

· 药剂与炮制 ·

枳实制白术的炮制工艺优选及 HPLC 特征图谱分析

王芳¹, 于欢¹, 李凤琴¹, 张帅杰², 刘怀伟², 代良敏³, 李艳^{1*}, 杨明^{1*}
(1. 江西中医药大学, 南昌 330004; 2. 成都百草和济科技有限公司, 成都 611137;
3. 西南医科大学附属医院, 四川 泸州 646000)

[摘要] 目的:探讨枳实制白术的最佳炮制工艺,建立其 HPLC 特征图谱。方法:采用“脾虚泄泻”免疫力低下动物模型和大鼠饮水量来评价枳实制白术的健脾祛燥作用;通过对比不同配比枳实制白术饮片的健脾祛燥作用,筛选枳实与白术的最佳配比;采用正交试验,以辛弗林和白术内酯Ⅲ的含量为评价指标,优选枳实制白术的炮制工艺,并建立其特征图谱。结果:10%枳实制白术组的效果最佳。枳实制白术饮片炮制过程中,影响辛弗林及白术内酯Ⅲ的主次因素依次为烘制温度>炒制温度>炒制时间,最佳炮制工艺为取生白术饮片 100 g,加入枳实汁 50 mL(生药质量浓度 0.2 g·mL⁻¹),浸泡 24 h,不时翻动,直至汁尽药透,于 110 ℃炒制 6 min,取出,于 40 ℃烘箱干燥。枳实制白术有 5 个共有峰,均能达到较好分离,该分析方法具有良好的精密性、重复性和稳定性,符合特征图谱相关要求。结论:药汁制是中药炮制的重要组成部分,枳实制白术的健脾祛燥作用充分体现了这一炮制特色——增效,纠正偏性。建立的 HPLC 特征图谱方法准确、可靠,为枳实制白术的质量控制提供了参考。

[关键词] 枳实;白术;白术内酯Ⅲ;辛弗林;药汁制;健脾祛燥

[中图分类号] R22;R283;R284;R943.1;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)17-0006-08

[doi] 10.13422/j.cnki.sjfx.20181604

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180523.1711.025.html>

[网络出版时间] 2018-05-24 16:47

Optimization of Processing Technology of *Atractylodis Macrocephalae* Rhizoma Processed with *Aurantii Fructus Immaturus* and Analysis of Its HPLC Fingerprint

WANG Fang¹, YU Huan¹, LI Feng-qin¹, ZHANG Shuai-jie², LIU Huai-wei²,
DAI Liang-min³, LI Yan^{1*}, YANG Ming^{1*}
(1. *Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China;*
2. *Chengdu Baicao Heji Technology Co. Ltd., Chengdu 611137, China;*
3. *The Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000, China*)

[Abstract] **Objective:** To optimize processing technology of *Atractylodis Macrocephalae* Rhizoma processed with *Aurantii Fructus Immaturus* and establish its HPLC fingerprint. **Method:** The invigorating spleen and dispelling dryness of *Atractylodis Macrocephalae* Rhizoma processed with *Aurantii Fructus Immaturus* was investigated by model rats with splenasthenic diarrhea, and then the best ratio of *Atractylodis Macrocephalae* Rhizoma and *Aurantii Fructus Immaturus* was screened. Taking overall desirability of contents of synephrine and atractylenolide III as index, orthogonal test was employed to optimize processing technology, and HPLC fingerprint of this processed product was established. **Result:** The best ratio of *Atractylodis Macrocephalae* Rhizoma to

[收稿日期] 20171113(007)

[基金项目] 国家级中药炮制技术传承基地项目(国中医药科技[2015]86号);江西中医药大学重点学科青年教师培养计划项目(2015jzdxk011);江西中医药大学博士启动基金项目(2015BS002);江西省教育厅科学技术研究项目(GJJ170752)

[第一作者] 王芳,讲师,博士,从事中药制剂学研究,Tel:0791-87118645,E-mail:cat689apple@163.com

[通信作者] *李艳,副主任医师,从事中药临床应用研究,Tel:0791-87119633,E-mail:liyan_62@163.com;

*杨明,教授,博士生导师,从事中药炮制学与中药制剂学研究,Tel:0791-87119118,E-mail:yangming16@126.com

Aurantii Fructus Immaturus was 9 : 1. The factors influenced contents of synephrine and atractylenolide III were followed by baking temperature > frying temperature > frying time, optimum processing technology of this processed product was as follows: added Aurantii Fructus Immaturus juice 50 mL (crude drug concentration of $0.2 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$) into 100 g of Atractylodis Macrocephalae Rhizoma pieces, soaked 24 hours, fried 6 min at $110 \text{ }^\circ\text{C}$, dried at $40 \text{ }^\circ\text{C}$ in a oven. Five common peaks were selected in Atractylodis Macrocephalae Rhizoma processed with Aurantii Fructus Immaturus. Among the obtained fingerprint, all of the detected peaks were separated effectively. The accuracy, repeatability and stability of this method were satisfied. **Conclusion:** The invigorating spleen and dispelling dryness of Atractylodis Macrocephalae Rhizoma processed with Aurantii Fructus Immaturus can reflect the processing characteristics of increasing efficiency and correcting bias. The established HPLC fingerprint can provide reference for the quality control of this processed product.

