

中图分类号: R932; R283.3 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2023)05-0092-05
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2023.05.021



鲜竹沥气相色谱特征图谱建立及不同炮制方法质量评价*

肖小武¹, 刘静佳², 洪挺¹, 付辉政¹, 罗跃华¹, 周志强^{1△}

(1. 江西省药品检验检测研究院·江西省药品与医疗器械质量工程技术研究中心·国家药品监督管理局中成药质量评价重点实验室, 江西南昌 330029; 2. 南昌理工学院, 江西南昌 330044)

摘要:目的 建立鲜竹沥气相色谱特征图谱, 评价不同炮制方法鲜竹沥的质量。方法 色谱柱为 DB-WAX 柱(30 m × 0.32 mm, 0.25 μm), 程序升温, 柱流速为 3.5 mL/min, 进样口温度为 260 °C, 氢火焰离子化检测器温度为 300 °C, 分流比为 50:1。结果 直火灼制法和干馏法的鲜竹沥有共有色谱峰, 相似度为 0.992~0.999; 水蒸气蒸馏法和水煮法的鲜竹沥除溶剂峰外无其他色谱峰。共标定 14 个共有峰, 并指认 6 个特征峰, 其中 4 号峰为愈创木酚, 5 号峰为 4-甲基愈创木酚, 6 号峰为苯酚, 7 号峰为 6-甲基愈创木酚, 8 号峰为对甲基苯酚, 9 号峰为对乙基苯酚。不同基原的鲜竹沥质量无显著差异, 但不同制备工艺的鲜竹沥质量存在显著差异。结论 所建立的方法灵敏快速、操作简便、重复性好, 可用于鲜竹沥的质量评价。

关键词: 鲜竹沥; 气相色谱法; 特征图谱; 质量评价

Establishment of GC Characteristic Chromatogram of Fresh Bamboo Sap and Quality Evaluation of Different Processing Methods

XIAO Xiaowu¹, LIU Jingjia², HONG Ting¹, FU Huizheng¹, LUO Yuehua¹, ZHOU Zhiqiang¹

(1. Jiangxi Institute for Drug Control · Jiangxi Provincial Engineering Research Center for Drug and Medical Device Quality · NMPA Key Laboratory for Quality Evaluation of Traditional Chinese Medicine, Nanchang, Jiangxi, China 330029; 2. Nanchang Institute of Technology, Nanchang, Jiangxi, China 330044)

Abstract: Objective To establish the gas chromatography (GC) characteristic chromatogram of fresh bamboo sap, and to evaluate

* 基金项目: 江西省重大科技研发专项[20223AAG02020]; 江西省科学技术厅重点研发项目[20203BBG73062]; 中国药品监管科学行动计划第二批重点项目[NMPAJGKX-2023-047]; 江西省药品监督管理局科研项目[2020JS04]。

