

白术的 UPLC 指纹图谱

叶文文, 邵毅, 胡润淮* (浙江农林大学林业与生物技术学院, 浙江 临安 311300)

摘要: 目的 建立白术的超高效液相色谱指纹图谱方法。方法 色谱柱为 ACQUITY UPLC BEH C₁₈(1.0 mm×50 mm, 1.7 μm), 乙腈-水二元梯度洗脱模式, 流速为 0.1 mL·min⁻¹, 紫外检测波长 242 nm, 建立了 32 批不同产地白术样品的 UPLC 指纹图谱。结果 白术药材有 32 个共有峰, 多数峰可达到较好的分离, 各批次白术药材间共有峰的相对保留时间 RSD 均<1.0%, 药材间相似度均>90%。结论 本方法简便、可靠, 较之 HPLC 具有更高的分辨率和灵敏度, 极大地缩短了分析时间, 建立的共有模式较为可靠, 可用于白术药材真伪鉴别和质量评价的快速分析。

关键词: 白术; UPLC; 指纹图谱; 质量评价

中图分类号: R282.5; R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2010)09-0799-06

基金项目: 浙江省新苗人才计划项目(2008R40G2100088)

作者简介: 叶文文, 女, 硕士 Tel: 13567177145 E-mail: yexue_123@163.com *通信作者: 胡润淮, 男, 教授, 硕士
Tel: 13221819659 E-mail: yexue_123@163.com

中国现代应用药学 2010 年 9 月第 27 卷第 9 期

Chin JMAP, 2010 September, Vol.27 No.9

· 799 ·

YE Wenwen, SHAO Yi, HU Runhuai^{*} (School of Forestry and Bio-technology, Zhejiang A & F University, Lin'an 311300, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish the UPLC fingerprint analysis method for the quality evaluation of *Rhizoma Atractylodis Macrocephala*. **METHODS** UPLC fingerprint analysis method was applied for quality evaluation. ACQUITY UPLC BEH C₁₈ column was used, with the mixture of acetonitrile and water as mobile phase in a gradient mode. The flow rate was 0.1 mL·min⁻¹. The wavelength of measurement was 242 nm. Thirty-two batches of *Rhizoma Atractylodis Macrocephalae* were determined. **RESULTS** Most of the peaks were separated effectively, and thirty-two mutual peaks were selected from chromatography. The RSD of relative retention time of these mutual peaks was less than 1.0%, and the similarity of all samples was over 90%. **CONCLUSION** The method is provided with high resolving power and sensitiveness, can shorten the analyze time effectively, will be used to identify and evaluate the quality of *Rhizoma Atractylodis Macrocephalae* conveniently.

KEY WORDS: *Rhizoma Atractylodis Macrocephalae*; UPLC; fingerprint; quality evaluation

白术为菊科苍术属植物白术 (*Atractylodes macrocephala* Koidz.)的干燥根茎,又名於术、浙术,是浙江著名的道地药材和“浙八味”之一。性温,具有利尿、抗肿瘤、抗菌消炎、抗糖尿病、抗衰老等功能,对神经系统、消化道、子宫平滑肌也有一定的作用,还能调节免疫功能,治脾虚食少、腹泻、水肿、胎动不安等^[1-2]。现野生资源已濒临绝迹,药用来源多为栽培品种,且由于多年种植导致药材种质退化、品质下降、药材质量受到严重影响。为更好地评价白术药材的质量,本试验按照国家药品监督管理局关于“中药注射剂指纹图谱研究的技术要求(暂行)”的通知^[3],参照文献^[4-5],对不同产地的白术药材进行了指纹图谱研究,为有效控制白术药

材质量提供一定的依据。

1 仪器与材料

Waters 超高效液相色谱/四极杆飞行时间质谱联用仪(美国 Waters 公司, ACQUITY PDA 检测器,自动进样器,二元高压泵, MassLynx V4.1 色谱工作站, QuanLynx 定量软件),水为 Milli-Q 超纯水,甲醇与乙腈均为色谱纯(默克公司)。白术内酯 I、II、III对照品购自上海顺勃生物工程技术有限公司(批号分别为: 081009、081124、080711,纯度≥98%)。32批药材分别采自西天目后院村、九思坞、顺溪、湍口、天台、东阳、磐安等地,经浙江农林大学何福基教授鉴定为正品白术 *Atractylodes macrocephala* Koidz., 详见表 1。

表 1 白术药材采摘地、采摘时间与性状描述

Tab 1 Harvest time, sites and characters of *Atractylodes macrocephala* Koidz.