[Key words] Aurantii Fructus Immaturus; Atractylodis Macrocephalae Rhizoma; atractylenolide III; synephrine; processing with herbal juice; invigorating spleen and dispelling dryness

药汁炮制法始载于《雷公炮炙论》^[1-2], 又称“法制”或“复制”, 是以中医药理论为原则, 治法为依据, 针对病情需要, 充分利用药汁自身性味, 通过相须为制、相反为制、相约为制等方式改变药物性能, 以制毒增效、纠正偏性、引药归经, 使饮片具有特有临床用途以满足中医临床辨证施治灵活用药需求的一种传统制药方法, 是传统中药炮制理论具有特色的重要组成部分, 是“药随病变, 随方炮制”思想的具体体现。如清朝出现吴茱萸制黄芩, 《本草述》记载“(黄芩) 吴茱萸制者为其入肝散滞火也”; 又如前胡^[3]记载为“甜竹沥浸冷润, 于日中晒干用”。然而, 由于药汁炮制方法繁琐, 品种临床应用减少, 部分品种甚至失传, 因此, 传承传统药汁炮制理论及方法, 并利用现代科学技术阐释其科学内涵, 是中药炮制传承与创新的重要内容, 这也是中医辨证论治临床用药的需求。

枳实制白术是白术众多炮制品记载中独具特色的一个品种, 始载于清代《本草述钩元》, 记载为“脾虚而气滞者, 枳实炒或香附炒”^[4]。枳实具有化痰散痞、破气消积的作用, 用于治疗积滞内停、痞满胀痛、泻痢后重、大便不通、痰滞气阻、胸痹、结胸、脏器下垂等^[5-6]; 白术具有益气健脾、燥湿利水、止汗安胎的功效, 用于治疗脾虚食少、腹胀泄泻、痰饮眩悸、水肿、自汗、胎动不安^[7-9]。白术经枳实汁拌炒后, 二药参合, 一泻一补, 一走一守, 一急一缓, 相互制约, 相互为用, 以达补而不滞、消不伤正、健脾强胃、消食化积、消痞除满之功效。枳实制白术不仅能消除白术的燥性, 增强白术健脾强胃的作用, 而且还可行气消滞而辅以健脾, 故临床应用时健脾与行气并施, 双管齐下, 以达消不伤正、补而不滞之目的^[10-12], 从而深化了炮制内涵——纠偏性及增效。

为进一步证明枳实制白术的科学性与合理性, 优化枳实制白术的炮制工艺, 本实验采用脾虚泄泻的免疫力低下动物模型和大鼠饮水量来评价枳实制白术的健脾祛燥作用; 通过对比不同配比枳实制白术饮片的健脾祛燥作用, 筛选枳实与白术的最佳配比; 以辛弗林和白术内酯 III 的含量为评价指标, 通过正交试验优选枳实制白术的炮制工艺, 并建立该饮片的指纹图谱, 为枳实制白术饮片的质量控制提供科学依据。

1 材料

1260 型高效液相色谱仪 (美国安捷伦公司), BT25S 型 1/10 万电子分析天平 (北京赛多利斯科学仪器有限公司), JA2003 型电子分析天平 (上海良平仪器仪表有限公司), CD3001 型酶标仪和 BC321 型离心机 (上海精密科学仪器有限公司), ACCU-CHEK 型血糖测定仪 (美国 Roche 公司)。

枳实、白术、大黄饮片 (四川科伦药业股份有限公司, 批号分别为 1603012, 1603015, 1603058) 经成都中医药大学中药鉴定教研室卢先明教授鉴定, 均符合 2015 年版《中国药典》(一部) 相关项下要求; 辛弗林、橙皮苷、白术内酯 I 和白术内酯 III 对照品 (中国食品药品检定研究院, 批号 110727-201107, 110721-201316, 111975-201501, 110875-201503, 纯度分别为 94.8%, 95.3%, 96.2%, 97.8%), 蒙脱石散 (四川维奥制药有限公司, 批号 151010), 大鼠血清免疫球蛋白 G (IgG) 和 IgM (南京建成生物工程研究所, 批号分别为 20160712, 20160712), 大鼠胃泌素 (GAS) 酶联免疫吸附法 (ELISA) 试剂盒和大鼠胃动素 (MTL) ELISA 试剂盒 (天津安诺瑞康生物技术有限公司, 批号分别为 294r0714, 434r0714), 水为怡宝纯净水, 乙腈、甲醇均为色谱纯, 其他试剂均为分

析纯。大黄药液,白术药液,1% 枳实制白术药液,5% 枳实制白术药液,10% 枳实制白术药液(自制,取各组饮片,粉碎,加水煎煮 2 次,合并煎液,减压浓缩至生药质量浓度为 0.5 g·L⁻¹,供药理试验用)。

健康 SPF 级 SD 大鼠,体质量 170 ~ 210 g,雌雄各半,由四川省人民医院实验动物研究所提供,合格证号 SCXK(川)2013-15。本文涉及的动物实验均符合实验动物福利伦理审查指南要求。

