

白术及其麸炒品的HPLC指纹图谱比较研究

杨彦华^{1*}, 沈晓庆¹, 赵文龙¹, 贾天柱^{1,2#} (1. 辽宁中医药大学药学院, 辽宁 大连 116600; 2. 辽宁省中药炮制工程技术研究中心, 辽宁 大连 116600)

中图分类号 R284.1; R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)23-2172-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.23.21

摘要 目的: 建立白术及其麸炒品的指纹图谱, 并比较不同产地白术及其麸炒品指纹特征的差异。方法: 采用高效液相色谱法。色谱柱为 Diamonsil C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-水 (梯度洗脱), 检测波长为 242 nm, 柱温为 28 ℃, 流速为 0.8 ml/min, 分析时间为 100 min。结果: 在选定的色谱条件下建立了白术生品指纹图谱的共有模式; 对比白术麸炒品与生品的指纹图谱, 两者基本一致, 相似度均在 0.9 以上, 但各成分间的相对含量有差异; 23 个共有指纹峰中, 6、10、3 号峰分别鉴定为白术内酯 I、白术内酯 II、白术内酯 III。结论: 所建立的指纹图谱具有很好的精密度、重复性和稳定性, 可作为白术及其炮制品质量评价的依据。

关键词 白术; 麸炒白术; 高效液相色谱法; 指纹图谱

Comparison of HPLC Fingerprint between *Atractylodes macrocephala* and Stir-baked *Atractylodes macrocephala* with Bran

YANG Yan-hua¹, SHEN Xiao-qing¹, ZHAO Wen-long¹, JIA Tian-zhu^{1,2} (1. School of Pharmacy, Liaoning University of TCM, Liaoning Dalian 116600, China; 2. Chinese Materia Medica Processing Engineering Center of Liaoning Province, Liaoning Dalian 116600, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To develop fingerprint of *Atractylodes macrocephala* and stir-baked *Atractylodes macrocephala* with bran, and to compare the difference of fingerprint between them. METHODS: HPLC method was adopted. The determination was performed on Diamonsil C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) column with mobile phase consisted of acetonitrile-water (gradient elution) at the flow rate of 0.8 ml/min. The detection wavelength was set at 242 nm, and the column temperature was 28 ℃. The analytic time was 100 min. RESULTS: Under the above chromatographic conditions, the mutual mode of HPLC fingerprints was set up for *Atractylodes macrocephala*; stir-baked *Atractylodes macrocephala* with bran had a similar fingerprint chromatogram to crude drug (similarity > 0.9), but there was a little difference in their content; among 23 common peaks, No. 6, 10 and 3 peaks were identified as atractylenolide I, II, III. CONCLUSIONS: Established fingerprint is in good precision, reproducibility and stability, which can be used as evidence for quality evaluation of *Atractylodes macrocephala* and processed product.

KEY WORDS *Atractylodes macrocephala*; Stir-baked *Atractylodes macrocephala* with bran; HPLC; Fingerprint

白术为菊科植物白术 *Atractylodes macrocephala* Koidz. 的干燥根茎, 主产于浙江、安徽、湖北、湖南等省。其味甘、苦, 性温, 具有健脾益气、燥湿利水、止汗、安胎的功效^[1]。白术生用燥性较强, 为降低其燥性, 增强其健脾作用, 常用麦麸炒制。白术中主要含有挥发油、内酯类成分^[2]、多糖^[3]和氨基酸^[4]等。关于生白术高效液相色谱 (HPLC) 指纹图谱的研究已有报道^[5-6], 但白术麸炒品及其与生品对比的 HPLC 指纹图谱尚未有人研究。为了比较白术与其炮制品的差异, 寻找实用的白术及其炮制品质量控制的方法, 笔者对不同产地的白术药材及其麸炒品的成分进行了指纹图谱分析, 并对其中白术内酯 I、II、III 进行了归属, 为白术及其炮制品的质量评价提供依据。

1 材料

1.1 仪器

* 硕士研究生。研究方向: 中药炮制。电话: 0411-87586116。
E-mail: 284725221@qq.com
通信作者: 教授。研究方向: 中药炮制。电话: 0411-87586499。
E-mail: jiatianzhu51@yahoo.com.cn

