

-0.2 %甲酸水溶液系统,在该系统下,全部分析时间为 60 min,各产地苦参药材指纹图谱上各色谱峰分离情况均较好。

3.2 提取溶剂与提取方法 考察了回流提取与超声提取方式,以及 95 %、70 %、50 %乙醇提取溶剂,结果表明,超声处理优于回流,95 %乙醇提取的色谱峰最为完全。提取时间优选的结果表明,30 min 提取较为完全。

3.3 色谱峰的归属 采用对照品对照和 LC-MS 法共同对共有峰进行指认,确定了 13 个共有峰中的 6 个色谱结构信息,其他共有峰的结构有待进一步研究。通过比较 10 批不同产地苦参样品的图谱发现,指纹图谱相似度均在 0.91 以上,但是共有峰的相对峰面积差异较大。说明不同产地药材化学成分含量存在较大的差异,该差异的产生与药材的种植环境等有关。采用指纹图谱方法可以表征苦参药材的内在信息,可用于苦参药材中黄酮类成分的质量控制。

参考文献:

- [1] Ryu SY, Choi SU, Kim SK, et al. In vitro antitumour activity of flavonoids from *Sophora flavescens* [J]. *Phytother Res*, 1997, 11(1): 51-53.
- [2] Ding PL, Chen DF, Kenneth FB, et al. Cytotoxic isoprenylated flavonoids from the roots of *Sophora flavescens* [J]. *Helv Chim Acta*, 2004, 87(10): 2574-2580.
- [3] Jung HA, Jin SE, Park JS, et al. Antidiabetic complications and anti-Alzheimer activities of sophoflavescenol, a prenylated flavonol from *Sophora flavescens*, and its structure activity relationship [J]. *Phytother Res*, 2011, 25(5): 709-715.
- [4] 张铁军. 中药质量认识与质量评价[J]. *中草药*, 2011, 42(1): 1-9.
- [5] 陈磊, 刘怡, 梁生旺. 苦参化学成分研究[J]. *广东药学院学报*, 2011, 27(5): 471-473.
- [6] 朱丽君, 刘斌, 石任兵. 高效液相色谱法测定苦参药材及其黄酮部位中降苦参酮、黄腐醇和苦参啉的含量[J]. *药物分析杂志*, 2008, 28(1): 32-35.

(编辑: 宋威)

白术 4 种炮制品 HPLC 指纹图谱比较

梁永枢, 庄义修, 段 启, 姚丽梅(广东食品药品职业学院, 广东 广州 510520)

摘要: 目的 建立并比较 4 种白术炮制品高效液相指纹图谱。**方法** 采用外标法。Dikma Kromasil C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm)色谱柱,以乙腈-水梯度洗脱(45 %~100 %乙腈),体积流量为 1.0 mL/min,柱温 25 ℃,检测波长为 242 nm。通过中药指纹图谱计算机辅助相似度软件,计算相似度等相关参数。**结果** 通过对白术 4 种炮制品指纹图谱的比较分析,各种炮制品共有指纹明显不同。**结论** 本研究所建立的方法可靠,简便易行,为更好地控制不同白术炮制品质量提供科学依据。

关键词: 炮制; 白术; 指纹图谱; 高效液相色谱; 比较

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2013)03-0285-05

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2013.01.021

Fingerprints Comparison of Four Processed Products of Rhizoma Atractylodis Macrocephalae by HPLC

LIANG Yongshu, ZHUANG Yixiu, DUAN Qi, YAO Limei (Guangdong Food and Drug Vocational College, Guangzhou 510520 Guangdong, China)

Abstract: Objective To establish a HPLC fingerprint method for four processed products of Rhizoma Atractylodis Macrocephalae. **Methods** External standard was used. The procedure of HPLC analysis was performed on Kromasil C₁₈ column(250 mm×4.6 mm, 5 μm) with the mobile phase composed of acetonitrile and water(45 %~100 % Acetonitrile) in gradient elution. The flow rate was 1.0 mL/min and detection wavelength was set at 242nm. The column temperature was maintained at 25 ℃. Similarity evaluation system for chromatographic fingerprint of traditional Chinese medicine was used for data analysis. **Results** The comparison results showed great variety in fingerprints of four processed