2 方法与结果

2.1 不同配比枳实制白术饮片的健脾祛燥作用比较^[13-14]

2.1.1 动物分组 大鼠适应性饲养 3 d,按体质量随机分为正常组,模型组,阳性药组(蒙脱石散组),白术组,1% 枳实制白术组,5% 枳实制白术组,10% 枳实制白术组,每组 10 只。

2.1.2 动物模型复制及给药 大鼠分组后,正常组灌胃生理盐水 4 mL,其余各组灌胃大黄药液(生药质量浓度 1 g·mL⁻¹),灌胃体积 20 mL·kg⁻¹,上午、下午各 1 次,共 9 d。第 10 天称重后,正常组、模型组上午灌胃等量生理盐水,蒙脱石散组(质量浓度

0.12 g·mL⁻¹)和白术组(生药质量浓度 0.16 g·mL⁻¹),1% 枳实制白术组(生药质量浓度 0.16 g·mL⁻¹),5% 枳实制白术组(生药质量浓度 0.16 g·mL⁻¹),10% 枳实制白术组(生药质量浓度 0.16 g·mL⁻¹)上午灌胃相应的药液,给药体积均为 10 mL·kg⁻¹;下午正常组灌胃等量生理盐水,其余各组均灌胃等量的大黄药液,连续 10 d。

2.1.3 大鼠生化指标测定 最后 1 次给药后进食 12 h,测定大鼠血糖水平;腹股动脉取血后脱颈处死,剖腹取脾脏、胃组织,用滤纸吸干脾脏组织液,称重,计算脾脏指数。取全血离心(转速 3 500 r·min⁻¹,10 min,下同)后取上清液,利用酶标仪测定血清中血清蛋白 IgG 和 IgM 水平,取部分胃组织匀浆离心后取上清液,利用酶标仪测定胃组织中 GAS 和 MTL 水平。数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,运用 SPSS 19.0 软件分析,组间比较采用 Two-way ANOVA,Post-hoc test 在每个组样本量相同的情况下采用 Tukey's t test,样本量不等采用最小显著性差异法(LSD)-t 检验;方差不齐的情况下,组间比较采用 Brown-Forsythe 检验的修正值。见表 1。

表 1 不同配比枳实制白术饮片对大鼠生化指标的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Effect of different ratio of *Atractylodis Macrocephalae Rhizoma* to *Aurantii Fructus Immaturus* on biochemical indexes of rats($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	血糖 /mmol·L ⁻¹	脾脏指数 /%	IgG /g·L ⁻¹	IgM /g·L ⁻¹	MTL /ng·L ⁻¹	GAS /ng·L ⁻¹
正常	-	6.7 ± 0.4 ¹⁾	0.268 ± 0.036 ¹⁾	8.123 ± 0.110 ²⁾	0.536 ± 0.011 ²⁾	58.609 ± 7.014 ²⁾	1 153.704 ± 191.848 ²⁾
模型	-	10.2 ± 0.7	0.236 ± 0.047	4.006 ± 0.004	0.297 ± 0.140	94.374 ± 7.883	657.345 ± 86.069
蒙脱石散	1.2	6.7 ± 0.3 ¹⁾	0.263 ± 0.067 ¹⁾	8.155 ± 0.111 ²⁾	0.578 ± 0.222 ²⁾	54.272 ± 3.207 ²⁾	1 096.954 ± 86.960 ²⁾
白术	1.6	6.5 ± 0.3 ¹⁾	0.271 ± 0.066 ¹⁾	5.259 ± 0.164 ¹⁾	0.404 ± 0.209 ¹⁾	59.326 ± 5.796 ²⁾	1 001.510 ± 195.599 ²⁾
1% 枳实制白术	1.6	6.9 ± 0.5 ¹⁾	0.267 ± 0.060 ¹⁾	5.980 ± 0.613 ¹⁾	0.519 ± 0.192 ¹⁾	54.221 ± 1.923 ^{2,3)}	1 063.582 ± 162.869 ²⁾
5% 枳实制白术	1.6	6.9 ± 1.0 ¹⁾	0.254 ± 0.082 ¹⁾	6.050 ± 0.032 ¹⁾	0.525 ± 0.149 ²⁾	54.956 ± 3.357 ^{2,3)}	1 131.727 ± 139.146 ^{2,3)}
10% 枳实制白术	1.6	6.6 ± 0.1 ¹⁾	0.269 ± 0.042 ¹⁾	8.175 ± 0.169 ^{2,3)}	0.572 ± 0.184 ^{2,3)}	55.223 ± 5.572 ^{2,3)}	1 156.171 ± 193.323 ^{2,3)}

注:与模型组比较¹⁾ P < 0.05, ²⁾ P < 0.01;与白术组比较³⁾ P < 0.05。

由表 1 可知,与正常组相比,模型组大鼠体质量、饮水量、自主活动量显著下降,大便不成形,泄泻症状明显,血糖水平升高,血清 IgG 和 IgM 水平显著下降,MTL 水平显著上升,GAS 水平显著下降,说明造模成功。与模型组相比,各枳实制白术组大鼠血糖显著下降(P < 0.05),脾脏指数显著上升(P < 0.05)。与白术组相比,各枳实制白术组血清 IgG, IgM, GAS 水平均上升,MTL 水平下降,同时观察到大鼠饮水量显著减少。综上所述,表明枳实制白术具有健脾祛燥的作用,且 10% 枳实制白术组效果