第一作者: 肖小武, 男, 硕士研究生, 主管药师, 研究方向为中药活性成分及质量标准, (电子信箱)342506404@qq.com。

△通信作者: 周志强, 男, 硕士研究生, 主管药师, 研究方向为中药活性成分及质量标准, (电子信箱)648767060@qq.com。

参考文献

- [1] 惠荣, 唐远山, 许磊, 等. 定眩饮治疗后循环缺血性眩晕临床研究[J]. 陕西中医, 2022, 43(2): 204-206.
- [2] 胡兴律, 王向阳, 唐远山, 等. 定眩饮治疗后循环缺血性眩晕随机对照研究[J]. 陕西中医, 2021, 42(10): 1375-1378.
- [3] 田欢, 惠荣, 李环娜, 等. 定眩饮颗粒剂的制备工艺考察[J]. 中国药师, 2022, 25(6): 1072-1076.
- [4] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020.
- [5] 沈敏, 赵雯, 刘敏, 等. 壮腰健身丸质量标准研究[J]. 中国现代中药, 2018, 20(8): 1024-1027.
- [6] 李洋, 陈健, 张越, 等. 基于指纹图谱结合化学模式识别及多成分含量测定的白芍药材质量评价研究[J]. 中草药, 2022, 53(1): 231-237.
- [7] 徐佳新, 许浚, 曹勇, 等. 中药白芍现代研究进展及其质量标志物的预测分析[J]. 中国中药杂志, 2021, 46(21): 5486-5495.
- [8] 金超, 孙璇君, 刘婷婷. 白芍总苷与芍药苷抗衰老作用及其机制研究进展[J]. 医药导报, 2022, 41(3): 355-360.
- [9] 唐国琳, 黄凤, 高天元, 等. HPLC 同时测定宽叶羌活药材中 5 种成分含量[J]. 中药与临床, 2018, 9(6): 14-17.
- [10] 郑东浪. HPLC 法测定羌活中阿魏酸的含量[J]. 海峡药学, 2017, 29(4): 74-76.
- [11] 邢晔忠, 雷明珠. HPLC-CAD 法测定川芎茶调散中绿原酸、阿魏酸、阿魏酸松柏酯、洋川芎内酯 A、Z-藁本内酯、欧前胡素和异欧前胡素[J]. 现代药物与临床, 2021, 36(6): 1138-1143.
- [12] 卢晨娜, 叶潇, 刘晓谦, 等. 当归药材与饮片中 7 种成分含量测定及其物质传递规律研究[J]. 中国中药杂志, 2021, 46(23): 6196-6203.
- [13] 陈志民, 刘建清, 郭莹莹, 等. 川芎促血管舒张有效部位中阿魏酸的含量测定[J]. 中国药业, 2018, 27(7): 11-13.
- [14] 张桂平, 杨荣波, 王平晟. 高效液相色谱-二极管阵列检测法同时测定二冬宁脑丸中橙皮苷、芍药苷及阿魏酸含量[J]. 中国药业, 2019, 28(20): 23-26.
- [15] 张婧秋, 姜明瑞, 岳珠珠, 等. 基于蜜炙甘草性状特征与内在成分含量的相关性研究[J]. 中华中医药学刊, 2022, 40(10): 16-19.
- [16] 樊宝娟, 黄艳, 罗定强, 等. 高效液相色谱法同时测定解郁安神颗粒中甘草苷及甘草酸含量[J]. 中国药业, 2018, 27(4): 13-15.
- [17] 赵准, 季玉林, 吴建明, 等. 高效液相色谱法测定逍遥散片中甘草苷含量[J]. 中国药业, 2019, 28(3): 31-33.

(收稿日期: 2022-06-20; 修回日期: 2022-09-26)

the quality of fresh bamboo sap prepared by different processing methods. **Methods** The chromatographic column was DB - WAX column (30 m × 0.32 mm, 0.25 μm), the temperature was programmed, the column flow rate was 3.5 mL/min, the inlet temperature was 260 °C, the temperature of the hydrogen flame ionization detector was 300 °C, and the split ratio was 50 : 1. **Results** There were common chromatographic peaks for the fresh bamboo sap prepared by the directly burning and the dry distillation methods, with the similarity of 0.992 - 0.999. There was no other chromatographic peak for the fresh bamboo sap prepared by the steam distillation and boiling methods except for the solvent peak. A total of 14 common peaks and six characteristic peaks were identified. Among the characteristic peaks, the peak 4 was guaiacol, the peak 5 was 4 - methylguaiacol, the peak 6 was phenol, the peak 7 was 6 - methoxy - guaiacol, the peak 8 was 4 - methylphenol, and the peak 9 was 4 - ethylphenol. There was no significant difference in the quality of fresh bamboo sap from different producing areas, but there was significant difference in the quality of fresh bamboo sap prepared by the different processing methods. **Conclusion** The established method is sensitive, rapid, simple and repeatable, which can be used for the quality evaluation of fresh bamboo sap.

