

# 苍术麸炒前后的专属性 HPLC 特征指纹图谱

陈祥胜, 容艳芬, 刘苗苗, 刘艳菊\*, 许安安

(湖北中医药大学药学院, 湖北省中药炮制工程技术研究中心, 武汉 430065)

**[摘要]** **目的:**比较苍术麸炒前后专属性 HPLC 特征图谱,明确特征性图谱差异性,为苍术生品和麸炒品提供专属性质量评价指标。**方法:**取 10 批生苍术和对应麸炒苍术饮片的正己烷提取物进行 HPLC 分析,流动相色谱乙腈-水梯度洗脱,流速  $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ,检测波长 254 nm。以苍术素色谱峰为参照峰,构建了 10 批苍术生品和麸炒品的 HPLC 指纹图谱的共有模式。**结果:**苍术生品和麸炒品 HPLC 中有 26 个共有峰,各共有峰相对保留时间基本相同,RSD 均  $< 0.5\%$ ;但相对峰面积有明显差异:第 47.36 min 和第 46.35 min 色谱峰的峰面积比值在生品中  $> 1$ ,但在麸炒品中却  $< 1$ ;第 51.70 min 和第 49.25 min 色谱峰的峰面积比值在生品中  $< 1$ ,但在麸炒品中却  $> 1$ 。**结论:**苍术生品和麸炒品的色谱特征峰差异明显,结果稳定、专属性强,可作为生苍术和麸炒苍术饮片的定性鉴别特征之一。

**[关键词]** 苍术; 麸炒品; 指纹图谱; 正己烷; 苍术素; 白术内酯 II; 邻苯二甲酸二异丁酯

**[中图分类号]** R283.2;R283.1;R284.1;R943.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)19-0023-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2016190023

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20160804.1043.012.html>

**[网络出版时间]** 2016-08-04 10:43

## HPLC Characteristic Fingerprints of Atractylodis Rhizoma Before and After Being Processed with Bran

CHEN Xiang-sheng, RONG Yan-fen, LIU Miao-miao, LIU Yan-ju\*, XU An-an

(Hubei Province Engineering Research Center of Chinese Materia Medica Processing, Pharmacy Faculty, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China)

**[Abstract]** **Objective:** To compare specific HPLC fingerprints of Atractylodis Rhizoma before and after being processed with bran, and clear differences among characteristic peaks. **Method:** *n*-Hexane extracts of ten batches of raw products and the corresponding processed products with bran were analyzed by HPLC, mobile phase was acetonitrile-water for gradient elution, the detection wavelength was 254 nm. Taking atractylodin as the reference peak, common pattern of HPLC fingerprints about raw and processed products was constructed. **Result:** There were 26 common peaks in HPLC of raw and processed products of Atractylodis Rhizoma, the relative retention time of common peaks was almost the same with RSD  $< 0.5\%$ ; but difference of their relative peak area was obvious. In HPLC fingerprints, the area ratio of chromatographic peaks at 47.36 min to 46.35 min was greater than 1 in raw products, but it was less than 1 in processed products; at the same time, the area ratio of peaks at 51.70 min to 49.25 min was less than 1 in raw products, but it was greater than 1 in processed products. **Conclusion:** Difference of chromatographic peaks in raw and processed products of Atractylodis Rhizoma is significant, and the results are stable with good specificity. It can be used as qualitative identification between raw and processed products of Atractylodis Rhizoma.

**[收稿日期]** 20160131(006)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81073051,81541080);国家科技部科技基础性专项(2014FY111100-2)

**[第一作者]** 陈祥胜,在读博士,副教授,从事中药炮制研究,Tel:027-68890070,E-mail:515887025@qq.com

**[通讯作者]** \*刘艳菊,博士,教授,博士生导师,从事中药炮制学研究,Tel:027-68890231,E-mail:lyj1965954@sohu.com

[Key words] *Atractylodis Rhizoma*; processed products with bran; fingerprints; *n*-hexane; atractylodin; atractylenolide II; diisobutyl phthalate

