

·质量标准研究·

仙茅及其炮制品质控指标的比较研究

陶 益, 黄苏润, 杜映珊, 李伟东, 蔡宝昌(南京中医药大学中药炮制重点实验室, 江苏 南京 210023)

摘要: **目的** 比较生仙茅、炒仙茅及酒仙茅的质控指标及主要化学成分~~的~~差异。**方法** 按照《中国药典》(2015 年版) 标准, 测定生仙茅、炒仙茅和酒仙茅的水分、总灰分、酸不溶性灰分及醇溶性浸出物; 考察 HPLC 方法的线性关系、精密度、稳定性、重复性及加样回收率, 同时采用液质联用技术鉴定仙茅不同炮制品的主要化学成分。**结果** 生仙茅的水分、总灰分、酸不溶性灰分及醇溶性浸出物测定结果均符合《中国药典》(2015 年版) 的要求。生仙茅、炒仙茅及酒仙茅的仙茅苷含量分别为 0.087 %、0.156 % 和 0.059 %。运用高分辨质谱鉴定了愈创木酚、绛叶仙茅苷 A、绿原酸、中华仙茅素 A 等 13 个主要化学成分。在被测的 13 种化学成分中, 与生仙茅比较, 炒仙茅中绛叶仙茅苷 A、仙茅皂甙元 C、绿原酸等 11 种化学成分显著上升; 而酒仙茅中大叶仙茅苷、仙茅苷、绛叶仙茅苷 A 等 12 种化学成分显著降低。**结论** 本研究所建立的方法准确可靠、重复性好, 可用于仙茅不同炮制品中主要成分的质量控制。炒仙茅中的大多数~~的~~化学成分高于生仙茅, 而酒仙茅中的大多数化学成分~~则~~低于生仙茅。

关键词: 仙茅; 炒仙茅; 酒仙茅; 飞行时间质谱

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2017)-05-0000-05

doi: 10.19378/j.issn.1003-9783.2017.05.

Comparative analysis of crude and processed products of *Curculigo orchioide*s Gaertn based on multiple quality indexes of pharmacopeia

TAO Yi¹, HUANG Su-run¹, DU Ying-shan¹, LI Wei-dong¹, CAI Bao-chang^{*1} (1.Key Laboratory of Nanjing University of Traditional Chinese Medicine Processing, Jiangsu, 210023)

Abstract: **Objective** To compare the quality control indexes and chemical constituents of crude and processed *Curculigo orchioide*s. **Methods** According to Chinese Pharmacopoeia 2015 edition, the quality control indexes of crude and processed *Curculigo orchioide*s were investigated, including water content, total ash, acid-insoluble ash and ethanol soluble extract. The linearity, precision, stability, repeatability and recoveries of HPLC method were well validated. Moreover, mass spectrometry was employed to identify major constituents in crude and processed *Curculigo orchioide*s. **Results** The water content, total ash, acid-insoluble ash and ethanol soluble extract of crude and processed *Curculigo orchioide*s satisfied the requirements of the Chinese Pharmacopoeia 2015 edition. The contents of curculigoside in crude, stir-fried and wine-processed *Curculigo orchioide*s were 0.087%, 0.156% and 0.059%. A total of 13 chemical constituents were identified by high resolution mass spectrometry, such as guaiacol, crassifoside A, chlorogenic acid and sinensigenin A. Compared with the crude *Curculigo orchioide*s, the contents of 11 constituents were increased significantly in stir-fried products, such as crassifoside A, curculigenin C and chlorogenic acid, whereas the contents of 12 constituents was significantly reduced in wine-processed products, such as curcapitoside, curculigoside and crassifoside A. **Conclusion** The established HPLC method showed good linearity, precision, accuracy and recovery, which can also be applied to the quality control of the main components of

收稿日期: 2017-01-11

作者简介: 陶益, 男, 助理研究员, 研究方向: 中药炮制学。Email: taoyi1985812@126.com。通信作者: 蔡宝昌, 男, 教授, 研究方向: 中药炮制学。Email: becai@126.com。

基金项目: 科技部国家科技重大专项(2012ZX09304005); 江苏省自然科学基金青年项目(BK20140963)。

processed *Curculigo orchoides*. Compared with the crude *Curculigo orchoides*, the contents of the majority of constituents in stir-fried *Curculigo orchoides* were significantly increased, whereas the contents of the majority of constituents in wine-processed *Curculigo orchoides* were significantly decreased.

