

· 专题 ·

半夏曲发酵过程化学成分的 HPLC 特征指纹图谱分析<sup>△</sup>张超<sup>1</sup>, 卢一<sup>1</sup>, 范润勇<sup>1</sup>, 兰泽伦<sup>2</sup>, 黄勤挽<sup>1\*</sup>

(1. 成都中医药大学, 成都 611137; 2. 国家中医药管理局中药炮制技术重点实验室, 成都 611731)

**[摘要]** **目的:** 对半夏曲自然发酵过程化学成分的 HPLC 特征指纹图谱进行研究, 为半夏曲的物质基础研究提供参考。**方法:** 采用 HPLC 梯度洗脱, 建立半夏曲不同发酵过程的特征指纹图谱, 运用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004(A 版)”进行分析。**结果:** HPLC 指纹图谱方法学考察中 RSD 均 < 3.0%, 符合相关规定; 指认了鸟苷、肌苷和腺苷 3 个特征峰。在发酵过程中, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 19 号色谱峰所代表的化合物均存在; 11, 12, 13, 14, 16, 17, 18 号色谱峰所代表的化合物则是因为发酵而新产生的 7 个化合物, 且 11, 12, 13, 14 号色谱峰的相对峰面积非常明显, 反应其成分含量较高。**结论:** 半夏曲发酵过程特征指纹图谱的研究可在一定程度上揭示其物质基础的变化, 为进一步研究半夏曲的物质基础提供参考。

**[关键词]** 半夏曲; HPLC; 指纹图谱; 发酵

## HPLC Characteristic Fingerprint Analysis of Pinelliae Rhizoma Fermentata in Fermenting Process

ZHANG Chao<sup>1</sup>, LU Yi<sup>1</sup>, FAN Runyong<sup>1</sup>, LAN Zelun<sup>2</sup>, HUANG Qinwan<sup>1\*</sup>

(1. Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

2. Key Laboratory TCM processing of State Administration of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611731, China)

**[Abstract]** **Objective:** To establish HPLC characteristic fingerprint for different fermented products of Pinelliae Rhizoma Fermentata and provide reference for the research on material foundations. **Methods:** The HPLC fingerprints of different fermented products of Pinelliae Rhizoma Fermentata were established and analyzed with Similarity Evaluation System for Chromatographic Fingerprint of TCM (Version 2004A). **Results:** RSD of methodological study in HPLC fingerprint were less than 3.0%, which was correspond to related regulations; Three specific peaks were recognized as guanosine inosine and adenosine. 12 chemicals (peak 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 19) were always be detected during the fermentation, the more important, there were 7 new ingredients (peak 11, 12, 13, 14, 16, 17, 18) in fermented processing, these seven new peaks increased rapidly, and there were 4 peaks (peak 11, 12, 13, 14), which relative peak areas were very obvious, and reflecting its high ingredients. **Conclusion:** The change of characteristic fingerprint could reveal that material foundation of Pinelliae Rhizoma Fermentata to a certain extent, which could provide a reference for further study on materials basis.

**[Keywords]** Pinelliae Rhizoma Fermentata; HPLC; fingerprint; fermentation

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.2016.7.004

半夏曲由天南星科植物半夏 *Pinellia ternate* (Thunb.) Breit. 的炮制品清半夏与姜汁、白矾等经过发酵而成, 具有降逆止呕, 止咳化痰的功效, 临床用于恶心呕吐, 食欲不振, 咳嗽痰壅<sup>[1]</sup>。目前, 以清半夏与姜汁、白矾等为发酵处方的半夏曲有关其发酵过程物质基础变化方面的研究未见报道。本实验拟采用 HPLC 特征指纹图谱技术<sup>[2-4]</sup>对半夏曲发

酵过程物质基础变化进行研究, 为进一步对半夏曲发酵过程及物质基础研究提供借鉴。

## 1 材料

## 1.1 仪器与试剂

Agilent 1260 高效液相色谱仪; Agilent Zorbax SB-Aq C<sub>18</sub> (5 μm, 4.6 mm × 250 mm, 美国 Agilent 公

<sup>△</sup> [基金项目] 国家中医药管理局 2015 年公益性行业科研专项项目(201507004-12)

\* [通信作者] 黄勤挽, 副教授; 研究方向: 中药炮制和药剂研究; 电话: 028-61800231, E-mail: 36190587@qq.com

司); FW135 型中草药粉碎机(上海隆拓仪器设备有限公司); DL-720D 数控超声波清洗器(上海之信仪器有限公司); RJ-TGL-16C 型高速离心机(无锡瑞江分析仪器有限公司); UPH-II-10T 型优普超纯水器(成都超纯科技有限公司); RE2000B 旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂); BS200S 电子天平(北京赛多利斯天平有限公司); 中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004A 版)。乙腈为色谱纯, 水为超纯水, 其他试剂均为分析纯。