苍术含挥发油及非挥发性成分,其中挥发油主要由倍半萜、聚乙烯炔类及少量酚类、倍半萜内酯等成分组成<sup>[1-2]</sup>;倍半萜主要成分为 $\beta$ -桉叶醇、茅术醇和苍术酮等;非挥发性成分日本学者研究较多,主要为糖苷类成分<sup>[3]</sup>。常晓文等<sup>[4]</sup>和李水清等<sup>[5]</sup>还对苍术麸炒前后的化学成分进行了分析。生苍术温燥而辛烈,麸炒可缓和苍术燥性,增强健脾和胃的作用<sup>[6-8]</sup>。现代研究表明,苍术的药理活性包括调节胃肠蠕动<sup>[9]</sup>、抗菌消炎<sup>[10-11]</sup>、利尿<sup>[12]</sup>和保肝<sup>[13]</sup>等。目前,对生苍术和麸炒苍术仍无专属性鉴别指标。本实验将在 2015 年版《中国药典》现有标准的基础上,对比生苍术质量标准,研究麸炒苍术专属性质量评价指标,比较苍术麸炒前后 HPLC 图谱,明确特征性差异峰,为补充和完善苍术饮片麸炒前后质量评价指标提供实验依据。

## 1 材料

1260 型高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司),BP211D 型 1/10 万电子分析天平(德国 Sartorius 公司)。苍术素对照品(中国食品药品检定研究院,批号 111924-201404),邻苯二甲酸二异丁酯对照品(德国 Dr. Ehrenstorfer Laboratory),白术内酯 II 对照品(四川省韦克奇生物科技有限公司,批号 130522),苍术饮片(采集于江苏句容茅山、安徽六安、湖北英山、湖北蕲春等 10 个产地,经湖北中医药大学药学院生药研究室陈科力教授鉴定为菊科植物茅苍术 *Atractylodes lancea* 的干燥根茎),水为娃哈哈纯净水,甲醇、乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

**2.1 饮片的制备** 参照 2015 年版《中国药典》一部的炮制方法<sup>[1]</sup>,将 10 批茅苍术药材各 5 kg 制备成茅苍术生饮片,并各取一半制备成对应的麸炒苍术饮片。

**2.2 供试品溶液的制备**<sup>[14]</sup> 取生苍术饮片及麸炒苍术饮片各 1.25 g,加入正己烷 120 mL,采用索氏提取法提取,提取液于 70 °C 水浴蒸发至无正己烷气味后,冷却至室温;用无水乙醇溶解并定容至 50 mL,经 0.45  $\mu$ m 微孔滤膜滤过,即得。

**2.3 对照品溶液的制备** 分别精密称取苍术素、邻苯二甲酸二异丁酯、白术内酯 II 对照品适量,加无水乙醇制成质量浓度分别为 20, 10, 5  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的混合对照品溶液,即得。

**2.4 色谱条件** Boston C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm  $\times$  250 mm, 5  $\mu$ m),柱温 30 °C,流动相乙腈(A)-水(B)梯度洗脱(0 ~ 20 min, 55% B; 20 ~ 30 min, 55% ~ 45% B; 30 ~ 45 min, 45% ~ 40% B; 45 ~ 55 min, 40% B; 55 ~ 65 min, 40% ~ 25% B; 65 ~ 80 min, 25% ~ 15% B; 80 ~ 85 min, 15% ~ 55% B),流速 1.0  $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ,检测波长 254 nm,进样量 20  $\mu$ L,所有组分均在 85 min 内被检测完。

## 2.5 方法学考察

**2.5.1 精密度试验** 取同一份苍术样品溶液(S1)按 2.4 项下色谱条件连续进样 5 次,将图谱导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2004 A 版),结果显示各图谱的相似度  $\geq 0.999$ ;以 22 号峰(苍术素)为参照峰,计算各共有峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD 分别为  $< 0.5\%$  和  $< 2.0\%$ ,符合指纹图谱技术要求,表明仪器精密度良好。

