

## 苦杏仁不同炮制品 HPLC 指纹图谱的比较

王均秀<sup>1</sup>, 张学兰<sup>1\*</sup>, 王秋红<sup>2</sup>, 李慧芬<sup>1</sup>, 赵鑫<sup>1</sup>, 宋梦晗<sup>1</sup>  
(1. 山东中医药大学, 济南 250355; 2. 济南市国医堂医院, 济南 250355)

**[摘要]** **目的:**建立具有生、制品个性特点的苦杏仁不同炮制品 HPLC 指纹图谱分析方法,为该药材的应用提供参考依据。**方法:**苦杏仁、燀苦杏仁、炒苦杏仁 3 种炮制品分别加 50% 甲醇超声提取,采用 HPLC 测定,流动相乙腈-0.1% 磷酸水溶液梯度洗脱,流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>,进样量 20 μL,柱温 25 ℃,检测波长 225 nm,比较苦杏仁不同炮制品的 HPLC 指纹图谱差异。**结果:**生苦杏仁指纹图谱与燀苦杏仁、炒苦杏仁指纹图谱有明显差异,而燀苦杏仁与炒苦杏仁指纹图谱较为相似。燀苦杏仁、炒苦杏仁色谱图与苦杏仁色谱图相比,缺失了 5 号峰(野黑樱苷)和 6 号峰,在保留时间 22 min 处增加一个新色谱峰 a;8 号峰的峰面积显著降低,4 号峰的峰面积显著升高,1,2,3,7 号峰的峰面积降低,但无明显变化。**结论:**建立的方法可用于苦杏仁不同炮制品的指纹图谱测定,苦杏仁经燀制和炒制后 HPLC 指纹图谱发生明显变化,为完善苦杏仁饮片的质量标准提供科学依据。苦杏仁苷水解后可能分解为 5 号峰(野黑樱苷),6 号峰和 8 号峰。

**[关键词]** 苦杏仁; 炮制品; 指纹图谱; 野黑樱苷; 苦杏仁苷; 炒制; 燀制

**[中图分类号]** R283.1;R284.1;R943.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)06-0032-03

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2017060032

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20161228.1110.010.html>

**[网络出版时间]** 2016-12-28 11:10

## Comparison on HPLC Fingerprints of Different Processed Products of Armeniaca Semen Amarum

WANG Jun-xiu<sup>1</sup>, ZHANG Xue-lan<sup>1\*</sup>, WANG Qiu-hong<sup>2</sup>, LI Hui-fen<sup>1</sup>, ZHAO Xin<sup>1</sup>, SONG Meng-han<sup>1</sup>  
(1. Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Ji'nan 250355, China;  
2. Ji'nan Guoyitang Hospital, Ji'nan 250355, China)

**[Abstract]** **Objective:** To set up the HPLC fingerprint chromatograms analytical methods of different processed products of Armeniaca Semen Amarum with the personality characteristics. **Method:** 50% Methanol was used for ultrasonic extraction of three processed products of Armeniaca Semen Amarum. HPLC was employed with mobile phase of acetonitrile-0.1% phosphoric acid water solution for gradient elution, the column temperature at 25 ℃, the detection wavelength at 225 nm, the flow rate of 1.0 mL·min<sup>-1</sup>. HPLC fingerprint differences of different processed products of Armeniaca Semen Amarum were compared. **Result:** There were significant differences in fingerprints between crude products and processed products, but fingerprints of blazed processed products and stir-fried products were relatively similar. **Conclusion:** This established method can be used for determining fingerprint chromatograms of different processed products of Armeniaca Semen Amarum. HPLC fingerprints have changed significantly after being processed.

