

麸炒前后苍术 HPLC 指纹图谱

常晓文, 刘玉强, 才谦*

(辽宁中医药大学药学院, 辽宁大连 116600)

[摘要] 目的:通过建立生苍术和麸炒苍术的高效液相指纹图谱,比较苍术麸炒前后化学成分的差异,为麸炒苍术炮制机制的研究提供科学依据。方法:采用 Agilent 1100 series 高效液相色谱仪, Promosil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 以乙腈-0.1% 磷酸水为流动相, 梯度洗脱, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 270 nm。结果:分别建立了生苍术和麸炒苍术的高效液相指纹图谱, 各标定 18 个共有峰, 相似度均大于 0.90。麸炒后苍术中包括苍术素醇, (4E, 6E, 12E)-十四癸三烯-8, 10-二炔-1, 3-二乙酸酯和苍术素在内的多个色谱峰的峰面积值下降。结论:运用高效液相法可对苍术麸炒前后化学成分进行分析, 实验方法准确可靠。

[关键词] 苍术; 炮制; 高效液相; 指纹图谱

[中图分类号] R284.1; R283.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)04-0040-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.2015040040

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20141229.1031.004.html>

[网络出版时间] 2014-12-29 10:31

Fingerprints of Raw and Processed Atractylodis Rhizoma by HPLC CHANG Xiao-wen, LIU Yu-qiang, CAI Qian* (Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China)

[Abstract] **Objective:** To study the differences of chemical components in raw and processed Atractylodis Rhizoma and to provide a scientific basis and evidence for clarifying the mechanism of processing. **Method:** Agilent C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) was used with the mobile phase of acetonitrile and water, the flow rate was 1 mL·min⁻¹, the detection wavelength was set at 270 nm. **Result:** The HPLC fingerprints of raw and processed Atractylodis Rhizoma were established and 18 common peaks were detected, the similarity of 10 batches raw and processed Atractylodis Rhizoma were over 0.9, the peak areas of multi-components including atractylodin, atractylodes lancea and (4E, 6E, 12E)-tetradecatriene-8, 10-diyne-1, 3-diyl diacetate were decreased after processing. **Conclusion:** HPLC fingerprint has been established to analyze the chemical components in raw and processed Atractylodis Rhizoma, the method is accurate and reliable.

[Key words] Atractylodis Rhizoma; process; HPLC; fingerprint

苍术为传统燥湿药,具有燥湿健脾、祛风、散寒、明目等功能^[1]。生苍术燥性偏大,麸炒可缓和其燥性,并可增强健脾和胃作用^[2]。苍术中富含丰富的挥发油,其中倍半萜类和聚乙烯炔类是该药的主要有效成分。刘玉强^[6]等已报道了苍术麸炒后聚乙烯炔成分的含量有所下降。本研究在此基础上对其炮制前后 HPLC 指纹图谱进行对比,进而明确炮制前后化学成分差异,为阐释麸炒苍术炮制机制提供

依据。

1 材料

1.1 仪器 1100 Series 系列高效液相色谱仪(美国安捷伦公司), Promosil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm; 天津博纳艾杰尔科技有限公司), CP225D 型 1/10 万电子天平(德国 sartorius 公司), AR2140 型电子分析天平(上海奥豪斯公司)。

1.2 试药 马兜铃酸 A 对照品(中国食品药品检

[收稿日期] 20140327(017)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81202919); 国家中医药管理局中医药行业科研专项(20110700712)

[第一作者] 常晓文,在读硕士,从事中药化学研究, Tel:024-31404993, E-mail:843756578@qq.com

[通讯作者] *才谦,博士,教授,研究生导师,从事中药化学成分和炮制机理研究, Tel:0411-87586318, E-mail:caiqianmail@sina.com

定研究院,批号 110746-201108);苍术素^[3-4]、苍术素醇^[5]和(4E,6E,12E)-十四癸三烯-8,10-二炔-1、3-二乙酸酯^[6]对照品均为自制,经液相色谱用归一化法测定,纯度均大于98%。10个批次苍术药材来源于湖北罗田,经辽宁中医药大学药用植物教研室王冰教授鉴定,均为菊科植物茅苍术 *Atractylodes lancea* 的干燥根茎。麸炒苍术按照2010年版《中国药典》麸炒方法自行炮制。乙腈、甲醇(色谱纯,天津科密欧化学试剂公司),纯净水(杭州娃哈哈集团有限公司),其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Agilent C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),柱温 25 °C,流速 1.0 mL·min⁻¹,检测波长 270 nm,流动相乙腈(A)-0.1%磷酸水(B),梯度洗脱(0.01 ~ 15 min, 55% ~ 50% B; 15 ~ 25 min, 50% ~ 44% B; 25 ~ 50 min, 44% B; 50 ~ 60 min, 44% ~ 30% B; 60 ~ 70 min, 30% ~ 20% B),进样量 10 μL,理论塔板数按苍术素计算不低于 1 500,所有组分均在 70 min 内被检测完。