Keywords: *Curculigo orchoides* Gaertn; Stir-fried; Wine-processed; Q-TOF/MS

仙茅为石蒜科植物仙茅 *Curculigo orchoides* Gaertn.的干燥根茎,其功能主治为补肾阳,强筋骨,祛寒湿,用于阳痿精冷,筋骨痿软,腰膝冷痛,阳虚冷泻等^[1]。目前,《中国药典》(2015年版)只收录1种规格,即生仙茅。除生品外,历代炮制文献中还记载着炒制、药汁制、泔制、酒制、蒸制等方法,譬如宋代《圣济总录》记载:“竹刀子刮去皮切为豆粒,米泔浸两宿阴干。”宋代《证类本草》记载:“于乌豆水中浸一宿,取出,用酒湿拌了蒸。”明代《正宗》记载:“浸去赤汁,蒸熟去皮,捣膏”^[2]。仙茅历代炮制方法繁多,但目前对其化学成分的研究较少^[3-4],尚未有仙茅炮制前后系统性的质量分析研究。本研究炮制了炒仙茅和酒仙茅,按照《中国药典》(2015年版)质量标准对生仙茅、炒仙茅及酒仙茅进行各项指标检测,为《中国药典》未收录品种炒仙茅和酒仙茅质量标准的制定提供借鉴,同时建立 HPLC 方法对生仙茅、炒仙茅及酒仙茅主要化学成分进行比较分析,并用液质联用技术对化学成分进行定性分析。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 Agilent1100 高效液相色谱仪(美国安捷伦公司); Shimadzu 超高效液相色谱仪(日本岛津公司); Q-TOF 5600-plus 质谱仪(美国 AB Sciex 公司); BT125 型电子天平(赛多利斯科学仪器有限公司); DHG-9023A 型电热恒温鼓风干燥箱(上海精宏实验设备有限公司); Ultra Pure 纯水仪(上海旦鼎国际贸易有限公司); Buchi R-205 型旋转蒸发器(瑞士 Buchi 公司); 红景天不锈钢打粉机(广州市大祥电子机械设备有限公司)。

1.2 药材与试剂 仙茅药材采集于广西靖西县,经南京中医药大学蔡宝昌教授鉴定为石蒜科植物仙茅 *Curculigo orchoides* Gaertn.的干燥根茎,仙茅药材标本保存于南京中医药大学标本馆(批号:20151228);仙茅苷(四川维克奇生物技术有限公司,批号:150816,纯度 $\geq 98\%$);黄酒(绍兴女儿红酿酒有限公司);乙腈为色谱纯,其他化学试剂均为国产分析纯。

2 方法与结果

2.1 饮片制备 生仙茅:取仙茅药材,拣去杂质,洗净,晾润至透,用直切机切为厚片,刀距 4~5 mm,晾干,备用。炒仙茅:取 100 g 净仙茅,置炒制锅内,将锅放置于美的电磁炉上,功率 500 W,参照《中国药典》(2015年版)炮制通则 0213 炒法炒至表面色泽加深,取出放凉,得炒仙茅备用。酒仙茅:取 100 g 净仙茅,加 20 g 黄酒拌匀,闷透,置炒制锅内,将锅放置于美的电磁炉上,功率 500 W,参照《中国药典》(2015年版)炮制通则 0213 酒炙法,用文火炒至表面色泽加深,微有酒香气,取出,放凉,得酒仙茅备用。

2.2 对照品溶液的制备 取仙茅苷对照品适量,精密称定,置棕色量瓶中,加甲醇制成每 1 mL 含 1.0 mg 的溶液,即得,备用。

2.3 样品溶液的制备 按照《中国药典》规定,取本品粉末(过 3 号筛)约 1 g,精密称定,精密加入甲醇 50 mL,称定质量,加热回流 2 h,取出,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 20 mL,蒸干,残渣加甲醇溶解,转移至 10 mL 容量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.4 检查项与浸出项考察 采用《中国药典》(2015年版)通则 2301 杂质检查法检查生仙茅、炒仙茅及酒仙茅中的杂质含量;采用通则 0832 第 2 法烘干法对生仙茅、炒仙茅及酒仙茅中的水分进行检查;采用通则 2302 总灰分测定法对生仙茅、炒仙茅及酒仙茅的总灰分进行检查;采用通则 2302 酸不溶性灰分测定法测定生仙茅、炒仙茅及酒仙茅的酸不溶性灰分。各检查项结果见表 1。根据《中国药典》要求,生仙茅杂质不得过 4.0%,水分不得超过 13.0%;总灰分不得超过 10.0%;酸不溶性灰分不得超过 2.0%;醇溶性浸出物不得少于 7.0%。结果表明生仙茅均符合《中国药典》的要求。炒仙茅和酒仙茅目前未被《中国药典》收载,但炒仙茅和酒仙茅各检查项目也符合《中国药典》生仙茅的相关要求。与生仙茅比较,炒仙茅的水分明显降低,醇溶性浸出物明显升高,而