**[Key words]** Armeniaca Semen Amarum; processed products; fingerprint; prunasin; amygdalin; stir-frying; blazed

**[收稿日期]** 20160906(015)

**[基金项目]** 国家科技基础性工作专项(2014FY111100-8);国家公共卫生专项(2015)

**[第一作者]** 王均秀,在读硕士,从事中药炮制与中药新药研发研究,Tel:18364165863,E-mail:972893348@qq.com

**[通讯作者]** \*张学兰,博士生导师,教授,从事中药炮制与中药新药研发研究,Tel:13406062766,E-mail:zhang8832440@sina.com

苦杏仁具有降气止咳平喘、润肠通便的功效<sup>[1]</sup>。历代对苦杏仁的炮制方法主要有去皮尖炒、麸炒、蛤粉炒等,现代主要采用焯制、炒制等。苦杏仁性微温,生用有小毒,剂量过大或使用不当易中毒。经焯制或炒制后可降低毒性,保证用药安全。苦杏仁经焯制后可增强润肺止咳功效。炒苦杏仁性温,长于温肺散寒<sup>[2]</sup>。研究表明苦杏仁主要含有苦杏仁苷和脂肪油,还含有苦杏仁酶、蛋白质、氨基酸等<sup>[3-5]</sup>。苦杏仁苷为苦杏仁止咳平喘的有效成分<sup>[6]</sup>,但是该成分性质不稳定,在一定温度和湿度条件下,易被共存的苦杏仁酶水解,生成野黑樱苷,野黑樱苷在樱叶酶的作用下生成扁桃腈,再分解生成苯甲醛和氢氰酸<sup>[2]</sup>。小剂量的氢氰酸对呼吸中枢有镇静作用,大剂量则会发生中毒。若大量口服生杏仁,在苦杏仁酶的作用下,可迅速分解生成大量的氢氰酸而导致中毒。苦杏仁经加热炮制后,酶被破坏,利于苦杏仁苷的保存,且使苦杏仁苷在体内胃酸作用下,缓缓分解,产生适量的氢氰酸,起镇咳平喘作用而不致引起中毒<sup>[2]</sup>。

《中国药典》2015年版收载了苦杏仁、焯苦杏仁和炒苦杏仁3种炮制规格,但焯苦杏仁和炒苦杏仁均缺乏客观的工艺技术参数,实际生产中难以掌握。孙飞等<sup>[7]</sup>以苦杏仁苷含量和灭酶程度为指标,通过正交试验优选苦杏仁的焯制工艺,结果得最佳焯制工艺为加10倍量水焯制10 min。《中国药典》2015年版对苦杏仁不同炮制品的质量标准除性状及苦杏仁苷含量要求不同外,其余要求均完全一致,饮片的质量标准缺乏专属性,不利于苦杏仁生、制品的鉴别。

目前已有研究建立了苦杏仁和炒苦杏仁的HPLC指纹图谱分析方法<sup>[8-11]</sup>,但焯苦杏仁饮片的指纹图谱研究未见报道,且缺乏具有生、制品个性特点的苦杏仁饮片指纹图谱分析方法,苦杏仁不同炮制品指纹图谱有何差异也未见报道。故本实验将苦杏仁生品、焯品和炒品分别以50%甲醇超声提取,采用HPLC测定其指纹图谱差异,比较苦杏仁炮制前后HPLC指纹图谱差异变化,旨在证明苦杏仁炮制前后化学成分发生了质变与量变,确定苦杏仁炮制前后质变与量变的特征性成分。

## 1 材料

L-2000型高效液相色谱仪(日本日立公司),MS105DU型1/10万电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司),LD-T100A型高速万能粉碎机(上海顶帅电器有限公司)。苦杏仁原药材由本实验室人员亲自采摘,产地为河北省邯郸市涉县鹿头乡木口村,本品

经河北省邯郸市药品检验所孔增科主任药师鉴定为蔷薇科植物山杏 *Prunus armeniaca* var. *ansu* 的干燥成熟种子;苦杏仁苷对照品(中国食品药品检定研究院,批号110802-200403,纯度98%),野黑樱苷对照品(上海源叶生物科技有限公司,批号X03N6L5404,纯度96%),水为纯净水,乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

### 2.1 炮制品的制备

**2.1.1 苦杏仁** 取原药材,筛去皮屑杂质,捡净残留的核壳及褐色颗粒,粉碎,过24目筛,即得。

**2.1.2 焯苦杏仁<sup>[7]</sup>** 取净苦杏仁,置10倍量沸水中,煮沸10 min,捞出,稍浸凉水,搓去种皮,取种仁,置烘箱内60℃烘干,放凉,粉碎,过24目筛,即得。

**2.1.3 炒苦杏仁<sup>[1]</sup>** 取净焯苦杏仁,置锅内,用文火炒至微黄色,略带焦斑,有香气,取出,放凉,粉碎,过24目筛,即得。

**2.2 混合对照品溶液的制备** 精密称取苦杏仁苷、野黑樱苷对照品1.05,0.54 g,置同一1 mL量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,制成苦杏仁苷、野黑樱苷质量浓度分别为1.05,0.54 g·L<sup>-1</sup>的混合对照品溶液。