LC-20AT HPLC 仪, 含 SPD-M20A 二极管阵列检测器 (DAD)、LC-20AB 泵、CTO-20A 柱温箱、SIL-20A 自动进样器、CBM-20A 数据转换器及 LC-Solution 色谱数据工作站 (日本岛津公司); 100 克手提式高速万能粉碎机 (温岭市林大机械有限公司); FA1004 电子天平 (上海精密科学仪器有限公司); AE240 十万分之一分析天平 (瑞士 Mettler Toledo 公司); KQ-250DB 数控超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司, 功率: 250 W, 频率: 40 kHz)。

1.2 试剂

白术内酯 I、白术内酯 II、白术内酯 III 对照品 (四川省维克奇生物科技有限公司, 批号均为 111127, 纯度均 ≥ 98%); 水为娃哈哈纯净水, 甲醇、乙腈均为色谱纯, 其余试剂均为分析纯。

1.3 药材

10 批生白术分别购自浙江、安徽、河北、湖北等地 (来源见表 1), 经辽宁中医药大学王冰教授鉴定为白术 *A. macrocephala* Koidz. 的干燥根茎。

2 方法与结果

表1 11批样品药材的来源

Tab 1 Source of 11 batches of samples

来源地/批号	样品编号	类别	来源地/批号	样品编号	类别
河北祁州/111102	S1	白术片	安徽/111021	S6	白术片
	S1'	麸炒白术片		S6'	麸炒白术片
河北行唐/111012	S2	白术片	浙江/111018	S7	白术片
	S2'	麸炒白术片		S7'	麸炒白术片
河北安国/111014	S3	白术片	浙江/111121	S8	白术片
	S3'	麸炒白术片		S8'	麸炒白术片
山东烟台/111123	S4	白术片	南京/111021	S9	白术片
	S4'	麸炒白术片		S9'	麸炒白术片
安徽/111016	S5	白术片	湖北/111127	S10	白术片
	S5'	麸炒白术片		S10'	麸炒白术片

2.1 对照品溶液的制备

精密称取白术内酯Ⅰ、白术内酯Ⅱ、白术内酯Ⅲ对照品各适量,分别置于10 ml量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,作为对照品贮备液。分别精密吸取3种对照品贮备液各1 ml,置于同一10 ml量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,即得每1 ml含白术内酯Ⅰ0.256 mg、白术内酯Ⅱ0.102 mg、白术内酯Ⅲ0.216 mg的混合对照品溶液。混合对照品的HPLC图见图1。

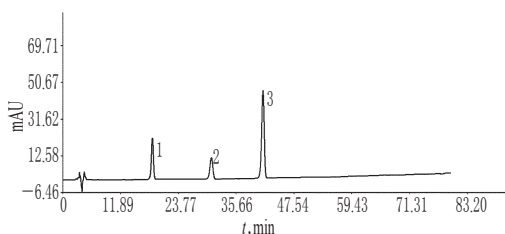


图1 混合对照品的HPLC图

1.白术内酯Ⅲ;2.白术内酯Ⅰ;3.白术内酯Ⅱ

Fig 1 HPLC chromatograms of mixed control

1. atractylenolide Ⅲ; 2. atractylenolide Ⅰ; 3. atractylenolide Ⅱ

2.2 供试品溶液的制备

精密称取白术生品或麸炒品的药材粗粉各约5 g,置于锥形瓶中,精密加入甲醇25 ml,密塞,称质量,超声30 min后放冷,再称质量,用甲醇补足减失的质量。滤过,滤液转移至50 ml量瓶中,用甲醇稀释至刻度,过0.45 μm微孔滤膜,即得2种样品的供试品溶液。

2.3 色谱条件的选择

2.3.1 检测波长的选择 精密吸取S8号样品的供试品溶液进样,得200~400 nm波长范围内的DAD扫描图谱。结果发现,白术内酯Ⅰ、白术内酯Ⅲ在220 nm,白术内酯Ⅱ在276 nm波长处吸收最强,但该两处波长下色谱信息较少;在242 nm波长处色谱信息最丰富,特征最为明显,图谱中各指纹峰信号较强,分离效果较好。故选择242 nm作为检测波长。

2.3.2 分析时间的考察 吸取S8号样品的供试品溶液20 μl注入HPLC仪,运行120 min,记录色谱图。结果发现,100 min以后已无明显色谱峰,故分析时间定为100 min。

