

中图分类号: R917; R927 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2024)14-0084-03  
doi: 10.3969/j.issn.1006-4931.2024.14.020



## 炒榧子仁高效液相色谱特征图谱研究\*

李翠华, 单梦, 侯金良, 李正国<sup>△</sup>

(山东省济宁市食品药品检验检测研究院, 山东 济宁 272000)

**摘要:**目的 建立炒榧子仁的高效液相色谱(HPLC)特征图谱。方法 色谱柱为 Thermo Hypersil Gold C<sub>18</sub> 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-0.1% 磷酸水溶液(梯度洗脱), 流速为 1.0 mL/min, 检测波长为 203 nm, 柱温为 30 °C, 进样量为 10 μL。建立 13 批药材饮片样品的 HPLC 特征图谱, 采用中药色谱指纹图谱相似度评价软件(2012 版)进行相似度评价, 确定特征峰, 并指认共有峰。结果 确定了 7 个特征峰, 其相对保留时间的 RSD 均小于 1%, 相对峰面积的 RSD 为 7.31%~70.45%; 指认了其中 2 个, 分别为亚油酸和油酸; 13 批药材饮片样品的相似度为 0.827~0.990(仅 2 批低于 0.900)。结论 该方法操作简便、可行, 结果稳定、准确, 有助于完善各地炒榧子仁饮片的炮制规范, 提高其质量标准。

**关键词:**炒榧子仁; 高效液相色谱法; 特征图谱; 产地; 炮制; 质量控制

### HPLC Characteristic Chromatograms of *Torreyae Semen Tostum*

LI Cuihua, SHAN Meng, HOU Jinliang, LI Zhengguo

(Jining Institute for Food and Drug Control, Jining, Shandong, China 272000)

**Abstract: Objective** To establish a high-performance liquid chromatography (HPLC) characteristic chromatograms of *Torreyae Semen Tostum*. **Methods** The chromatographic column was the Thermo Hypersil Gold C<sub>18</sub> column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was acetonitrile - 0.1% phosphoric acid aqueous solution (gradient elution), the flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelength was 203 nm, the column temperature was 30 °C, and the injection volume was in the range of 10 μL. The HPLC characteristic chromatograms of 13 batches of medicinal material decoction pieces were established, the Similarity Evaluation Software for Chromatographic Fingerprint of Traditional Chinese Medicine (2012 Version) was used for similarity evaluation, the characteristic peaks were marked and the common peaks were identified. **Results** Seven characteristic peaks were marked, the RSDs of relative retention time were lower than 1%, and the RSDs of relative peak area were in the range of 7.31% - 70.45%. Two of them were identified, namely linoleic acid and oleic acid. The similarity of 13 batches of medicinal material decoction pieces was in the range of 0.827 - 0.990, with only two batches below 0.900. **Conclusion** This method is simple, feasible, stable and accurate, which can help to improve the processing specifications and quality standards of *Torreyae Semen Tostum* Decoction Pieces in various producing areas.

**Key words:** *Torreyae Semen Tostum*; HPLC; characteristic chromatogram; producing area; processing; quality control

炒榧子仁为红豆杉科植物榧 *Torreyae grandis* Fort. 干燥成熟种子的炮制加工品, 为榧子去壳取仁后炒焦(带焦斑), 放凉所得<sup>[1]</sup>。其性平味甘, 有杀虫消积、润肺止咳、润燥通便功效, 主治钩虫病、蛔虫病、绦虫病、虫积腹痛、小儿疳积、肺燥咳嗽、大便秘结<sup>[2]</sup>。系统研究证明, 榧子的营养成分有蛋白质(13%), 油脂(60%, 其中超 80% 为不饱和脂肪酸), 氨基酸(19 种, 其中人体必需氨基酸占 30%), 维生素(维生素 D<sub>3</sub>、维生素 E、烟酸、叶酸含量高), 矿物元素(19 种, 钾、磷、钙、镁含量丰富, 其中钾含量 1.0%), 糖、淀粉等<sup>[3-7]</sup>。研究表明, 榧子不同部位富含成分不同, 药理活性也有差异<sup>[7-13]</sup>。榧子仁提取物中的不饱和脂肪酸对动脉粥样硬化有明显预防作用; 榧子枝叶和肉质假种皮中的紫杉醇和多种黄酮类