收稿日期: 2012-12-18

作者简介: 梁永枢, 男, 副主任中药师, 主要从事中药质量标准研究。Email: liangys@gdzy.edu.cn。通讯作者: 姚丽梅, 副教授, 主要从事中药药理的教学与科研工作。Email: yaolm@gdzy.edu.cn。

products of Rhizoma Atractylodis Macrocephalae. **Conclusion** The established method is simple and reliable, and the HPLC fingerprint can be used for the quality control of the processed products of Rhizoma Atractylodis Macrocephalae. **Keywords:** Processing; Rhizoma Atractylodis Macrocephalae; Fingerprints; High performance liquid chromatography; Comparison

白术为菊科植物白术 *Atractylodes macrocephala* Koidz.的干燥根,道地产区为浙江,其性甘、苦、温,具有健脾益气、燥湿利水、止汗、安胎的功效^[1]。《中国药典》2010 年版收载有白术(生饮片)、麸炒白术(蜜麸)^[2],广东省中药饮片炮制规范收载有土白术、白术炭和焦白术^[3],全国中药炮制规范收载有白术、焦白术、麸炒白术、土炒白术^[4]。白术所含有的内酯类成分和挥发性成分在炮制前后变化明显,且不同炮制品变化亦有不同,主要表现在所含成分的种类和含量大小的变化方面^[5]。中华人民共和国药品管理法规定,中药炮制必须按照国家和地方药品标准炮制,本文采用 HPLC 法建立了白术饮片、麸炒白术、土炒白术、焦白术(清炒)4 种炮制品的指纹图谱,并进行了比较分析。指纹图谱数据依据国家食品药品监督管理局颁布的《中药注射剂指纹图谱研究的技术要求(暂行)》和国家药典委员会印发的《中药注射剂指纹图谱实验研究技术指南(试行)》进行处理,本研究拟为科学控制白术各炮制品的质量提供科学的依据。

1 仪器与试药

美国 Agilent 1100 高效液相色谱仪,二级管阵列检测器,含在线真空脱气机、四元梯度泵、柱温箱;1100 色谱工作站。乙腈和甲醇均为色谱纯,购自广州化学试剂厂;水为自制纯化水;SB-4200DT 型超声波清洗仪,宁波新艺生物科技股份有限公司。药材共 10 批,由课题组分别采自浙江 4 批、江西 2 批、湖南 1 批、湖北 2 批、重庆 1 批,具体来源见表 1。经我院庄义修教授鉴定为《中国药典》规定的正品白术。

表 1 10 批白术药材的产地和编号
Table 1 Source and lot numbers of 10 batches of Rhizoma Atractylodis Macrocephalae

样品	来源	样品	来源
S1	江西修水	S6	重庆酉阳
S2	江西修水	S7	湖南岳阳
S3	浙江缙云	S8	浙江金华
S4	浙江磐安	S9	湖北恩施
S5	浙江新昌	S10	湖北利川

2 方法与结果

2.1 炮制品的制备^[2-4] 白术饮片(生品):分别取表1 各批白术,除去杂质,洗净,润透,切厚片,干燥,即得。麸炒白术:将蜜炙麸皮撒入热锅内,待冒烟时加入白术片,炒至黄棕色、溢出焦香气,取出,筛去蜜炙麸皮。每 100 kg 白术片,用蜜炙麦麸 10 kg。土炒白术:取赤石脂粉用中火加热至滑利,倒入净白术片,拌炒至表面均匀挂有土色,有香气溢出时取出,筛去多余的土粉。每 100 kg 白术片,用赤石脂 20 kg。清炒白术(焦):取净白术片,置炒制容器内,用中火炒至表面焦黄色或焦褐色,断面颜色加深,取出,摊凉即可。

2.2 色谱分析条件 色谱柱: Dikma Kromasil C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 以乙腈为流动相 A, 水为流动相 B, 梯度洗脱程序为(A): 0~25 min, 45%~80%; 25~40 min, 80%~100%; 40~55 min, 100%。流速: 1.0 mL/min; 柱温: 25℃, 检测波长: 242 nm; 进样量: 10 μL; 记录时间: 55 min。

