

茅苍术水溶性成分的 HPLC 指纹图谱分析

刘菊燕, 巢建国*, 谷巍, 孙亚昕, 李孟洋
(南京中医药大学, 南京 210023)

[摘要] 目的:建立茅苍术水溶性成分的 HPLC 指纹图谱并测定苍术苷 A 含量,为该药材的质量控制与资源开发提供参考。方法:利用 HPLC 建立茅苍术的指纹图谱并测定苍术苷 A 含量,流动相乙腈(A)-0.25% 甲酸水溶液(B)梯度洗脱(0~17 min,2%~5% A;17~25 min,5%~12% A;25~35 min,12% A;35~50 min,12%~17% A;50~70 min,17%~34% A;70~80 min,34%~40% A),检测波长 221 nm,流速 0.6 mL·min⁻¹。采用外标法测定苍术苷 A 在 10 批茅苍术药材中含量。结果:建立了茅苍术水溶性成分的 HPLC 指纹图谱,检出共有峰 18 个,精密性、稳定性、重复性试验中各共有峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均 <3%。10 批茅苍术水提取物中苍术苷 A 含量较稳定,平均质量分数 2.775 mg·g⁻¹。结论:HPLC 指纹图谱方法与苍术苷 A 的含量测定方法准确、稳定、简便,可有效控制茅苍术药材的内在质量。

[关键词] 茅苍术;水溶性成分;指纹图谱;苍术苷 A

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)04-0044-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015040044

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20141229.1033.006.html>

[网络出版时间] 2014-12-29 10:33

HPLC Fingerprint of Water-soluble Components in Atractylodis Rhizoma LIU Ju-yan, CHAO Jian-guo*, GU Wei, SUN Ya-xin, LI Meng-yang (Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China)

[Abstract] **Objective:** To establish HPLC fingerprints of water-soluble components in Atractylodis Rhizoma and determine the content of atractyloside A. **Method:** HPLC was adopted to determine the content of atractyloside A with mobile phase of acetonitrile (A) -0.25% aqueous formic acid (B) for gradient elution (0-17 min, 2% -5% A; 17-25 min, 5% -12% A; 25-35 min, 12% A; 35-50 min, 12% -17% A; 50-70 min, 17% -34% A; 70-80 min, 34% -40% A), detection wavelength at 221 nm and flow rate of 0.6 mL·min⁻¹. The external standard method was employed to determine the content of atractyloside A in ten batches of Atractylodis Rhizoma. **Result:** Fingerprint of water extract in Atractylodis Rhizoma was established by HPLC, and 18 common peaks were detected. RSD of common peaks relative retention time and relative peak area in precision, stability and repeatability tests were less than 3%. Water extract of ten batches of samples showed high stability with the content of atractyloside A in Atractylodis Rhizoma was 2.775 mg·g⁻¹. **Conclusion:** This established method is specific, accurate and reproducible, it can be used as a quality control method for Atractylodis Rhizoma.

[Key words] Atractylodis Rhizoma; water-soluble components; fingerprint; atractyloside A

茅苍术味辛、苦,性温,归脾、胃、肝经,具有燥湿健脾、祛风散寒、明目之功效^[1],主治脘腹胀满、泄泻、水肿、风湿痹痛、风寒感冒等,中医临床使用历史悠久。茅苍术主要化学成分包括脂溶性成分和水溶性成分,其中脂溶性成分以挥发油中苍术素、苍术醇

和β-桉叶醇等为主,近年对茅苍术的化学成分研究主要集中于挥发油方面^[2-4],而关于其水溶性成分的报道较少^[5]。为了全面评价茅苍术的质量,有必要对其含有的水溶性成分进行深入研究,以建立较完善的茅苍术质量评价体系。本实验采用 HPLC 对

[收稿日期] 20140610(006)

[基金项目] 国家工业和信息化部中药材生产建设项目(2013018)