2.3.3 色谱条件 色谱柱:Diamondsil C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈(A)-水(B),梯度洗脱(0~5 min, 49% A; >5~15 min, 49%→54% A; >15~30 min, 54%→55% A; >30~45 min, 55%→65% A; >45~55 min, 65%→66.8% A; >55~60 min, 66.8%→68% A; >60~65 min, 68%→70% A; >65~75 min, 70%→80% A; >75~82 min, 80%→85% A; >82~87 min, 85%→90% A; >87~100 min, 90%→95% A);流

速:0.8 ml/min;柱温:28 ℃;检测波长:242 nm;进样量:20 μl。

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度试验 取S8号样品粉末适量,精密称定,按“2.2”项下方法制备供试品溶液,重复进样6次,记录色谱图。结果,各主要色谱峰相对保留时间和相对峰面积的比值无明显变化,其RSD分别小于0.512%和1.324%,表明本方法精密度良好,符合指纹图谱技术要求。

2.4.2 稳定性试验 取S8号样品的供试品溶液适量,分别于0、2、4、8、10、12、24 h进样测定,记录色谱图。结果,各主要色谱峰相对保留时间和相对峰面积的比值无明显变化,其RSD分别小于0.598%和1.450%,表明供试品溶液在24 h内稳定性良好,符合指纹图谱技术要求。

2.4.3 重复性试验 取S8号样品粉末适量,共6份,精密称定,分别按“2.2”项下方法制备供试品溶液,照上述色谱条件进样测定,记录色谱图。结果,各主要色谱峰相对保留时间和相对峰面积的比值无明显变化,其RSD分别小于0.498%和1.343%,表明本方法重复性良好,符合指纹图谱技术要求。

2.5 指纹图谱的建立与技术参数

2.5.1 指纹图谱的建立 按“2.2”项下方法操作,分别制备10批白术生品和10批白术麸炒品的供试品溶液,各取20 μl进样,记录色谱图。分别把10批白术生品和麸炒品的指纹图谱导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2004A版)软件,对保留时间0~100 min内的色谱峰进行多点校正后自动匹配,生成10批白术生品的HPLC指纹图谱(图2)、10批白术麸炒品(S1~S10)与生品(S11)共有模式的HPLC指纹图谱(图3)。

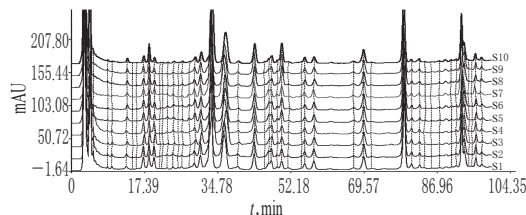


图2 10批白术生品的HPLC指纹图谱

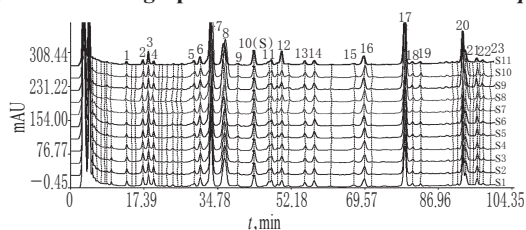
Fig 2 HPLC fingerprints of 10 batches of *A. macrocephala*

图3 10批白术麸炒品与生品共有模式的HPLC指纹图谱

Fig 3 Mutual mode of HPLC fingerprints of 10 batches of stir-baked *A. macrocephala* with bran and crude drugs

2.5.2 共有指纹峰的标定 通过比较10批白术生品的HPLC指纹图谱的检测结果,分离出30个色谱峰,经相似度计算选定其中23个共有的色谱峰为共有指纹峰,经对照品定性,3、6、10号色谱峰分别鉴定为白术内酯Ⅲ、白术内酯Ⅰ、白术内酯Ⅱ。其中,白术内酯Ⅱ分离度好、出峰时间适中且峰面积较稳定,因此选其为参照峰,标为S。

10批白术生品指纹图谱共有峰的相对保留时间和相对峰面积分别见表2、表3。表中结果表明,10批白术生品样品基本均一、稳定。

2.5.3 指纹图谱相似度计算 采用国家药典委员会发布的

表2 10批白术生品指纹图谱共有峰的相对保留时间
Tab 2 Relative retention time of common peaks of 10 batches of *A. macrocephala* in HPLC fingerprints