Key words: fresh bamboo sap; GC; characteristic chromatogram; quality evaluation

鲜竹沥为禾本科刚竹属的数种竹子的鲜杆经加热后自然沥出的液体,具有清热化痰、镇惊利窍功效,主要用于肺热咳嗽痰多、壮热烦渴、小儿痰热惊风等,《本草衍义》称之为痰家之圣剂^[1],主产于江西。截至2022年12月31日,在国家药品监督管理局网站数据中库查询到鲜竹沥单方及复方制剂批准文号43个。其中,鲜竹沥单方制剂文号24个;鲜竹沥复方制剂文号有19个,涉及全国多地区的多家生产企业。鲜竹沥现行质量标准收载于1992年版《中华人民共和国卫生部药品标准 中药材(第一册)》,质量标准仅有性状、酪氨酸薄层色谱鉴别及pH值、总固体、相对密度检查项,不足以全面反映鲜竹沥质量的优劣。鲜竹沥的炮制方法包括传统的直火烧制法、模仿倒悬炭火逼干馏法、直接水煮法、水蒸气蒸馏法等。炮制方法及生产工艺不同,造成不同厂家和同一厂家、不同批次样品的质量存在差异。中药特征图谱是一种综合、可量化的鉴定手段,主要用于评价中药材及其制剂质量的真实性、稳定性、一致性等,中药特征图谱能全面反映中药化学成分的种类和数量,进行整体质量控制、评价和描述^[2-3]。鲜竹沥主要含有酚类、木质素、氨基酸等成分^[4-5],且酚类成分为药效成分^[6-8]。目前,主要集中在单组分酚类、糖、氨基酸等成分的含量测定,未见鲜竹沥特征图谱的相关研究报告^[9-12]。为此,本研究中在前期研究基础上^[13-14]建立了鲜竹沥的气相色谱(GC)法特征图谱的检测方法,并用于评价不同炮制方法鲜竹沥的质量,以全面控制和评价鲜竹沥的质量。现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

8890B型气相色谱仪(美国Agilent公司),配有氢火焰离子化检测器(FID),7693型液体自动进样器,Openlab色谱工作站;BT25S型电子天平(瑞士赛多利斯公司,精度为十万分之一);Milli - Q型超纯水仪(美国Millipore公司)。

1.2 试药

愈创木酚对照品(批号为111510 - 200202,纯度为100.0%),4 - 甲基愈创木酚对照品(批号为AL190815 - 27,纯度为99.98%),苯酚对照品(批号为G181013 - 04,纯度为99.61%),甲基苯酚对照品(批号为G201021 - 05,纯度为99.34%),乙基苯酚对照品(批号为G191026 - 03,纯度为99.41%),6 - 甲氧基愈创木酚对照品(批号为MA190816 - 07,纯度为99.08%),均购于中国食品药品检定研究院;鲜竹沥共19批(编号为S1 - S19),分别来自江西省的上饶、九江、宜春及湖南省的怀化等,竹子基原均经江西省林业科学院竹类研究所余林副研究员鉴定为正品,样品信息见表1。

表1 鲜竹沥样品信息

Tab. 1 Information of fresh bamboo sap samples

编号	产地	竹子基原	炮制方法
S1	湖南怀化	篾竹	直火烧制法
S2	湖南怀化	篾竹	直火烧制法
S3	湖南怀化	篾竹	直火烧制法
S4	江西九江	毛竹	干馏法
S5	江西上饶	毛竹	干馏法
S6	江西上饶	毛竹	干馏法
S7	江西九江	毛竹	直火烧制法
S8	江西九江	毛竹	直火烧制法
S9	江西宜春	毛竹	直火烧制法
S10	江西九江	毛竹	干馏法
S11	江西九江	毛竹	干馏法
S12	江西九江	粉绿竹	干馏法
S13	江西九江	净竹	干馏法
S14	江西宜春	毛竹	水蒸气蒸馏法
S15	江西宜春	毛竹	水蒸气蒸馏法
S16	江西宜春	毛竹	水蒸气蒸馏法
S17	江西宜春	毛竹	水煮法
S18	江西宜春	毛竹	水煮法
S19	江西九江	毛竹	水煮法

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:DB-WAX柱(30 m × 0.32 mm, 0.25 μm); 初始温度:75 ℃;程序升温:以5 ℃/min的速率升至150 ℃、保持0.5 min,再以3 ℃/min的速率升至210 ℃、保持0.5 min;载气:99.999% N₂;柱流速:3.5 mL/min;进样口温度:260 ℃;FID温度:300 ℃;进样量:1 μL;分流比:50:1。

2.2 溶液制备

取6-甲氧基愈创木酚对照品适量,精密称定,用甲醇制成质量浓度为0.03 mg/mL的溶液,即得对照品溶液。精密量取鲜竹沥30 mL,用乙酸乙酯振摇提取3次,每次30 mL,合并乙酸乙酯液,低温旋干,残渣加甲醇溶解并定容至5 mL,即得供试品溶液。