酒仙茅的总灰分含量则明显升高。

表 1 仙茅炮制品的水分、总灰分、酸不溶性灰分和醇溶性浸出物的检查结果($n=3$, %)

Table 1 Test results on water content, total ash, acid-insoluble ash and ethanol soluble extract of crude *Curculigo orchoides* and its processed products

样品	水分	总灰分	酸不溶性灰分	醇溶性浸出物
生仙茅	12.04 ± 0.06	4.54 ± 0.19	1.49 ± 0.10	10.96 ± 0.12
炒仙茅	2.49 ± 0.04	3.02 ± 0.43	1.23 ± 0.11	16.56 ± 0.33
酒仙茅	12.58 ± 0.22	7.53 ± 0.15	1.34 ± 0.13	10.85 ± 0.16

2.5 液相、质谱条件

2.5.1 液相色谱条件 Xbridge C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相: A 为 0.1 % 甲酸 - 水溶液, B 为乙腈, 梯度洗脱: 0 ~ 45 min, 10 % ~ 100 % B; 流速: 1.0 mL·min⁻¹; 检测波长: 254 nm; 柱温: 30 ℃; 进样量: 10 μL。

2.5.2 质谱分析条件 扫描模式: 正离子模式, 毛细管温度: 325 ℃, 离子源电压: +4.5 kV, 喷雾气压: 55 psi, 去簇电压: +60 V, 加热气压: 55 psi, 离子源温度: 550 ℃, 一级质谱扫描范围: m/z 100~1 500, 二级质谱激活类型: 碰撞诱导裂解(CID)。

2.6 HPLC 法测定仙茅苷含量

2.6.1 方法学考察

2.6.1.1 系统适用性试验 按《中国药典》(2015 年版)仙茅项下要求对色谱系统进行适用性试验, 用仙茅苷对照品溶液对色谱系统进行试验, 计算理论塔板数。理论塔板数按仙茅苷计算大于 3 000, 符合《中国药典》的要求。

2.6.1.2 线性关系考察 精密吸取 10 μL 不同浓度的仙茅苷对照品溶液(0.025, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0 g·L⁻¹)进样, 记录色谱峰, 以仙茅苷对照品溶液的浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 绘制标准曲线, 计算回归方程, 得 $Y=3\ 618.3X-17.629(r^2=0.999\ 8)$ 。结果表明仙茅苷在 0.025 ~ 1.0 g·L⁻¹ 浓度范围内呈良好的线性关系。

2.6.1.3 精密度试验 取仙茅苷对照品溶液连续进样 6 次, 记录色谱峰峰面积, 测得其峰面积 RSD 为 0.84 %, 符合《中国药典》要求。

2.6.1.4 稳定性试验 按照 2.3 项下制备供试样品, 分别于 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 按 2.5 项中色谱条件, 进样 10 μL, 记录色谱图, 计算仙茅苷峰面积 RSD 为 2.85 %, 结果表明稳定性良好。

