

HPLC 法同时测定桂枝茯苓胶囊中 4 种茯苓三萜酸成分

杨鹏飞¹, 李保明¹, 王振中², 萧伟², 陈若芸^{1*}

1. 中国医学科学院 北京协和医学院 药物研究所, 天然药物活性物质与功能国家重点实验室, 北京 100050

2. 江苏康缘药业股份有限公司, 江苏 连云港 222001

摘要: **目的** 建立 HPLC 法同时测定桂枝茯苓胶囊 (GFC) 中 4 种茯苓三萜酸成分 (去氢土莫酸、猪苓酸 C、3-表去氢茯苓酸、去氢茯苓酸) 的方法。**方法** 色谱柱为 Diamonsil C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-0.2%甲酸水溶液; 梯度洗脱: 0~70 min, 50%~85%乙腈; 70~80 min, 85%~100%乙腈; 80~90 min, 100%乙腈; 检测波长 242 nm, 体积流量 1.0 mL/min, 柱温 40 ℃。**结果** 去氢土莫酸、猪苓酸 C、3-表去氢茯苓酸、去氢茯苓酸在 HPLC 中达到基线分离, 线性范围分别为 0.408~2.04 ($r=0.999\ 9$)、0.192~0.96 ($r=0.999\ 5$)、0.078~0.39 ($r=0.999\ 5$)、0.075 6~0.378 ($r=0.999\ 5$) μg/mL; 平均加样回收率分别为 97.5%、98.5%、97.2%、102.3%, RSD 分别为 1.4%、1.6%、1.2%、1.8%; 测定了 6 批 GFC, 结果显示去氢土莫酸平均量为 0.070 mg/粒, 猪苓酸 C 平均量为 0.015 mg/粒, 3-表去氢茯苓酸平均量为 0.030 mg/粒, 去氢茯苓酸平均量为 0.061 mg/粒。**结论** 该方法可行、重现性好, 可用于 GFC 的质量控制。

关键词: HPLC; 桂枝茯苓胶囊; 茯苓三萜酸; 去氢土莫酸; 猪苓酸 C; 3-表去氢茯苓酸; 去氢茯苓酸

中图分类号: R286.02 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2016)18-3215-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.18.013

Determination of four triterpenoid acids from Guizhi Fuling Capsules by HPLC

YANG Peng-fei¹, LI Bao-ming¹, WANG Zhen-zhong², XIAO Wei², CHEN Ruo-yun¹

1. State Key Laboratory for Bioactive Substances and Functions of Natural Medicines, Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China

2. Jiangsu Kanion Pharmaceutical Co., Ltd., Lianyungang 222001, China

Abstract: **Objective** To establish an HPLC method for the determination of four triterpene constituents (dehydrotumulosic acid, polyporenic acid C, 3-*epi*-dehydropachymic acid, anddehydropachymic acid) in Guizhi Fuling Capsules (GFC). **Methods** Chromatography conditions were Diamonsil C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), system mobile phase was composed of acetonitrile (A)-0.2% HCOOH aqueous solution (C) in a linear gradient elution mode (0—70 min: 50%—85% A; 70—80 min: 85%—100% A; 80—90 min: 100% A), detective wavelength was set at 242 nm, and column temperature was 40 ℃. **Results** The calibration curve was linear within 0.408—2.04 μg/mL ($r=0.999\ 9$), 0.192—0.96 μg/mL ($r=0.999\ 5$), 0.078—0.39 μg/mL ($r=0.999\ 5$), and 0.075 6—0.378 μg/mL ($r=0.999\ 5$) for dehydrotumulosic acid, polyporenic acid C, 3-*epi*-dehydropachymic acid, anddehydropachymic acid, respectively. The average recoveries were 97.5% (RSD = 1.4%, $n=5$), 98.5% (RSD = 1.6%, $n=5$), 97.2% (RSD = 1.2%, $n=5$), and 102.3% (RSD = 1.8%, $n=5$). Six batches of GFC sample were determined, The average contents of dehydrotumulosic acid, polyporenic acid C, 3-*epi*-dehydropachymic acid, anddehydropachymic acid were 0.070, 0.015, 0.030, and 0.061 mg/capsule, separately. **Conclusion** The method is simple, accurate, and can be used as a quality control method for GFC.