编号	性状	采集地点	采集时间	编号	性状	采集地点	采集时间
S1	块根小	后院村	071112	S17	优株窄叶裂叶	九思坞	071111
S2	块根小	后院村	071112	S18	移于海拔 650 m	学校苗圃	071109
S3	块根大	后院村	071112	S19	移于海拔 650 m	学校苗圃	071109
S4	块根大	后院村	071112	S20	移于海拔 300 m	学校苗圃	071109
S5	优株宽叶中裂	九思坞	071111	S21	移于海拔 300 m	学校苗圃	071109
S6	优株宽叶中裂	九思坞	071111	S22	块根小	昌化顺溪	071108
S7	优株窄叶中裂	九思坞	071111	S23	块根小	昌化顺溪	071108
S8	优株窄叶中裂	九思坞	071111	S24	块根大	天台石梁	71109
S9	劣株宽叶中裂	九思坞	071111	S25	块根大	天台石梁	71109
S10	劣株宽叶中裂	九思坞	071111	S26	块根小	昌化湍口	071107
S11	优株宽叶裂叶	九思坞	071111	S27	块根小	昌化湍口	071107
S12	优株宽叶裂叶	九思坞	071111	S28	块根大	东阳市	071110
S13	劣株窄叶中裂	九思坞	071111	S29	块根大	东阳市	071110
S14	劣株窄叶中裂	九思坞	071111	S30	饮片	福建柘荣	080215
S15	优株宽叶全缘	九思坞	071111	S31	饮片	浙江磐安	080215
S16	茎秆红色	九思坞	071111	S32	饮片	饮片厂	071227

注: 植株没有病虫害或病虫害所占面积<10%为“优株”, ≥10%为“劣株”; 叶的长宽比≤2.5 的为“宽叶”, ≥3.0 的为“窄叶”; 全部叶片都有缺裂的为“裂叶”, 都是全缘的为“全缘”, 其他的为“中裂”

Note: The plants which are not damaged by diseases and insects or the damaged area is less than 10% are defined as “fine”, the others are defined as “inferior”. Those the ratio of leaf length to leaf width is no more than 2.5 are defined as “broad leaf”, while the ratio is no less than 3.0 are defined as “narrow leaf”. All leaves split are defined as “dissected”, all leaves smooth are defined as “entire”, the others are defined as “lobed”.

2 方法与结果

2.1 色谱条件

ACQUITY UPLC BEH C₁₈(1.0 mm×50 mm, 1.7 μm)色谱柱, 以水为流动相 A, 以乙腈为流动相 B, 梯度洗脱程序为: 0~2 min, 5%~35%; 2~5 min, 35%~42%; 5~10 min, 42%~50%; 10~15 min, 50%~100%; 15~18 min, 100%。流速: 0.1 mL·min⁻¹; 紫外检测波长 242 nm; 柱温: 30 ℃; 进样量: 2 μL。

2.2 对照品溶液的制备

依次精密称取白术内酯 I、II、III 对照品 1.42, 1.25, 1.53 mg, 置于 10 mL 量瓶中, 用甲醇溶解定容至刻度, 超声 10 min, 摇匀, 制成含白术内酯 I、II、III 分别为 0.142, 0.125, 0.153 mg·mL⁻¹ 的混标贮备液, 备用。