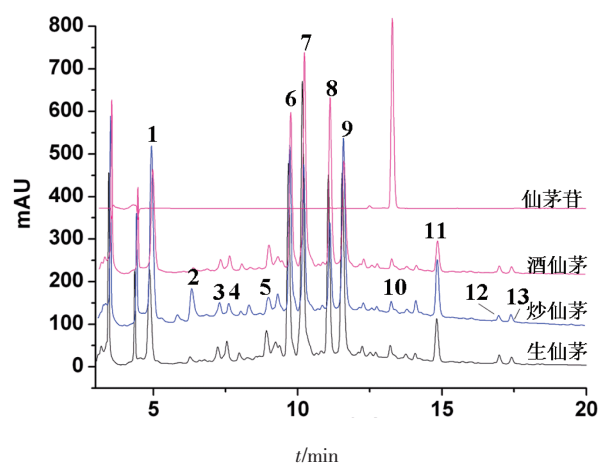
2.6.1.5 重复性试验 按照 2.3 项下制备供试样品,

按 2.5 项下的色谱条件进样 6 次, 每次进样 10 μL, 记录色谱图, 计算仙茅苷峰面积 RSD 为 2.36 %, 结果表明重复性良好。

2.6.1.6 回收率试验 采取加样回收法, 取 6 份已知含量的同一批次样品约 1 g, 精密称定, 分别按照 1 : 1 精密加入仙茅苷对照品, 按 2.3 项下方法制备供试品溶液, 精密吸取上述供试品溶液 10 μL, 注入色谱仪, 依法测定, 计算回收率为 100.65 %, RSD 为 1.64 %, 符合《中国药典》要求。

2.7 含量测定结果 按照 2.3 项下制备供试样品, 精密吸取生仙茅、炒仙茅及酒仙茅供试品溶液 10 μL, 注入液相色谱仪, 按前述色谱的条件测定, 记录峰面积, 采用外标法计算供试品中仙茅苷含量, 结果生仙茅、炒仙茅及酒仙茅中仙茅苷质量分数分别为 0.087 %, 0.156 % 和 0.059 %, 生仙茅中仙茅苷含量符合《中国药典》规定的仙茅苷质量分数要求(不得少于 0.080 %)。

2.8 化学成分比较 按照 2.3 项制备供试样品, 精密吸取生仙茅、炒仙茅及酒仙茅供试品溶液及仙茅苷对照品溶液各 10 μL, 注入液相色谱仪, 按 2.5 项下的色谱条件进行分析, 各样品的出峰情况见图 1, 仙茅苷的出峰时间为 13.326 min。



1. 愈创木酚; 2. 绒叶仙茅苷 A; 3. 绿原酸; 4. 中华仙茅素 A; 5. 绒叶仙茅苷 D; 6. 2, 6-二甲氧基苯甲酸; 7. 1-O-甲基尼亚希木脂素苷; 8. 灯盏花素 C; 9. 大叶仙茅苷; 10. 仙茅苷; 11. 仙茅皂甙元 A; 12. 仙茅皂甙元 B; 13. 仙茅皂甙元 C

图 1 仙茅不同炮制品的 HPLC 色谱图

Figure 1 HPLC Chromatograms of different extracts of crude and processed *Curculigo orchoides*

仙茅中 13 个主要化学成分的一级和二级质谱信息见表 2。

表2 仙茅不同炮制品化学成分的一级和二级质谱信息

Table 2 MS¹ and MS² information of the major constituents in extracts of crude Curculigo orchioideis and its processed products

编号	MS ¹	MS ²	分子式	误差(×10 ⁻⁶)	鉴定成分
1	125.0595	110.0382	C ₇ H ₈ O ₂	-1.6	愈创木酚
2	313.0705	151.0395	C ₁₇ H ₁₂ O ₆	-0.5	绒叶仙茅苷 A
3	355.1022	163.0389	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	-0.4	绿原酸
4	317.1015	299.0919, 283.0970	C ₁₇ H ₁₆ O ₆	-1.5	中华仙茅素 A
5	479.1545	179.0722, 161.0600	C ₂₃ H ₂₆ O ₁₁	-0.6	绒叶仙茅苷 D
6	182.0579	165.0538, 137.0587	C ₉ H ₁₀ O ₄	3.0	2,6-二甲氧基苯甲酸
7	493.1700	179.0706, 153.0190	C ₂₄ H ₂₈ O ₁₁	-0.9	1-O-甲基尼亚希木脂素苷
8	317.1010	137.0209	C ₁₇ H ₁₆ O ₆	-3.0	灯盏花素 C
9	475.1230	331.0779, 161.0586, 153.0185	C ₂₃ H ₂₂ O ₁₁	-1.0	大叶仙茅苷
10	467.1545	305.0830	C ₂₂ H ₂₆ O ₁₁	-0.6	仙茅苷
11	475.3780	297.2580	C ₃₀ H ₅₀ O ₄	-0.4	仙茅皂甙元 A
12	477.3935	251.0530	C ₃₀ H ₅₂ O ₄	-0.7	仙茅皂甙元 B
13	459.3830	297.2548	C ₃₀ H ₅₀ O ₃	-0.6	仙茅皂甙元 C