化合物有抗病毒、抗肿瘤活性; 榧子壳含大量烯类挥发油, 有抑菌活性。目前, 市场上榧子的产地较多, 而各地炮制规范<sup>[1, 14-15]</sup>中对榧子或炒榧子仁仅进行了常规定性检验, 均未收载榧子或炒榧子仁的特征图谱, 难以全面反映饮片的整体质量。为此, 本研究中采用高效液相色谱(HPLC)法建立了炒榧子仁的特征图谱, 以为其质量控制和临床安全用药提供参考。现报道如下。

#### 1 仪器与试剂

LC-2030C 3D 型高效液相色谱仪(日本 Shimadzu 公司); XS205DU 型电子分析天平(瑞士 Mettler Toledo 公司, 精度为 0.01 mg); SH8200LHC 型超声波清洗器(上海科导超声仪器有限公司)。亚油酸对照品(批号为 111622-201704, 含量 99.8%), 油酸对照品(批号为

\*基金项目: 山东省中药材及饮片标准研究课题[2020-025]。

第一作者: 李翠华, 女, 硕士, 主管药师, 研究方向为中药质量分析, (电子信箱)1016565984@qq.com。

<sup>△</sup>通信作者: 李正国, 男, 博士, 主任药师, 研究方向为中药质量分析, (电子信箱)lzgwh123@sina.com。

111621 - 201707, 含量 99.9%), 均购自中国食品药品检定研究院。13批药材饮片, 7批为榧子仁药材[产自湖北恩施(批号分别为 20200609, 20200608, 20200607, 编号为 S1, S2, S6), 浙江东阳(批号为 20201101, 编号为 S5), 浙江诸暨(批号分别为 20201012, 20200914, 20200820, 编号为 S7, S9, S11)], 按 2020 年版《中国药典(四部)》及《山东省中药饮片炮制规范》(2012 年版)方法, 委托山东嘉泰中药饮片有限公司炒制; 6批为炒榧子仁饮片[产自浙江嵊州(批号分别为 20201104, 20201103, 20201102, 20200508, 编号为 S4, S8, S10, S12), 安徽黄山(批号为 20200610, 编号为 S3), 浙江磐安(批号为 20200604, 编号为 S13)]。乙腈、甲醇、磷酸均为色谱纯, 其余试剂均为分析纯, 水为娃哈哈纯净水。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

色谱柱: Thermo Hypersil Gold C<sub>18</sub> 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈(A) - 0.1% 磷酸水溶液(B), 梯度洗脱(0 ~ 55 min 时 45%A → 100%A, 55 ~ 78 min 时 100%A, 78 ~ 79 min 时 100%A → 45%A, 79 ~ 105 min 时 45%A); 流速: 1.0 mL/min; 检测波长: 203 nm; 柱温: 30 °C; 进样量: 10 μL。

### 2.2 溶液制备

取亚油酸对照品、油酸对照品各适量, 精密称定, 加甲醇制成每 1 mL 各含 0.15 mg 和 0.05 mg 的混合溶液, 摇匀, 经 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得混合对照品溶液。取药材饮片样品, 粉碎, 取约 1 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 25 mL, 称定质量, 超声(功率 500 W、频率 53 kHz, 下同)处理 60 min, 放冷, 再称定质量, 用甲醇补足减少的质量, 摇匀, 经 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得供试品溶液。

### 2.3 方法学考察

精密密度试验: 取供试品溶液(批号为 20201103)适

量, 按 2.1 项下色谱条件连续进样测定 6 次, 以 1 号峰(亚油酸)为参照峰, 记录相对保留时间和相对峰面积。结果 7 个特征峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均小于 1%(n = 6), 表明方法精密度良好。

稳定性试验: 取供试品溶液(批号为 20201103)适量, 按 2.1 项下色谱条件进样测定 1 次, 共 6 次, 以 1 号峰(亚油酸)为参照峰, 记录相对保留时间和相对峰面积。结果 7 个特征峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均小于 1%(n = 6), 表明供试品溶液在室温下放置 10.5 h 内基本稳定。

重复性试验: 取同一批(批号为 20201103)样品, 按 2.2 项下方法平行制备供试品溶液 6 份, 按 2.1 项下色谱条件进样测定, 以 1 号峰(亚油酸)为参照峰, 记录相对保留时间和相对峰面积。结果 7 个特征峰相对保留时间的 RSD 均小于 1%(n = 6), 相对峰面积的 RSD 均小于 3%(n = 6), 表明方法重复性较好。