2.3 供试品溶液的制备 取各炮制品白术粉末(过 3 号筛),精密称取约 2 g 置于 50 mL 容量瓶中,用甲醇定容至刻度,称定质量。超声提取 30 min,放冷后再称质量,用甲醇补足减失质量。滤过,吸取续滤液,过 0.20 μm 滤膜,即得。

2.4 测定方法 精密吸取各供试品溶液 10 μL,注入液相色谱仪,记录 55 min 的色谱图,即得。供试品色谱中,以色谱峰(S 峰)的保留时间和峰面积为 1,计算各指纹峰的相对保留时间比值。

2.5 精密度试验 取同一供试品溶液(编号 S5),连续进样 6 次,共有峰的相对保留时间一致。结果表明,各共有峰的相对保留时间 RSD 小于 2.0%,符合指纹图谱分析要求。

2.6 重现性试验 取同一供试品(编号 S5)6 份,按照 2.3 项下分别制备后,连续进样 6 次,共有峰的相对保留时间一致。所考察的各共有峰的相对保留时间 RSD 小于 1.0%,具有较好的重现性,符合指纹图谱分析要求。

2.7 稳定性试验 取同一供试品溶液(编号 S5), 分别于 0, 4, 6, 8, 12, 14, 18, 22, 24 h 进行分析, 记录各共有峰的保留时间。结果表明, 24 h 内各共有峰的相对保留时间 RSD 小于 0.5 %, 表明常温下供试品溶液在 24 h 内基本稳定。

2.8 HPLC 指纹图谱分析

2.8.1 参照峰的确立 分别对白术 4 种炮制品共 10 批样品依据上述条件进行分析, 记录色谱图, 36 个化合物中, 5 个化合物利用 HPLC-MS 做了结构鉴定, 分别是: 17(石竹烯)、18(γ -榄香烯)、23(桉叶烷-4(14), 11-二烯)、30(9, 10-脱氢环异长叶烯)和 31(苍术酮)化合物。白术饮片保留时间(t_R)为 36.060 min, 清炒白术保留时间为 36.088 min, 麸炒白术保留时间为 36.053 min, 土炒白术保留时间为 36.065 min 时, 苍术酮峰面积均较稳定, 且分离度好, 将其

设为参照峰 S, 保留时间为 1, 计算各峰的相对保留时间比值(α/T_r), 见图 1 和表 2。

2.8.2 共有模式的建立及相似性分析 将 4 种白术炮制品的 10 批样品出峰数据分别导入中药指纹图谱计算机辅助相似度计算软件, 经过峰点校正和数据匹配, 以中位数法建立对照指纹图谱即共有模式, 见图 1。各样品与共有模式之间的相似度在 0.94 以上, 结果见表 3。结合样品出峰情况与匹配结果, 白术饮片有 19 个、清炒白术有 24 个、麸炒白术有 27 个、土炒白术有 23 个峰为样品所共有。据此确定 4 种炮制品的共有峰, 其相对保留时间结果见表 2。经统计共有峰面积占总峰面积百分比为 91.0~98.0 %, 非共有峰面积占总峰面积的百分比为 2~9 %。符合指纹图谱研究的非共有峰面积占总峰面积百分比 < 10 %的技术要求。

