia toosendan* Sieb from different areas in order to provide a base for the identification of its quality. **METHODS:** A gradient separated method was applied. Column: Inertsil ODS-3 C₁₈, mobile phase: acetonitrile-water, detection wavelength: 270 nm, flow rate: 1.0 mL/min, column temperature: 25℃. **RESULTS:** To establish the chromatography fingerprint of the

收稿日期:2008-06-15

基金项目:上海市科学技术委员会科研计划项目(05DZ19736,06DZ22910)

作者简介:盛云华(1984-),女,硕士研究生,中药学。Tel: (021) 51323027

^{*}通讯作者:金若敏,研究员。Tel: (012) 51322401 E-mail: mj801@126.com

constituents of *Melia toosendan* Sieb, make the technical parameters for its quality controlling, and mark 39 main peaks as its characteristic fingerprint **CONCLUSION:** The distribution of constituents of *Melia toosendan* Sieb differ a little from different areas, but the proportion of the constituents differ greatly, with the *Melia toosendan* Sieb from the same area, the distribution and proportion differ a little. This method is reproducible, simple and easy, and can be used to provide a base for the quality control of *Melia toosendan* Sieb.

川楝子为楝科植物川楝 *Melia toosendan* Sieb et Zucc 的干燥成熟果实。川楝子具有舒肝行气止痛,驱虫的作用,临床上主要用于胸胁、脘腹胀痛,疝痛,虫积腹痛^[1]。楝科植物主要分布于南方各省,如四川,贵州,湖南,湖北等。现代研究表明川楝子主要含川楝素 (toosendanin),苦楝子萜酮 (melianone),苦楝子萜醇 (melianol),苦楝子萜三醇 (melianetriol),苦楝子萜二醇 (melianediol),苦楝子内酯 (melialactone),印苦楝子素 (azadirachtin),脂川楝醇 (lipomeli-anol),川楝苷 A 和川楝苷 B 等成分^[2,3]。其中川楝素是川楝子中唯一有售的对照品,结构为呋喃四环三萜类化合物^[4]。本文主要研究了不同产地的川楝子指纹图谱,并通过数字化指纹谱尽可能的将川楝子的内在品质反映出来,克服了以单组分川楝素描述川楝子质量的不足。建立的川楝子色谱指纹谱能够更加全面,客观的反映其内在特性。

1 材料

1.1 样品来源

川楝子对照药材 (2号样品)购自中国药品生物检定所,其余各药材分别来源于四川成都 (1号样品)、四川新都 (3号样品)、四川自贡 (4号样品)、四川内江 (5号样品)、四川资阳 (6号样品)、云南昆明 (7号样品)、湖北武汉 (8号样品)、湖南长沙 (9号样品)。以上川楝子药材经上海中医药大学中药学院生药学教研室赵志礼教授鉴定为楝科植物川楝 *Melia toosendan* Sieb et Zucc 的干燥成熟果实。

1.2 仪器与试剂

1.2.1 仪器 Agilent 1100 series 高效液相色谱系统:四元泵,在线脱气机,柱温箱,Agilent 1100 化学工作站;AE-240S 十万分之一电子天平 (瑞士梅特勒)。

1.2.2 药品与试剂 对照品川楝素购自上海君创生物制品有限公司 (批号: T01023201),乙腈为色谱纯 (Burdick & Jackson),水为纯净水 (杭州娃哈哈集团有限公司出品)。

2 方法与结果

2.1 川楝子指纹谱的方法学

2.1.1 色谱条件 色谱柱: Inertsil ODS-3 C₁₈ (5 μ m, 250 mm $\times$ 4.6 mm) (GL Sciences Inc),保护柱 (Dikma EasyGuard 通用 HPLC 保护柱);流动相为乙腈 (A) 和水 (B) 作梯度洗脱, A: 0 ~ 10 min, 0 ~ 5%; 10 ~ 45 min, 5% ~ 20%; 45 ~ 55 min, 20% ~ 25%; 55 ~ 75 min, 25% ~ 35%; 75 ~ 90 min, 35% ~ 50%。检测波长 270 nm;柱温 25 $^{\circ}$ C;流速: 1.0 mL/min;进样量为 20 μ L。

2.1.2 供试品溶液的制备 取川楝子果实粉末 (过 40 目筛) 5 g,置索氏提取器中,加石油醚 100 mL 加热回流 1 h,

弃石油醚,挥尽溶剂,残渣加甲醇 100 mL 加热回流 4 h,蒸干,残渣加甲醇定容至 10 mL,微孔滤膜 (0.45 μ m) 过滤,即得。

2.1.3 精密度试验 取同一份供试品溶液,连续进样 5 次,对各主要色谱峰保留时间及峰面积进行考察,结果表明保留时间的 RSD 小于 0.08%,峰面积的 RSD 小于 2.0%。