2.3 供试品溶液的制备

将采集的白术原药材进行统一加工干燥, 控制水分含量在 9% 左右。干燥好的药材进行切片、粉碎, 过 8 号筛[筛孔内径(90±4.6) μm, 150 目]。精密称取白术样品细粉 0.2 g, 置于锥形瓶中, 加甲醇 10 mL, 超声 30 min 后放冷, 滤过, 滤液浓缩至小体积, 用甲醇转移并定容至 10 mL 量瓶内, 摇匀, 得 20 mg·mL⁻¹ 的供试品溶液。

2.4 UPLC 分析

按“2.1”项下色谱条件进甲醇空白液, 结果溶剂出峰少, 对检测基本不干扰。继而分别进样对照品溶液和供试品溶液, 记录色谱图, 见图 1。放大色谱峰信号, 选择出峰时间较居中, 在各样品中均存在的组分 15 号峰为参照峰(S 峰), 见图 2, 其中 4 号、11 号和 19 号峰分别对应白术内酯 III、I、II。各批白术药材的叠加指纹图谱见图 3。

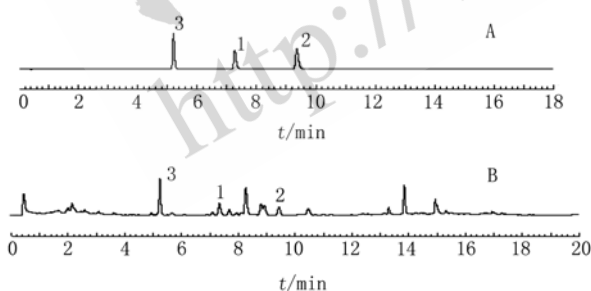


图 1 白术色谱指纹图谱

A-对照品; B-药材; 1-白术内酯 I; 2-白术内酯 II; 3-白术内酯 III

Fig 1 UPLC chromatograms

A-control; B-sample; 1-atractylenolides I; 2-atractylenolides II; 3-atractylenolides III

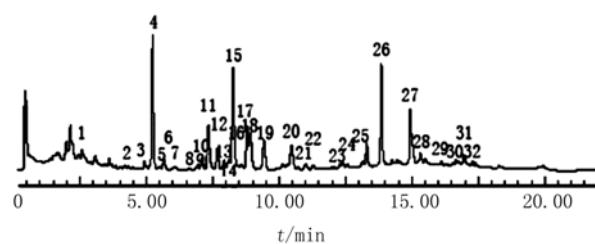


图 2 白术药材标准色谱指纹图谱

Fig 2 Fingerprint peak of *Rhizoma Atractylodis Macrocephalae*

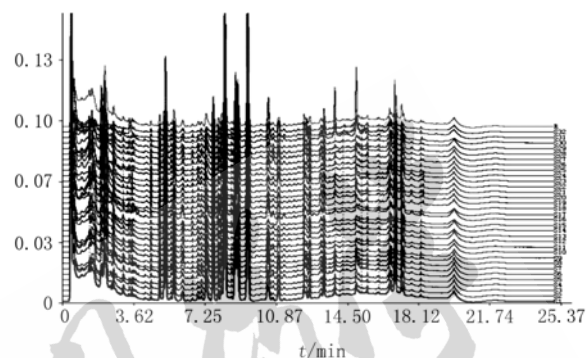


图 3 32 批白术药材色谱指纹图谱

Fig 3 Fingerprints of 32 batches of *Rhizoma Atractylodis Macrocephalae*

2.5 方法学考察

2.5.1 精密度试验 取同一供试品溶液, 连续进样 6 次, 记录色谱图, 测得各共有峰的相对保留时间 RSD 为 0.16%, 峰面积比值 RSD 为 0.98%, 表明仪器精密度良好。

2.5.2 重复性试验 取同一白术样品 6 份, 按“2.3”项下方法制备, 分别对共有峰的相对保留时间和峰面积比值进行考察。结果各共有峰的相对保留时间 RSD 为 0.92%, 峰面积比值 RSD 为 1.26%, 表明实验重复性良好。

2.5.3 稳定性试验 取同一供试品溶液分别于 0, 2, 4, 8, 12, 24, 36, 48 h 进样分析, 考察共有峰的相对保留时间和峰面积比值。结果显示, 各共有峰的相对保留时间 RSD 为 0.47%, 峰面积比值 RSD 为 1.32%, 表明供试样溶液在 48 h 内基本稳定。