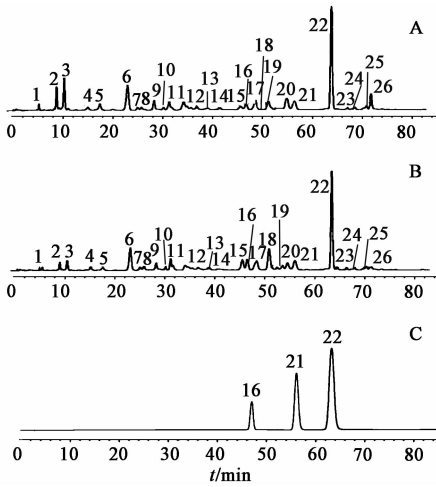
**2.5.2 稳定性试验** 取同一供试品溶液(S1),分别在 2, 4, 6, 8, 12 h 按 2.4 项下色谱条件检测,将图谱导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2004 A 版),考察色谱峰相似度的一致性,结果显示各色谱图相似度  $\geq 0.999$ ;以 22 号峰(苍术素)为参照峰,计算各共有峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD 分别为  $< 0.3\%$  和  $< 2.1\%$ ,表明供试品溶液在 12 h 内稳定性良好。

**2.5.3 重复性试验** 取同一供试品(S1),平行 6 份,按 2.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.4 项下色谱条件测定,结果各色谱图相似度  $\geq 0.999$ ,以 22 号峰(苍术素)为参照峰,计算各共有峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD 分别为  $< 0.3\%$  和  $< 3.0\%$ ,表明该方法重复性良好。

**2.6 HPLC 特征指纹图谱的建立** 分别吸取不同产地的 10 批苍术生品、麸炒品供试品溶液及对照品溶液 20  $\mu$ L,按 2.4 项下色谱条件测定,记录 85 min 内的色谱信息,将图谱导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2004 A 版),以 S1 为参照图谱,将其他样品色谱图进行色谱峰自动匹配,建立 10 批苍术麸炒前后指纹图谱的共有模式,见图 1。

## 2.7 HPLC 特征指纹图谱分析

**2.7.1 共有峰标定** 苍术麸炒前后 HPLC 分别标定 26 个共有峰作为指纹图谱的特征峰。与苍术素色谱峰(22 号峰)相比,苍术生品色谱图中其他 25



A. 生品; B. 麸炒品; C. 对照品; 16. 白术内酯 II; 21. 邻苯二甲酸二异丁酯; 22. 苍术素

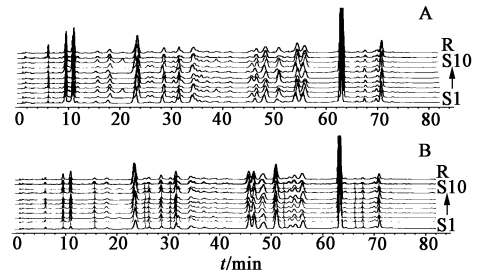
图 1 苍术 HPLC 特征指纹谱共有模式

Fig. 1 Common pattern of HPLC fingerprint of Atractylodis Rhizoma

个共有峰的相对保留时间(10 批样品的平均值)依次为 6.243, 9.742, 11.251, 15.952, 18.451, 23.930, 25.922, 26.631, 29.091, 30.896, 31.953, 32.442, 39.840, 41.496, 46.352, 47.361, 49.252, 51.707, 53.309, 55.412, 56.803, 67.270, 68.741, 71.192, 71.924; 与苍术素色谱峰相比, 苍术麸炒品色谱图中其他 25 个共有峰的相对保留时间(10 批样品的平均值)依次为 6.241, 9.723, 11.181, 15.853, 18.452, 23.958, 25.947, 26.627, 29.161, 30.892, 31.948, 32.450, 39.857, 41.646, 46.349, 47.355, 49.248, 51.681, 53.405, 55.467, 56.836, 67.335, 68.644, 71.255, 71.854。经与对照品确认, 共有峰中 16 号峰为白术内酯 II, 21 号峰为邻苯二甲酸二异丁酯, 22 号峰为苍术素。

**2.7.2 特征指纹图谱相似度评价** 将 10 批苍术生品和麸炒品检测数据导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2004 A 版), 以 S1 为参照图谱, 得苍术生品和麸炒品的 HPLC 指纹图谱共有模式, 见图 2, 对特征指纹图谱进行相似度比较, 结果各色谱图相似度均 > 0.95。