## 1.2 样品来源及制备

清半夏(四川新荷花中药饮片股份有限公司, 批号: D1310106)、白矾(四川新荷花中药饮片股份有限公司, 批号: 1408090)、六神曲(四川辅正药业股份有限公司, 批号: 150410)、面粉和生姜采购于附近农贸市场; 肌苷对照品(Lot: 141013)、鸟苷对照品(Lot: 140607)、腺苷对照品(Lot: 140521)均购于成都普菲德生物技术有限公司。在四川辅正药业股份有限公司代为加工, 按照前期预实验结果, 分5个时间节点(0%, 25%, 50%, 75%, 100%)取样; 其处方为清半夏 160 g, 白矾 10 g, 六神曲 5 g, 生姜汁 20 g, 面粉 32 g; 加工工艺为取清半夏、白矾、六神曲粉碎成细粉; 生姜榨汁加适量水, 与面粉及上述细粉搅匀, 制成软硬适宜的小块或颗粒, 发酵至产生“黄衣”时<sup>[5]</sup>, 取出, 干燥, 即得; 发酵过程样品详细信息见表1。

表1 半夏曲发酵过程样品

编号	发酵时间/h	时间节点
S <sub>1</sub>	0	0%
S <sub>2</sub>	30	25%
S <sub>3</sub>	60	50%
S <sub>4</sub>	90	75%
S <sub>5</sub>	120	100%

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

色谱柱: Agilent Zorbax SB-Aq C<sub>18</sub> (5 μm, 4.6 mm × 250 mm); 流动相: 乙腈(A)-水(B), 梯度洗脱, 见表2; 流速: 1 mL · min<sup>-1</sup>; 检测波长: 270 nm; 进样量: 15 μL; 柱温: 30 ℃。

表2 流动相梯度洗脱条件表

时间/min	乙腈/%	水/%
0	0	100
20	2	98
25	20	80
50	30	70
65	45	55
85	45	55

### 2.2 对照品溶液的制备

精密称取肌苷、鸟苷和腺苷对照品适量, 加50%甲醇定容至100 mL量瓶中, 配成0.02 mg/mL的混合对照品溶液。混合对照品色谱图见图1。

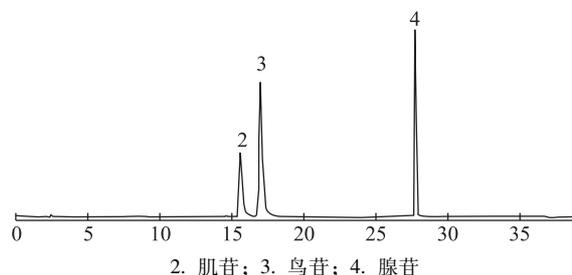


图1 核苷类混合对照品 HPLC 色谱图

### 2.3 供试品溶液的制备

取不同发酵时间节点的半夏曲样品粉末(过40目筛)约2.5 g, 精密称定, 置100 mL锥形瓶中, 加甲醇25 mL, 称定重量, 超声处理45 min, 放冷后, 补足重量, 滤过, 挥干, 残渣用甲醇溶解, 并定容至5 mL容量瓶中, 经微孔滤膜(0.45 μm)滤过, 即得。

### 2.4 方法学考察

2.4.1 空白实验 精密吸取甲醇溶液15 μL作为空白溶液, 注入高效液相色谱仪, 按2.1项下色谱条件进行测定。结果表明, 空白溶液对测定结果无干扰。

2.4.2 分析时间的确定 精密吸取供试品溶液15 μL, 注入高效液相色谱仪, 按2.1项下色谱条件进行分析, 85 min后继续保持体积分数45%乙腈洗脱60 min, 色谱图显示, 保留时间85 min后无色谱峰, 因此确定每次进样分析时间为85 min。样品色谱分析结果见图2。

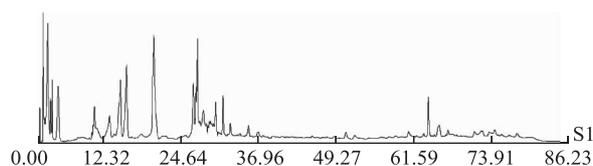


图2 半夏曲发酵样品 HPLC 色谱(S<sub>1</sub>)

**2.4.3 精密度考察** 精密吸取同一供试品溶液 15  $\mu\text{L}$ , 连续进样 6 次, 检测指纹图谱, 结果表明各色谱峰的相对保留时间的 RSD 在 0.11% ~ 1.43%, 各色谱峰的相对峰面积 RSD 在 0.68% ~ 1.97%, 说明仪器精密度良好。