Key words: HPLC; Guizhi Fuling Capsules; triterpenoid acids; dehydrotumulosic acid; polyporenic acid C; 3-*epi*-dehydropachymic acid;dehydropachymic acid

桂枝茯苓胶囊 (GFC) 处方来源于汉代张仲景《金匱要略》, 由桂枝、茯苓、牡丹皮、桃仁和赤芍 5 味药组成, 气微香, 味微苦, 有抑制血小板聚集、降低血黏度、缓解子宫痉挛、镇痛等作用, 能活血

收稿日期: 2016-02-25

基金项目: 国家“十二五”科技重大专项 (2012ZX09103201-043, 2012ZX09301002-002)

作者简介: 杨鹏飞, 博士研究生, 研究方向为天然药物化学。E-mail: ypf_87@imm.ac.cn

*通信作者 陈若芸 Tel/Fax: (010)83161622 E-mail: rych@imm.ac.cn

化痰、缓消症块，主要用于治疗妇人瘀血阻络所致的症块、经闭、痛经、产后恶露不尽等。目前为止对该制剂质量控制方面报道很少^[1-3]，杨青等^[3]利用 SPE-HPLC 法同时测定了 GFC 中桂皮醛和丹皮酚的量，《中国药典》2015 年版一部^[4]中收载的 GFC，定量测定项下仅对丹皮酚、芍药苷、苦杏仁苷进行了测定，未见对茯苓中三萜酸类化学成分进行定量测定，而三萜酸类化学成分也为 GFC 中重要的有效成分^[5-6]。为进一步完善 GFC 的质量控制方法，本实验首次建立了同时测定 GFC 中 4 种茯苓三萜酸成分（去氢土莫酸、猪苓酸 C、3-表去氢茯苓酸、去氢茯苓酸）的方法。该方法快速、灵敏，分离度好，为完善 GFC 的质量控制标准提供了参考。

1 材料

Agilent 1200 系统高效液相色谱仪，美国安捷伦科技有限公司；Mettler Toledo ABS135-S 电子天平，瑞士梅特勒-托利多国际股份有限公司；超声波清洗器，北京天鹏电子新技术有限公司。

4 种茯苓三萜酸（去氢土莫酸、猪苓酸 C、3-表去氢茯苓酸、去氢茯苓酸）对照品均由本实验室制备，经 IR、UV、NMR、MS 等光谱鉴定化合物结构，HPLC 分析质量分数为 98% 以上；GFC 由江苏康缘药业股份有限公司提供，规格：0.31 g×50 粒/盒，批号 151102、151201、160202、160301、160302、160401；乙腈，美国 Fisher 公司；水为娃哈哈纯净水，其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 Diamonsic C₁₈ 柱（250 mm×4.6 mm，5 μm）；流动相为乙腈-0.2% 甲酸水溶液；梯度洗脱条件：0~70 min，50%~85% 乙腈；70~80 min，85%~100% 乙腈；80~90 min，100% 乙腈；柱温 40 ℃；体积流量 1.0 mL/min；进样量 20 μL；检测波长 242 nm。

2.2 对照品溶液的制备

分别精密称取去氢土莫酸 5.1 mg、去氢茯苓酸 3.9 mg、3-表去氢茯苓酸 4.8 mg、猪苓酸 C 3.78 mg，分别置于 5 mL 量瓶中，用甲醇溶解，并定容至刻度，配成对照品储备液。