峰1的[M+H]⁺为125.0595,分子式为C₇H₈O₂,主要二级碎片为 m/z 110.0382,通过与文献^[9]比对,推断化合物1为愈创木酚,为化合物1失去一个15 Da的甲基分子的产物。

峰2的[M+H]⁺为313.0705,分子式为C₁₇H₁₂O₆,主要二级碎片为 m/z 151.0395,为化合物丢失一个162 Da的葡萄糖分子的产物,通过与文献^[9]及对照品比对,推断化合物2为绒叶仙茅苷A。

峰3的[M+H]⁺为355.1022,分子式为C₈H₅O₃,主要二级碎片为 m/z 163.0389,通过与文献^[6]比对,推断化合物3为绿原酸。

峰4的[M+H]⁺为317.1015,分子式为C₁₇H₁₆O₆,主要二级碎片为 m/z 299.0919,通过和文献^[7]比对,推断化合物4为中华仙茅素A。

峰5的[M+H]⁺为479.1545,分子式为C₂₃H₂₆O₁₁,主要二级碎片为 m/z 179.0722和161.0600,通过和文献^[8]比对,推断化合物5为绒叶仙茅苷D。

峰6的[M+H]⁺为182.0579,分子式为C₂₃H₂₆O₁₁,主要二级碎片为 m/z 165.0538和137.0587,通过和文献^[9]比对,推断化合物6为2,6-二甲氧基苯甲酸。

峰7的[M+H]⁺为493.1700,分子式为C₂₄H₂₈O₁₁,主要二级碎片为 m/z 179.0706和153.0190,通过和文献^[8]比对,推断化合物7为1-O-甲基尼亚希木脂素苷。

峰8的[M+H]⁺为317.1010,分子式为C₁₇H₁₆O₆,主要二级碎片为 m/z 137.0209,通过和文献^[10]比对,推断化合物8为灯盏花素C。

峰9的[M+H]⁺为475.1230,分子式为C₂₃H₂₂O₁₁,主要二级碎片为 m/z 331.0779和 m/z 161.0586,通过和文献^[10]比对,推断化合物9为大叶仙茅苷。

峰10的[M+H]⁺为466.1475,分子式为C₂₂H₂₆O₁₁,主要二级碎片为 m/z 305.0830,通过和文献^[9]比对,推断化合物10为仙茅苷, m/z 305为化合物丢失一个162 Da的葡萄糖分子的产物。

峰11的[M+H]⁺为475.3780,分子式为C₃₀H₅₀O₄,主要二级碎片为 m/z 297.2580,通过和文献^[11]比对,推断化合物11为仙茅皂甙元A。

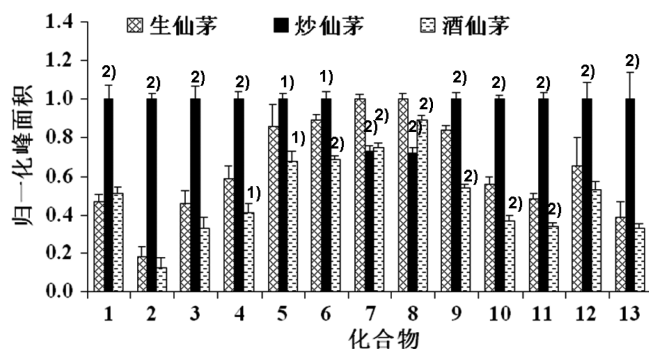
峰12的[M+H]⁺为477.3539,分子式为C₃₀H₅₂O₄,主要二级碎片为 m/z 251.0530,通过和文献^[12]比对,推断化合物12为仙茅皂甙元B。

峰13的[M+H]⁺为459.3830,分子式为C₃₀H₅₀O₃,主要二级碎片为 m/z 297.2548,通过和文献^[12]比对,推断化合物13为仙茅皂甙元C。

仙茅炮制品中13种主要化学成分的归一化面积比较,见图2。与生仙茅相比,炒仙茅中除1-O-甲基尼亚希木脂素苷和灯盏花素C外,其他11种成分含量均显著上升,其中绒叶仙茅苷A含量上升最大,是生仙茅的5倍,其次为仙茅皂甙元C和绿原酸,分别为生仙茅的2.56倍和2.17倍。与生仙茅比较,酒仙茅中的愈创木酚含量上升10%,但是其他12种成分含量均显著下降,其中大叶仙茅苷含量下降最大(下降36%),其次为仙茅苷(下降33%)、绒叶仙茅苷A(下降31%)及中华仙茅素A(下降30%)。