2.5.4 线性关系 分别精密吸取混标储备液 0.005, 0.01, 0.02, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0 mL 加甲醇定容至 1 mL 量瓶中, 摇匀。按“2.1”项下色谱条件进行分析, 分别以色谱峰面积(Y)对质量浓度(X)绘制标准曲线。结果表明白术内酯 I、II、III 分别在 0.71~142 μg·mL⁻¹, 0.625~125 μg·mL⁻¹, 0.765~153 μg·mL⁻¹ 浓度范围内, 其峰面积与质量

浓度呈现良好的线性关系，回归方程分别为 $Y=7\,064.9X-4\,365.2$ ， $Y=14\,218.7X-4\,276.6$ ， $Y=9\,831.4X-1\,896.1$ ，相关系数 r 分别为 0.999 9、0.999 8、0.999 7。

2.5.5 样品测定 按“2.3”项下要求配制样品溶液，每批次准备两个平行样，按“2.1”项下色谱条件进样。根据已得到的线性方程分别计算样品中白术内酯 I、II、III 的含量，其结果见表 2。

2.6 色谱指纹图谱的构建

2.6.1 相对保留时间 α 的计算 利用公式 $\alpha=t_{Ri}/t_{Ra}$ 计算白术药材共有峰的相对保留时间，式中 t_{Ri} 为各组分的出峰时间， t_{Ra} 为参照峰的出峰时间。取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。32 个共有峰 α 值的 RSD 均小于 1.0%，符合国家食品药品监督管理局颁发的关于印发《中药注射剂指纹图谱研究的技术要求(暂行)》的通知^[3]的规定。

2.6.2 峰的相对面积 考察白术药材中共有峰和非共有峰的面积，结果符合《中药注射剂指纹图谱研究的技术要求(暂行)》的通知^[3]的规定。

2.6.3 相似度计算 本研究以后院村、九思坞、苗圃、顺溪、石梁、湍口、东阳、柘荣、磐安、饮片厂等地的 10 批白术药材合成的色谱图(S1)为参照图谱，分别利用国家药典委员会的“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004A 版”软件和“中药色谱图分析和数据管理系统”软件，对白术药材进行分析，经对比研究表明利用“中药色谱图分析和数据管理系统”软件，以 S1 为参照图谱，进行自动匹配，匹配时间漂移范围为 0.1，采用夹角余弦法对全图谱进行相似度计算，各批药材的相似度都>90%，同产地的白术药材具有较高的相似度，且白术内酯总含量接近的白术药材其相似度也接近，具有较好的判别能力。相似度计算数据如表 3 所示。

3 讨论

本研究考察了乙腈-水、乙腈-0.1%甲酸水、甲醇-水及甲醇-0.1%甲酸水等 4 种流动相对白术药材的检测。结果发现乙腈-水流动相较之甲醇-水或甲醇-0.1%甲酸水具有更好的分离效果，出峰多，基线更稳。同时采用 ACQUITY PDA 二级管阵列检测器，在 190~400 nm 3D 通道下进行扫描，得到不同波长下的全数据。结果显示，检测效果受

表 2 不同药材中白术内酯 I、II、III 含量的检测结果
Tab 2 Determination of atractylenolides I, II and III in *A. macrocephala* from different habitats