[第一作者] 刘菊燕,在读硕士,从事中药资源培育与利用研究,Tel:18252067609,E-mail:niupi909@163.com

[通讯作者] *巢建国,硕士,教授,从事中药资源开发与研究,Tel:13851562488;E-mail:jgchao016@163.com

10 批茅苍术进行研究,建立其水溶性成分的指纹图谱并测定水溶性成分中苍术苷 A 含量,为茅苍术的质量评价提供参考。

1 材料

1100 系列高效液相色谱仪(美国安捷伦公司), AUW220D 型电子天平(日本岛津), Milli-Q 型纯水器(美国 Millipore 公司)。苍术苷 A 对照品(中国食品药品检定研究院,批号 126054-77-1),水为重蒸水,其他试剂均为分析纯。10 批茅苍术药材采自江苏茅山、湖北英山、河南信阳和南京中医药大学药苑,经南京中医药大学中药资源学教研室巢建国教授鉴定为菊科植物茅苍术 *Atractylodes lancea* 的根茎;根茎除去杂质及泥土,自然晾干,粉碎,过 60 目筛,备用。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Hedra C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 0.5 μm),保护柱(5 cm),流速 0.6 mL·min⁻¹,柱温 30 °C,进样量 20 μL,流动相乙腈(A)-0.25% 甲酸水溶液(B)梯度洗脱(0 ~ 17 min, 2% ~ 5% A; 17 ~ 25 min, 5% ~ 12% A; 25 ~ 35 min, 12% A; 35 ~ 50 min, 12% ~ 17% A; 50 ~ 70 min, 17% ~ 34% A; 70 ~ 80 min, 34% ~ 40% A),检测波长 221 nm,见图 1。

表 1 不同批次茅苍术出粉率和苍术苷 A 含量的测定

Table 1 Determination of flour yield and the content of atractylside A in ten batches of *Atractylodes lancea*

产地	编号	出粉率/%	苍术苷 A/mg·g ⁻¹
江苏茅山 1	S1	29.89	2.79
江苏茅山 2	S2	31.18	2.84
江苏茅山 3	S3	29.47	2.78
湖北英山 1	S4	29.06	2.75
湖北英山 2	S5	27.34	2.72
河南信阳 1	S6	29.18	2.77
河南信阳 2	S7	25.62	2.78
河南信阳 3	S8	29.97	2.77
药苑 1	S9	28.66	2.75
药苑 2	S10	30.37	2.80

杯中,缓慢加入 95% 乙醇,慢加快搅至不再有絮状物析出为止,静置过夜,抽滤,滤液浓缩,加甲醇溶解并定容至 50 mL,3 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,取上清液,过 0.45 μm 微孔滤膜,得供试品溶液。

2.3 对照品溶液的制备 准确称取苍术苷 A 对照品适量,加甲醇溶解并制成 0.42 g·L⁻¹ 对照品溶液,保存备用。

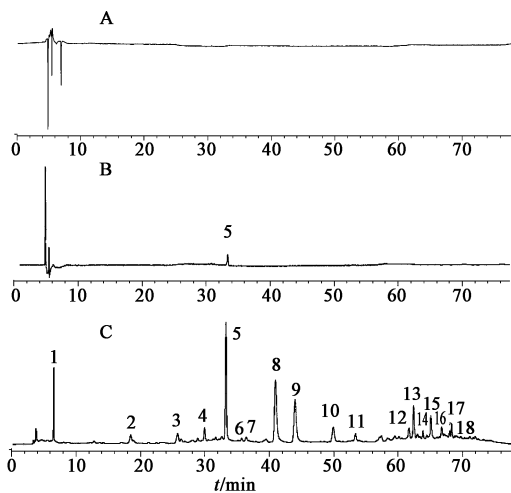
2.4 方法学考察

2.4.1 参比峰确定 取各样品的水提取物及苍术苷 A 对照品溶液,按 2.1 项下色谱条件测定,结果显示指纹图谱中保留时间 33.268 min 的色谱峰与苍术苷 A 对照品的色谱峰一致,且峰面积较大,分离度良好、稳定,故选定此峰为茅苍术水溶性成分指纹图谱的参比峰。

2.4.2 精密度试验 精密吸取 S1 供试品溶液 10 μL,按 2.1 项下色谱条件连续进样 6 次,结果共有峰的相对保留时间的 RSD 均 < 1.5%,相对峰面积的 RSD 均 < 3%,说明仪器精密度良好。

2.4.3 稳定性试验 精密吸取同一份 S1 供试品溶液 10 μL,按 2.1 项下色谱条件每隔 2 h 测定 1 次,共进样 6 次,结果共有峰的相对保留时间的 RSD 均 < 2%,相对峰面积的 RSD 均 < 3%,说明 24 h 内供试品溶液稳定性较好。

