

不同产地茅苍术水溶性成分的 HPLC 指纹图谱研究

王 鸣¹, 肖超成^{1,2}, 陈 雨¹, 梁敬钰², 冯 煦^{1,①}

[1. 江苏省·中国科学院植物研究所(南京中山植物园) 江苏省药用植物研究开发中心, 江苏 南京 210014;

2. 中国药科大学天然药物化学教研室, 江苏 南京 210038]

摘要: 采用 HPLC-ELSD 法建立了茅苍术 [*Atractylodes lancea* (Thunb.) DC.] 水溶性成分的指纹图谱, 并对不同产地野生与栽培茅苍术水溶性成分的指纹图谱进行了比较分析。结果表明, 采用 HPLC-ELSD 法获得的茅苍术水溶性成分指纹图谱稳定、可靠、重复性好; 供试茅苍术水溶性成分的保留时间一般在 65 min 之内, 共有 16 个典型的共有色谱峰; 供试茅苍术样品的指纹图谱与对照模式色谱图的相似度较高, 说明该指纹图谱可作为茅苍术水溶性化学成分的特征指纹图谱。江苏产野生与栽培茅苍术水溶性成分的化学组成基本一致, 以倍半萜苷类为主, 主要成分均为苍术苷 A; 湖北产野生茅苍术水溶性成分的倍半萜苷类总含量较高, 但主要成分不是苍术苷 A。

关键词: 茅苍术; 水溶性成分; 指纹图谱; 高效液相色谱法

中图分类号: Q946.8; S567.21⁺1; R284.1 文献标志码: A 文章编号: 1004-0978(2009)01-0012-04

Study on HPLC fingerprint of water-soluble constituents in *Atractylodes lancea* from different locations WANG Ming¹, XIAO Chao-cheng^{1,2}, CHEN Yu¹, LIANG Jing-yu², FENG Xu^{1,①} (1. Jiangsu Center for Research and Development of Medicinal Plants, Institute of Botany, Jiangsu Province and the Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210014, China; 2. Department of Natural Medicinal Chemistry, China Pharmaceutical University, Nanjing 210038, China), *J. Plant Resour. & Environ.* 2009, 18(1): 12-15

Abstract: Fingerprints of water-soluble constituents in *Atractylodes lancea* (Thunb.) DC. were established by HPLC-ELSD, and the fingerprints of water-soluble constituents in wild and cultivated *A. lancea* from different locations were compared. The results show that the fingerprint obtained by HPLC-ELSD is stable and reliable, and has a good reproducibility. The retention time of water-soluble constituents in tested samples is less than 65 min and the fingerprint has 16 typical common peaks. The fingerprints are quite similar to the standard chromatogram, indicating that the chromatogram fingerprint could be used as the characteristic fingerprint for the water-soluble constituents in *A. lancea*. The chemical component of water-soluble constituents in wild *A. lancea* from Jiangsu Province are essentially identical with those in the cultivated ones which are mainly sesquiterpenoids, and the main component is atractyloside A. While water-soluble constituent in wild *A. lancea* from Hubei Province also contains a higher content of sesquiterpenoids, but the main component is not atractyloside A.

Key words: *Atractylodes lancea* (Thunb.) DC.; water-soluble constituents; fingerprint; HPLC-ELSD

茅苍术 [*Atractylodes lancea* (Thunb.) DC.] 药用历史悠久, 具有燥湿、祛风的功效, 主要产于江苏、湖北、浙江及安徽等地, 以产于江苏茅山一带的质量最佳。

近年来, 对茅苍术的质量研究主要集中于对其挥发油成分的比较^[1-2], 道地茅苍术的挥发油总量低于其他产区, 但苍术酮在挥发油中所占的比例则显著高于其他产区。尽管有学者发现, 道地茅苍术

收稿日期: 2008-05-20

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30370292); 江苏省自然科学基金资助项目(BK2004062); 江苏省基础设施建设项目(BM2006104; BM2006507)

作者简介: 王 鸣(1958—), 男, 江苏南京人, 本科, 副研究员, 主要从事药用植物资源开发利用等方面的研究。

①通讯作者 E-mail: fengxu@mail.cnbg.net

的水溶性浸出物含量较其他产区高^[3],但尚无系统的研究,对差异产生的原因也没有深入的研究。

为了全面评价茅苍术的质量,有必要对其所含的非挥发性成分进行深入研究,以建立较完善的茅苍术质量评价体系。作者首次建立了茅苍术水溶性成分的指纹图谱,并对不同产地(江苏和湖北)野生与栽培茅苍术水溶性成分的 HPLC 指纹图谱进行了比较,以期为茅苍术的质量评价提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 材料