2.1.4 重复性试验 取同一批样品,一式 5 份,按 2.1.2 项下制备,每份样品进样 1 次,对各主要色谱峰保留时间及峰面积进行考察,结果表明保留时间的 RSD 小于 0.8%,峰面积的 RSD 小于 2.0%。

2.1.5 稳定性试验 取同一份供试品溶液,分别于 2、4、8、12、24 h 不同时间间隔点进样分析,对各主要色谱峰保留时间及峰面积进行考察,结果表明保留时间的 RSD 小于 0.5%,峰面积的 RSD 小于 2.2%,结果表明样品溶液在 24 h 稳定。

2.2 川楝子的色谱指纹谱

2.2.1 内参照峰的选择 在本实验色谱条件下,色谱峰较多且密集,选择一个出峰时间居中,各样品中均存在的峰 ($k_r = 43$) 作为内参照峰。

2.2.2 色谱指纹谱的建立 按样品各色谱峰 α 值的大小次序排列,在每个 α 项下标出该组分的相对面积值 (RA) 即组成了样品的数字化色谱指纹谱 (HPLC-FPS)^[5], (见表 1)。

2.2.3 重叠率 重叠率是两个相互比较样品的各自峰数及两者共有峰数基础上,从质的角度上考虑其相关性。将 9 个川楝子样品计算两两之间的峰重叠率,并列组成反映样品间相似性的峰重叠率矩阵,结果显示,9 个样品两两重叠率除 7 号,8 号,9 号三个样品外,其余 6 个样品两两重叠率均在 90% 以上。(见表 2)。

2.2.4 特征指纹的建立 共有峰抓住了生物样品间的共性,这就构成了该生物体所有的指纹,可称其为特征指纹。选取 1 号,3 号,4 号,5 号,6 号药材为基准药材,制备方法如 2.1.2 项,在 2.1.1 项色谱条件下每个样品各进 2 次,统计 10 张色谱图,特征指纹峰的入选条件,80% 以上样品所共有者,特征指纹峰数占总峰数的 70%,得特征指纹谱。

2.2.5 特征指纹的检出率与差异率 检出率为待检药材中的特征指纹峰数与特征指纹峰总数的比值;差异率是以每个特征指纹峰与相应的标准特征指纹峰的面积归一化值间的差与标准特征指纹峰面积归一化值的比值来表示两者间的差异程度,总差异率则是将每个特征指纹峰的差异率求和即得。总差异率越大,表示比较双方相差越大。对各样品的特征指纹的检出率与差异率进行分析,结果见表 3。

