

白术药材 HPLC 色谱指纹图谱研究

于超¹, 阳勇³, 刘世尧², 白志川², 张小梅³, 王婷婷³

(1. 重庆医科大学, 重庆 400016; 2. 西南农业大学, 重庆 400716; 3. 重庆市中药研究院, 重庆 400065)

摘要:目的 应用 HPLC 法建立酉阳规范化种植白术的指纹图谱, 为白术药材的质控提供依据。方法 采用 Symmetry C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 以甲醇-水 (65%~100%) 连续梯度洗脱, 体积流量 0.8 mL/min; 在 254 nm 波长下检测。测定 11 批药材的色谱图, 确立标准指纹图谱。结果 白术药材有 11 个共有峰, 多数峰可以达到较好分离。该分析方法具有很好的精密度、重现性和稳定性, 各批次间共有峰的相对保留时间的 RSD 均小于 1%, 相对峰面积符合指纹图谱相关要求。结论 建立的指纹图谱检测标准可以作为白术质量评价和品种鉴别的主要依据之一。

关键词: 白术; 高效液相色谱; 指纹图谱

中图分类号: R282.7

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2006)05-0766-04

Fingerprint of *Rhizoma Atractylodis Macrocephalae* by HPLCYU Chao¹, YANG Yong³, LIU Shi-yao², BAI Zhi-chuan², ZHANG Xiao-mei³, WANG Ting-ting³

(1. Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400016, China; 2. South-West Agriculture University, Chongqing 400716, China; 3. Chongqing Academy of Chinese Materia Medica, Chongqing 400065, China)

Abstract: **Objective** To establish the chromatographic fingerprint of *Rhizoma Atractylodis Macrocephalae* (RAM) from GAP base at Youyang by HPLC for the quality control. **Methods** With Symmetry C₁₈ column (250 mm×4.6 mm, 5 μm), gradient elution was performed by mobile phase containing MeOH-H₂O (65%—100%). The flow rate was 0.8 mL/min and detection wavelength was 254 nm. Eleven batches of RAM from various producing areas were comparatively analyzed to establish a fingerprint. **Results** Eleven Mutual peaks were selected in chromatography. Among the obtained fingerprint, the most of the detected peaks were separated effectively. The accuracy, repeatability, and stability of this method were satisfied. The RSD of relative retention time of mutual peaks which existed in all samples was less than 1%. The results of peak area were in accordance with the request of fingerprint. **Conclusion** The established fingerprint can be used for the quality control and species identifying of RAM.

Key words: *Rhizoma Atractylodis Macrocephalae* (RAM); HPLC; fingerprint

白术 *Atractylodes macrocephala* Koidz. 原名“术”, 又名贡术, 菊科多年生草本, 始载于《神农本草经》, 列为上品, 为常用大宗中药材品种, 以根茎供药用, 能健脾燥湿, 治脾虚食少、腹泻、水肿、胎动不安。最新的临床研究表明, 白术具明显的抗衰老作用, 其应用前景十分广阔^[1]。野白术产于浙江於潜、昌化、天目山一带, 以於潜所产品质最佳, 称为“於术”。现白术多为栽培, 已少有野生, 主产浙江、安徽、湖南、湖北、江西、福建、重庆等地。重庆产白术主要引种于浙江。白术的主要成分为白术内酯 I、II、III、IV 及杜松酯、棕榈醇、β-香树素醋酸酯、γ-谷甾醇、β-谷甾醇及含有较高的挥发油成分。白术有效成分的量因产地、采收季节、储藏、炮制方法、提取工艺等条件不

同, 会发生变化。为了能够有效控制药材质量, 根据其所含化学成分的特性和指纹图谱研究方法^[2,3], 通过方法考察, 建立白术药材特征性色谱指纹谱图, 为白术建立稳定、可靠、全面的质量控制方法提供科学依据。

1 仪器与试剂

1.1 仪器与试剂: WATERS 600E—996 高效液相色谱仪 (996 PDA 检测器, 7225i 手动进样器, 柱温箱, Millennium³² 化学工作站); AW220 (岛津) 万分之一电子天平; H66005 超声清洗机; 电热恒温水浴锅 (北京长源实验设备厂); Mini Qplus 超纯水仪 (密里博)。甲醇 (色谱醇, 默克公司), 氯仿 (上海化学试剂总厂), 石油醚、丙酮 (重庆市东方试剂厂),