样品 编号	白术内酯 I / $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$	白术内酯 II / $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$	白术内酯 III / $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$	白术内酯总量 / $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$
S1	0.784	0.340	0.477	1.601
S2	0.634	0.385	0.559	1.578
S3	0.752	0.372	0.481	1.605
S4	0.793	0.337	0.479	1.609
S5	0.591	0.358	0.492	1.441
S6	0.769	0.390	0.446	1.605
S7	0.737	0.310	0.490	1.537
S8	0.748	0.309	0.568	1.625
S9	0.716	0.451	0.655	1.822
S10	0.657	0.356	0.676	1.689
S11	0.525	0.335	0.594	1.454
S12	0.545	0.341	0.696	1.582
S13	0.515	0.326	0.636	1.477
S14	0.476	0.369	0.605	1.450
S15	0.565	0.252	0.634	1.451
S16	0.694	0.386	0.595	1.675
S17	0.661	0.314	0.873	1.848
S18	0.367	0.307	0.361	1.035
S19	0.775	0.468	0.836	2.079
S20	0.279	0.279	0.364	0.922
S21	0.287	0.264	0.315	0.866
S22	0.694	0.372	0.648	1.714
S23	0.641	0.450	0.686	1.777
S24	0.674	0.396	0.631	1.701
S25	0.706	0.433	0.626	1.765
S26	0.540	0.370	0.537	1.447
S27	0.372	0.405	0.395	1.172
S28	0.730	0.479	0.627	1.836
S29	0.705	0.597	0.815	2.117
S30	0.272	0.338	0.274	0.884
S31	0.348	0.450	0.332	1.130
S32	0.756	0.495	0.779	2.030

波长影响较大。经比较表明，在 242 nm 下色谱峰形最好，出峰数目适中，各色谱峰之间的分离度较好，故选择检测波长为 242 nm。

鉴于相关文献报道^[4]，用甲醇、乙醇、醋酸乙酯、丙酮 4 种提取溶剂，超声、回流不同提取方式，0.5，1，2 h 等不同提取时间，对白术药材进行 1 次或 2 次的提取，结果显示用甲醇超声 30 min 提取一次可达到与长时间提取结果相差较小的效果。故本试验选定甲醇作为提取溶剂，同时考察 20%，40%，60%，80%，100% 等不同浓度甲醇提取的效果。结果表明，用 100% 甲醇超声 30 min 提取一次，效果最佳。此外还考察了不同颗粒度和提取条件对白术色谱峰分离效果的影响。通过

表 3 白术药材的相似度分析结果

Tab 3 Results of comparability of chromatogram on *Rhizoma Atractylodis Macrocephalae*

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)
标准	1	1	1	1	1	1
S1	0.996 175	0.995 432	0.992 548	0.996 371	0.992 387	0.997 514
S2	0.994 287	0.994 979	0.994 350	0.995 430	0.996 170	0.996 687
S3	0.987 975	0.990 310	0.991 845	0.993 294	0.992 409	0.993 861
S4	0.979 585	0.978 056	0.991 561	0.989 050	0.993 511	0.994 678
S5	0.944 952	0.943 237	0.979 533	0.978 067	0.981 728	0.985 593
S6	0.981 843	0.985 438	0.986 663	0.989 413	0.990 275	0.991 914
S7	0.985 319	0.989 059	0.976 737	0.982 010	0.984 544	0.987 995
S8	0.991 897	0.993 943	0.992 640	0.994 158	0.996 074	0.996 868
S9	0.941 535	0.933 546	0.965 251	0.960 771	0.960 071	0.967 277
S10	0.964 377	0.969 991	0.974 696	0.977 193	0.974 665	0.978 929
S11	0.967 010	0.957 909	0.986 572	0.980 860	0.986 410	0.986 963
S12	0.981 769	0.984 230	0.983 131	0.984 955	0.989 478	0.990 744
S13	0.955 174	0.942 215	0.984 467	0.976 449	0.986 533	0.986 584
S14	0.981 025	0.981 747	0.981 847	0.984 083	0.985 492	0.986 816
S15	0.924 261	0.938 391	0.974 862	0.979 378	0.977 929	0.981 405
S16	0.979 211	0.982 878	0.974 410	0.977 898	0.974 052	0.978 825
S17	0.914 965	0.904 875	0.963 061	0.955 554	0.965 774	0.967 284
S18	0.915 426	0.934 893	0.921 755	0.938 166	0.945 265	0.956 609
S19	0.895 229	0.918 860	0.895 913	0.917 779	0.932 967	0.947 136
S20	0.864 143	0.894 602	0.887 761	0.912 239	0.906 076	0.926 410
S21	0.848 244	0.882 221	0.856 575	0.888 698	0.884 123	0.909 642
S22	0.943 652	0.955 975	0.952 306	0.961 140	0.970 00	0.976 041
S23	0.941 311	0.953 534	0.941 786	0.952 698	0.962 627	0.969 423
S24	0.909 672	0.913 037	0.953 519	0.953 047	0.964 920	0.972 284
S25	0.928 031	0.932 497	0.957 723	0.960 086	0.970 274	0.975 823
S26	0.973 470	0.971 727	0.970 391	0.971 753	0.979 401	0.982 197
S27	0.947 912	0.953 378	0.948 218	0.953 900	0.951 018	0.959 111
S28	0.895 081	0.919 904	0.936 111	0.947 181	0.959 096	0.968 231
S29	0.888 426	0.915 541	0.903 942	0.925 125	0.932 309	0.947 525
S30	0.848 278	0.839 655	0.876 693	0.890 618	0.893 139	0.917 185
S31	0.905 165	0.912 700	0.961 620	0.962 562	0.949 230	0.957 035
S32	0.886 530	0.895 631	0.960 829	0.959 477	0.938 375	0.945 643