表 1 样品的色谱指纹谱

α	0.06	0.08	0.08	0.09	0.23	0.25	0.27	0.30	0.32	0.34	0.42	0.46
1	0.00	0.55	6.11	0.53	0.00	0.00	0.00	0.88	0.38	0.52	17.54	1.64
2	8.38	0.32	3.43	0.00	0.00	0.00	0.51	1.36	0.43	0.48	4.91	1.18
3	4.52	0.40	4.17	0.00	0.00	0.00	0.00	1.59	0.51	0.54	4.69	1.03
4	4.78	0.57	4.28	0.00	0.00	0.00	0.00	1.63	0.42	0.47	8.43	0.47
5	4.58	0.53	2.94	0.00	0.00	0.00	0.00	1.10	0.45	0.00	1.69	1.23
6	8.46	0.39	1.13	0.00	0.00	1.77	1.12	0.72	0.57	0.33	8.03	0.40
7	0.06	0.24	3.43	0.00	0.00	0.00	0.70	16.33	0.25	0.00	0.53	4.38
8	0.08	0.04	0.32	0.00	0.00	0.00	0.00	0.04	0.02	0.01	0.16	0.01
9	0.16	0.64	3.88	0.00	0.49	0.35	0.00	0.14	15.51	0.19	61.58	0.00
共有峰	8.00	9.00	9.00	1.00	1.00	2.00	3.00	9.00	9.00	7.00	9.00	8.00
α	0.48	0.50	0.53	0.56	0.57	0.61	0.63	0.70	0.79	0.81	0.86	0.89
1	0.00	2.01	0.00	0.00	1.79	1.31	1.32	0.00	0.00	1.95	0.46	1.79
2	0.00	3.40	0.00	0.00	4.95	1.56	0.81	0.00	0.00	1.89	0.70	2.62
3	0.00	3.77	0.00	0.00	5.18	0.00	1.63	0.00	0.44	2.33	0.34	2.87
4	0.00	2.79	0.00	0.00	3.71	1.07	1.23	0.00	0.34	1.67	0.40	2.15
5	0.00	5.03	0.00	0.00	3.00	1.08	1.11	0.00	0.00	2.05	0.28	2.46
6	0.00	3.58	0.00	0.00	2.25	1.24	2.13	0.00	0.32	1.59	0.36	1.82
7	0.00	0.88	0.00	0.00	1.27	0.00	0.59	0.00	0.00	0.26	1.66	0.55
8	0.00	0.01	0.00	0.00	0.17	0.02	0.00	0.05	0.00	0.07	0.02	0.02
9	0.81	1.33	1.04	0.13	0.17	0.70	0.39	0.00	0.00	0.28	0.10	0.17
共有峰	1.00	9.00	1.00	1.00	9.00	7.00	8.00	1.00	3.00	9.00	9.00	9.00
α	0.91	0.92	0.95	0.97	1.00	1.03	1.06	1.08	1.11	1.14	1.17	1.18
1	0.76	0.85	0.38	0.44	16.97	0.42	0.00	2.52	5.19	4.83	0.66	0.21
2	0.62	0.74	0.53	0.36	19.08	1.74	0.00	1.19	4.88	2.56	1.00	0.95
3	0.76	0.82	0.45	0.45	23.21	1.12	0.00	1.70	3.69	3.67	0.49	0.94
4	0.57	0.89	0.30	0.52	22.41	0.00	0.00	1.64	3.38	3.75	0.51	0.16
5	0.59	0.66	0.52	0.00	23.01	1.54	0.00	1.55	5.29	6.09	0.25	0.32
6	0.71	0.63	0.54	0.51	14.97	0.30	0.00	1.68	6.60	5.40	0.35	0.54
7	0.55	0.80	0.40	0.13	26.43	0.59	0.00	1.25	5.23	6.36	0.39	0.35
8	0.02	0.02	0.01	0.01	0.56	0.00	0.02	0.04	0.09	0.11	0.03	0.00
9	0.09	0.05	0.24	0.23	4.22	0.00	0.00	0.10	0.82	0.65	0.00	0.13
共有峰	9.00	9.00	9.00	8.00	9.00	6.00	1.00	9.00	9.00	9.00	8.00	8.00
α	1.26	1.29	1.32	1.45	1.53	1.56	1.59	1.63	1.67	1.70	1.76	1.78
1	1.21	1.71	0.71	3.20	2.40	0.59	1.34	7.87	2.96	0.95	0.57	0.48
2	1.68	2.69	0.51	3.99	2.98	0.67	1.47	5.50	4.16	0.85	0.32	0.24
3	1.20	2.08	0.27	3.48	2.67	0.56	1.51	6.45	2.86	1.02	0.29	0.54
4	1.43	3.44	0.39	2.91	2.56	0.82	1.22	6.29	2.98	0.96	0.30	0.66
5	0.98	1.36	0.74	5.92	2.99	0.87	1.53	5.62	3.24	0.71	0.29	0.43
6	1.31	1.68	0.40	7.74	3.86	0.64	1.66	6.34	3.54	0.42	0.26	0.37
7	0.98	1.73	0.00	5.99	2.52	0.54	1.78	5.34	2.50	0.00	0.30	0.60
8	0.09	0.13	0.01	0.05	0.08	0.02	0.05	0.16	0.16	0.04	0.02	0.02
9	0.32	0.61	0.15	0.89	0.39	0.09	0.28	0.88	0.80	0.14	0.11	0.19
共有峰	9.00	9.00	8.00	9.00	9.00	9.00	9.00	9.00	9.00	8.00	9.00	9.00
α	1.85	1.88	1.93	1.95	2.01	2.03	2.06	2.08				
1	0.35	0.62	1.51	1.05	0.20	0.26	0.00	0.00				
2	0.49	0.65	0.56	1.18	0.31	0.36	0.00	0.80				
3	0.41	1.58	0.53	1.54	0.66	0.17	0.37	0.48				
4	0.42	1.78	0.00	1.87	0.55	0.33	1.63	0.92				
5	0.37	2.02	1.22	1.72	0.88	0.00	0.48	1.28				
6	0.45	0.63	0.00	0.75	0.16	0.32	0.65	0.38				
7	0.41	1.00	0.18	0.89	0.50	0.21	0.18	0.73				
8	0.02	0.02	97.10	0.04	0.01	0.02	0.01	0.02				
9	0.08	0.06	0.00	0.22	0.03	0.00	0.03	0.13				
共有峰	9.00	9.00	6.00	9.00	9.00	7.00	7.00	8.00				