供试茅苍术来源于江苏和湖北,具体采集地见

表1。于2007年10月至12月分别采集不同产地茅苍术的根茎,自然晾干,去泥后,剪成薄片,60℃烘干,粉碎后过65目筛,备用。

1.2 仪器和试剂

实验用仪器包括美国 Agilent 公司生产的 1100 型液相色谱仪、美国 Alltech 公司生产的 ELSD 2000 ES 检测器及中国天津华生公司生产的 XWK-III 无油空气泵;所用试剂有乙腈(色谱纯,美国 Tedia 公司)、甲醇(色谱纯,淮阴汉邦科技有限公司)及纯净水(广州乐百氏食品饮料公司),其他试剂均为分析纯,购于上海九亿化学试剂厂。标准品苍术苷 A (atractyloside A) 为自制标准品,经 UV、IR 和 NMR 等鉴定,纯度大于 99.5% (归一化法计算)。

表1 茅苍术供试样品的基本情况

Table 1 Basic status of tested samples of *Atractylodes lancea* (Thunb.) DC.

样号 No.	产地 Location	采集时间 Collection time (YYYY-MM)	类型 Type	栽培时间/a Cultivation time
J01-J10	江苏茅山 Maoshan in Jiangsu	2007-10	野生 Wild	-
J11	江苏茅山 Maoshan in Jiangsu	2007-10	栽培 Cultivated	4
J12	江苏小九华山 Xiaojiuhuashan in Jiangsu	2007-10	栽培 Cultivated	3
J13	江苏湖山 Hushan in Jiangsu	2007-10	栽培 Cultivated	3
J14	江苏茅山 Maoshan in Jiangsu	2007-12	野生 Wild	-
J15	湖北保康 Baokang in Hubei	2007-12	野生 Wild	-

1.3 方法

1.3.1 茅苍术水溶性成分的提取 取干燥茅苍术粉末 3 g,用滤纸包裹后,置于索氏提取器内,用石油醚回流提取至无色;将提取后的粉末干燥,再用乙酸乙酯和甲醇依次提取至无色;将甲醇提取液浓缩后,用甲醇定容至 10 mL,用 0.45 μm 微孔滤膜过滤,所得滤液即为茅苍术水溶性成分溶液。

1.3.2 茅苍术水溶性成分的检测条件 按照下列条件分别对各样品的水溶性成分进行检测。

色谱条件:Phenomenex Hydro-RP 80R 型色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 4 μm)。流动相为乙腈(A)和体积分数 0.25% 的乙酸水溶液(B)的混合液,采用梯度洗脱法,洗脱程序为:0~17 min, A 2%~5%; 17~25 min, A 5%~11.5%; 25~35 min, A 11.5%; 35~50 min, A 11.5%~17%; 50~68 min, A 17%~34%。柱温 25℃,流速 0.6 mL·min⁻¹,自动进样,进样量 10 μL。

ELSD 检测条件:汽化温度 110.5℃,压缩空气流速 3.1 mL·min⁻¹,理论塔板数按苍术苷 A 峰计

算应不低于 1 000。

1.3.3 方法学考察

1.3.3.1 参比峰确定 分别取 10 μL J01 样品提取液以及 4 μL 标准品溶液,按照上述色谱条件测定。结果显示提取液的指纹图谱中保留时间为 32.75 min 的色谱峰与苍术苷 A 标准品的色谱峰一致,且峰面积较大,分离度良好、稳定,所以选定此峰为茅苍术水溶性成分指纹图谱的参比峰(S)。

1.3.3.2 稳定性试验 取 J01 样品提取液,分别在 0、4、8、12 和 24 h 按照上述色谱条件进行分析。各色谱峰的相对保留时间及峰面积比值基本一致,RSD 均小于 3%,表明茅苍术的水溶性成分提取液在 24 h 内稳定,符合指纹图谱技术的要求。

1.3.3.3 精密度试验 取 J02 样品提取液,按照上述色谱条件进行分析,连续进样 5 次。色谱峰的相对保留时间及峰面积比值基本一致,RSD 均小于 3%,表明该方法精密度良好,符合指纹图谱的检测要求。

1.3.3.4 重现性试验 取 J03 样品粉末 5 份,按照

上述提取方法制备样品提取液,并分别按上述色谱条件进行分析,5份样品溶液色谱峰的相对保留时间及峰面积比值基本一致,RSD均小于3%,表明该方法的重现性良好,符合指纹图谱的检测要求。

1.4 数据分析和处理

对10个江苏茅山产野生样品的指纹图谱进行比较,确定共有模式色谱图,分别计算共有成分的峰面积和保留时间,并运用中国药典委员会发布的“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004年版)”进行实验数据的处理,对多个色谱图进行比较,得到可全面反映多个色谱图特征的对照模式色谱图,并以此模式为基准,进行指纹图谱的相似度评价,建立茅苍术水溶性成分的特征指纹图谱。