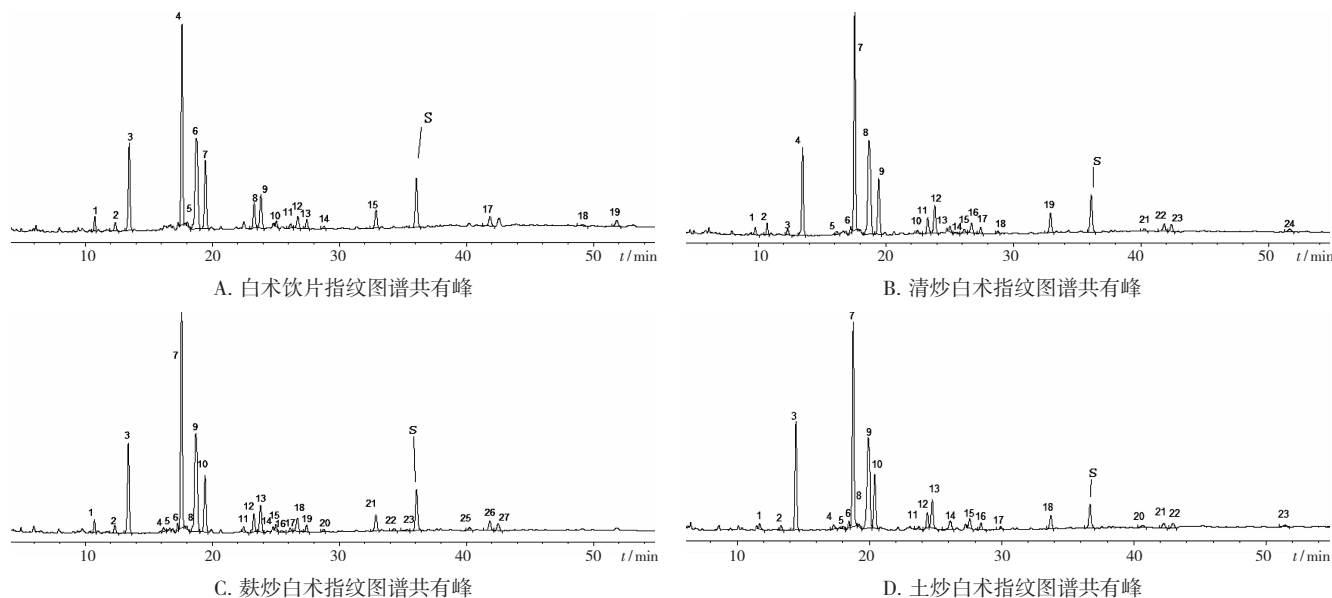


图 1 白术 4 种炮制品共有模式指纹图谱

Figure 1 Reference fingerprints of four kinds of processed Rhizoma Atractylodis Macrocephalae

2.8.3 白术 4 种炮制品指纹图谱对比分析 从表 2 可知, 白术饮片 19 个共有峰, 清炒后有 24 个共有峰, 有 17 个峰是相同的, 其中, 清炒白术在生饮片的基础上新产生了 4 个峰, 应该是加热炒制过程中部分成分分解的原因; 麸炒白术有 27 个共有峰, 其中 17 个与白术饮片相同, 有 20 个与清炒白术相同, 说明麸炒后, 由于加热的原因, 部分成分分解变化与清炒白术相似, 但由于有麦麸的作用, 其中, 麦麸的成分参与了新成分的构成; 土炒白术有 23 个共有峰, 与白术饮片有 13 个峰相同, 与清炒白术有 14 个峰相同, 与麸炒白术有 16 个峰相同; 其中, 清炒白术新产生 1 个峰, 麸炒新产生 3 个峰, 土炒新产

生 6 个峰, 说明炒制过程中, 由于辅料的不同, 新产生的成分更为复杂, 特别是土炒白术, 炒制温度较高, 所以产生的新成分更多。对比 4 种炮制品之间相同峰的相对保留时间(α/T_r), 基本在 ± 0.005 范围内波动, 具有较高的稳定性。因此, 利用相对保留时间作为白术炮制品指纹图谱定性鉴别指标是完全可行的。

3 讨论

本实验用梯度洗脱的方法使 4 种白术炮制品指纹图谱得到了很好的分离。采集的 10 批白术药材基本代表了国内白术药材分布的现状, 通过比较各样

表 2 白术 4 种炮制品共有峰

Table 2 Common peaks of four kinds of processed Rhizoma Atractylodis Macrocephalae