最佳。

2.2 辛弗林的含量测定

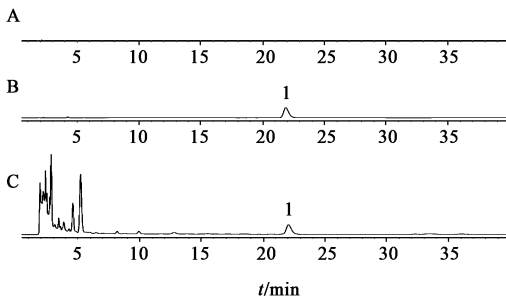
2.2.1 色谱条件 Agilent Extend-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相甲醇-磷酸二氢钾水溶液(取磷酸二氢钾 0.6 g,十二烷基磺酸钠 1.0 g,冰乙酸 1 mL,加水溶解并稀释至 1 L)(45:55),流速 1 mL·min⁻¹,柱温为室温,检测波长设定 275 nm,进样量 10 μL。

2.2.2 对照品溶液的制备 精密称取辛弗林对照品 12.74 mg,置于 25 mL 量瓶中,加适量水使溶解,

摇匀,超声 30 min,冷却,加水定容至刻度,摇匀,得辛弗林对照品储备液。精密吸取该储备液 4.6 mL,置 10 mL 量瓶中,加水至刻度,摇匀,得辛弗林对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液的制备 取枳实制白术饮片,粉碎后过 4 号筛,精密称取 1.0 g,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇 50 mL,称定质量,加热回流 1.5 h,放冷,再称定质量,用甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,精密量取续滤液 10 mL,蒸干,残渣加水 10 mL 使溶解,通过聚酰胺柱,用水 25 mL 洗脱,收集洗脱液,转移至 25 mL 量瓶中,加水定容至刻度,摇匀,即得。

2.2.4 专属性考察 分别量取空白溶剂、对照品溶液、供试品溶液,按 2.2.1 项下色谱条件测定,见图 1。结果发现在该分析条件下,理论板数按辛弗林峰计算 > 5 000,与其他组分的色谱峰分离良好,且阴性无干扰。



A. 空白溶剂; B. 对照品; C. 供试品; 1. 辛弗林

图 1 枳实制白术饮片中辛弗林含量测定的专属性试验 HPLC

Fig. 1 HPLC chromatograms of specific test of synephrine in *Atractylodis Macrocephalae Rhizoma* processed with *Aurantii Fructus Immaturus*

2.2.5 线性关系考察 分别准确移取 2.2.2 项下对照品储备液适量,加水稀释,制得辛弗林质量浓度分别为 509.6, 305.76, 234.416, 178.36, 101.92, 30.576 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的对照品溶液,按 2.2.1 项下色谱条件测定,以质量浓度为横坐标,峰面积积分为纵坐标,绘制标准曲线,得回归方程 $Y = 4.53X - 0.9649$ ($r = 0.9999$),线性范围 30.576 ~ 509.6 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

2.3 白术内酯Ⅲ的含量测定

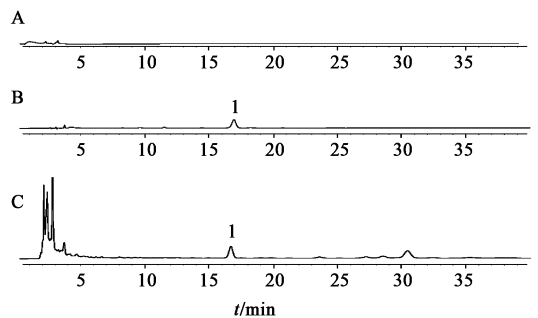
2.3.1 色谱条件 采用 Agilent Extend- C_{18} 色谱柱 (4.6 mm \times 250 mm, 5 μm),流动相甲醇-乙腈-0.2% 磷酸水溶液 (49:5:46),流速 1 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$,柱温室温,检测波长 220 nm,进样量 10 μL 。

2.3.2 对照品溶液的制备 精密称取白术内酯Ⅲ对照品约 6.9 mg,置于 50 mL 量瓶中,加适量甲醇使溶解,摇匀,超声 30 min,冷却,加甲醇至刻度,摇

匀,得储备液。精密吸取该储备液 5 mL 至 50 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,得白术内酯Ⅲ对照品溶液。

2.3.3 供试品溶液的制备 取枳实制白术饮片,粉碎(过五号筛)后取粉末 1.0 g,精密称定,置于 25 mL 量瓶中,加适量甲醇使溶解,摇匀,超声 30 min,冷却,加甲醇稀释至刻度,摇匀,过 0.45 μm 微孔滤膜滤过,即得。

2.3.4 专属性考察 分别取空白溶剂、对照品溶液、供试品溶液,按 2.3.1 项下色谱条件测定,见图 2。结果表明在该分析条件下,理论板数按白术内酯Ⅲ峰计算 > 5 000,与其他组分的色谱峰分离良好,且无阴性干扰。