2.3 供试品溶液的制备

取 GFC 10 粒，将内容物置研钵中研磨均匀。取细粉约 1 g，精密称定，置具塞锥形瓶中，加入氯仿溶液 50 mL，超声 1 h，滤过后浓缩至干，用甲醇

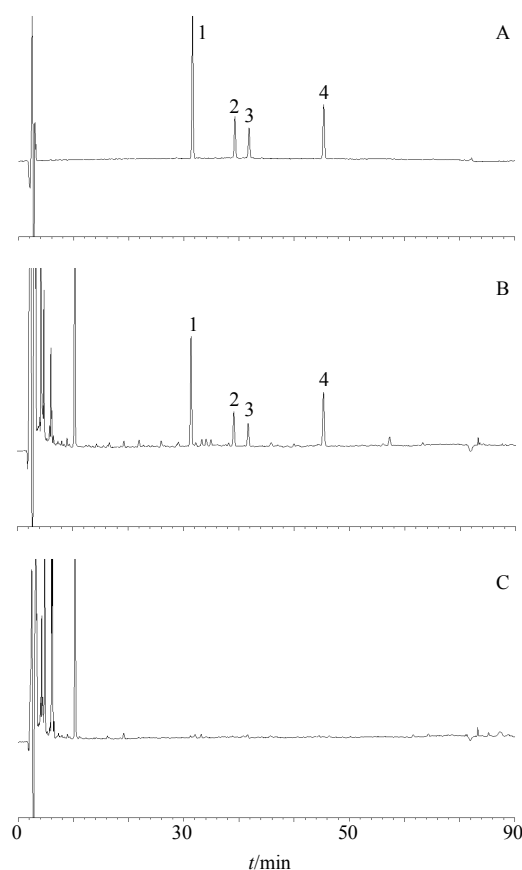
溶解定容至 5 mL，摇匀，静止，滤过，取滤过液作为供试品溶液。

2.4 阴性样品的制备

按厂方提供的处方中药味比例及工艺，再按“2.3”项方法制成不含茯苓的阴性对照溶液。

2.5 专属性试验

吸取对照品溶液、供试品溶液和阴性对照溶液各 5 μL，按“2.1”项色谱条件分别进样，结果供试品溶液中在去氢土莫酸、猪苓酸 C、3-表去氢茯苓酸、去氢茯苓酸对照品色谱相同的保留时间处均有相应的色谱峰，各峰与相邻峰之间的分离度均大于 2.0，理论塔板数均大于 6 000，阴性对照溶液显示在各对照品主峰保留位置均无相应的干扰峰。说明供试品中其他成分对检测结果均无影响。色谱图见图 1。



1-去氢土莫酸 2-猪苓酸 C 3-3-表去氢茯苓酸 4-去氢茯苓酸
1-dehydrotumulosic acid 2-polyporenic acid C
3-3-epi-dehydropachymic acid 4-dehydropachymic acid

图 1 混合对照品溶液 (A)、供试品溶液 (B) 和阴性对照品溶液 (C) 的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC of mixed reference solution (A), sample solution (B), and negative solution (C)

2.6 线性关系考察

精密吸取对照品去氢土莫酸储备液 200 μL , 对照品去氢茯苓酸储备液 100 μL , 对照品 3-表去氢茯苓酸储备液 50 μL , 对照品猪苓酸 C 储备液 50 μL , 用甲醇定容至 1 000 μL , 按“2.1”项下方法分别进样 2、4、6、8、10 μL 。以对照品溶液进样量为横坐标 (X), 峰面积为纵坐标 (Y) 绘制样品的标准曲线。得去氢土莫酸回归方程: $Y=1\ 233\ X-1\times 10^{-12}$, $r=0.999\ 9$; 去氢茯苓酸回归方程: $Y=1\ 206\ X-6.775$, $r=0.999\ 5$; 3-表去氢茯苓酸回归方程: $Y=1\ 659\ X+2.305$, $r=0.999\ 5$; 猪苓酸 C 回归方程: $Y=2\ 051\ X+7.08$, $r=0.999\ 5$; 分别在 0.408~2.040、0.192~0.960、0.078~0.390、0.075 6~0.378 0 μg 与峰面积呈良好的线性关系。

2.7 精密度试验

精密吸取对照品去氢土莫酸储备液 200 μL , 对照品去氢茯苓酸储备液 100 μL , 对照品 3-表去氢茯苓酸储备液 50 μL , 对照品猪苓酸 C 储备液 50 μL , 用甲醇定容至 1 000 μL , 按“2.1”项下方法连续进样 6 次, 每次 6 μL 。以色谱峰面积计算, 其精密度分别为去氢土莫酸 RSD 0.3%, 猪苓酸 C RSD 0.6%, 3-表去氢茯苓酸 RSD 0.7%, 去氢茯苓酸 RSD 1.1%, 说明仪器精密度良好。

2.8 稳定性试验

取样品溶液, 按上述色谱条件分别在 0、4、12、

24、48 h 进行测定, 进样量为 20 μL , 计算去氢土莫酸、猪苓酸 C、3-表去氢茯苓酸和去氢茯苓酸峰面积的 RSD 分别为 1.2%、1.5%、0.9%、1.5%。说明供试品溶液在 48 h 内稳定。

2.9 重复性试验

取同一批号的 GFC 6 份, 每份粉末 1 g, 精密称定, 按“2.3”项下方法平行制取供试品溶液并测定去氢土莫酸、猪苓酸 C、3-表去氢茯苓酸和去氢茯苓酸峰面积的 RSD 分别为 0.6%、0.9%、1.4%、1.0%, 说明重复性良好。