序号	化合物名称	白术饮片共有峰		清炒白术共有峰		麸炒白术共有峰		土炒白术共有峰	
		保留时间 / 峰编号	相对保留	保留时间 / 峰编号	相对保留	保留时间 / 峰编号	相对保留	保留时间 / 峰编号	相对保留
		t _R /Lot	时间 α/Tr	t _R /Lot	时间 α/Tr	t _R /Lot	时间 α/Tr	t _R /Lot	时间 α/Tr
1				9.753(S1)	0.270				
2		10.754 (S1)	0.298	10.685(S2)	0.296	10.752 (S1)	0.298		
3								11.686(S1)	0.319
4		12.358 (S2)	0.343	12.284(S3)	0.340	12.354(S2)	0.343		
5		13.466 (S3)	0.373	13.452(S4)	0.373	13.452(S3)	0.373	13.299(S2)	0.373
6								14.426(S3)	0.394
7				16.129(S5)	0.447	16.195(S4)	0.449		
8						16.582(S5)	0.460		
9				17.229(S6)	0.477	17.292(S6)	0.480	17.261(S4)	0.481
10		17.605(S4)	0.488	17.542(S7)	0.486	17.606(S7)	0.488	17.995(S5)	0.491
11		18.041(S5)	0.500			18.036(S8)	0.500	18.424(S6)	0.503
12		18.726(S6)	0.519	18.66(S8)	0.517	18.723(S9)	0.519	18.746(S7)	0.517
13		19.461(S7)	0.540	19.422(S9)	0.538	19.458(S10)	0.540	19.205(S8)	0.539
14								19.889(S9)	0.543
15								20.38(S10)	0.556
16				22.445(S10)	0.622	22.479(S11)	0.623		
17	石竹烯	23.297(S8)	0.646	23.255(S11)	0.644	23.292(S12)	0.646		
18	γ- 榄香烯	23.825(S9)	0.611	23.803(S12)	0.660	23.817(S13)	0.661	23.70(S11)	0.657
19						24.339(S14)	0.675	24.36(S12)	0.672
20		25.03(S10)	0.694	24.998(S13)	0.693	25.026(S15)	0.694	24.72(S13)	0.695
21				25.443(S14)	0.705	25.476(S16)	0.707		
22		26.15(S11)	0.725	26.121(S15)	0.724	26.152(S17)	0.725	26.08(S14)	0.722
23	桉叶烷-4(14), 11- 二烯	26.73(S12)	0.741	26.704(S16)	0.740	26.718(S18)	0.741		
24		27.42(S13)	0.761	27.412(S17)	0.760	27.421(S19)	0.761	27.56(S15)	0.762
25		28.76(S14)	0.798	28.765(S18)	0.797	28.758(S20)	0.798	28.40(S16)	0.795
26		32.87(S15)	0.912	32.891(S19)	0.911	32.867(S21)	0.912		
27								29.91(S17)	0.816
28								33.68(S18)	0.919
29						34.284(S22)	0.951		
30	9, 10- 脱氢 环异长叶烯					35.297(S23)	0.979		
31	苍术酮	36.060(S)	1.000	36.088(S)	1.000	36.053(S)	1.000	36.065(S)	1.000
32				40.262(S21)	1.116	40.208(S25)	1.115	40.64(S20)	1.117
33		41.88(S17)	1.161	41.829(S22)	1.159	41.839(S26)	1.160	42.17(S21)	1.158
34				42.425(S23)	1.176	42.487(S27)	1.178	42.87(S22)	1.175
35		49.16(S18)	1.364						
36		51.87(S19)	1.439	51.736(S24)	1.434			51.368(S23)	1.432

注: S 为参照峰, α/Tr 为相对保留时间, t_R 为保留时间, Lot 为峰编号。

品的出峰情况,标定了白术饮片 19 个、清炒白术 24 个、麸炒白术 27 个和土炒白术 23 个共有峰。建立了 4 种白术炮制品的指纹图共有模式。各样品之间的相似度均在 0.9 以上,与共有模式的相似度均在 0.94 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。通过实验证实该方法,稳定、可靠,特别是 4 种炮制品的指纹图谱大部分共有峰相同,但区别也比较明显,可用于白术炮制品的鉴别和质量控制。

对指纹图谱色谱条件进行了优化,对 0.5 %磷酸

表 3 白术 4 种炮制品的相似度结果

Table 3 Similarity of four kinds of processed Rhizoma Atractylodis Macrocephalae

样品	白术饮片相似度	清炒白术相似度	麸炒白术相似度	土炒白术相似度
S1	0.963	0.971	0.994	0.989
S2	0.993	0.999	0.998	0.994
S3	0.998	0.991	0.991	0.98
S4	0.987	0.988	0.999	0.979
S5	0.996	0.994	0.994	0.998
S6	0.993	0.993	0.992	0.995
S7	0.983	0.934	0.997	0.971
S8	0.949	0.985	0.996	0.961
S9	0.993	0.992	0.978	0.966
S10	0.991	0.956	0.947	0.988