**2.7.3 HPLC 特征指纹图谱比较** 将苍术生品和麸炒品 HPLC 特征指纹图谱作镜像图, 比较两者对应色谱峰的峰面积变化规律, 寻找专属性差异, 见图 3。经过对苍术麸炒前后的 HPLC 特征图谱对比分析, 发现麸炒苍术 HPLC 指纹图谱较生苍术的色谱峰多(如共有模式图中 19 号与 20 号色谱峰之间及 22 号与 23 号色谱峰之间存在非共有峰), 提示炮制



A. 生品; B. 麸炒品; R. 共有模式

图 2 10 批苍术样品 HPLC 指纹谱

Fig. 2 HPLC fingerprints for 10 batches of Atractylodis Rhizoma

过程中有新成分的产生; 且共有峰中 16 号(47.36 min)与 15 号(46.35 min)色谱峰的峰面积比值及 18 号(51.70 min)与 17 号(49.25 min)色谱峰的峰面积比值具有明显的差异性规律, 结果见表 1。

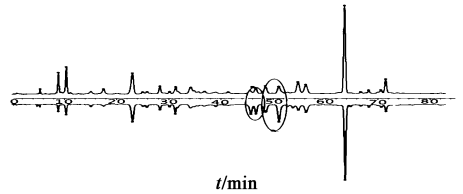


图 3 苍术麸炒前后 HPLC 共有峰模式的镜像对比(正像为生品, 反像为麸炒品)

Fig. 3 Mirror comparison of Atractylodis Rhizoma before and after being processed with bran (the positive figure is the raw sample and the reverse figure is the processed sample)

表 1 苍术麸炒前后特征色谱峰峰面积比值

Table 1 Area ratio of characteristic chromatographic peaks for Atractylodis Rhizoma before and after being processed with bran

样品	生苍术		麸炒苍术	
	$A_{16}/A_{15}$	$A_{18}/A_{17}$	$A_{16}/A_{15}$	$A_{18}/A_{17}$
1	1.052	0.938	0.926	1.962
2	3.581	0.517	0.806	1.989
3	3.302	0.636	0.986	1.649
4	3.685	0.408	0.983	2.344
5	1.020	0.808	0.816	1.683
6	1.343	0.955	0.807	1.564
7	1.275	0.863	0.770	1.864
8	2.594	0.772	0.814	1.548
9	1.602	0.671	0.983	1.669
10	2.336	0.973	0.671	2.087

结果在相同色谱条件下, 麸炒苍术 HPLC 指纹图谱较生苍术出现了非共有峰, 且相关色谱峰的峰面积发生了显著变化: 第 16 号(47.36 min)和第 15 号(46.35 min)色谱峰的峰面积比值在生品中 > 1, 但在麸品中却 < 1; 第 18 号(51.70 min)和第 17 号

(49.25 min) 色谱峰的峰面积比值在生品中 < 1, 但在麸品中却 > 1。此变化规律稳定。

### 3 讨论

苍术作为临床常用中药, 研究其麸炒前后化学成分变化的文献较多, 但主要侧重于研究炮制对个别成分的影响<sup>[4-5, 15-16]</sup>; 本文以苍术麸炒前后正己烷总提取物为研究对象, 通过对指纹图谱中共有峰和非共有峰进行比较研究, 揭示麸炒对苍术内在化学成分影响的总体规律。10 批生苍术饮片及对应麸炒苍术饮片的 HPLC 特征指纹图谱, 其各自的相似度均 > 0.95; 进一步通过共有模式镜像对比研究, 结果生苍术和麸炒苍术 HPLC 特征图谱中存在 26 个共有峰, 且部分共有峰的峰面积比值在麸炒前后有明显变化; 提示苍术饮片在麸炒过程中, 其内部化学成分发生了量变和转化的现象。以上结果在 10 组对应样品中变化规律稳定, 且本文采用的检测方法精密度和稳定性良好, 所得 HPLC 特征指纹图谱变化特征明显, 具有专属性, 建议将环己烷提取物的 HPLC 特征指纹图谱作为麸炒苍术和苍术的色谱鉴别指标。本研究在采用样本时虽覆盖了道地产区和主产区, 所得结果具有一定的代表性和可信性, 但由于样本量还不足够大, 课题组后续将进一步加大采集地和样本量, 以进一步验证实验结果。