A. 空白溶剂; B. 对照品; C. 供试品; 1. 白术内酯Ⅲ

图 2 枳实制白术饮片中白术内酯Ⅲ含量测定的专属性试验 HPLC
Fig. 2 HPLC chromatograms of specific test of atractylenolide III in *Atractylodis Macrocephalae Rhizoma* processed with *Aurantii Fructus Immaturus*

2.3.5 线性关系考察 分别准确移取 2.3.2 项下对照品储备液适量,用甲醇稀释,制得白术内酯Ⅲ质量浓度分别为 138.2, 69.1, 27.64, 13.82, 5.528, 2.764 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的系列对照品溶液,按 2.3.1 项下色谱条件测定,以质量浓度为横坐标,峰面积积分为纵坐标,绘制标准曲线,得回归方程 $Y = 22.58X + 5.1024$ ($r = 0.9999$),线性范围 2.764 ~ 138.2 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

2.4 枳实汁的制备 取枳实饮片,加 12 倍量水浸泡 0.5 h,煎煮 2 次,每次 1.5 h,合并 2 次煎液,减压浓缩至生药质量浓度为 0.2 $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,作为枳实制白术的炮制辅料。

2.5 正交试验 选择炒制温度、炒制时间、烘制温度为考察因素,以白术内酯Ⅲ和辛弗林含量的总评“归一值”(overall desirability, OD)为评价指标,根据 Hassan 法对各个指标进行均一化处理^[8-9],计算公式为 $d_i = (Y_i - Y_{\min}) / (Y_{\max} - Y_{\min})$,式中 Y_i 为实测值, Y_{\min} 和 Y_{\max} 分别指每一指标在不同试验中测得的

最小值和最大值, $OD = (d_1 \times d_2 \cdots \times d_k)^{1/k}$, k 为指标数。试验安排及结果见表2, 方差分析见表3。

表2 枳实制白术炮制工艺优选的正交试验分析

Table 2 Orthogonal test analysis of processing technology of *Atractylodis Macrocephalae Rhizoma* processed with *Aurantii Fructus Immaturus*

No.	A 炒制 温度 /°C	B 炒制 时间 /min	C 烘制 温度 /°C	D (空白)	白术内酯 Ⅲ质量 分数/%	辛弗林 质量分数 /%	OD
1	110	6	30	1	0.042	0.049	0.564
2	110	7	40	2	0.045	0.053	0.953
3	110	8	50	3	0.046	0.046	0.354
4	120	6	40	3	0.043	0.051	0.739
5	120	7	50	1	0.035	0.050	0
6	120	8	30	2	0.039	0.047	0.302
7	130	6	50	2	0.035	0.053	0
8	130	7	30	3	0.040	0.045	0
9	130	8	40	1	0.039	0.047	0.302

表3 总评“归一值”的方差分析

Table 3 Variance analysis of overall desirability

方差来源	SS	MS	F	P
A	0.411	0.206	16.440	>0.05
B	0.027	0.014	1.080	>0.05
C	0.469	0.235	18.760	>0.05
D(误差)	0.03	0.465		

注: $F_{0.05}(2,2) = 19$ 。

由直观分析可知,各因素对炮制工艺的影响顺序为 $C > A > B$ 。方差分析表明各因素对实验结果均无显著性影响。综合实际成本考虑,确定最佳炮制工艺为 $A_1B_1C_2$,即取生白术饮片 100 g,加入枳实汁 50 mL(生药质量浓度 $0.2 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$),浸泡 24 h,不时翻动,直至汁尽药透,110 °C 炒制 6 min,取出,于 40 °C 烘箱烘干(水分不得超过 15.0%)。

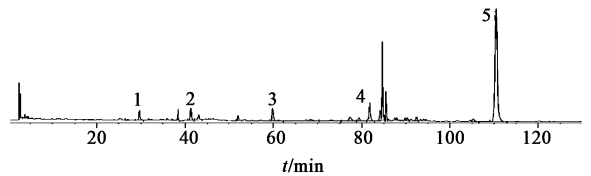
2.6 枳实制白术的 HPLC 特征图谱分析

2.6.1 色谱条件 以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂,流动相甲醇(A)-水(B,含 0.1% 十二烷基硫酸钠和 0.1% 磷酸)梯度洗脱(0 ~ 10 min,30% A; 10 ~ 20 min,30% ~ 35% A; 20 ~ 25 min,35% ~ 40% A; 25 ~ 30 min,40% ~ 50% A; 30 ~ 40 min,50% ~ 55% A; 40 ~ 50 min,55% ~ 60% A; 50 ~ 60 min,60% ~ 65% A; 60 ~ 70 min,65% ~ 60% A; 70 ~ 80 min,60% ~ 75% A; 80 ~ 85 min,75% ~ 80% A; 85 ~ 135 min,80% A),流速 $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$,检测波长 225 nm。理论板数按白术内酯Ⅲ峰计算 > 14 000。

2.6.2 参照物溶液的制备 取橙皮苷,辛弗林,白术内酯Ⅲ,白术内酯 I 和苍术酮对照品适量,精密称定,分别加甲醇制成每 1 mL 含 0.06,0.1,0.1,0.04,0.3 mg 的溶液,即得。