水-乙腈、甲醇-水、乙腈-水系统进行了考察,结果表明乙腈-水系统分离良好,峰形符合要求,故选择乙腈-水系统进行梯度洗脱。考察了甲醇、乙醇、乙酸乙酯、丙酮等不同提取溶剂,超声、回流等不同提取方式,并进行了提取时间为 30 min、1 h、2 h,提取次数为 1 次、2 次的考察,结果表明,以甲醇超声 30 min,1 次即可提取完全,与长时间的提取结果相差很小,因此,确定该提取方法。比较了 203、220、242、276、300 nm 共 5 个波长下的色谱图,发现 203 和 300 nm 峰信号少,220 和 276 nm 处有几个出峰信号大,但其他峰信号太少,而 242 nm

处出峰多且信号整体较为明显,因此,选择 242 nm 为检测波长。对分析时间也进行了考察,吸取供试品 S5 溶液 10 μL,注入高效液相色谱仪,运行 120 min,记录色谱图,发现 55 min 后已无明显色谱峰,因此,分析时间定为 55 min。

白术饮片在加热炮制过程中,不同加热温度和时间,白术内酯 I、II、III 的含量变化明显^[6],说明炒制后,饮片内在成分发生了较大变化,但哪些成分发生了变化,变化规律如何有待进一步的研究。但本实验制定的 4 种白术炮制品指纹图谱,为科学评价白术炮制品质量标准提供了科学依据。

参考文献:

[1] 杨娥,钟艳梅,冯亦凡. 白术化学成分和药理作用的研究进展[J]. 广东药学院学报, 2012, 28(2): 218-221.
[2] 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, 2010: 96.
[3] 广东省食品药品监督管理局. 广东省中药饮片炮制规范[S]. 第一册. 广州: 广东科技出版社, 2011: 83.
[4] 中华人民共和国卫生部药政管理局. 全国中药炮制规范[S]. 北京: 人民卫生出版社, 1988: 33.
[5] 周爱珍,程斌,王和平. 炮制对白术的化学成分及药理作用的影响[J]. 中医药导报, 2010, 16(2): 79-80.
[6] 段启,许冬瑾,谢晨. HPLC 法测定白术不同炮制品中白术内酯 I、II、III [J]. 中草药, 2008, 39(9): 1343-1345.

(编辑: 宋威)

雷公藤色谱指纹图谱方法学研究及质量评价

邵 莉¹, 谢培山² (1. 澳门科技大学中医药学院, 澳门; 2. 澳门科技大学澳门药物与健康应用研究所, 澳门)

摘要: 目的 建立雷公藤的高效液相指纹图谱, 考察雷公藤药材及商品饮片的质量。方法 高效液相色谱条件: 色谱柱: Symmetry C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-0.1 %磷酸溶液梯度洗脱; 柱温: 20 ℃; 流速: 1.0 mL·min⁻¹; 波长: 210 nm。对雷公藤种植药材、商品饮片的图谱与 HPLC 指纹图谱共有模式比较, 并进行相似度计算和主成分分析。结果 种植药材的成分分布较为稳定, 福建 GAP 基地药材质量相似度高, 商品饮片所含成分与共有模式相比有较大差异, 且不同来源饮片之间相互差别明显。结论 根据雷公藤的 HPLC 指纹图谱可有效地分析和评估药材之间的质量情况, 商品饮片质量亟待提高。

关键词: 雷公藤; 高效液相色谱法; 色谱指纹图谱; 质量分析

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 1003-9783(2013)03-0289-05

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2013.03.022

收稿日期: 2013-04-10

作者简介: 邵莉, 女, 博士研究生, 从事中药质量控制研究。Email: Shaoli82@yahoo.cn。通讯作者: 谢培山, 教授, 博士生导师。Email: xiepsnew@163.com。

基金项目: 澳门科技基金项目(040/2009/A2)。