表 2 9个样品的两两重叠率

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	100%	-	-	-	-	-	-	-	-
2	95. 60%	100%	-	-	-	-	-	-	-
3	93. 30%	95. 70%	100%	-	-	-	-	-	-
4	92. 10%	94. 50%	96. 70%	100%	-	-	-	-	-
5	91. 90%	94. 40%	94. 40%	93. 20%	100%	-	-	-	-
6	91. 30%	95. 70%	95. 70%	96. 80%	92. 30%	100%	-	-	-
7	89. 60%	94. 40%	94. 40%	90. 90%	93%	92. 30%	100%	-	-
8	89. 90%	92. 30%	92. 30%	93. 30%	90. 90%	90. 30%	88. 60%	100%	-
9	86. 30%	88. 80%	88%	92. 10%	89. 70%	91. 30%	85. 50%	87. 60%	100%

表 3 9个样品的检出率和差异率

	检出率 / %	总差异率 / %
1	84. 60	3. 17
2	97. 40	2. 09
3	89. 70	4. 1
4	94. 80	4. 2
5	84. 60	3. 76
6	89. 70	2. 72
7	92. 30	15. 6
8	87. 10	11. 6
9	89. 70	18. 3

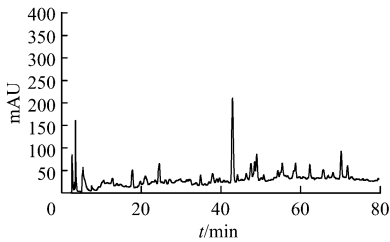


图 1 2号样品 (对照药材) HPLC 色谱图

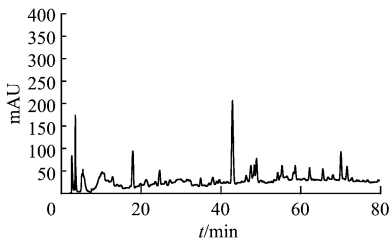


图 2 6号样品 HPLC 色谱图

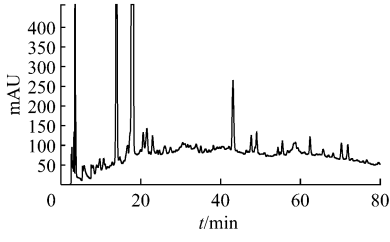


图 3 9号样品 HPLC 色谱图

3 讨论

3.1 流动相的选择 本实验中考察了甲醇-水系统，甲醇-0.5%冰醋酸溶液系统，乙腈-水系统。由各色谱图比较得，甲醇-0.5%冰醋酸溶液系统基线漂移情况严重，乙腈-水系统比甲醇-水系统出峰峰形较好，基线平稳。故选择乙腈-水系统梯度洗脱分离。

3.2 检测波长的选择 在选定的色谱条件下，以DAD检测器得到的三维图谱在不同波长下切割，得到270 nm条件下出峰最多，峰行较好，特征性较强，峰的分离度较好，基线也较平稳，故选择270 nm作为检测波长。

3.3 参照峰的选择 川楝子药材中川楝素是唯一一个有售的标准品，但川楝素在药材中的含量很小，因此选择两两重叠率大于90%的药材作为基准药材统计川楝子特征指纹谱。内参照峰($\alpha = 1$)的选择依据是图谱中每个样品中均存在的，出峰时间居中，含量相对较高的，峰形较好，分离度较好的峰。

3.4 由川楝子色谱指纹谱重叠率，检出率和差异率可知，各样品检出率均在85%以上，总差异率四川5个产地药材总差异率较小，湖北、湖南和云南产地总差异率较大(表3)。四川五个产地的药材与湖北、湖南和云南产地的药材在特征指纹峰的分布上有较大的相似之处，但是在各峰的含量上存在较大的差异，对不同产地的药材正在进行药效实验，以期对川楝子药材进行更客观全面的评价。

参考文献：

[1] 中国药典[S].一部. 2005: 29.
[2] 田文浩,王忠兴,魏乃森. 川楝子对呼吸中枢的抑制作用[J]. 生理学报, 1998, 32(4): 338-342.
[3] 孙毅坤,雷海民,魏宁漪,等. 川楝子挥发油化学成分的GC-MS分析[J]. 中国中药杂志, 2004, 29(4): 475-476.
[4] 钟炽昌,谢晶曦,陈淑凤,等. 川楝素的化学结构[J]. 上海化学学报, 1975, 3(1): 35-47.
[5] 洪筱坤,王智华. 中药数字化色谱指纹谱[M]. 上海:上海科学技术出版社, 2003: 65-108.