2.6.3 供试品溶液的制备 取本品粉末(过五号筛)2.0 g,精密称定,精密加入甲醇 40 mL,称定质量,置 80 °C 水浴上保持微沸 2 h,放冷,称定质量,用甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,精密量取续滤液 30 mL,减压浓缩至少量,转移至 5 mL 量瓶中,用甲醇定容至刻度,过 $0.45 \mu\text{m}$ 微孔滤膜,即得。

2.6.4 HPLC 分析 精密量取供试品溶液 10 μL 注入液相色谱仪,记录 HPLC 色谱图,见图 3,以图谱中分离度较好、相对保留时间稳定的 5 个色谱峰为特征峰。



1. 橙皮苷;2. 辛弗林;3. 白术内酯Ⅲ;4. 白术内酯 I;5. 苍术酮(图 4 同)

图3 枳实制白术的 HPLC 对照特征谱

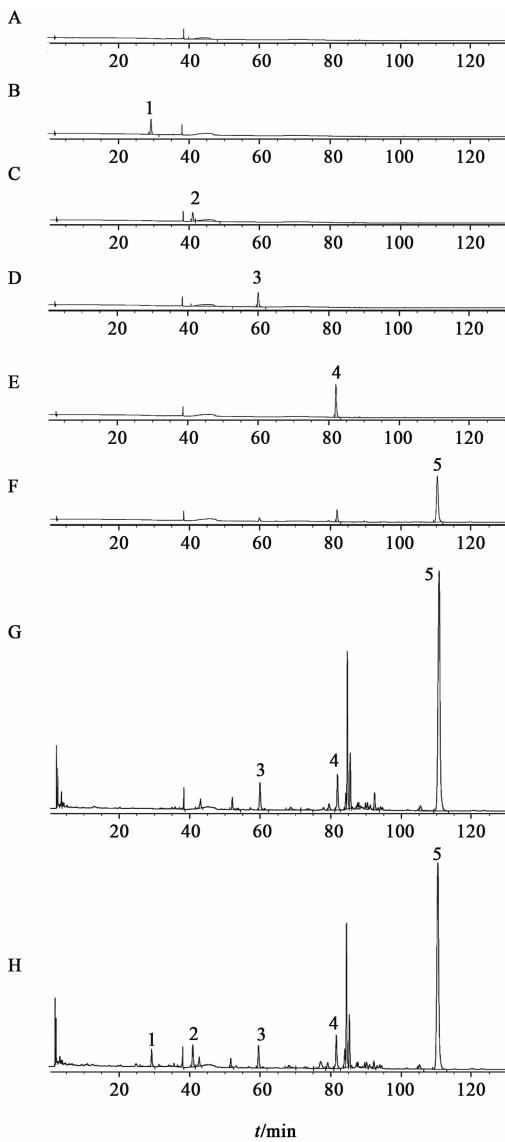
Fig. 3 HPLC control fingerprint of *Atractylodis Macrocephalae Rhizoma* processed with *Aurantii Fructus Immaturus*

2.6.5 专属性试验 分别配制空白溶剂、橙皮苷对照品溶液、辛弗林对照品溶液、白术内酯Ⅲ对照品溶液、白术内酯 I 对照品溶液、苍术酮对照品溶液、白术样品溶液(按 2.6.3 项下方法制备)和枳实制白术供试品溶液,按 2.6.1 项下色谱条件测定,见图 4。结果发现该方法专属性和特征性均较强。

2.6.6 精密度试验 随机抽取同一批枳实制白术饮片,按 2.6.3 项下方法制备供试品溶液,连续进样 6 次,记录色谱图,选择上述 5 个共有峰进行比较,结果表明各共有峰保留时间的 RSD 0.1% ~ 1.7%,峰面积的 RSD 0.1% ~ 1.1%,表明仪器精密度良好。

2.6.7 重复性试验 随机取同一批枳实制白术饮片,按 2.6.3 项下方法制备 6 份供试品溶液,记录色谱图。结果各共有峰保留时间的 RSD 0.1% ~ 0.2%,峰面积的 RSD 1.1% ~ 3.8%,表明该方法重复性良好。

2.6.8 稳定性试验 取同 1 份枳实制白术饮片的供试品溶液,分别于制备后 0,5,10,15,20,25,48 h 进样,记录色谱图,对 5 个共有色谱峰进行比较。



A. 空白溶剂; B~F. 对照品; G. 清炒白术; H. 供试品

图 4 枳实制白术样品的 HPLC 色谱

Fig. 4 HPLC chromatograms of *Atractylodis Macrocephalae Rhizoma* processed with *Aurantii Fructus Immaturus*

结果各共有峰保留时间的 RSD 0.8% ~ 1.1%, 峰面积的 RSD 0.3% ~ 4.7%, 表明供试品溶液在 48 h 内

稳定性良好。

2.7 特征图谱的构建

2.7.1 相对保留时间的计算 选择出峰时间较居中、在各样品中均存在的组分作为参照峰 ($\alpha = 1$), 求出样品所有色谱峰的相对保留时间为 $t_{Ri}/t_{R\alpha}$, 式中 t_{Ri} 为各组分的出峰时间, $t_{R\alpha}$ 为参照峰的出峰时间。

