

不同产地白术醇提物的HPLC指纹图谱及聚类分析[△]

李洪玉^{1*},董宇¹,陈莉君²,寿旦^{1#},费莹²(1.浙江省中医药研究院中药研究中心,杭州 310007;2.浙江中医药大学药学院,杭州 310053)

中图分类号 R283.6;R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)35-3305-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.35.14

摘要 目的:从化学成分种类与特征成分峰面积两方面评价白术质量。方法:采用高效液相色谱(HPLC)法建立白术醇提物HPLC指纹图谱。色谱柱为Capcell PAK C₁₈(250 mm×4.6 mm,5 μm),流动相为水-甲醇(梯度洗脱),流速为1.0 ml/min,柱温为35℃,检测波长为220 nm,进样量为20 μl。采用中药指纹图谱相似度评价系统、峰重叠率计算、系统聚类分析等方法对其进行全面评价。结果:10批不同产地白术醇提物共检出10个共有指纹峰,并标定出其中白术内酯Ⅲ、白术内酯Ⅰ、苍术酮3个主要成分。各产地白术醇提物指纹峰重叠率>96%,相似度>90%。结论:该方法从化学成分种类以及特征峰强度两个方面评价了不同产地白术的相似度,能够为白术以及其他中药材质量评价提供研究基础。

关键词 白术;指纹图谱;相似度评价;聚类分析

HPLC Fingerprints and Cluster Analysis of Ethanol Extract from *Atractylodes macrocephalae* from Different Producing Areas

LI Hong-yu¹, DONG Yu¹, CHEN Li-jun², SHOU Dan¹, FEI Ying²(1.TCM Research Center, Zhejiang Academy of TCM, Hangzhou 310007, China; 2.College of Pharmaceutical Science, Zhejiang University of TCM, Hangzhou 310053, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To evaluate the quality of *Atractylodes macrocephalae* from the type of chemical component and peak area of characteristic component. METHODS: The HPLC fingerprint of ethanol extract from *A. macrocephalae* was established by HPLC. The determination was performed on CAPCELL PAK C₁₈(250 mm×4.6 mm,5 μm) column with mobile phase consisted of water-methanol (gradient elution) at the flow rate of 1.0 ml/min. The column temperature was 35℃, and detection wavelength was set at 220 nm. The sample size was 20 μl. TCM fingerprint similarity evaluation system, peak overlap rate calculation and hierarchical cluster analysis were used to assess it completely. RESULTS: 10 common fingerprint peaks were detected in ethanol extract from 10 batches of *A. macrocephalae*, and atractylenolide III, atractylenolide I and atractylone were identified. The fingerprint peak overlap rate of *A. macrocephalae* ethanol extract from different producing areas was over 96%, and the similarity was over 90%. CONCLUSIONS: The established method can be use to evaluate the similarity of *A. macrocephalae* from different producing areas in terms of chemical components and characteristic peak intensity, and provides foundation for the quality evaluation of *A. macrocephalae* and other medicinal materials.

KEYWORDS *Atractylodes macrocephalae*; Fingerprint; Similarity evaluation; Cluster analysis

白术 *Atractylodes macrocephalae* Koidz. 为菊科植物的干燥根茎,具有补气健脾、燥湿利水、止汗安胎等功效^[1],是浙江道地药材“浙八味”之一,始载于《神农本草经》。白术主要含有挥发油、白术内酯和多糖等多种化学成分^[2-3],临床上广泛用于治疗脾胃虚弱引起的食后腹胀、四肢无力、慢性腹泻等^[4-5]。中药成分的复杂性为其质量控制增加了难度,指纹图谱技术由于能够从整体的角度分析复杂中药样品,且操作简便、重复性好,近年来被广泛用于中药质量评价。目前,指纹图谱的相似度评价一般通过选择峰高或峰面积为参数,根据相关系数法或夹角余弦法进行计算,该方法具有一定的优越性,但是忽

略了中药成分的复杂性^[6-7]。本试验优化了白术高效液相色谱(HPLC)法,建立了分析时间短、重复性好的白术醇提物HPLC指纹图谱,并标定了其中的特征峰白术内酯Ⅲ、白术内酯Ⅰ及苍术酮^[8]。从白术药材化学成分相似性和共有指纹峰面积两个方面的相似性计算结合聚类分析,系统评价白术的质量,期望能够为白术药材的质量控制提升提供客观依据。

1 材料

1.1 仪器

20A-VP型HPLC仪、LC-Solution型色谱工作站、SPD-20A型紫外-可见光检测器(日本岛津公司);AE240型电子分析天平(瑞士Mettler Toledo公司);YJ-40L/h型超纯水机(杭州亚洁环保设备有限公司);中药粉碎机(上海淀久中药机械制造有限公司);RE600型旋转蒸发器(日本Yamato公司);TC-15套式恒温器(海宁市新华医疗器械厂)。