**2.4.4 稳定性考察** 精密吸取同一供试品溶液 15  $\mu\text{L}$ , 分别在 0 h、2 h、4 h、8 h、16 h、24 h 不同时间点进样, 检测指纹图谱, 结果表明各色谱峰的相对保留时间的 RSD 在 0.93% ~ 1.78%, 各色谱峰的相对峰面积 RSD 在 0.75% ~ 2.24%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定性较好。

**2.4.5 重复性实验** 取同一样品, 照 2.2 实验方法, 平行制备 6 份供试品溶液, 同时按照 2.1 色谱条件进行分析, 检测指纹图谱, 结果表明各色谱峰的相对保留时间的 RSD 在 0.53% ~ 1.65%, 各色谱峰的相对峰面积 RSD 在 1.05% ~ 2.38%, 表明该实验方法重复性较好。

## 2.5 HPLC 特征指纹图谱的分析

采用卫生部药典委员会推荐的“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004(A 版)”对半夏曲发酵过程的样品的色谱图进行特征指纹图谱分析, 结果见表 3 和图 3。

表 3 半夏曲发酵过程中各色谱峰情况

峰号	样品编号				
	S1	S2	S3	S4	S5
1	√	√	√	√	√
2	√	√	√	√	√
3	√	√	√	√	√
4	√	√	√	√	√
5	√	√	√	√	√
6	√	√	√	√	√
7	√	√	√	√	√
8	√	√	√	√	√
9	√	√	√	√	√
10	√	√	√	√	√
11	—	—	—	—	√
12	—	—	—	—	√
13	—	—	—	—	√
14	—	—	—	—	√
15	√	√	√	√	√
16	—	—	—	—	√
17	—	—	—	—	√
18	—	—	—	—	√
19	√	√	√	√	√

注：“√”表示检出；“—”表示未检出

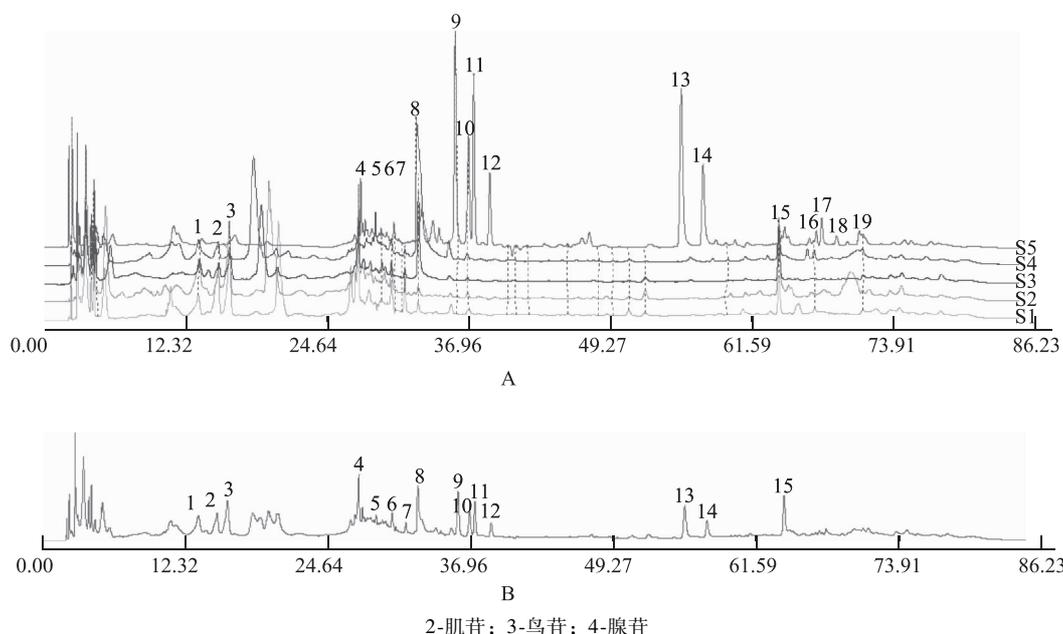


图 3 半夏曲发酵过程 HPLC 特征指纹图谱 (A) 及对照图谱 (B)

由表 3 和图 3 可知, 半夏曲发酵过程样品均含有肌苷(峰 2)、鸟苷(峰 3)、腺苷(峰 4) 3 种核苷类成分的共有峰, 从色谱峰的分离度和峰形来看, 选

择鸟苷色谱峰(相对保留时间约为 16.967 min)作为参照峰。以 S<sub>5</sub> 样品(即发酵终点 100%)为参照, 进行特征指纹图谱分析。实验结果表明: 1, 2, 3, 4,

5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 19 号色谱峰所代表的化合物在半夏曲发酵过程中均存在; 11, 12, 13, 14, 16, 17, 18 号色谱峰均是在  $S_4 \sim S_5$  (75% ~ 100%) 之间产生, 且 11, 12, 13, 14 号色谱峰的相对峰面积非常明显, 反映其成分含量较高。