2 结果和分析

2.1 江苏茅山产野生茅苍术共有模式色谱图的确定

对江苏茅山产10个野生茅苍术样品的水溶性成分指纹图谱进行检测和比较,结果显示,供试茅苍术样品中各水溶性成分的色谱峰一般在65 min以内出峰。由于11 min之前所出色谱峰为溶剂峰及色谱柱不保留的难分离成分峰,因此只对保留时间为11~65 min的色谱峰进行分析,得到能全面反映多个色谱图特征的共有模式色谱图(图1)。

供试茅苍术样品水溶性成分的指纹图谱中共有16个典型的共有色谱峰,其中7号峰为最高峰,为苍术苷A的色谱峰,占共有峰总面积的25%;4号和5号峰的分离效果不稳定;12号峰由2个小峰组成,且后峰低于前峰,表现为肩峰;14号峰由2组峰组成,

每组峰由多个小峰组成,峰形常有细微变化。其他峰为非共有峰,总面积小于总峰面积的10%。

2.2 江苏茅山产茅苍术水溶性成分指纹图谱的相似度评价及茅苍术特征指纹图谱的建立

以苍术苷A的色谱峰为参照峰,将其保留时间和峰面积设为1,计算江苏茅山产10个野生茅苍术样品水溶性成分的指纹图谱中16个共有峰的相对保留时间及相对峰面积,结果见表2。根据表2中的数据对指纹图谱的相似度评价,以对照模式色谱图为基准,10个样品与之的相似度分别为0.939、0.983、0.938、0.951、0.986、0.957、0.957、0.983、0.972和0.941。可见,样品的指纹图谱与对照模式色谱图的相似度较高,说明这16个特征峰在各样品中均能稳定出现,且吻合度较好,因此,该图谱可作为茅苍术水溶性化学成分的特征指纹图谱。

2.3 江苏产野生与栽培茅苍术指纹图谱的比较分析

对采自江苏茅山的野生茅苍术(J10)、栽培茅苍术(J11)以及采自江苏小九华山和江苏湖山的栽培茅苍术(J12和J13)水溶性成分的指纹图谱进行比较分析,结果显示,相同采收期的野生与栽培茅苍术的水溶性成分以倍半萜苷类为主,主要成分是苍术苷A;在保留时间25~65 min内色谱峰的个数及保留时间大致相同,仅峰面积有一定的差异。栽培茅苍术的水溶性成分在保留时间为15.91、18.48和20.91 min位置的出峰面积较小或不出峰,与野生茅苍术水溶性成分的指纹图谱稍有差异。以野生茅苍术(J10)的水溶性成分色谱图为基准,分别将J11、J12及J13号样品的色谱图与之比较,相似度分别为0.847、0.892和0.874,相似度较高,说明野生与栽

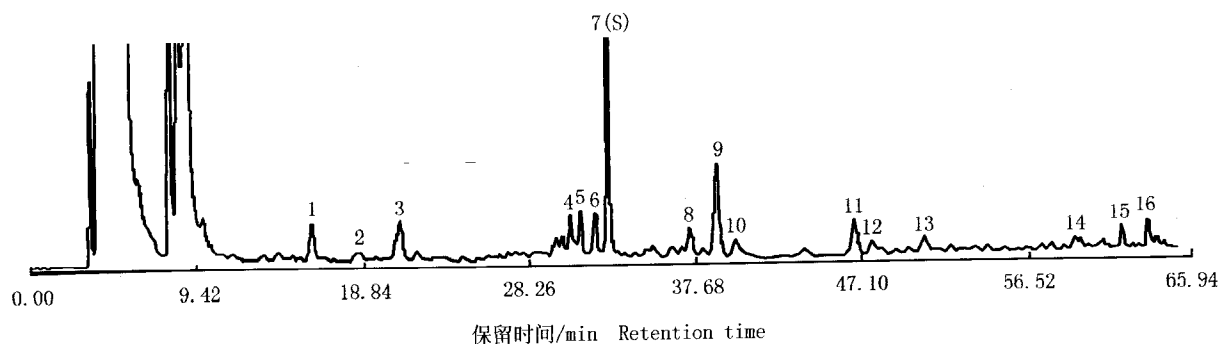


图1 江苏茅山产10个野生茅苍术样品水溶性成分的HPLC-ELSD共有模式色谱图
Fig. 1 The mutual model of HPLC-ELSD fingerprint of water-soluble constituents in ten wild samples of *Atractylodes lancea* (Thunb.) DC. from Maoshan of Jiangsu Province