2.2 内标物溶液制备 精密称取马兜铃酸 A 对照品适量,加甲醇制成内标物溶液,即得。

2.3 供试品溶液制备 分别取 10 批次生苍术和麸炒苍术粉末(过 60 目)各 1 g,精密称定,置 150 mL 具塞锥形瓶中,精密加入甲醇溶液 10 mL,称定质量,超声处理(功率 180 W,频率 59 kHz) 60 min,放冷,再称定质量,用甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液经 0.45 μm 微孔滤膜即得。每 10 mL 供试品加入 10 mL 马兜铃酸 A 内标物溶液,备用。

2.4 方法学考察

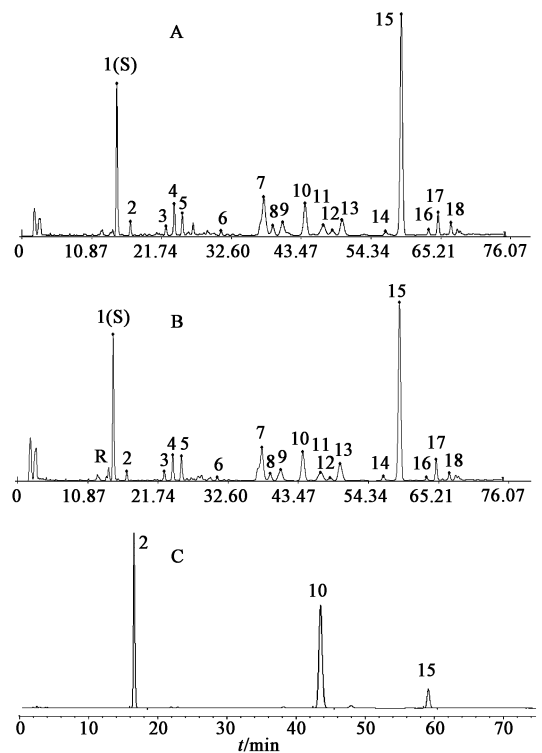
2.4.1 精密度试验 取同一份生苍术供试品溶液(S2),连续进样 6 次,记录色谱图,采用国家药典委员会编制的“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2004A 版)软件对所得色谱图进行数据分析,结果显示,各色谱图的相似度不低于 0.995;以 1 号峰马兜铃酸 A 为参照峰,分别计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积,结果其 RSD 分别 < 1.1% 和 < 1.9%,符合指纹图谱技术要求,表明仪器精密度良好。

2.4.2 重复性考察 取同一批号生苍术药材(S2) 6 份,按 2.3 项下方法制备供试品溶液,按 2.1 项下方法测定,记录色谱图。采用国家药典委员会编制的“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2004A 版)软件对所得色谱图进行数据分析,结果显示,各色谱图的相似度不低于 0.995;以 1 号峰马兜铃酸 A 为参照峰,分别计算各共有峰的相对保留时间和相

对峰面积,结果其 RSD 分别 < 0.2% 和 < 1.8%,符合指纹图谱技术要求,表明方法重复性良好。

2.4.3 稳定性考察 取同一份生苍术供试品溶液(S2),分别在制备后 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 进样检测记录色谱图。采用国家药典委员会编制的“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2004A 版)软件对所得色谱图进行数据分析,结果显示,各色谱图的相似度不低于 0.995;以 1 号峰马兜铃酸 A 为参照峰,分别计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积,结果其 RSD 分别 < 0.7% 和 < 1.9%,符合指纹图谱技术要求,表明 24 h 内样品溶液稳定性良好。

2.5 指纹图谱的建立 分别精密吸取不同批次麸炒前后苍术药材供试品溶液 10 μL,注入高效液相色谱仪,按 2.1 项下色谱条件检测。采用国家药典委员会编制的“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2004A 版)软件,以 S6 为参照图谱,采用中位数法,时间窗宽度为 0.5,将其他样品色谱图进行自动色谱峰匹配,建立 10 个批次苍术药材麸炒前后的指纹图谱共有模式,见图 1。