### 2.4 特征图谱建立与相似度评价

特征图谱建立: 以取 13 批药材饮片样品, 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, 将所得数据导入国家药典委员会“中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件(2012 版)”, 得 13 批药材饮片样品的叠加指纹图谱(见图 1)及对照指纹图谱(见图 2), 结果确定 11 个共有峰。通过与混合对照品溶液色谱图(图 3)比对, 鉴定了 2 个共有峰, 其中 1 号峰为亚油酸, 3 号峰为油酸。选择 1 号峰(亚油酸)为参照峰。根据 13 批样品中各共有峰的峰面积大小及各色谱峰的分离度, 确定了 7 个特征峰。各特征峰相对保留时间的 RSD 为 0 ~ 0.07%, 相对峰面积的 RSD 为 7.31% ~ 70.45%。

相似度评价: 采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件(2012 版)”计算 13 批样品的相似度。结果样品 S1 - S13 相似度分别为 0.990, 0.989, 0.976, 0.958, 0.968, 0.990, 0.989, 0.977, 0.948, 0.938, 0.877, 0.929, 0.827(仅 2 批低于 0.900)。

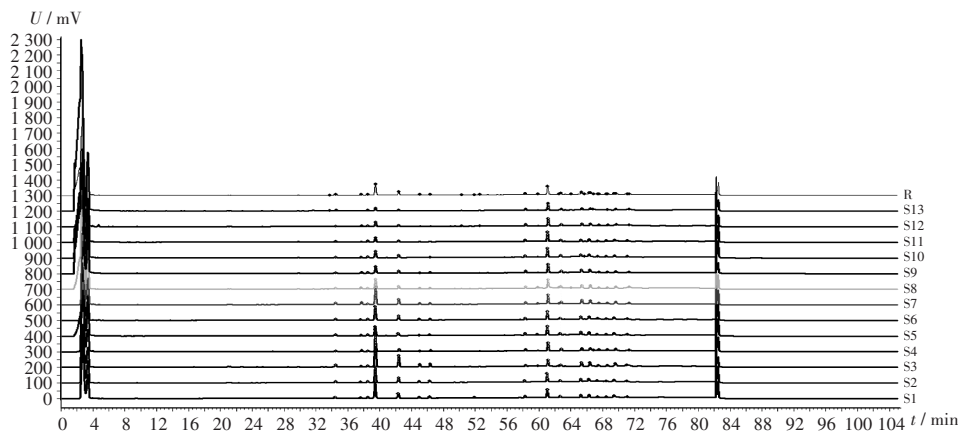


图 1 13 批炒榧子仁的高效液相色谱叠加指纹图谱

Fig. 1 HPLC superimposed fingerprint of 13 batches of Torreyae Semen Tostum

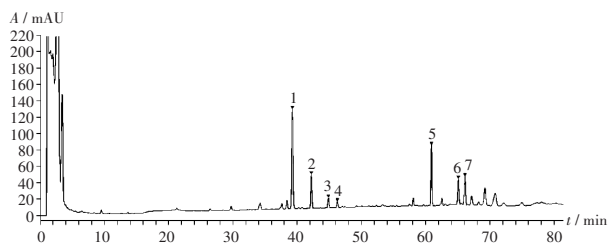
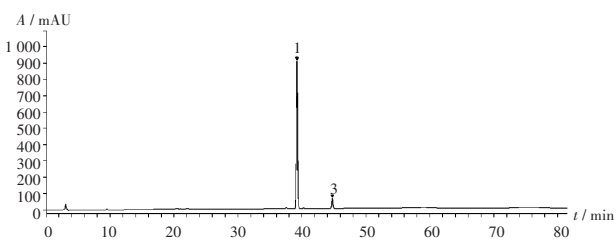


图2 药材饮片样品的高效液相色谱对照指纹图谱

Fig. 2 HPLC reference fingerprint of medicinal material decoction pieces



1. 亚油酸 3. 油酸

1. Linoleic acid 2. Oleic acid

图3 混合对照品的高效液相色谱图

Fig. 3 HPLC chromatograms of mixed reference

### 3 讨论

#### 3.1 特征图谱确定

以亚油酸和油酸作为参照物。供试品图谱中应呈现7个特征峰,其中2个峰应与相应参照峰保留时间相同;以亚油酸峰为参照峰,计算特征峰2-7的相对保留时间,应在规定值[分别为1.07(峰2)、1.14(峰3)、1.17(峰4)、1.55(峰5)、1.66(峰6)、1.68(峰7)]的 $\pm 5\%$ 之内。结果均符合要求。