收稿日期: 2005-07-31

基金项目: 重庆市自然科学基金资助项目 (7351)

作者简介: 于超 (1963—), 男, 博士, 从事中药化学研究。Tel: (023) 68485915 E-mail: yuchao@cqu.edu.cn

乙醚(上海马陆制药厂),均为分析醇。

1.2 药材:白术药材来源于重庆市酉阳县 GAP 规范化种植基地,为《中国药典》品种菊科植物白术 *Atractylodes macrocephala* Koidz. 的干燥根茎(由赵素云研究员鉴定)。样品编号 S1~S11。

2 方法与结果

2.1 色谱条件:Symmetry C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);柱温 28 ℃;甲醇-水(65%~100%)为流动相,连续梯度洗脱;体积流量 0.8 mL/min,检测波长 254 nm;进样量 10 μL。

2.2 供试品溶液的制备:取供试品粉碎,过 30 目筛,精密称取白术样品细粉约 1.0 g,置于三角瓶中,加入石油醚 20 mL 超声处理 20 min,滤过,残渣用甲醇洗涤 3 次,每次加 5 mL,合并滤液和洗涤液,减压浓缩至干,用甲醇溶解,置 5 mL 量瓶中至刻度,取上清液用微孔滤膜(0.45 μm)滤过,滤液置棕色量瓶中,即得。

2.3 HPLC 分析:取样品溶液 10 μL,注入高效液相色谱仪,记录色谱图(图 1)和各色谱峰的保留时间,以面积归一化法计算各色谱峰的相对峰面积(A_R),各谱图中峰面积最大的 11 个峰为 11 强峰。

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度试验:按样品制备方法,随机抽取同一批白术药材制备供试液,连续进样 5 次,测定 HPLC 色谱图,选择 11 个共有峰进行比较,结果表明各共有峰相对保留时间 RSD 为 0.18%~1.85%,各共有峰相对峰面积的 RSD 为 0.33%~2.5%,表明仪器精密度良好。

2.4.2 重现性试验:随机取同一批白术药材,按样品制备方法平行操作,制备 5 份白术药材供试品溶液,测定其 HPLC 色谱图。结果各共有峰相对保留时间 RSD<1%,各共有峰相对峰面积 RSD 为 2.1%~3.9%。

2.4.3 稳定性试验:取同一批白术药材的供试品溶液,分别于 0、2、4、8 h 测定 HPLC 色谱图,对 11 个共有色谱峰进行比较。结果各共有峰相对保留时间 RSD<1%,各共有峰的相对峰面积 RSD 为 1.1%~4.2%,表明样品在 8 h 内稳定性良好。

2.5 色谱指纹谱的构建

2.5.1 相对保留时间 α 的计算:选择一个出峰时间较居中、在各样品中均存在的组分作为参照峰(α=1)。求出样品所有峰的相对保留时间为: t_{Ri}/t_{Rs} ,式中 t_{Ri} 为各组分的出峰时间, t_{Rs} 为参照峰的出峰时间。

2.5.2 参照峰的选择:通过色谱图比较,可知各样

品色谱图中 2、3、4 号峰为强信号峰,选取色谱图中的第 3 个强峰(4 号峰)为参照峰,计算各峰的相对保留时间 α。

2.5.3 α 值窗口的设定:计算各样品色谱图中同一峰位值的 α 平均值,作为每个色谱峰的标准 α 值。计算每个峰位 α 值的 RSD 值,所有 α 值的 RSD 均小于 1%。所以设定窗口 α≤1,同一窗口内的色谱峰认定为同一 α 值的色谱峰,予以归并,可信限范围在 ±1%。按国家食品药品监督管理局“中药注射剂指纹图谱研究的技术要求”,研究测定了 11 批白术药材的色谱图谱,并制定了以内参比峰为参照物的标准指纹图谱,见图 1,11 批药材指纹图谱的相似性见图 2。