2.7.2 参照峰的选择 通过色谱图比较, 可知各样品色谱图中 1, 2, 3, 4, 5 号峰为特征峰, 选取色谱图中的第 3 个强峰 (3 号峰) 为参照峰, 计算各峰的相对保留时间。

2.7.3 特征图谱的建立及评价 取 10 批枳实制白术饮片 (白术来自不同产地, 下同), 分别按 2.6.3 项下方法制备供试品溶液, 按 2.6.1 项下色谱条件进样并记录色谱图。根据 10 批样品特征图谱的特点, 可以确定 5 个峰为特征峰, 其中 3 号峰为白术内酯 III (S)。将各批枳实制白术饮片的色谱信号导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2008 版), 见图 5。计算对照图谱和 10 批样品图谱之间的相似度数据^[10], 结果发现 10 批药材的相似度均 > 0.90, 表明枳实制白术饮片组分群体特征的一致性较高。

2.7.4 样品的特征图谱检测 取 10 批枳实制白术饮片, 按 2.6.3 项下方法制备供试品溶液, 各精密量取 10 μ L 进样测定, 记录色谱图。10 批不同产地的白术经枳实炮制后所得饮片的特征峰峰面积和保留时间分别见表 4, 5。

3 讨论

检索古今文献, 结合现代化学成分、药理作用的研究可知, 在脾胃功能方面, 枳实、白术间存在着相辅的配伍关系。枳实丸为历代本草所记载的经典名方, 二药配伍运用, 枳实以走为主, 白术以守为要, 一消一补, 一走一守, 一急一缓, 相互制约, 相互为用,

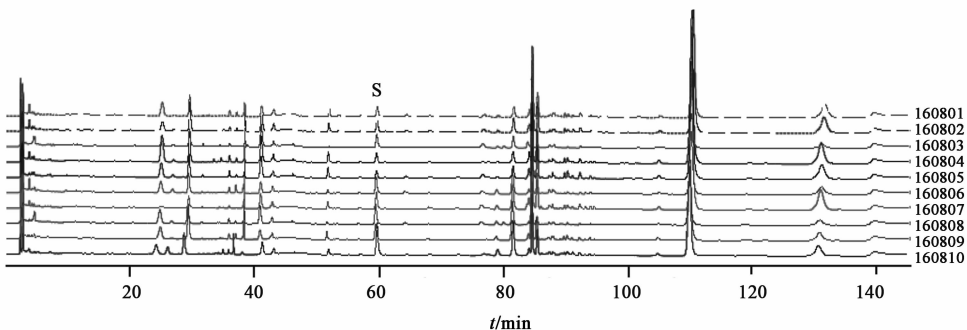


图 5 10 批枳实制白术饮片的 HPLC 特征谱

Fig. 5 HPLC fingerprint of 10 batches of *Atractylodis Macrocephalae Rhizoma* processed with *Aurantii Fructus Immaturus*

表 4 10 批不同产地白术经枳实制后所得饮片特征图谱中色谱峰的保留时间

Table 4 Retention times of 5 peaks in fingerprint of 10 batches of *Atractylodis Macrocephalae Rhizoma* processed with *Aurantii Fructus Immaturus* min

批号	峰 1	峰 2	峰 3	峰 4	峰 5
160801	28.588	41.160	59.550	81.434	109.774
160802	29.287	40.784	59.329	81.249	109.867
160803	29.217	40.800	59.342	81.317	109.801
160804	29.348	40.898	59.455	81.368	110.119
160805	29.333	40.908	59.409	81.352	110.059
160806	29.393	40.968	59.489	81.438	110.163
160807	29.463	41.011	59.475	81.428	110.156
160808	29.482	41.011	59.522	81.460	110.098
160809	29.524	41.070	59.552	81.511	110.356
160810	29.494	41.064	59.594	81.564	110.386

表 5 10 批不同产地枳实制白术饮片特征图谱中色谱峰的峰面积
Table 5 Peak areas of 5 peaks in fingerprint of 10 batches of *Atractylodis Macrocephalae Rhizoma* processed with *Aurantii Fructus Immaturus*

批号	峰 1	峰 2	峰 3	峰 4	峰 5
160801	6 808.1	3 991.8	10 695.9	11 560.1	34 521.1
160802	9 838.4	3 199.1	5 331.7	6 548.5	44 782.9
160803	5 969.1	5 892.8	6 823.0	7 667.2	25 371.3
160804	3 107.7	4 912.9	5 465.5	8 649.8	74 516.1
160805	5 650.3	3 692.6	5 476.9	8 388.1	33 471.7
160806	6 451.7	6 995.3	2 567.1	4 306.5	69 046.6
160807	8 662.4	8 406.2	3 514.9	4 064.2	86 205.5
160808	5 002.7	7 122.5	4 159.1	4 122.6	18 549.8
160809	7 973.0	5 701.4	4 023.7	5 155.0	68 945.9
160810	6 006.6	3 393.9	3 543.3	3 882.5	54 839.5