峰号	样品编号										平均值
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	
1	0.300	0.301	0.304	0.300	0.304	0.305	0.305	0.304	0.305	0.306	0.303
2	0.393	0.393	0.397	0.393	0.394	0.394	0.395	0.395	0.394	0.396	0.394
3	0.424	0.425	0.427	0.424	0.425	0.425	0.428	0.425	0.424	0.425	0.425
4	0.452	0.452	0.456	0.452	0.453	0.453	0.454	0.453	0.452	0.454	0.453
5	0.672	0.672	0.677	0.673	0.674	0.675	0.673	0.674	0.674	0.676	0.674
6	0.706	0.706	0.710	0.706	0.707	0.708	0.706	0.707	0.707	0.709	0.707
7	0.763	0.763	0.771	0.765	0.767	0.768	0.761	0.766	0.765	0.769	0.766
8	0.835	0.835	0.844	0.836	0.839	0.840	0.833	0.837	0.836	0.841	0.838
9	0.909	0.910	0.913	0.911	0.911	0.911	0.909	0.911	0.911	0.912	0.911
10	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
11	1.126	1.126	1.124	1.125	1.126	1.126	1.125	1.126	1.127	1.125	1.125
12	1.151	1.151	1.147	1.150	1.149	1.149	1.152	1.150	1.150	1.147	1.149
13	1.276	1.276	1.273	1.275	1.275	1.275	1.276	1.275	1.277	1.272	1.275
14	1.327	1.327	1.323	1.326	1.326	1.325	1.326	1.326	1.328	1.323	1.326
15	1.545	1.544	1.539	1.542	1.544	1.542	1.543	1.542	1.543	1.538	1.542
16	1.600	1.600	1.594	1.597	1.598	1.597	1.602	1.598	1.600	1.593	1.598
17	1.823	1.824	1.809	1.819	1.816	1.816	1.828	1.818	1.820	1.810	1.818
18	1.864	1.866	1.849	1.860	1.857	1.857	1.872	1.859	1.861	1.851	1.860
19	1.908	1.910	1.892	1.904	1.900	1.899	1.917	1.903	1.904	1.893	1.903
20	2.140	2.143	2.119	2.136	2.128	2.128	2.153	2.133	2.134	2.121	2.134
21	2.155	2.158	2.133	2.151	2.142	2.142	2.167	2.147	2.148	2.135	2.148
22	2.218	2.221	2.195	2.213	2.204	2.204	2.232	2.210	2.210	2.210	2.212
23	2.250	2.254	2.227	2.246	2.236	2.236	2.264	2.242	2.242	2.229	2.243

表3 10批白术生品指纹图谱共有峰的相对峰面积
Tab 3 Relative peak area of common peaks of 10 batches of *A. macrocephala* in HPLC fingerprints

峰号	样品编号										平均值
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	
1	0.169	0.187	0.145	0.241	0.197	0.192	0.181	0.189	0.304	0.149	0.195
2	0.591	0.499	0.418	0.436	0.320	0.461	0.410	0.259	0.396	0.257	0.405
3	0.712	0.632	0.529	0.502	0.650	0.848	0.907	0.618	0.721	0.623	0.674
4	0.562	0.486	0.447	0.396	0.206	0.287	0.439	0.186	0.267	0.187	0.346
5	0.359	0.369	0.349	0.292	0.446	0.681	0.530	0.286	0.313	0.367	0.399
6	0.820	0.838	0.689	0.622	0.626	0.793	0.755	0.563	0.601	0.555	0.686
7	5.471	5.782	4.856	4.123	4.808	5.063	5.149	3.778	3.807	3.768	4.660
8	3.258	3.476	2.903	2.521	2.944	3.092	3.083	2.263	2.295	2.256	2.809
9	0.190	0.167	0.235	0.214	0.109	0.109	0.118	0.129	0.128	0.125	0.152
10	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
11	0.154	0.155	0.142	0.131	0.207	0.211	0.210	0.130	0.129	0.135	0.160
12	0.460	0.482	0.402	0.352	0.640	0.642	0.648	0.913	0.916	0.929	0.638
13	0.314	0.327	0.281	0.230	0.278	0.285	0.282	0.237	0.247	0.246	0.273
14	0.522	0.535	0.463	0.383	0.473	0.466	0.466	0.329	0.326	0.321	0.428
15	0.133	0.147	0.118	0.100	0.187	0.191	0.213	0.106	0.113	0.149	0.146
16	0.843	0.907	0.728	0.613	1.019	1.017	1.029	0.696	0.710	0.753	0.831
17	3.715	3.986	3.201	2.683	3.647	3.655	3.688	3.073	3.057	3.064	3.377
18	0.291	0.309	0.253	0.215	0.178	0.175	0.165	0.170	0.163	0.135	0.205
19	0.217	0.226	0.147	0.147	0.176	0.194	0.211	0.168	0.172	0.188	0.185
20	1.810	1.933	1.573	1.299	1.688	1.673	1.682	1.685	1.660	1.669	1.667
21	0.794	0.870	0.644	0.577	0.808	0.745	0.765	0.705	0.695	0.676	0.728
22	0.483	0.524	0.408	0.344	0.360	0.379	0.383	0.286	0.293	0.272	0.373
23	0.179	0.197	0.148	0.126	0.172	0.184	0.187	0.164	0.162	0.164	0.168