2.3 方法学考察

精密度试验:取样品(编号为S1),按2.2项下方法制备供试品溶液,按2.1项下色谱条件连续进样测定6次,以7号峰6-甲氧基愈创木酚为参照峰,计算各特征峰与参照峰相对保留时间的RSD。结果13个共有特征峰相对保留时间的RSD ≤ 0.01% (n = 6),表明仪器精密度良好。

稳定性试验:取样品(编号为S1),按2.2项下方法制备供试品溶液,分别于0, 4, 8, 12, 16, 24 h时按2.1项下色谱条件进样测定,以7号峰6-甲氧基愈创木酚为参照峰,计算各特征峰与参照峰相对保留时间的RSD。结果13个共有特征峰相对保留时间的RSD ≤ 0.02% (n = 6),峰面积的RSD ≤ 1.5% (n = 6),表明供试品溶液在24 h内稳定性良好。

重复性试验:取(编号为S1)样品,按2.2项下方法制备供试品溶液,平行6份,按2.1项下色谱条件进样

测定,以7号峰6-甲氧基愈创木酚为参照峰,计算各特征峰与参照峰相对保留时间的RSD。结果13个共有特征峰相对保留时间的RSD ≤ 0.02% (n = 6),峰面积的RSD ≤ 2.5% (n = 6),表明方法重复性良好。

耐用性试验:取样品(编号为S1),按2.2项下方法制备供试品溶液,选择不同色谱柱(DB-WAX柱、HP-INNOWAX柱、SH-Rtx-WAX柱)考察方法耐用性,均以7号峰6-甲氧基愈创木酚为参照峰,计算各特征峰与参照峰相对保留时间的RSD。结果13个共有特征峰相对保留时间的RSD ≤ 0.5%,峰面积的RSD ≤ 2.0%,表明方法耐用性良好。

2.4 对照特征图谱建立

取19批(编号为S1-S19)样品,按2.2项下方法制备供试品溶液,按2.1项下色谱条件进样测定,得19批样品的色谱图。可见,直火烧制法和干馏法的样品(编号为S1-S13)有共有色谱峰,而水煮法和水蒸气蒸馏法的样品(编号为S14-S19)除溶剂峰外无其他色谱峰。4种炮制方法的典型色谱图见图1。分别将样品(编号为S1-S13)色谱图导入中药色谱指纹图谱相似度评价系统2012版,剪切0~2 min的溶剂峰,对14个共有峰进行多点校正,采用Mark峰匹配,对照特征图谱叠加指纹图谱见图2。采用中药色谱指纹图谱相似度评价2012版软件对有共有峰的13批(编号为S1-S12)样品的特征图谱进行比较,确定共有特征峰。生成14个共有峰构成的对照特征图谱,其中7号峰6-甲氧基愈创木酚为参照峰,详见图3。