### 3 讨论

#### 3.1 提取溶剂、色谱条件的考察

本研究对提取溶剂、色谱柱、流动相和检测波长进行了考察, 实验结果发现, 在相同色谱条件下, 不同提取溶剂: 水、甲醇、乙醇, 以甲醇提取的样品色谱峰数目较多, 且分离度较好; Agilent Zorbax SB-Aq  $C_{18}$  柱分离色谱峰能力优于 Global  $C_{18}$  柱; 分别考察甲醇-水、乙腈-水、乙腈-0.05% 磷酸水 3 种流动相体系, 结果表明乙腈-水洗脱系统所得的色谱峰较多且分离效果好; 查阅有关半夏的文献资料<sup>[3,4]</sup>, 发现半夏炮制品中主要含强极性化合物, 结合实验分析, 最终确定有机相流动相(乙腈)的变化范围为 0% ~ 45%; 通过 DAD 检测器对样品在 200 ~ 400 nm 进行紫外波段扫描, 从 3D 图谱中发现在 270 nm 色谱峰数目多, 且其强度及分离效果较好。在本研究所建立的色谱条件下, 半夏曲发酵过程不同时间节点样品的化学成分分离效果良好, 图谱清晰, 方法重复性良好、精密度较高, 可用于反映半夏曲发酵过程的化学成分变化。

#### 3.2 半夏曲发酵过程 HPLC 特征指纹图谱分析

本研究通过对半夏曲发酵过程特征指纹图谱分析, 在半夏曲发酵过程中 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 19 号色谱峰所代表的化合物为半夏曲原料本身中所含有的化学成分, 其中峰 2, 峰 3 和峰

4 所代表的核苷类化合物既是微生物生长与繁殖所必需的原料, 也是其代谢产物, 对于这 3 种核苷类化合物在自然发酵过程中的变化规律还有待进一步研究; 而 11, 12, 13, 14, 16, 17, 18 号色谱峰均是在  $S_4 \sim S_5$  (75% ~ 100%) 之间产生, 且 11, 12, 13, 14 号色谱峰的峰面积非常明显, 反映其成分含量较高, 这可能是在接近发酵终点(“黄衣”上遍)微生物代谢产物急剧增加, 后期可通过 LC-MS 或其他分析手段对 11, 12, 13, 14 号色谱峰(新产生的化合物)进行分离与结构鉴定; 可将其作为从化学成分方面对半夏曲发酵与否进行鉴别。

本实验对半夏曲发酵过程的指纹图谱研究的目的是为了揭示半夏曲在发酵过程中物质基础的变化, 通过对发酵过程样品的特征指纹图谱分析, 在一定程度上揭示了发酵对半夏曲物质基础变化规律, 对进一步研究半夏曲的物质基础具有一定的参考意义。

#### 参考文献

- [1] 卫生部药典委员会. 中华人民共和国卫生部药品标准中药成方制剂(第十册)[S]. 北京: 卫生部出版, 1995: 49.
- [2] 何晓燕, 刘玉杰, 黄永亮, 等. 槟榔炒制过程中不同炮制品的指纹图谱分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(17): 44-46.
- [3] 杨冰月, 李敏, 施佳, 等. 半夏及其炮制品姜半夏 HPLC 特征指纹图谱系统性研究[J]. 中草药, 2014, 45(5): 652-658.
- [4] 杨冰月, 李敏, 卢道会, 等. 半夏不同炮制品 HPLC 特征指纹图谱的研究[J]. 中国药学杂志, 2014, 49(11): 955-962.
- [5] 王世宇, 任振丽, 傅超美, 等. 半夏曲发酵处方的筛选[J]. 华西药学杂志, 2009, 24(4): 367-369.

(收稿日期 2016-03-01)

(上接第 813 页)

- [21] 陈娟, 焦晓林, 杨春勇, 等. 分离培养方法结合 PCR-SSCP 技术分析六神曲中的真菌类群[J]. 中国中药杂志 2014, (21): .
- [22] 王秋红, 苏阳, 王荔慧, 等. 六神曲中真菌的分离与鉴定[J]. 中国实验方剂学杂志 2014, 20(7): 122-127.
- [23] 刘燕. 六神曲发酵过程分析及消食机理初探[D]. 华南农业大学 2011 硕士学位论文. .
- [24] 金其荣. 低聚糖及根霉低聚糖的生理功能[J]. 食品科学 1994, 169(1): 5-7.
- [25] 吴昊, 杨思行, 张艳杰. 功能性低聚糖的开发现状及在食品中的应用[J]. 中国乳品工业 2001, 29(3): 41-45.
- [26] 肖家军, 王云, 戴仕奎, 等. 苍耳叶挥发油的提取及抑菌和抗氧化性研究[J]. 食品工业科技 2011, 32(7): 115-118.

(收稿日期 2016-03-30)