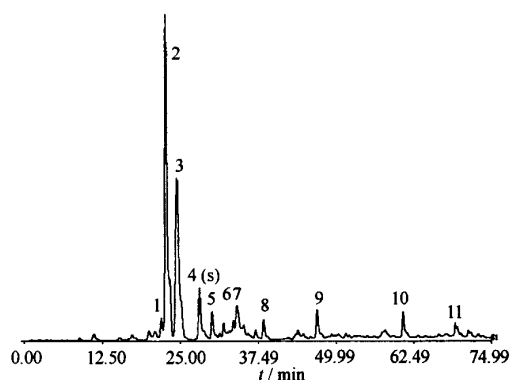


图 1 白术药材标准色谱指纹图谱

Fig. 1 Fingerprint peak of RAM

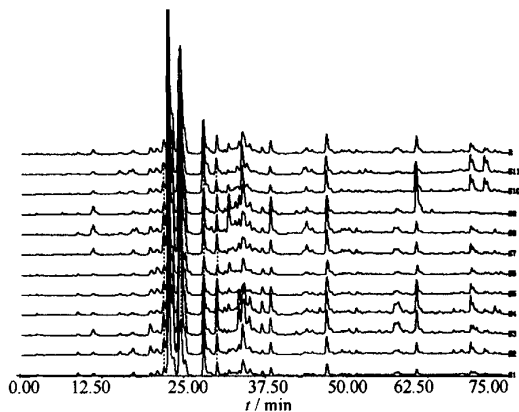


图 2 11 批白术药材色谱图

Fig. 2 Fingerprint peak of 11 batches of RAM

2.5.4 共有峰的标定:记录 75 min 的色谱图,通过比较各峰的保留时间选择每一个图谱都产生的共有峰。采用相对保留时间标定共有指纹峰,以图谱中保留时间为(28±0.14) min(4 号峰)的峰为参照物(s),将各指纹峰保留时间与同一图谱中参照物的保留时间比较,其比值为各指纹峰的相对保留时间。计

算 11 批药材指纹图谱中各指纹峰的相对保留时间(表 1), 标定白术药材的共有峰为 11 个。11 批药材中各共有峰的 α 值的 RSD 均 $<1\%$ 。

2.5.5 共有峰的相对面积: 据“中药注射剂指纹图谱研究的技术要求”规定, 各共有指纹峰的面积比值必须相对固定: 单峰面积占总峰面积 $\geq 20\%$, 其差

值 $<20\%$; 单峰面积占总峰面积 $\geq 10\%$ 而 $<20\%$, 其差值 $<25\%$; 单峰面积占总峰面积 $<10\%$, 面积比值不作要求, 仅需检定相对保留时间。结果只有峰-2、峰-3 单峰面积占总峰面积的百分比 $>20\%$, 其他峰均小于 10% , 设定第 3 个强峰(峰-4)为参照峰, 结果符合指纹图谱研究的技术要求。见表 2。

表 1 白术药材共有峰相对保留时间测定结果

Table 1 Results of relative retention time of mutual peaks on RAM

样品 编号	相对保留时间(α)										
	峰-1	峰-2	峰-3	峰-4 (S)	峰-5	峰-6	峰-7	峰-8	峰-9	峰-10	峰-11
S1	0.78	0.81	0.87	1.00	1.07	1.19	1.21	1.36	1.67	2.16	2.46
S2	0.79	0.81	0.88	1.00	1.07	1.19	1.21	1.36	1.67	2.16	2.46
S3	0.78	0.81	0.87	1.00	1.07	1.19	1.22	1.37	1.67	2.17	2.48
S4	0.78	0.81	0.86	1.00	1.07	1.20	1.22	1.37	1.67	2.17	2.46
S5	0.78	0.80	0.86	1.00	1.07	1.19	1.21	1.37	1.67	2.16	2.46
S6	0.77	0.81	0.87	1.00	1.07	1.19	1.22	1.37	1.67	2.17	2.47
S7	0.78	0.81	0.87	1.00	1.07	1.19	1.22	1.37	1.67	2.17	2.47
S8	0.78	0.80	0.88	1.00	1.07	1.19	1.22	1.37	1.67	2.17	2.47
S9	0.78	0.81	0.87	1.00	1.07	1.19	1.22	1.37	1.67	2.16	2.46
S10	0.78	0.81	0.87	1.00	1.07	1.19	1.24	1.37	1.67	2.16	2.48
S11	0.78	0.81	0.87	1.00	1.07	1.19	1.21	1.36	1.67	2.16	2.48
平均	0.78	0.81	0.87	1.00	1.07	1.19	1.22	1.37	1.67	2.16	2.47
RSD/%	0.57	0.50	0.73	0.00	0.00	0.25	0.72	1.34	0.00	0.24	0.35