2.5 特征图谱色谱峰确认

取愈创木酚、4-甲基愈创木酚、苯酚、甲基苯酚、乙基苯酚、6-甲氧基愈创木酚对照品各适量,按2.2项下方法制备供试品溶液,按2.1项下色谱条件进样测

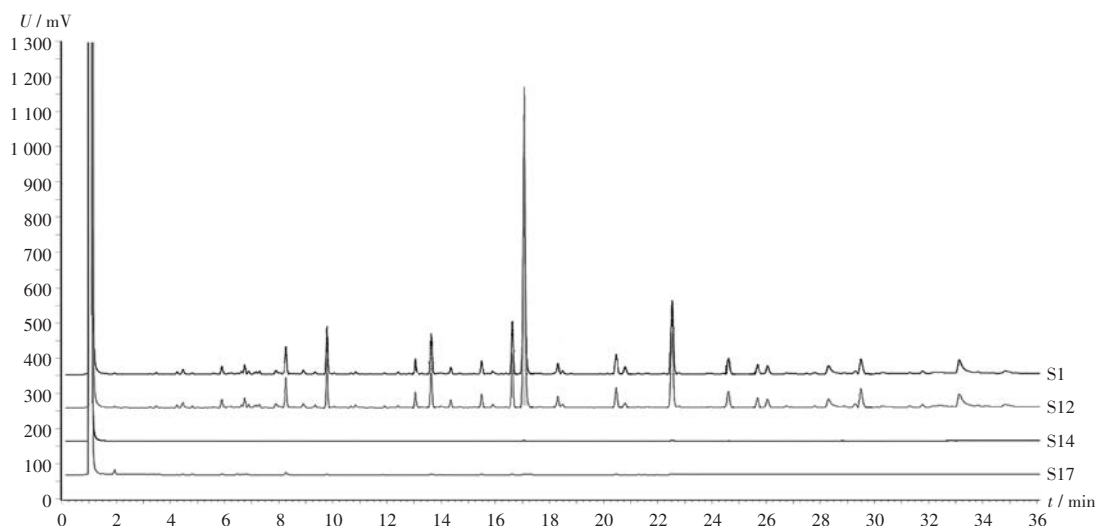


图1 4种炮制方法的典型色谱图

Fig. 1 Typical chromatograms of fresh bamboo sap prepared by the four processing methods

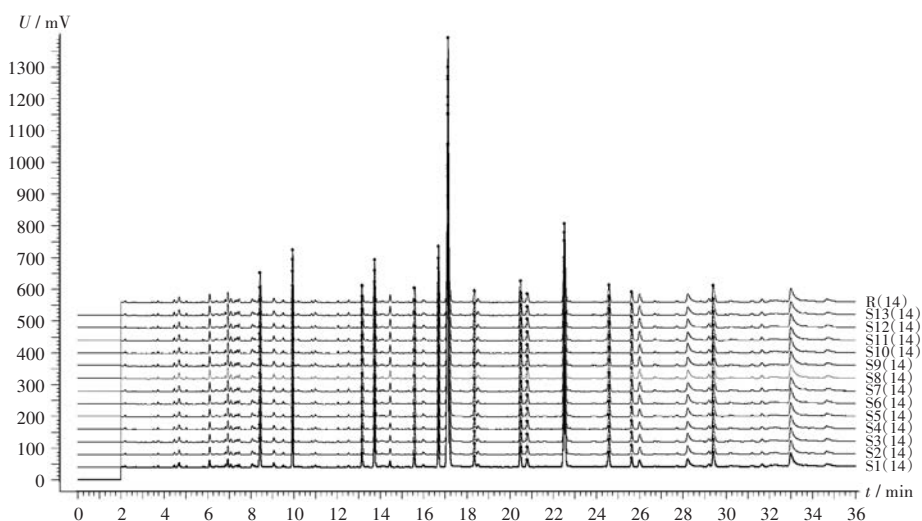


图2 13批鲜竹沥对照特征图谱叠加指纹图谱

Fig. 2 Reference characteristic chromatogram superimposed fingerprint of 13 batches of fresh bamboo sap