“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2004A版)软件计算均值相似度。结果,10批白术生品指纹图谱的相似度分别为

0.993、0.982、0.981、0.955、0.952、0.959、0.978、0.985、0.981、0.976,表明不同产地白术生品的成分含量存在一定差异;10批白术麸炒品指纹图谱的相似度分别为0.966、0.965、0.995、0.985、0.973、0.975、0.935、0.989、0.967、0.987,表明不同产地白术麸炒品的成分含量存在一定差异。10批白术麸炒品与生品共有模式指纹图谱比较的相似度均在0.9以上,结合图3表明麸炒品与生品所含化学成分基本一致,只是含量上有一定的差异。

3 讨论

3.1 流动相比例的确定

笔者考察了以甲醇-水、甲醇-磷酸水、乙腈-水系统作为流动相的试验结果,发现用乙腈-水系统作流动相梯度洗脱时,色谱峰信息量丰富,各色谱峰分离度较好、保留时间适中、峰形较好,故确定该洗脱系统为流动相。

3.2 白术生品与麸炒品指纹图谱的比较

白术生品中的23个共有色谱峰,在白术麸炒品中均可检测到,但生品中多数色谱峰的信号强度低于麸炒品,表明白术麸炒品与生品化学成分的种类没有很大的差别,但是含量存在一定的差异。例如,白术麸炒品中内酯类成分的含量高于生品。有文献报道内酯类成分有健脾的作用^[7-8],麸炒可使白术中的苍术酮转化为内酯类成分^[2],增加了内酯类成分的含量,增强了白术健脾的作用,符合白术传统炮制理论。

3.3 小结

本试验采用梯度洗脱的方法使白术各成分得到较好的分离,利用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2004A版)软件标定出23个共有峰,其中3、6、10号色谱峰分别鉴定为白术内酯Ⅲ、白术内酯Ⅰ、白术内酯Ⅱ。有文献报道内酯类成分是白术药理作用的有效成分^[2,5-6],且炮制对其含量的影响较为明显,可以作为白术及其炮制品质量评价的标准。

本试验还建立了白术生品指纹图谱的共有模式,10批样品之间的相似度均在0.9以上,说明样品间整体出峰相似,以这些样品建立共有模式较为可靠。本试验所建立的指纹图谱具有很好的精密性、重复性和稳定性,可用于白术及其麸炒品的质量控制。

参考文献

[1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2010年版.北京:中国医药科技出版社,2010:95.
[2] 郝延军.白术的炮制原理研究[D].大连:辽宁中医药大学,2006.
[3] 池玉梅,李伟,文红梅,等.白术多糖的分离纯化和化学结构研究[J].中药材,2001,24(9):647.
[4] 王志奇,袁谨,李昉,等.野生植物灰叶堇菜、白术中氨基酸含量分析[J].氨基酸和生物资源,2004,26(2):77.
[5] 寿旦,章建民,俞忠明.白术高效液相色谱指纹图谱的建立及在品种鉴定与种源差异分析中的应用[J].中华中医药学刊,2009,27(10):2158.
[6] 黎琼红,马兴田,谢晨,等.白术药材的指纹图谱研究[J].中草药,2007,38(6):929.
[7] 郝延军,桑育黎,贾天柱,等.白术内酯Ⅰ及白术内酯Ⅲ对唾液淀粉酶活性的影响[J].时珍国医国药,2006,17(9):1617.
[8] 李伟,文红梅,朱荃.白术提取液及成分对唾液淀粉酶活性的影响[J].时珍国医国药,2006,17(11):2123.

(收稿日期:2012-08-12 修回日期:2012-10-23)