对分别过 4, 5, 6, 8 号 4 种筛的白术药材的检测发现, 过 8 号筛的白术药材其色谱峰分离效果最好, 过 4 号筛的次之, 过 5 号、6 号筛的分离效果较差, 故选用过 8 号药典筛的药材为供试品。

本试验根据植株叶形、裂叶数目、病虫害情况、海拔、块根大小等将同产地的白术植株进行标记和分类, 研究结果显示, 同产地的不同形态的白术植株其药材质量具有一定的差异性。九思坞的几批白术其白术内酯总量结果为优株窄叶裂叶>劣株宽叶中裂>茎秆红色>优株窄叶中裂>优株宽叶中裂>优株宽叶裂叶>劣株窄叶中裂>优株宽叶全缘; 其他同产地的白术其白术内酯总量为块根大的>块根小的, 移种自高海拔的>移种自低海拔的。由于现今常用白术内酯量作为评价白术药材质量的指标之一, 以上研究结果可为进一步的质量评价提供可靠依据。

各批白术药材成分虽有差异, 但色谱图概貌一致, 相似度都大于90%。白术的指纹图谱能反映

其内在的化学成分种类和数量, 可对药材组分群体特征的一致性作出判断。在白术指纹图谱中, 整体分离度较好, 建立的共有模式较为可靠, 可有效鉴别药材的真伪。本研究首次将UPLC色谱法应用到白术药材的鉴定与质量评价中, 在22 min内, 标识了32个共有峰, 各样品间的相似度也都达到90%以上, 较之文献[5]用普通的高效液相色谱法(HPLC)需花费75 min的分析时间, 分离11个共有峰, 具有更高的分辨率和灵敏度, 缩短了分析时间, 能更加有效地评价药材化学成分的多样性和复杂性, 对白术植株的栽培和管理也有一定的借鉴作用。

REFERENCES

[1] WU Y F. A study on *Atractylodes macrocephala* Koidz [J]. Journal of Datong Vocational College (大同职业技术学院学报), 2005, 19(4): 79-83.

[2] DU P F, NIE J H. Review of *Rhizoma Atractylodis Macrocephalae* [J]. Qilu Pharm Aff(齐鲁药事), 2004, 23(9): 41-43.

- [3] State Food and Drug Administration. Technical requirements of study on Chinese medicine injection fingerprint (trial version) [EB/OL]. 2000-08-15[2009-02-10]. <http://www.sda.gov.cn/WS01/CL0237/15768.html>.
- [4] LIU W X, LI Q H, XIE C, et al. Determination of atractylenolides I, II, III in *Atractylodes macrocephala* by

HPLC [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2007, 38(8): 1261-1262.

- [5] YU C, YANG Y, LIU S Y, et al. Fingerprint of *Rhizoma Atractylodis Macrocephalae* by HPLC [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2006, 37(5): 766-769.

收稿日期: 2009-10-26