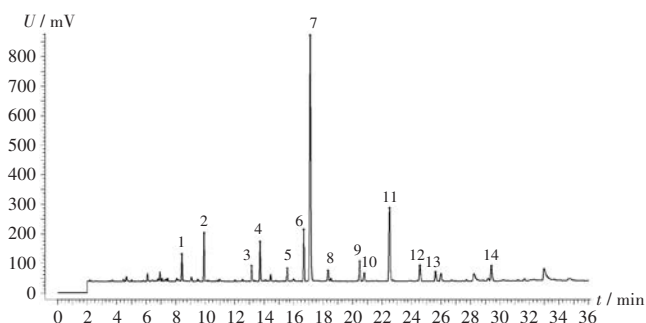


图3 对照特征图谱

Fig. 3 Reference characteristic chromatogram

定,记录色谱图。以保留时间对供试品溶液色谱图的主要色谱峰进行指认,结果见图4。其中,4号峰为愈创木酚,5号峰为4-甲基愈创木酚,6号峰为苯酚,7号峰

为6-甲氧基愈创木酚,8号峰为对甲基苯酚,9号峰为对乙基苯酚。

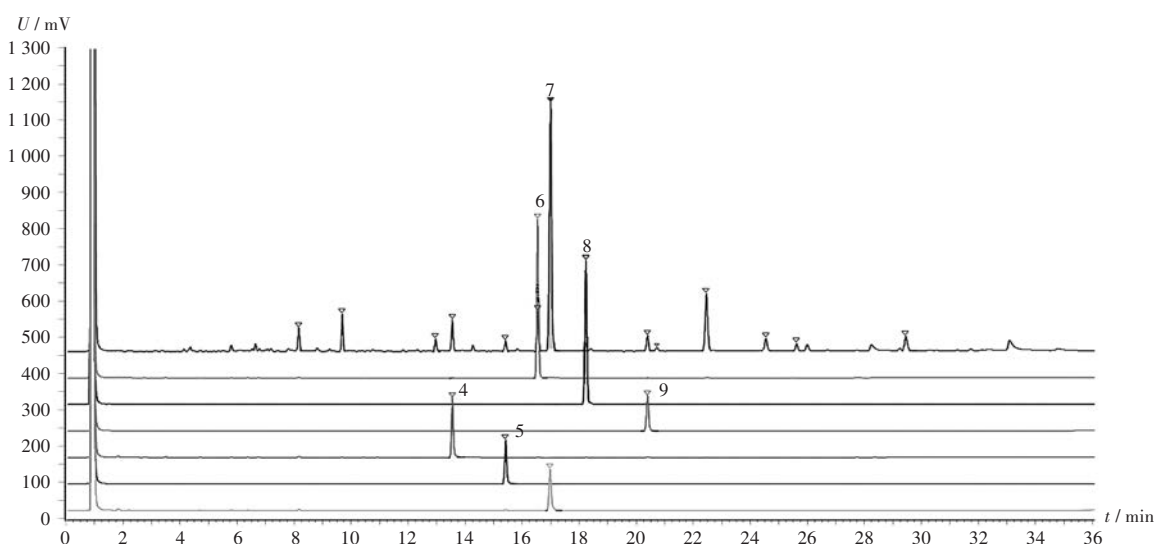
2.6 相似度评价

采用中药色谱指纹图谱相似度评价系统2012版软件对13批样品(编号为S1-S13)的特征图谱与生成的对照特征图谱的相似度进行评价,结果相似度均大于0.990;而水煮法和水蒸气蒸馏法的样品(编号为S14-S19)除溶剂峰外无其他色谱峰,故无法计算相似度。结果见表2。

3 讨论

3.1 提取溶剂选择

曾考察水饱和正丁醇、乙酸乙酯、乙醚3种试剂作



4. 愈创木酚 5. 4-甲基愈创木酚 6. 苯酚 7. 6-甲氧基愈创木酚 8. 对甲基苯酚 9. 对乙基苯酚

图4 对照特征图谱色谱峰指认结果

4. Guaiacol 5. 4-Methylguaiacol 6. Phenol 7. 6-Methoxy-guaiacol 8. 4-Methylphenol 9. 4-Ethylphenol

Fig. 4 Identification of chromatographic peaks of reference characteristic chromatogram

表2 气相色谱特征图谱相似度评价结果

Tab. 2 Results of similarity evaluation of GC characteristic chromatogram

样品	相似度	样品	相似度	样品	相似度
S1	0.994	S6	0.997	S11	0.993
S2	0.993	S7	0.998	S12	0.995
S3	0.997	S8	0.998	S13	0.992
S4	0.992	S9	0.993		
S5	0.999	S10	0.998		

为提取溶剂的提取效果。结果表明,用水饱和的正丁醇提取时的色谱峰明显少于乙酸乙酯和乙醚,不利于样品整体情况的表征,而用乙酸乙酯和乙醚提取时的色谱峰数量相当,考虑到乙醚试剂的安全性及管控性。最终选择乙酸乙酯为提取溶剂。

3.2 色谱柱选择

曾考察 HP-5 弱极性柱、DB-17 中等极性柱、DB-WAX 强极性柱规格相同但固定相不同的毛细管色谱柱。结果 HP-5 柱存在分离效果不佳, DB-WAX 柱因对分析物的色谱吸附能力强,导致大部分色谱峰都集中在 25~30 min 保留时间处出峰,综合各色谱峰的分离度、保留时间分布分离度,最终选择 DB-WAX 柱。

3.3 升温程序及分流比选择

考察了多种色谱柱程序升温及分流比,按拟订色谱条件,各色谱峰分离均大于 1.5,色谱峰峰形对称且 14 个共有特征峰保留时间分布较平均,其他条件下存在色谱峰分离度不达标或峰形不对称等现象。