#### 3.2 提取方法与提取条件考察

预试验中,提取溶剂分别考察了不同体积分数的甲醇(50%,60%,70%,80%,90%,100%),结果以100%甲醇为溶剂时提取效果最好。提取方式考察了加热回流提取法和超声提取法,提取时间为1h,提取效果基本相同。但考虑炒榧子仁粉碎后黏度较大,加热回流提取不易分散,故采用超声提取。取样量分别考察了2.0,1.0,0.5g,加甲醇25mL,超声处理60min,结果3种取样量均可得到相应的特征图谱。

#### 3.3 色谱条件优化

预试验中,分别考察了Hypersil Gold C<sub>18</sub>柱、Agilent Zorbax SB-C<sub>18</sub>柱、Symmetry shield™ C<sub>18</sub>柱和Kromasil 100-5 C<sub>18</sub>柱(规格均为250mm×4.6mm,5μm)。结果以Hypersil Gold C<sub>18</sub>柱分离效果最好,色谱峰出峰时间较短,故选择。并选用二极管阵列检测器,分别检测203,205,210,215,220,230,250,270nm波长处的响应值,结果203nm波长处的响应值最高。柱温分别考察了25,30,35℃,结果特征图谱无明显差异,最后选择了30℃。流动相分别考察了乙腈-水,乙腈-0.1%磷酸

水溶液洗脱系统,均可对供试品溶液进行有效分离,且乙腈-0.1%磷酸水溶液洗脱系统对不同色谱柱适应性更佳。

#### 3.4 方法评价

本研究中13批炒榧子仁的特征图谱基本一致,但不同产地不同批次的炒榧子仁饮片的不同组分峰的强度存在一定差异,分析发现这可能与榧子仁的产地及炮制工艺有关。本研究中通过建立炒榧子仁特征图谱研究其中的相似性与差异性<sup>[16-17]</sup>,为药材饮片的质量评价提供了参考。

#### 参考文献

- [1] 山东省食品药品监督管理局. 山东省中药饮片炮制规范[M]. 济南:山东科学技术出版社,2012:710.
- [2] 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,2020:380-381.
- [3] 严晓素,陈红星,喻卫武. 香榧——中国特有的珍稀干果树种[J]. 浙江林业,2022(12):24-25.
- [4] 贾姗姗. 不同品种榧树化学成分分析及生物活性研究[D]. 杭州:浙江农林大学,2016.
- [5] 周炳江,李靖,马长乐,等. 基于广泛代谢组学的云南榧子营养成分分析[J]. 食品研究与开发,2020,41(12):42-46.
- [6] 黎章矩,骆成方,程建,等. 香榧种子成分分析及营养评价[J]. 浙江林学院学报,2005,22(5):540-544.
- [7] 张露,刘鹏飞,涂宗财,等. 香榧不同部位提取物的抗氧化和酶抑制活性比较分析[J]. 食品科学,2018,39(10):78-83.
- [8] 王向阳,修丽丽. 香榧的营养和功能成分综述[J]. 食品研究与开发,2005,26(2):20-22.
- [9] 肖庆来,曾松伟,黎章矩,等. 香榧研究现状与展望[J]. 浙江林业科技,2014,34(3):93-97.
- [10] 阙斐,张星海,赵粼. 香榧籽油的超临界萃取及其脂肪酸组成的比较分析研究[J]. 中国粮油学报,2013,28(2):33-36.
- [11] 于勇杰,吴帆,李彪,等. 香榧假种皮提取物的提取工艺及其主要成分分析[J]. 中国食品学报,2015,15(3):97-104.
- [12] 何宛燕,陈雨欣,于勇杰,等. 香榧假种皮提取物的体外抗氧化活性研究[J]. 中国野生植物资源,2015,34(6):1-4.
- [13] 刘冰冰,李颖,樊佳祺,等. 香榧假种皮醇提物抑制植物病原菌活性及乳油制备初步研究[J]. 湖北农业科学,2015,54(2):349-354.
- [14] 湖北省药品监督管理局. 湖北省中药饮片炮制规范[M]. 武汉:中国医药科技出版社,2018:420.
- [15] 上海市药品监督管理局. 上海市中药饮片炮制规范[M]. 上海:上海科学技术出版社,2018:297.
- [16] 王永洁,陈桎,邓莉莉,等. 基于质量源于设计理念的红花颗粒制备工艺及物理指纹图谱研究[J]. 中草药,2019,50(17):4123-4130.
- [17] 秦雯,巴寅颖,张兰珍,等. 不同产地夏枯草药材 HPLC 特征图谱[J]. 中华中医药杂志,2012,27(5):1418-1420.

(收稿日期:2023-07-17;修回日期:2023-12-13)