2.4.4 重复性试验 精密称取同一批号药材细粉 6 份,按 2.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件测定,结果共有峰的相对保留时间的 RSD 均 < 1.5%,相对峰面积的 RSD 均 < 3%,说明该方法重复性良好。



A. 空白样品; B. 对照品; C. 供试品; 5. 苍术苷 A

图 1 茅苍术水提取液的 HPLC 指纹谱

Fig. 1 HPLC fingerprint of water extract of *Atractylodes lancea*

2.2 供试品溶液的制备 准确称取茅苍术粉末 5 g,加水 100 mL 浸泡 1 h,回流提取 1 h,纱布过滤,药渣继续提取 1 h,合并 2 次滤液并浓缩成浸膏状,于 65 °C 烘干成干粉,计算出粉率,见表 1,干粉置于 4 °C 冰箱保存。精密称取干粉约 0.2 g,置于小烧

2.4.5 线性关系考察 精密吸取 $0.42 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 苍术苷 A 对照品溶液, 等比稀释, 得 0.210, 0.105, 0.052 5, 0.026 3 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 系列对照品溶液, 按 2.1 项下色谱条件测定, 以质量浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 得回归方程 $Y = 3\,464.4X + 95.483 (r = 0.999\,8)$, 线性范围 26.3 ~ 420 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

2.4.6 加样回收率试验 精密称取已知苍术苷 A 含量的茅苍术药材粉末 0.05 g, 各加入一定量苍术苷 A 对照品, 按 2.2 项下方法制备供试品溶液, 按 2.1 项下色谱条件测定, 计算平均回收率 99.1%, RSD 1.4%, 表明本方法准确度较好。

2.5 水溶性成分指纹图谱分析^[6] 取 10 批茅苍术样品的供试品溶液, 按 2.1 项下色谱条件测定, 标定了 18 个特征指纹峰, 见图 1 和表 2。

表 2 茅苍术水溶性成分共有峰的技术参数 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Technical parameters of common peaks of water-soluble components in *Atractylodes lancea* ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

色谱峰	R_t/min	相对 R_t	相对峰面积
1	6.540	0.197	0.231
2	18.487	0.556	0.152
3	25.766	0.774	0.141
4	29.964	0.901	0.127
5	33.268	1.000	1.000
6	35.710	1.073	0.030
7	36.409	1.094	0.062
8	40.972	1.232	1.040
9	44.007	1.323	0.755
10	49.940	1.501	0.245
11	53.387	1.605	0.090
12	61.739	1.856	0.137
13	62.408	1.876	0.321
14	63.850	1.919	0.050
15	65.082	1.956	0.247
16	66.781	2.007	0.126
17	68.004	2.044	0.066
18	68.319	2.054	0.125

通过对 10 批茅苍术样品水溶性成分的指纹图谱进行检测和比较, 结果显示各水溶性成分的色谱峰一般在 70 min 内出峰, 70 min 后基线趋于平衡。由于 6 min 前的色谱峰为溶剂峰及色谱柱不保留的难分离成分峰, 故只对保留时间 7 ~ 70 min 的色谱峰进行分析。水溶性成分的指纹图谱中共有 18 个典型的共有色谱峰, 其中 5 号峰为最高峰, 经与对照

品比较, 确定为苍术苷 A, 占共有峰总面积的 20.22%; 6 和 7 号峰较小, 所对应的成分在茅苍术中含量较低; 11 和 12 号峰间有些小峰, 但在总面积中所占比例很小, 可忽略不计; 17 和 18 号峰也得到了分离, 但分离效果不是很稳定。综上分析, 茅苍术水提取物中以苍术苷 A 为代表的倍半萜苷类成分为主, 与文献[7]报道一致。由表 1 可知, 不同批次的茅苍术水提取物中苍术苷 A 含量较稳定, 最高 $2.84 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$, 最低 $2.72 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$; 苍术苷 A 在茅苍术药材中含量较大, 可考虑可将其作为质量控制成分。