**2.3 供试品溶液的制备** 取苦杏仁不同炮制品粉末约0.2 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,加入50%甲醇20 mL,密塞,称定质量,超声提取30 min,放冷,称定质量,用50%甲醇补足减失的质量,摇匀,过滤,取续滤液,经0.45 μm微孔滤膜滤过,即得。

**2.4 色谱条件** Kromasil C<sub>18</sub>色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈(A)-0.1%磷酸水溶液(B)梯度洗脱(0~10 min, 5%~20% A; 10~35 min, 20%~35% A; 35~40 min, 35%~40% A; 40~41 min, 40%~41% A; 41~46 min, 41% A; 46~52 min, 41%~42% A),流速1.0 mL·min<sup>-1</sup>,进样量20 μL,柱温25℃,检测波长225 nm。

### 2.5 方法学考察

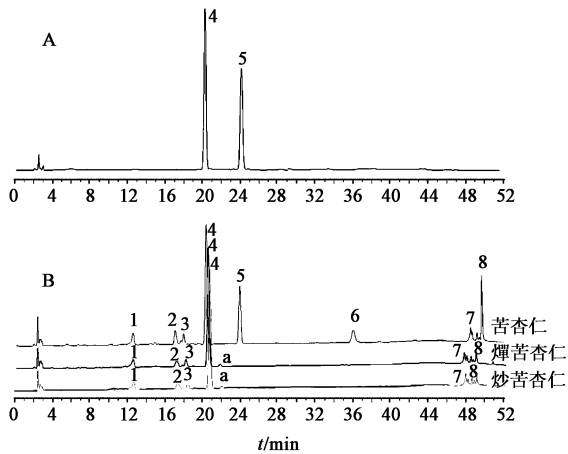
**2.5.1 精密度试验** 取苦杏仁粉末0.2 g,精密称定,按2.3项下方法制备供试品溶液,按2.4项下色谱条件连续测定6次,记录色谱图,以苦杏仁苷为参照峰,计算主要色谱峰的相对保留时间RSD均<3.0%,相对峰面积的RSD均<3.5%。

**2.5.2 稳定性试验** 精密称定,取苦杏仁粉末0.2 g,按2.3项下方法制备供试品溶液,室温放置,分别于0,2,4,8,12 h按2.4项下条件测定,记录色谱图,以苦杏仁苷为参照峰,计算主要色谱峰的相对保留

时间 RSD 均 <3.0%, 相对峰面积的 RSD 均 <3.5%。

**2.5.3 重复性试验** 取同一苦杏仁样品粉末称取 6 份, 按 2.3 项下方法制备供试品溶液, 按 2.4 项下条件测定, 记录色谱图, 以苦杏仁苷为参照峰, 计算各主要色谱峰的相对保留时间 RSD 均 <3.0%, 相对峰面积 RSD 均 <3.5%。

**2.6 苦杏仁不同炮制品 HPLC 指纹图谱的比较** 分别精密吸取混合对照品溶液及苦杏仁、焯苦杏仁、炒苦杏仁供试品溶液各 20  $\mu$ L, 按 2.4 项下色谱条件测定, 见图 1。通过对苦杏仁不同炮制品供试品溶液的 HPLC 指纹图谱分析, 结果显示苦杏仁色谱图共检出 8 个主要色谱峰, 焯苦杏仁与炒苦杏仁色谱图均共检出 7 个主要色谱峰, 其中 1~4, 7, 8 号峰为苦杏仁、焯苦杏仁、炒苦杏仁共有峰。与混合对照品色谱图比较可知, 4 号峰为苦杏仁苷, 5 号峰为野黑樱苷。焯苦杏仁、炒苦杏仁色谱图与苦杏仁色谱图相比, 缺失了 5 号峰(野黑樱苷)和 6 号峰, 在保留时间 22 min 处增加一个新色谱峰 a; 8 号峰的峰面积显著降低, 4 号峰的峰面积显著升高, 1, 2, 3, 7 号峰的峰面积降低, 但无明显变化。通过比较焯苦杏仁、炒苦杏仁色谱图与苦杏仁色谱图, 结果表明苦杏仁苷水解后可能分解为 5 号峰(野黑樱苷), 6 号峰和 8 号峰。