1.2 试药

所用试剂除甲醇、乙腈为色谱纯,其余均为分析纯;水为

△ 基金项目:浙江省自然科学基金资助项目(No.LY12B05004);浙江省科技计划(No.2011F10017);浙江省中医药科技计划(No.2010ZB020)

* 研究员,硕士研究生导师。研究方向:中药化学。电话:0571-88849089。E-mail:lihongyu@hz.cn

通信作者:研究员,硕士研究生导师。研究方向:药物分析。电话:0571-88849089。E-mail:shoudan@hz.cn

反渗透纯水;苍术酮、白术内酯 I 及白术内酯 III 对照品(自制,经结构鉴定及纯度检查,含量均达 98% 以上,符合含量测定标准要求)。

1.3 药材

白术药材均采集自白术主要产区,经浙江省立同德医院主任中药师高家鉴鉴定为菊科植物白术 *A. macrocephala* Koidz. 的干燥根茎。白术药材来源见表 1。

表 1 白术药材来源

Tab 1 The source of *A. macrocephala* Koidz.

编号	采集地	采集时间	编号	采集地	采集时间
S1	浙江磐安	2010.08	S6	安徽亳州	2010.09
S2	浙江临安	2010.08	S7	湖南	2010.09
S3	安徽亳州	2010.09	S8	湖南	2010.09
S4	浙江临安	2010.11	S9	江西玉山	2010.09
S5	河南漯河	2010.09	S10	浙江	2010.10

2 方法与结果

2.1 色谱条件的建立

色谱柱: Capcell PAK C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 水(B)-甲醇(A), 梯度洗脱(0~15.5 min, 29% B; >15.5~19.0 min, 29%→9% B; >19.0~38.0 min, 9% B; >38.0~40.5 min, 9%→29% B; >40.5~55.0 min, 29% B); 流速: 1.0 ml/min; 柱温: 35℃; 检测波长: 220 nm; 进样量: 20 μl。

2.2 混合对照品溶液的制备

精密称取干燥至恒质量的苍术酮 12.2 mg, 白术内酯 I 12.0 mg, 白术内酯 III 12.0 mg, 分别置于 20 ml 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 即为标准品贮备液。分别精密吸取苍术酮标准品贮备液 6 ml, 白术内酯 I、白术内酯 III 标准品贮备液各 1 ml, 置 25 ml 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 即得每 1 ml 含苍术酮 0.146 4 mg、白术内酯 I 0.024 0 mg、白术内酯 III 0.024 0 mg 的混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备

取白术样品干燥粗粉 0.6 g, 精密称定, 置 25 ml 量瓶中, 加入 20 ml 甲醇, 超声(功率: 400 W, 频率: 25 kHz) 提取 30 min, 放冷, 加甲醇至刻度, 摇匀, 滤过, 取滤液, 即得。

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度试验 取“2.3”项下供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件连续进样 6 次测定。结果, 各主要色谱峰的相对保留时间和相对峰面积比值的 RSD<2.0%, 符合指纹图谱要求, 表明精密度良好。

2.4.2 重复性试验 取 2 号白术药材, 按“2.3”项下方法分别制备供试品溶液 6 份, 按“2.1”项下色谱条件进样测定。结果, 各色谱峰相对保留时间的 RSD<2.0%, 相对峰面积的 RSD<5.0%, 表明本方法的重复性良好。

2.4.3 稳定性试验 取“2.3”项下供试品溶液, 分别于 0、1、2、4、12、24 h 进样测定。结果, 各色谱峰相对保留时间的 RSD<2.0%, 相对峰面积的 RSD<5.0%, 表明样品在 24 h 内稳定。

2.5 指纹图谱的建立及相似度评价

2.5.1 不同产地白术指纹图谱的建立 参照“2.1”项下方法, 记录 10 批白术药材的色谱峰, 色谱见图 1 和图 2。共得到 10 个色谱共有指纹峰, 其中 1、3、8 号峰分别为白术内酯 III、白术内酯 I、苍术酮。以苍术酮(8 号峰)保留时间为参照, 计算各共有指纹峰的相对保留时间, RSD<0.35%, 见表 2; 记录峰面积, 共有指纹峰占总峰面积的 87.99% 以上, 见表 3。由表 2 和表 3