表 2 白术药材色谱图谱相对峰面积数据

Table 2 Data of relative peak area on chromatogram of RAM

样品 编号	相对峰面积										
	峰-1	峰-2	峰-3	峰-4 (S)	峰-5	峰-6	峰-7	峰-8	峰-9	峰-10	峰-11
S1	0.294 16	5.968 05	6.180 56	1.000 00	0.392 63	0.088 56	0.575 96	0.217 20	0.343 23	0.138 97	0.095 36
S2	0.461 90	8.372 58	5.802 58	1.000 00	0.439 47	0.254 90	0.958 28	0.257 41	0.407 77	0.234 42	0.254 05
S3	0.666 70	8.222 90	6.447 45	1.000 00	1.033 77	0.924 59	1.780 48	0.400 70	0.607 66	0.872 23	0.207 23
S4	0.437 63	7.281 89	4.903 67	1.000 00	0.759 37	0.585 49	1.248 74	0.698 37	0.560 32	0.970 60	0.495 94
S5	0.852 04	7.561 06	5.687 08	1.000 00	0.975 40	0.432 20	0.051 07	0.362 21	1.316 55	1.031 88	0.322 74
S6	0.476 14	6.526 70	4.854 04	1.000 00	0.334 86	0.168 56	0.955 61	0.267 99	0.514 91	0.315 76	0.244 48
S7	0.807 84	8.782 01	6.674 68	1.000 00	1.172 25	0.442 13	1.048 06	0.398 06	0.764 85	0.330 02	0.328 67
S8	0.483 38	8.265 04	6.288 02	1.000 00	0.442 61	0.424 05	9.344 31	0.663 13	0.791 29	0.212 92	0.166 51
S9	0.513 88	8.753 71	6.509 14	1.000 00	0.829 29	0.693 17	1.677 93	0.829 81	0.662 45	2.236 29	0.206 21
S10	0.193 27	5.937 91	4.828 90	1.000 00	0.154 27	0.120 43	0.169 78	0.103 07	0.432 39	0.480 14	0.192 76
S11	0.179 54	6.233 39	4.647 80	1.000 00	0.252 22	0.092 63	0.200 83	0.094 04	0.211 17	0.190 41	0.159 92
平均	0.487 86	7.445 93	5.711 27	1.000 00	0.616 92	0.384 25	1.637 37	0.390 18	0.601 15	0.637 60	0.243 08

2.5.6 非共有峰面积: 通过对 11 批白术药材供试品的测定, 统计各批非共有峰面积比, 其结果为非共有峰面积百分比在 $5.5\% \sim 9.7\%$, 符合指纹谱研究规定小于 10% 的检测要求。见表 3。

2.5.7 共有峰的相似度计算: 选取色谱图中的 11 个共有峰, 由中药色谱图分析和数据管理软件辅助自动进行峰匹配, 确定 11 个共有峰。以 2 号样品色谱图做模板, 利用相关系数法^[4]和夹角余弦法^[5]计算指纹图谱的相似度, 结果见表 4。两种计算方法全图谱相似度均 $\geq 93\%$, 这表明所建立指纹图谱的技术指标稳定, 重现性好。

3 讨论

表 3 11 批白术药材非共有峰面积

Table 3 Unmutual peak area on 11 batches of RAM

样品编号	总面积	共有峰面积	非共有峰面积	百分比/%
S1	15 257 616	13 775 379	1 482 237	9.7
S2	28 511 048	20 724 505	1 786 543	6.3
S3	23 446 580	21 731 986	1 714 594	7.3
S4	20 044 975	18 218 215	1 826 760	9.1
S5	10 890 222	10 051 403	838 819	7.7
S6	11 764 343	10 897 700	866 643	7.3
S7	19 301 697	17 715 030	1 586 649	8.2
S8	38 635 181	35 382 405	3 252 776	8.4
S9	17 623 800	16 044 669	1 579 131	9.0
S10	27 910 263	25 746 476	2 163 787	7.8
S11	29 946 105	28 809 667	1 636 438	5.5

表 4 色谱图相似性分析结果 (参照模板:S2)

Table 4 Results of comparability of chromatogram (control template: S2)