A. 混合对照品; B. 供试品; 4. 苦杏仁苷; 5. 野黑樱苷

图 1 苦杏仁不同炮制品的 HPLC

Fig. 1 HPLC chromatograms of different processed products of Armeniaca Semen Amarum

### 3 讨论

通过对苦杏仁不同炮制品的 HPLC 指纹图谱比较分析, 发现苦杏仁 HPLC 指纹图谱与焯苦杏仁、炒苦杏仁 HPLC 指纹图谱色谱峰数目和峰面积均有明显差异, 而炒苦杏仁与焯苦杏仁 HPLC 指纹图谱较相似。焯苦杏仁、炒苦杏仁色谱图与苦杏仁色谱图相比, 缺少了野黑樱苷, 说明苦杏仁炮制后达到了杀

酶保苷的目的, 苦杏仁苷得以保存, 并可以作为鉴别苦杏仁生、制品个性特点的依据。

本文加 50% 甲醇超声提取苦杏仁各炮制品, 并以 HPLC 指纹图谱对苦杏仁不同炮制品进行比较, 结果发现苦杏仁生、制品指纹图谱之间具有明显差异, 可对苦杏仁生、制品的鉴别提供依据。以野黑樱苷为对照品, 通过 HPLC 指纹图谱对苦杏仁不同炮制品进行比较, 确定了野黑樱苷在 HPLC 指纹图谱的出峰时间, 为苦杏仁生、制品之间的鉴别增加了一个定性指标。为确定最佳检测波长, 采用 Agilent 1100 系列 DAD 检测器对样品进行全波长扫描, 其有效成分苦杏仁苷和野黑樱苷在 210 nm 左右有最大吸收波长, 综合考虑已知有效成分的紫外吸收范围, 根据 3D-plot 图谱, 样品在 225 nm 处色谱峰数目较多, 峰形较好, 基线较平稳, 故最终选择检测波长 225 nm。

本实验对供试品提取溶剂进行了考察, 苦杏仁分别用甲醇, 50% 甲醇, 70% 甲醇超声提取 30 min, 结果显示 50% 甲醇提取的供试品溶液中色谱峰较多, 且基线较稳定。对供试品的提取方法进行考察, 分别对超声提取 30 min, 回流提取 2 h, 冷浸 12 h 共 3 种提取方法进行考察, 结果超声法提取的色谱峰较多, 多数色谱峰峰面积较大, 基线较平稳, 超声法提取时间较短, 且操作简单, 故选择超声法提取。

### 【参考文献】

- [1] 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, 2015: 201-202.
- [2] 龚千峰. 中药炮制学[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2012: 365-367.
- [3] 江苏新医学院. 中药大辞典[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1985: 1100-1103.
- [4] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999: 93-99.
- [5] 李科友, 史清华, 朱海兰, 等. 苦杏仁化学成分的研究[J]. 西北林学院学报, 2004, 19(2): 124-126.
- [6] 利仕伟. 杏仁的加工炮制及现代药理研究[J]. 内蒙古中医药, 2014, 33(1): 84.
- [7] 孙飞, 王晓清, 别甜甜, 等. 正交试验优选苦杏仁的焯制工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(1): 28-30.
- [8] 崔淑艳. 苦杏仁的品种整理和质量研究[D]. 石家庄: 河北医科大学, 2010.
- [9] 吕琴. 苦杏仁液相色谱指纹图谱研究[D]. 长沙: 中南大学, 2012.
- [10] 魏惠珍, 王信, 王跃生, 等. 炒苦杏仁饮片指纹图谱研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(8): 71-74.
- [11] 董自亮, 徐瑞超, 官柳, 等. 苦杏仁指纹图谱的建立及质量评价[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(11): 60-63.

【责任编辑 刘德文】