3.4 图谱特征

目前,鲜竹沥的生产工艺较粗放,且大部分工艺参数是通过人工控制或经验判断,导致其特征峰峰面积相差较大。故建立了鲜竹沥的特征图谱进行质量控制和评价。

3.5 方法评价

由图 2 可知,干馏法和直火烧制法均有 14 个共有色谱峰,其中大部分指认为酚类成分,而水蒸气蒸馏法和水煮法均不含上述酚类化合物。酚类成分是鲜竹沥止咳化痰的有效成分。研究报道,禾本科植物竹子中含有大量木质素^[15],且木质素在高温下裂解成苯酚类对羟基苯基(H)型、愈创木酚类的愈创木基(G)型、6-甲氧基愈创木酚类紫香丁(S)型及 3-甲氧基邻苯二酚类邻苯二酚(C)型不同类型酚类成分^[16-18],上述酚类化合物跟特征图谱指认峰的结构相吻合。可见,直接烧制法与干馏法均可将竹子中的木质素裂解,而水煮法和水蒸气蒸馏法的温度达不

到木质素裂解成酚类化合物的温度。按现行标准规定,鲜竹沥为经直接加热自然沥出的液体,故可认为水煮法和水蒸气蒸馏法制备的非自然沥出的液体为鲜竹沥的非法制备工艺。建议采用特征图谱对不同制备工艺制备的鲜竹沥进行质量评价,以及对非法工艺进行区分。

参考文献

- [1] 南京中医药大学. 中药大辞典[M]. 上海:上海科学技术出版社,1999:182.
- [2] 陈静. 新型指纹图谱技术在中药分析中的应用进展[J]. 黑龙江科学,2021,12(6):38-39.
- [3] 赵娟,谢世静,赵兴华,等. 中药指纹图谱质控方法研究进展[J]. 云南中医中药杂志,2020,41(4):82-86.
- [4] 徐诗军,万娜,伍振峰,等. 鲜竹沥的本草考证与现代研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2021,27(4):196-204.
- [5] 冯绘敏,胡云飞,曾茜焱,等. 鲜竹沥化学成分及质量控制方法研究进展[J]. 中国中药杂志,2021,46(11):2753-2759.
- [6] 姚金龙,付辉政,罗跃华,等. 鲜竹沥的化学成分及其对枸橼酸致豚鼠咳嗽的研究[J]. 南昌大学学报(医学版),2019,59(6):9-17.
- [7] 蔡华芳. 鲜竹沥镇咳祛痰作用的实验研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2007,13(5):43-44.
- [8] 张雨恬,伍振峰,黄艺,等. 基于网络药理学与分子对接技术的鲜竹沥治疗“咳、喘、痰”机制及其质量标志物预测分析[J]. 中草药,2021,52(24):7538-7549.
- [9] 陈碧莲,祝明,周冯秋. 高效毛细管气相色谱法测定鲜竹沥中愈创木酚的含量[J]. 中成药,2010,8(6):482-485.
- [10] 熊艳,吴学文,蒋孟良. HPLC 测定鲜竹沥口服液中愈创木酚的含量[J]. 中国中药杂志,2007,32(8):747-748.
- [11] 刘绪平. 同时测定中药鲜竹沥中的多种止咳化痰活性成分的方法:CN111398507A[P]. 2020-07-10.
- [12] 赵雯,洪挺,游媛,等. HPLC-ELSD 同时测定鲜竹沥中单糖双糖的含量[J]. 中国现代中药,2020,22(3):423-426.
- [13] 肖小武,刘静佳,周志强,等. GC-MS 法同时测定复方鲜竹沥液中 8 个酚类有效成分[J]. 中国现代应用药学,2022,39(6):788-793.
- [14] 肖小武,周志强,易路遥,等. GC-MS 法分析不同基原、炮制方法制备的鲜竹沥中成分[J]. 中药材,2021,44(11):2634-2639.
- [15] 周厚德,刘玉环,阮榕生,等常压醋酸法分离毛竹木质素[J]. 林业科学,2011,47(10):154-159.
- [16] 邵鲁鹏. 工业木质素热化学转化制备芳香化学品的研究[D]. 北京:北京林业大学,2018.
- [17] 邹容格. 微波条件下催化毛竹木质素与油脂热解制备芳香化合物[D]. 南昌:南昌大学,2019.
- [18] 傅泽武. 愈创木酚及木质素的热解研究[D]. 北京:北京林业大学,2020.

(收稿日期:2022-04-26;修回日期:2023-01-20)