A. 生苍术; B. 麸炒苍术; C. 对照品

图 1 苍术指纹图谱共有模式

Fig. 1 Fingerprint common model HPLC of *Atractylodes Rhizoma*

2.6 指纹图谱分析

2.6.1 共有峰标定 麸炒前后苍术药材分别标定 18 个共有峰作为指纹图谱的特征峰。与马兜铃酸

A 峰(1 号峰)相比,生苍术药材其他 17 个共有峰相对保留时间依次为(10 批药材的平均值)1.143, 1.508, 1.596, 1.683, 2.076, 2.549, 2.645, 2.748, 2.980, 3.177, 3.272, 3.373, 3.833, 3.997, 4.284, 4.385, 4.520。与马兜铃酸 A 对照品峰(1 号峰)相比,麸炒苍术药材 17 个共有指纹峰相对保留时间依次为 1.142, 1.504, 1.594, 1.681, 2.074, 2.545, 2.643, 2.745, 2.981, 3.172, 3.268, 3.372, 3.829, 3.994, 4.279, 4.380, 4.616。经与对照品对照确认共有峰中 1 号峰为内标物马兜铃酸 A, 2 号峰为苍术素醇, 10 号峰为(4E, 6E, 12E)-十四癸三烯-8, 10-

二炔-1,3-二乙酸酯, 15 号峰为苍术素。

2.6.2 生苍术、麸炒苍术药材指纹图谱相似度评价
将 10 批次生苍术、麸炒苍术药材测试数据导入国家药典委员会编制的“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2004A 版)软件,以 S6 为参照图谱,通过中药指纹图谱相似度软件计算得出生苍术、麸炒苍术高效液相指纹图谱共有模式,与共有模式比较,10 个批次苍术药材相似度,生苍术、麸炒苍术药材对照图谱相似度均可达到 0.90 以上。结果见表 1, 2, 生苍术、麸炒苍术 10 个批次药材 HPLC 指纹图谱见图 2。

表 1 生苍术供试品相似度分析

Table 1 Investigation of similarity of *Atractylodis Rhizoma*

样品号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	对照图谱
S1	1	0.965	0.943	0.906	0.902	0.912	0.965	0.914	0.912	0.901	0.933
S2	0.965	1	0.981	0.970	0.968	0.968	0.983	0.956	0.953	0.913	0.985
S3	0.943	0.981	1	0.978	0.974	0.961	0.971	0.976	0.956	0.901	0.985
S4	0.906	0.970	0.978	1	0.997	0.943	0.957	0.974	0.978	0.967	0.991
S5	0.902	0.968	0.974	0.997	1	0.947	0.961	0.973	0.980	0.976	0.993
S6	0.912	0.968	0.961	0.943	0.947	1	0.963	0.950	0.934	0.904	0.966
S7	0.965	0.983	0.971	0.957	0.961	0.963	1	0.958	0.945	0.929	0.982
S8	0.914	0.956	0.976	0.974	0.973	0.950	0.958	1	0.980	0.903	0.976
S9	0.912	0.953	0.956	0.978	0.980	0.934	0.945	0.980	1	0.916	0.973
S10	0.901	0.913	0.901	0.967	0.976	0.904	0.929	0.903	0.916	1	0.907
对照图谱	0.933	0.985	0.985	0.991	0.993	0.966	0.982	0.976	0.973	0.907	1

表 2 麸炒苍术供试品相似度分析

Table 2 Investigation of similarity of processed *Atractylodis Rhizoma*

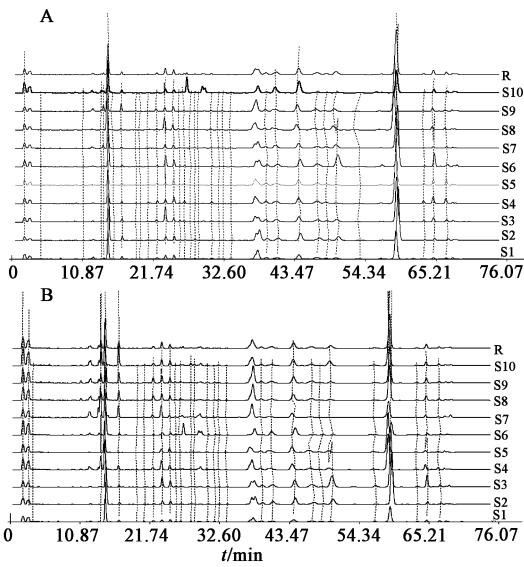
样品号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	对照图谱
S1	1	0.908	0.901	0.927	0.930	0.945	0.932	0.915	0.901	0.924
S2	0.908	1	0.909	0.901	0.900	0.977	0.931	0.953	0.909	0.918
S3	0.901	0.909	1	0.918	0.900	0.957	0.917	0.905	0.967	0.956
S4	0.927	0.901	0.918	1	1	0.957	0.981	0.903	0.959	0.915
S5	0.930	0.900	0.900	1	1	0.956	0.981	0.953	0.960	0.918
S6	0.945	0.977	0.957	0.957	0.956	1	0.906	0.925	0.919	0.976
S7	0.932	0.931	0.917	0.981	0.981	0.906	1	0.909	0.971	0.934
S8	0.915	0.953	0.905	0.903	0.953	0.925	0.909	1	0.908	0.909
S9	0.901	0.909	0.967	0.959	0.960	0.919	0.971	0.908	1	0.961
对照图谱	0.924	0.918	0.956	0.915	0.918	0.976	0.934	0.909	0.961	1