样品编号	相关系数法(峰面积)	夹角余弦法(峰面积)	相关系数法(峰高)	夹角余弦法(峰高)	相关系数法(全图谱)	夹角余弦法(全图谱)
S1	0.991 770	0.988 780	0.990 398	0.986 732	0.988 994	0.989 552
S3	0.923 206	0.931 884	0.935 960	0.940 249	0.941 697	0.945 210
S4	0.987 101	0.981 120	0.985 604	0.975 153	0.979 832	0.971 399
S5	0.982 929	0.982 344	0.984 954	0.974 569	0.979 292	0.979 428
S6	0.990 774	0.979 062	0.991 496	0.966 609	0.970 412	0.968 227
S7	0.992 610	0.992 931	0.994 086	0.994 436	0.991 162	0.991 637
S8	0.989 780	0.989 514	0.990 533	0.989 128	0.990 945	0.990 504
S9	0.953 277	0.947 137	0.952 801	0.934 746	0.939 417	0.938 310
S10	0.967 358	0.961 661	0.970 920	0.961 429	0.964 196	0.952 053
S11	0.972 295	0.973 160	0.972 042	0.962 920	0.967 514	0.966 494

从色谱图上比较,虽各批样品成分的量有差异,但色谱图概貌一致,说明该药材群体成分的一致性(包括成分种类和相对质量分数的一致性),且稳定,制定的指纹图谱可对白术药材组分群体特征的一致性作出判断。白术指纹图谱有自身化学条码的特征,是其内在化学成分种类与数量的反映。在白术药材指纹图谱的共有特征峰中,整体分离度比较好;不同批次药材指纹图谱概貌也有较好的一致性,能充分反映白术药材化学成分的特征。

采用 996 PDA 二级管阵列检测器,在分析时进行全波长紫外扫描,同时得到不同波长下全数据。结果显示,检测效果受波长影响较大,经比较后表明在 254 nm 色谱峰形最好,出峰数目适中,各色谱峰相互之间分离度较好,故检测波长定在 254 nm。

在供试品溶液制备方法考察中,对提取条件(溶媒、提取方法)及色谱条件(流动相、流速、进样量)进行了单因素平行研究。不同溶媒(石油醚、氯仿、甲醇、50% 甲醇)中以石油醚提取物共有峰相对稳定,绝对峰面积和总峰数均最高。故确定提取溶剂为石油醚;超声提取较索氏提取、回流等方法操作方便,提取时间短且效率高,但为了防止溶剂挥发和

有效成分损失,提取时应注意水浴温度不宜过高。

本研究首次将 HPLC 色谱法运用到白术药材的鉴定与质量评价中,能更加有效地评价药材化学成分多样性的复杂性;通过使用国家药典委员会 2004 年出版的中药色谱指纹图谱相似性分析软件进行相似度评价,为指纹图谱研究成果运用于中药材生产和市场流通中具体环节的质量检验,提供一个新的方法。对科研与生产实践的结合,具有重要的指导意义。

References:

- [1] Yang C P, Lao Y X, Wu F W. Progress in study of *Atractylodes macrocephala* Koidz. [J]. *J Chin Med Mater* (中草药), 2002, 25(3): 206-208.
- [2] Yan L, Gao J, Hou L L. Summarize on study of methodology in fingerprints of Chinese herbs [J]. *J Luzhou Med Coll* (泸州医学院学报), 2004, 27(1): 87-89.
- [3] Liu H H, Guo S H. Modern equipment and fingerprint of Chinese herbs [J]. *J Chin Med Pharmacol* (中医药学报), 2002, 30(2): 35.
- [4] Miao A D, Sun D J. Application of microsoft excel 2002 to calculate the similarity in fingerprints of Chinese herbs [J]. *Prog Pharm Sci* (药学进展), 2003, 27(1): 51.
- [5] Wang L X, Xiao H B. Vectorial angle method for evaluating the similarity between two chromatographic fingerprints of Chinese herb [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2002, 37(9): 713.

刺五加的体细胞胚胎发生研究

邢朝斌¹, 沈海龙², 赵丽娜¹, 王明艳¹, 陈正恒¹

(1. 华北煤炭医学院 生物科学系, 河北 唐山 063000; 2. 东北林业大学林学院, 黑龙江 哈尔滨 150040)

摘要:目的 用不同质量浓度 2,4-D 和外植体类型对刺五加体细胞胚胎诱导进行研究,为刺五加的资源保护和遗传工程提供理论依据。方法 以刺五加的萌发 3 周幼苗和层积处理种子合子胚的胚根、下胚轴和子叶为外植体,

收稿日期:2005-07-01

基金项目:国家“十五”科技攻关子课题(2001BA510B0801)

作者简介:邢朝斌(1975—),男,河北省定州市人,讲师,硕士,主要从事药用植物细胞工程的研究。

Tel: (0315) 3725859 E-mail: xingzhb@mail.edu.cn