可知, 不同产地白术色谱峰数量相似, 但共有峰相对峰面积差异较大, 表明各成分含量存在较大差异。

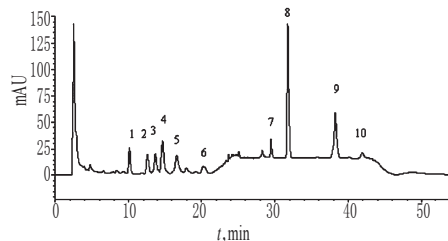


图 1 白术共有峰 HPLC 图谱

Fig 1 The characteristic fingerprint of common peaks of *A. macrocephala*

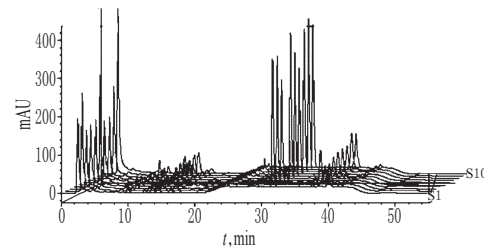


图 2 白术醇提取物 HPLC 指纹图谱

Fig 2 The HPLC fingerprint of ethanol extract form *A. macrocephala*

表 2 白术共有峰的相对保留时间

Tab 2 Relative retention time of common peaks of *A. macrocephala*

峰号	样品编号										\bar{x}	RSD, %
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10		
1	0.318	0.318	0.317	0.317	0.317	0.317	0.318	0.318	0.317	0.318	0.318	0.138
2	0.397	0.397	0.396	0.396	0.396	0.395	0.397	0.397	0.397	0.396	0.396	0.145
3	0.432	0.432	0.432	0.432	0.432	0.432	0.433	0.433	0.433	0.431	0.432	0.119
4	0.460	0.460	0.459	0.460	0.459	0.459	0.461	0.461	0.461	0.459	0.460	0.217
5	0.522	0.519	0.520	0.519	0.519	0.521	0.523	0.521	0.522	0.518	0.520	0.316
6	0.892	0.892	0.892	0.892	0.892	0.892	0.892	0.892	0.892	0.892	0.892	0.025
7	0.927	0.927	0.928	0.927	0.927	0.927	0.927	0.927	0.927	0.927	0.927	0.018
8	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0
9	1.204	1.203	1.203	1.204	1.204	1.204	1.204	1.205	1.204	1.203	1.204	0.053
10	1.318	1.318	1.318	1.319	1.318	1.318	1.319	1.320	1.319	1.318	1.319	0.054

表 3 不同产地白术共有指纹峰相对峰面积

Tab 3 Relative peaks area of *A. macrocephala* from different producing areas

峰号	样品编号										\bar{x}	RSD, %
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10		
1	0.063	0.054	0.132	0.083	0.083	0.041	0.773	0.135	0.041	0.091	0.150	148.082
2	0.030	0.040	0.050	0.042	0.055	0.032	0.979	0.065	0.043	0.038	0.137	215.236
3	0.089	0.119	0.151	0.103	0.11	0.046	0.842	0.141	0.068	0.111	0.178	132.239
4	0.237	0.221	0.205	0.358	0.257	0.201	1.257	0.223	0.272	0.135	0.337	97.565
5	0.071	0.082	0.105	0.135	0.114	0.072	1.074	0.094	0.098	0.066	0.191	162.722
6	0.031	0.025	0.017	0.017	0.028	0.027	0.227	0.039	0.027	0.023	0.046	138.582
7	0.026	0.032	0.024	0.03	0.02	0.024	0.239	0.039	0.041	0.035	0.051	130.211
8	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0
9	0.381	0.382	0.317	0.403	0.331	0.277	1.901	0.267	0.436	0.109	0.480	105.675
10	0.037	0.046	0.051	0.037	0.035	0.034	0.255	0.041	0.062	0.054	0.065	103.256

2.5.2 各产地白术指纹图谱相似度评价 将所得的图谱数据导入国家药典委员会推荐的《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2.0 版) 软件, 经过选峰, 设定其匹配模板, 将谱峰进行

自动匹配;并设定标准模板,进行谱峰差异性评价和整体相似度评价,结果见表4。所有样品中,7号与4号样品,以及7号与9号样品相似度相对较低,但所有样品的相似度均>90%,表明不同产地的白术样品相似度较高。

表4 不同产地白术指纹图谱相似度评价

Tab 4 Similarity evaluation of *A. macrocephalae* from different producing areas

序号	相似度, %	序号	相似度, %
S1	98.0	S6	98.0
S2	98.1	S7	91.0
S3	98.3	S8	98.3
S4	97.1	S9	97.3
S5	98.3	S10	96.7

2.6 峰重叠率计算

峰重叠率以不同样品共有峰和总峰数为参数,从成分角度来反映样本之间的相关性和相似程度。白术2号样品采集于浙江淳安,在本试验色谱条件下,其吸收峰具有代表性,各峰分离度也最好,共有13个吸收峰,故将其作为峰重叠率计算的标准图谱,按下式计算不同产地白术的重叠率: $\omega = 2p / (q + s) \times 100\%$ (p:共有峰个数;q:待测样本总峰个数;s:标准谱总峰个数)。结果显示,峰重叠率达到96%以上,表明本试验所收集的10批白术药材所含主要化学成分相似性良好。