2.6.3 苍术药材及其炮制品指纹图谱比较
从各自的指纹图谱中,可以直观的看出,生苍术、麸炒苍术药材指纹图谱其特征峰数目、位置(相对保留时间)相同,未出现炮制后新增加的峰,所测共有峰峰面积均有不同程度的下降。

3 讨论

本实验采取加入马兜铃酸 A 作为内标物,生苍

术、麸炒苍术药材指纹图谱各峰均与马兜铃酸 A 峰相比较,以各峰峰面积相对马兜铃酸 A 峰面积的变化来推测麸炒前后苍术药材各峰面积的变化。马兜铃酸 A 能完全溶解于样品中,不与待测组分发生化学反应;能与待测组分完全分开(分离度 $R \geq 1.5$),保留时间大于 10 min,且出峰稳定,符合内标物标准,见图 3。生苍术、麸炒苍术药材指纹图谱各共有



A. 生苍术; B. 麸炒苍术; R. 共有模式; S1 ~ S10. 10 批样品

图 2 10 个批次苍术 HPLC 指纹图谱

Fig. 2 HPLC fingerprint of ten batches of the processed *Atractylodis Rhizoma*

峰以马兜铃酸 A 为参照峰计算相对保留时间和相对峰面积。结果表明, 苍术麸炒后各共有峰含量均有不同程度的降低。

件进行了考察^[3], 先后考察了 220, 270, 340 nm 波长, 结果在 270 nm 下, 色谱峰信息较多, 且各色谱峰分离度较好, 基线不漂移, 各色谱峰分离度较好。先后考察了乙腈-水、甲醇-水、乙腈-0.05% 磷酸水、乙腈-0.1% 磷酸水流动相, 结果在乙腈-0.01% 磷酸水条件下, 供试品及内标物马兜铃酸 A 峰形对称且稳定^[7]。

生品苍术与麸炒苍术药材高效液相指纹图谱共有模式相比较, 其中 18 个共有峰含量均有下降, 但麸炒苍术共有模式图谱中 R 峰显示升高, 由于其峰在各批次样品中存在情况不稳定, 有些批次药材不存在 R 峰, 故不算在共有峰中。有文献报道苍术麸炒后 5-羟甲基糠醛的含量升高^[8], 但经与对照品进行对照, R 峰并非 5-羟甲基糠醛的色谱峰。5-羟甲基糠醛色谱峰在此条件下在 5 min 前洗脱。

[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: 66.
[2] 龚千锋. 中药炮制学[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2007: 125.
[3] 张金龙, 秦昆明, 徐自升, 等. 南北苍术炮制前后特征图谱及苍术素含量研究[J]. 科学技术与工程, 2011, 11(20): 4843-4847.
[4] 张晓兰, 李锦, 李遇伯, 等. 高效液相色谱法测定茅苍术药材中 β -桉叶醇与苍术素的含量[J]. 药物分析杂志, 2009, 29(12): 2051-2053.
[5] 南洋, 贾凌云, 李倩, 等. RP-HPLC 法同时测定苍术中苍术素和白术内酯 II 的含量[J]. 药物分析杂志, 2010, 30(1): 17-20.
[6] 刘玉强, 才谦, 贾天柱. 麸炒前后苍术中 3 种成分的 HPLC 测定[J]. 中成药, 2013, 35(1): 131-135.
[7] 李水清, 许康, 刘艳菊, 等. 苍术及麸炒苍术高效液相色谱对比分析[J]. 湖北中医药大学学报, 2011, 13(4): 28-29.
[8] 王丹凤. 苍术麸炒前后化学成分和药效对比研究[D]. 大连: 辽宁中医药大学, 2013: 1-63.

[责任编辑 顾雪竹]

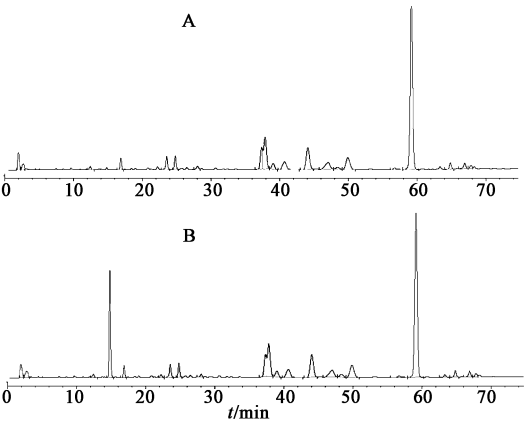


图 3 苍术加内标马兜铃酸前(A), 后(B) HPLC

Fig. 3 HPLC chromatography of *Atractylodis Rhizoma* (add internal standard aristolochic acid A)

实验过程中选择了多种流动相系统, 对色谱条