本实验采用正己烷索氏提取苍术饮片中化学成分, 相较于《中国药典》2015 年版中规定的甲醇超声提取, 得到的色谱峰个数更多, 且分离度更好, 其特征图谱更具直观性。Wagner 等<sup>[14]</sup> 在研究中也获得了相同的结论。建议将苍术的正己烷提取物所得 HPLC 色谱峰信息作为苍术饮片质量评价的重要指标。

整体而言, 麸炒苍术 HPLC 指纹图谱较生苍术的色谱峰多(如共有模式图中 19 号与 20 号色谱峰之间及 22 号与 23 号色谱峰之间出现了新的色谱峰), 说明炮制过程中有新成分产生, 这可能是麸炒苍术药性和药效改变的内在物质基础。已标定的 3 种成分(白术内酯 II, 邻苯二甲酸二异丁酯和苍术素)在苍术麸炒以后含量均呈现下降, 这一变化规律与文献<sup>[15]</sup>报道相吻合; 可能与这几种成分存在于挥发油中有关。其中邻苯二甲酸二异丁酯属于邻苯二甲酸酯类增塑剂, 已确认为第四类毒性化学物质, 是苍术“燥性”的主要成分之一<sup>[16]</sup>, 麸炒苍术中其含量下降也证实了麸炒对苍术确有降燥作用。

### [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, 2015: 161-162.
- [2] 王锡宁, 郭明才. 茅苍术挥发油化学成分的分析研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2003, 13(3): 295-297.
- [3] 吉力, 敖平, 潘炯光, 等. 苍术挥发油的气相色谱-质谱联用分析[J]. 中国中药杂志, 2001, 26(3): 182-185.
- [4] 常晓文, 刘玉强, 才谦. 麸炒前后苍术 HPLC 指纹图谱[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(4): 40-43.
- [5] 李水清, 许康, 刘艳菊, 等. 苍术及麸炒苍术高效液相图谱对比分析[J]. 湖北中医药大学学报, 2011, 13(4): 28-30.
- [6] 王丹凤, 刘玉强, 才谦. 苍术麸炒前后健脾作用研究[J]. 时珍国医国药, 2013, 24(1): 155-156.
- [7] 徐德春, 蒋继洋, 沈俊美. 苍术古今炮制研究初探[J]. 时珍国医国药, 2001, 12(3): 257-258.
- [8] 叶定江, 张世臣, 吴浩. 中药炮制学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2012: 328-332.
- [9] Kimura Y, Sumiyoshi M. Effects of an *Atractylodes lancea* rhizome extract and a volatile component  $\beta$ -eudesmol on gastrointestinal motility in mice[J]. J Ethnopharmacol, 2012, 141(1): 530-536.
- [10] 于艳, 贾天柱, 才谦. 茅苍术及其麸炒品对胃溃疡大鼠抗炎作用的比较研究[J]. 中国中药杂志, 2016, 41(4): 705-710.
- [11] 付伟, 孙雄杰, 李水清, 等. 苍术炒焦前后对湿阻中焦模型大鼠 AQP2, AQP3 含量的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(19): 19-22.
- [12] Sotoh K, Yasuda I, Nagai F, et al. The effects of crude drugs using diuretic on horse kidney ( $\text{Na}^+ + \text{K}^+$ )-adenosine triphosphatase[J]. Yakugaku Zasshi, 1991, 111(2): 138-145.
- [13] Hwang J M, Tseng T H, Hsieh Y S, et al. Inhibitory effect of atractylon on tert-butyl hydroperoxide induced DNA damage and hepatic toxicity in rat hepatocytes[J]. Arch Toxicol, 1996, 70(10): 640-643.
- [14] Wagner H, Bauer R, Xiao P G, et al. Chromatographic fingerprint analysis of herbal medicines[J]. Chin Herbal Med, 2011, 3(4): 319-320.
- [15] 李爱华, 才谦. HPLC 法测定苍术麸炒前后白术内酯 II 的含量[J]. 辽宁科技学院学报, 2013, 15(2): 26-28.
- [16] 李鑫, 孙雄杰, 程颖, 等. 苍术麸炒前后邻苯二甲酸二异丁酯含量对比研究[J]. 时珍国医国药, 2014, 25(8): 1871-1872.

[责任编辑 刘德文]