2.7 聚类分析

以各共有指纹峰峰面积为参数,用SPSS17.0统计软件几何平均最小法对其进行系统聚类分析,结果见图3。其中1、2、3、5、6、9号样品相似度良好,可归为一类;4、8、10号样品可归为一类;而7号白术与其他样品相似度最差。用中药指纹图谱相似度评价系统验证,1、2、3、5、6、9号样品相似度达98.7%;4、8号样品相似度达98.4%;相比之下10号样品与4、8号最相似,相似度达94.5%,故可与4、8号归为同一类;7号样品与其他样品相似度最差。

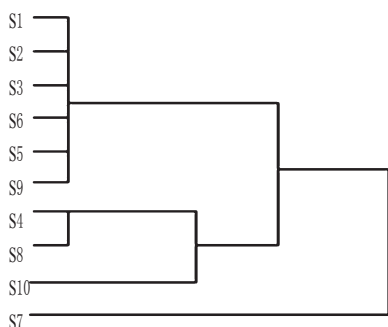


图3 不同产地白术聚类分析图

Fig 3 Clustering analysis diagram of *A. macrocephalae* from different producing areas

3 讨论

本试验建立了10批不同产地白术的中药指纹图谱,并标定了其中的主要成分白术内酯Ⅲ、白术内酯Ⅰ及苍术酮,各样品吸收峰重叠率大于96%,相似度达90%以上,从成分种数

以及共有指纹峰强度两个方面表明,该10批白术样品所建立的指纹图谱具有代表性。通过系统聚类分析发现,1、2、3、5、6、9号样品相似度良好,可归为一类;4、8、10号样品可归为一类;7号样品与其他产地白术相似度相对较低。该结果与指纹图谱评价系统计算的相似度结果较为一致,能为白术的质量控制、等级及优质产区划分等提供客观依据。

苍术酮为白术主要有效成分,并且在本试验条件下实现了最佳的吸收度和较好的分离度,峰位居中,相对面积稳定,故选择该成分为内参物^[9-10]。预试验发现,在现有色谱条件下,10 min以前多数为色素等非药效成分,并且在60 min以后基本无特征峰,故本方法采集了60 min内的谱图,并确保10~60 min内的色谱峰分离良好。

由于中药的复杂性,仅以化学成分个数计算重叠率,或者以共有指纹峰含量计算相似度,都存在不足,故本试验将两者结合,从化学成分种类和特征成分峰面积两个方面来评价白术质量,能为白术以及其他中药材质量控制提供研究基础。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 2010年版. 北京: 中国医药科技出版社, 2010:95.
- [2] 寿旦, 俞忠明, 章建民. 白术高效液相色谱指纹图谱的建立及种源差异分析[J]. 中华中医药杂志, 2010, 25(3): 466.
- [3] Guo FQ, Huang LF, Zhou SY, et al. Comparison of the volatile compounds of *Atractylodes* medicinal plants by headspace solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2006, 570(1): 73.
- [4] 彭腾, 李鸿翔, 邓赟, 等. 白术内酯类成分及其药理作用研究进展[J]. 中国药房, 2012, 23(39): 3 732.
- [5] Li CQ, He LC, Jin JQ. Atractylenolide I and atractylenolide III inhibit Lipopolysaccharide-induced TNF-alpha and NO production in macrophages[J]. *Phytother Res*, 2007, 21(4): 347.
- [6] 关洪月, 李林, 刘晓, 等. 中药指纹图谱相似度计算方法探析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(18): 282.
- [7] 朱东亮, 张海, 田文君, 等. 基于“成分-药效”关联分析的六味地黄丸质量控制方法[J]. 中国科学: 化学, 2010, 40(6): 786.
- [8] 寿旦, 戴诗文, 章建民, 等. 微管液相色谱法同时测定白术中的白术内酯Ⅲ、白术内酯Ⅰ、苍术酮[J]. 色谱, 2008, 26(5): 637.
- [9] 刘晓丽, 周清, 姜玲, 等. 三七总皂苷 HPLC 数字化指纹图谱研究[J]. 中华中医药学刊, 2012, 30(10): 2 427.
- [10] 陈琴华, 李鹏, 何婧, 等. 白术饮片 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中药材, 2009, 32(1): 35.

(收稿日期:2013-09-19 修回日期:2013-11-20)

《中国药房》杂志——《化学文摘》(CA)收录期刊, 欢迎投稿、订阅