3 讨论

本研究比较了仙茅及其炮制品炒仙茅和酒仙茅



1. 愈创木酚; 2. 绒毛仙茅苷 A; 3. 绿原酸; 4. 中华仙茅素 A; 5. 绒毛仙茅苷 D; 6. 2, 6-二甲氧基苯甲酸; 7. 1-O-甲基尼亚希木脂素苷; 8. 灯盏花素 C; 9. 大叶仙茅苷; 10. 仙茅苷; 11. 仙茅皂甙元 A; 12. 仙茅皂甙元 B; 13. 仙茅皂甙元 C。与生仙茅比较, 1) $P < 0.05$; 2) $P < 0.01$ 。

图 2 仙茅炮制品中主要化学成分归一化面积比较($n=3$)

Figure 2 The content of thirteen components in different extracts of processed *Curculigo orchioideis*

的质控指标。本研究所建立的方法准确可靠、重复性好, 可用于仙茅不同炮制品中主要成分的质量控制。结果表明仙茅各项指标均符合《中国药典》的要求。对比《中国药典》仙茅的检查项目, 炒仙茅和酒仙茅的水分、总灰分、酸不溶性灰分和醇溶性浸出物均符合仙茅的质量要求。与生仙茅比较, 炒仙茅的水分明显降低, 醇溶性浸出物明显升高, 而酒仙茅的总灰分含量则明显升高。

液相色谱法分析结果表明, 仙茅及其炮制品中化学成分有明显的差异。在被测的 13 种化学成分中, 与生仙茅比较, 炒仙茅中绒毛仙茅苷 A、仙茅皂甙元 C、绿原酸等 11 种化学成分显著上升; 而酒仙茅中大叶仙茅苷、仙茅苷、绒毛仙茅等 12 种化学成分显著降低。可见, 炒仙茅中的大多数的化学成分高于生仙茅, 而酒仙茅中的大多数化学成分则低于

生仙茅。本研究为炒仙茅和酒仙茅的质量标准研究提供重要的参考。

参考文献:

- [1] 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: 102-103.
- [2] 王孝涛. 历代中药炮制法汇典(现代部分)[M]. 南昌: 江西科学技术出版社, 1998: 53-54.
- [3] 刘振丽, 宋志前, 孙明杰, 等. 不同地区仙茅中仙茅苷含量测定及酒炙后仙茅苷含量变化[J]. 中成药, 2007, 29(3): 397-398.
- [4] 赵红岩, 刘建利, 刘竹兰. 威灵仙和仙茅酒炙前后整体化学成分变化研究[J]. 中成药, 2007, 29(10): 1469-1472.
- [5] SHA S, CHEN S, QIAN M, et al. Characterization of the typical potent odorants in Chinese roasted sesame-like flavor type liquor by headspace solid phase microextraction-aroma extract dilution analysis, with special emphasis on sulfur-containing odorants. J Agr Food Chem, 2016, 65(1): 123.
- [6] HE Y, DONG X, JIA X, et al. Qualitative and quantitative analysis on chemical constituents from *Curculigo orchioideis* using ultra high performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry. J Pharm Biomed Anal, 2015, 102: 236.
- [7] LI N, WANG T M, WANG K J, et al. Norlignans from Rhizomes of *Curculigo sinensis*. Helv Chim Acta, 2010, 93(4): 724.
- [8] LI N, LI S P, WANG K J, et al. Novel norlignan glucosides from rhizomes of *Curculigo sinensis*. Carbohydr Res, 2012, 351: 64.
- [9] BIAN Q, YANG H, CHAN C O, et al. Fingerprint analysis and simultaneous determination of phenolic compounds in extracts of *Curculiginis Rhizoma* by HPLC-Diode array detector. Chem Pharm Bull, 2013, 61(8): 802.
- [10] LI N, ZHU C C, XIAO H M, et al. Norlignan derivatives from *Curculigo breviscapa*. Fitoterapia, 2010, 81(6): 528.
- [11] XU J P, XU R S, LI X Y. Glycosides of a cycloartane sapogenin from *Curculigo orchioideis*. Phytochemistry, 1992, 31(1): 233.
- [12] XU J P, XU R S. Cycloartane-type sapogenins and their glycosides from *Curculigo orchioideis*. Phytochemistry, 1992, 31(7): 2455.

(编辑: 梁进权)