表2 江苏茅山产茅苍术样品水溶性成分 HPLC-ELSD 指纹图谱中 16 个特征峰的技术参数

Table 2 The technical parameters of sixteen characteristic peaks in HPLC-ELSD fingerprint of water-soluble constituents in *Atractylodes lancea* (Thunb.) DC. from Maoshan of Jiangsu Province

峰号 No. of peak	保留时间/min Retention time	相对保留时间 Relative retention time	峰面积 Peak area	相对峰面积 Relative peak area
1	15.91	0.49	251.06	0.16
2	20.93	0.64	364.96	0.23
3	21.86	0.67	106.04	0.07
4	30.60	0.93	271.71	0.17
5	31.18	0.95	295.51	0.19
6	32.00	0.98	333.95	0.21
7(5)	32.75	1.00	1 573.20	1.00
8	37.37	1.14	237.78	0.15
9	38.93	1.19	759.09	0.48
10	40.01	1.22	259.46	0.16
11	46.73	1.43	344.61	0.22
12	47.74	1.46	127.19	0.08
13	50.72	1.55	225.52	0.14
14	59.21	1.81	152.24	0.10
15	61.91	1.89	233.27	0.15
16	63.40	1.94	221.67	0.14

培茅苍术水溶性成分的化学组成基本一致。

2.4 江苏茅山和湖北保康产野生茅苍术指纹图谱的比较分析

对江苏茅山产野生茅苍术(J14)和湖北保康产野生茅苍术(J15)水溶性成分的指纹图谱进行比较分析,结果显示,相同采收期的江苏茅山产与湖北保康产野生茅苍术水溶性成分的指纹图谱存在显著差异。江苏茅山产野生茅苍术水溶性成分中含量最高的倍半萜苷成分为苍术苷 A,约占总含量的 39%;湖北保康产野生茅苍术水溶性成分中的苍术苷 A 只占总含量的 8%,其含量最高的成分为保留时间 39.10 min 的化合物。湖北保康产野生茅苍术水溶性成分的指纹图谱上的出峰个数较多,且峰面积百分比超过 2% 的有 19 个峰;而江苏茅山产野生茅苍术水溶性成分的指纹图谱出峰个数较少,且仅有 6 个峰的峰面积百分比超过 2%。

综上所述,12 月份采收的江苏茅山产野生茅苍术水溶性成分中苍术苷 A 的含量较高,是主要的倍半萜苷类成分;而湖北保康产野生茅苍术水溶性成分中含有多个主要成分,苍术苷 A 并不是含量最高

的成分,其中所含的倍半萜苷类总含量明显高于江苏茅山产野生茅苍术。

3 讨论和结论

茅苍术的水溶性成分主要以倍半萜苷类为主^[4-5],大多无紫外吸收。运用 ELSD 检测器能够检测到茅苍术中绝大部分的倍半萜苷类成分,使所建立的指纹图谱能够全面反映样品中水溶性成分的信息。通过色谱条件优化,可以使各色谱峰得到较好的分离,保留时间适中。该方法稳定、可靠、重复性好,为茅苍术的质量评价提供了可靠的实验依据。

江苏产野生与栽培茅苍术的水溶性成分的化学组成基本一致,主要是倍半萜苷类,以苍术苷 A 为主,含量较高;湖北产野生茅苍术水溶性成分的主要成分有数个,苍术苷 A 并不是含量最高的成分,且湖北保康产野生茅苍术的水溶性成分中倍半萜苷类成分的总含量明显高于江苏茅山产野生茅苍术。因此,与非道地茅苍术相比,江苏茅山产的茅苍术中倍半萜苷类的总含量较低,而苍术苷 A 在水溶性成分中所占的比例则显著高于非道地产区。上述研究结果与茅苍术挥发油质量研究结果^[1]类似,即道地茅苍术挥发油含量显著低于非道地茅苍术。综上所述,茅苍术的道地性并不是体现在挥发油或倍半萜苷的总量上,而可能与各化学成分的种类及所占比例有关。

参考文献:

- [1] 郭兰萍,刘俊英,吉力,等. 茅苍术道地药材的挥发油组成特征分析[J]. 中国中药杂志, 2002, 27(11): 814-819.
- [2] 徐晓兰,冯煦,王鸣,等. 野生与栽培茅苍术挥发油成分的比较分析[J]. 植物资源与环境学报, 2007, 16(1): 28-30.
- [3] 朱晓琴,贺善安. 不同产地苍术药材化学成分的比较[J]. 植物资源与环境, 1994, 3(4): 18-22.
- [4] Kano Y, Komatsu K, Saito K, et al. A new polyacetylene compound from *Atractylodes* rhizome [J]. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 1989, 37(1): 193-194.
- [5] Kitajima J, Kamoshita A, Ishikawa T, et al. Glycosides of *Atractylodes lancea* [J]. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 2003, 51(6): 673-678.