助其升清降浊之枢机,以达补而不滞、消不伤正、健脾强胃、消食化积、消痞除满之功^[15]。现代药理研究也充分证明了该药对促进胃肠动力效果尤佳,是临床常用治疗胃肠疾病的药对之一。枳实制白术见于清代,未见现代研究与剖析,本文通过药理和化学评价对枳实制白术工艺进行优选,以量化指标来体现枳实制白术的炮制工艺,从而更科学、深入、全面地揭示枳实制白术的科学内涵。

中医理论认为“燥胜则干”,本实验结果表明枳实制白术具有减少大鼠饮水量的作用,说明白术经枳实炮制后燥性降低,枳实制白术具有祛燥作用。MTL 是由氨基酸组成的多肽,其分泌细胞集中分布

于十二指肠和近端空肠黏膜窝内,在胃窦及下部小肠黏膜有少量存在,也存在于神经组织中。MTL 主要功能是影响胃及肠道的动力,具有肠道“清道夫”的功效;GAS 主要是由人体内细胞分泌的一种消化道激素,细胞以胃窦部最多,十二指肠次之^[16-18]。本文研究结果显示枳实制白术组与白术组相比胃组织 GAS 水平显著上升,胃组织 MTL 水平显著下降,反映了枳实制白术有增强健脾功效的作用,且 10% 枳实制白术效果最佳,为枳实制白术饮片炮制工艺研究提供了配比依据。

研究表明枳实中消痞健脾的有效成分为辛弗林^[19],白术的健脾有效成分为白术内酯类,在枳实制白术的条件筛选时,由于白术内酯类成分对温度敏感,因此以枳实制白术中的辛弗林与白术内酯Ⅲ的含量为评价指标,重点考察了炒制温度、炒制时间、烘制温度等因素,筛选出枳实制白术的炮制工艺。在特征图谱中,10 批不同产地的枳实制白术饮片标定的共有色谱峰为 5 个,其中枳实中有 2 个峰,白术中有 3 个峰。比较 10 批不同产地的枳实制白术的色谱图后发现,虽然各批样品中成分的含量有一定差异,但色谱图概貌一致,整体分离度较好且稳定,特征图谱是其内在化学成分种类与数量的反映,可对枳实制白术饮片组分群体特征的一致性作出判断,能充分反映枳实制白术饮片的质量特征,为该饮片标准的制定提供了参考。

[参考文献]

[1] 徐楚江,万德光,杨明. 传统药汁制法的探讨[J]. 中国中药杂志,1989,14(3):22-25.

[2] 王丽娜,贾天柱,刘洋. 药汁制法研究概况[J]. 中成药,2006,28(12):1803-1805.

[3] 崔妮,史辑,景海漪,等. 中药炮制药汁制法历史沿革及研究进展[J]. 药学实践杂志,2014,32(3):167-198.

[4] 王朝阳.《伤寒杂病论》中白术临床运用及证治规律研究[D]. 武汉:湖北中医药大学,2015.

[5] 石俊英,陈随清,崔亚军,等. 中药鉴定学[M]. 北京:中国医药科技出版社,2006:316.

[6] 于欢,钟凌云,宁希鲜,等. 枳实不同炮制品挥发油 GC-MS 分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(15):12-18.

[7] 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,2015:103-104.

[8] 张金莲,谢日健,刘明贵,等. 不同炮制方法对白术中白术内酯 I, II, III 含量的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2016,22(21):15-18.

- [9] 龙全江,徐雪琴,胡昀.白术的化学、药理与炮制研究进展[J].中国中医药信息杂志,2004,11(11):1033-1034.
- [10] 孙慧茹,杨庆有.临床运用枳实汤的升降作用经验拾零[J].陕西中医,2008,29(8):1072.
- [11] 李新旺,任钧国.枳实白术配伍的实验研究[J].中医研究,2002,15(6):23-25.
- [12] 田亚欣,王风云,张娇,等.功能性消化不良的常用方剂及药对规律总结[J].中国实验方剂学杂志,2016,22(21):182-185.
- [13] 钟子劭,张海燕,张望,等.四君子汤对脾虚证胃肠动力障碍大鼠胃平滑肌 CaM-MLCK 信号通路的机制探讨[J].中国实验方剂学杂志,2018,24(5):95-99.
- [14] 刘名波.香砂六君子汤对脾虚泄泻免疫功能和肠道微生态的影响[D].苏州:苏州大学,2015.
- [15] 刘蔚雯.枳实、白术促胃肠动力作用的配伍及枳实饮作用机理的研究[D].哈尔滨:黑龙江中医药大学,2007.
- [16] 龚鹏飞,于欢,翟莹莹,等.多指标评价米泔水漂苍术对湿盛困脾脾虚大鼠的药效作用[J].中国实验方剂学杂志,2017,23(24):36-40.
- [17] 刘瑶,刘伟.藿香正气散对湿困脾胃型亚健康大鼠胃肠功能的影响[J].江苏中医药,2011,43(6):89-90.
- [18] 祝婧,钟凌云,叶喜德,等.枳壳不同炮制品的燥性比较及其对功能性消化不良大鼠胃肠功能的影响[J].中国实验方剂学杂志,2017,23(22):20-26.

[责任编辑 刘德文]