3 讨论

由于茅苍术水溶性成分较多, 紫外吸收差异较大, 采用 UV 对茅苍术的水溶性成分在 200 ~ 800 nm 进行扫描, 结果在 221 nm 处, 茅苍术水溶性成分的图谱中色谱峰较多, 峰形较好, 故确定检测波长 221 nm。选择甲醇-不同体积分数甲酸 (0.1%, 0.15%, 0.2%, 0.25%)、乙腈-不同体积分数磷酸 (0.1%, 0.2%, 0.3%)、乙腈-不同体积分数甲酸 (0.1%, 0.15%, 0.2%, 0.25%) 分别进行等度和梯度洗脱, 结果显示乙腈-甲酸梯度洗脱的效果较理想, 故选用乙腈-0.25% 甲酸梯度洗脱。通过对流动相的梯度和流动相浓度进行多次考察, 结果以本文选择的梯度为最佳。曾考察不同流速 (0.6, 0.8, 1.0 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$), 结果显示在 0.6 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 时峰形及分离度较好。通过对不同柱温 (10, 25, 30 $^{\circ}\text{C}$) 进行比较, 结果发现柱温 30 $^{\circ}\text{C}$ 条件下峰分离度较好。由于茅苍术水提液的成分种类较多, 各成分含量相差较大, 比较进样量为 10, 20, 30 μL 的色谱图, 结果表明进样量 20 μL 基本可满足要求。在上述梯度条件下检测了 60, 80, 100, 120 min 的图谱, 结果表明所有成分在 80 min 内出现, 故确定检测时间 80 min。比较超声法与水浴回流法提取茅苍术中水溶性成分, 结果显示水浴回流提取效果更好, 故选择水为溶媒回流 2 次。以水为提取溶媒, 方法简便环保、操作性强, 同时与中药传统的临床用药方法保持一致。

研究表明茅苍术的水溶性成分含量较高^[8], 主要为倍半萜苷类^[9], 大多数成分无紫外吸收。本文运用 UV 检测, 结果发现检测波长 221 nm 处建立的指纹图谱能全面反映茅苍术水溶性成分的信息。通过对色谱条件进行优化, 使检测到的各色谱峰得到较好分离, 且保留时间适中。

10 批茅苍术药材中水溶性成分 HPLC 指纹图谱均具有 18 个特征峰, 峰面积相对含量无显著差异, 说明建立的方法稳定性强, 茅苍术水溶性成分种

类较一致。18个特征峰中,苍术苷A含量最高,在10批茅苍术药材中,苍术苷A含量以江苏茅山最高,一方面说明了江苏茅山地区茅苍术质量较其他地区好,另一方面显示了该药材在茅山地区的道地性。日本学者在研究茅苍术时,从其水溶性部分分得了大量单萜苷类成分,且具有较好的药理活性^[10],结合本文研究结果,可考虑将其水溶性成分作为质控指标。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:150-151.
[2] 郭兰萍,刘俊英,吉力,等. 茅苍术道地药材的挥发油组成特征分析[J]. 中国中药杂志,2002,27(11):814-819.
[3] 陈佳,解小霞,刘合刚. 几个道地产区茅苍术指纹图谱及苍术素含量测定研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(10):125-127.
[4] 陶野,张贝贝,付梅红,等. 基于色谱指纹图谱的苍术

挥发油多成分体内药代动力学研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(11):156-159.
[5] 张磊. 茅苍术质量评价体系的建立与方法学研究[D]. 镇江:江苏大学,2010.
[6] 王鸣,肖超成,陈雨,等. 不同产地茅苍术水溶性成分的HPLC指纹图谱研究[J]. 植物资源与环境学报,2009,18(1):12-15.
[7] Kitajima J, Kamoshita A, Ishikawa T, et al. Glycosides of *Atractylodes japonica* [J]. Chem Pharm Bull, 2003, 51(2):152-157.
[8] Kano Y, Komatsu K I, Saito K I, et al. A new polyacetylene compound from *Atractylodes Rhizome*[J]. Chem Pharm Bull,1989,37(1):193-194.
[9] Kitajima J, Kamoshita A, Ishikawa T, et al. Glycosides of *Atractylodes lancea* [J]. Chem Pharm Bull, 2003, 51(6):673-678.
[10] Kim Y C, Jun M, Jeong W S, et al. Antioxidant properties of flavone C-glycosides from *Atradyloides japonica* leaves in human low-density lipoprotein oxidation[J]. J Food Sci,2005,70(9):S575-S580.

[责任编辑 刘德文]

《中国实验方剂学杂志》声明

本刊最近发现有一些诈骗类网站使用类似本刊网站的域名,冒用本刊名义,骗取高额审稿费及版面费。现本刊郑重声明:本刊不会以任何名义收取任何审稿费,http://www.syfjxzz.com 为本刊唯一域名。对于假冒本刊名义、侵犯本刊权利的不法行为,本刊将通过法律程序进行维权。