2.10 加样回收率试验

精密称取 5 份已测定的 GFC 粉末 0.5 g, 精密加入适量去氢土莫酸、猪苓酸 C、3-表去氢茯苓酸和去氢茯苓酸对照品溶液, 按“2.3”项方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下色谱方法操作。结果去氢土莫酸、猪苓酸 C、3-表去氢茯苓酸和去氢茯苓酸的平均回收率分别为 97.5%、98.5%、97.2%、102.3%, RSD 依次为 1.4%、1.6%、1.2%、1.8%。

2.11 样品测定

取不同批号的 GFC 内容物 1 g, 精密称定, 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下方法进行测定 (每批号 2 份, 每份 3 次), 计算每粒 GFC 中 4 种茯苓三萜酸成分的量, 结果见表 1。

3 讨论

分别用氯仿、醋酸乙酯和甲醇超声提取 GFC,

表 1 样品中指标成分的定量测定

Table 1 Quantitative determination of constituents in samples

批号	去氢土莫酸/(mg·粒 ⁻¹)	猪苓酸 C/(mg·粒 ⁻¹)	3-表去氢茯苓酸/(mg·粒 ⁻¹)	去氢茯苓酸/(mg·粒 ⁻¹)
151102	0.068	0.014	0.028	0.061
151201	0.071	0.013	0.032	0.061
160202	0.072	0.015	0.029	0.062
160301	0.071	0.016	0.031	0.065
160302	0.069	0.015	0.032	0.059
160401	0.070	0.016	0.031	0.062
平均值	0.070	0.015	0.030	0.061

结果显示, 醋酸乙酯和甲醇的提取液中含有较多的杂质, 影响此 4 种化合物的测定, 而氯仿对 4 种化合物的提取率较高且提取的杂质较少。

根据指标性成分的理化性质, 分别用超声法、冷浸法、加热回流法进行提取, 结果表明超声法较好, 并对超声时间 (0.5、1.0、1.5 h) 进行了考察, 结果表明 1.0 h 即可基本提取完全。

根据指标性成分的理化性质, 比较了甲醇-水、乙腈-水、甲醇-甲酸水、乙腈-甲酸水的不同比例和梯度洗脱程序, 结果显示, 甲醇-水、甲醇-甲酸水系统各成分的分离效果不理想, 乙腈-水系统色谱峰的对称性不理想, 经优化后的乙腈-甲酸水系统, 样品的分离度和理论塔板数均符合要求, 峰形对称。

有关 HPLC 法分别测定去氢土莫酸、猪苓酸 C、

3-表去氢茯苓酸和去氢茯苓酸的方法虽然有文献报道^[7-12],但尚未见在复方 GFC 中同时测定这 4 种成分的方法。本实验采用梯度洗脱的方法,使得 GFC 中去氢土莫酸、猪苓酸 C、3-表去氢茯苓酸和去氢茯苓酸在同一张色谱图上得到有效分离,为完善 GFC 的质量控制提供了参考。

参考文献

- [1] 马婷婷,陈晓辉,毕开顺,等. RP-HPLC 法同时测定桂枝茯苓胶囊中 3 种化学成分的含量 [J]. 沈阳药科大学学报, 2010, 27(3): 216-219.
- [2] 李家春,孙 兰,李红娟,等. 桂枝茯苓胶囊 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 中草药, 2012, 43(7): 1333-1335.
- [3] 杨 青,郭炎荣. SPE-HPLC 法同时测定桂枝茯苓胶囊中桂皮醛和丹皮酚的含量 [J]. 中国药师, 2010, 13(9): 1312-1314.
- [4] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [5] 张新庄,萧 伟,徐筱杰,等. 基于网络药理学的桂枝茯苓胶囊治疗痛经、子宫肌瘤和盆腔炎的分子作用机制研究 [J]. 中草药, 2016, 47(1): 81-94.
- [6] 杨鹏飞,王振中,王洪庆,等. 桂枝茯苓胶囊化学成分研究 (III) [J]. 中草药, 2012, 43(3): 463-466.
- [7] 沈玉萍,杨 欢,陈 斌,等. 反相高效液相色谱法测定中药茯苓中 4 种三萜酸的含量 [J]. 中国药学杂志, 2011, 46(5): 388-390.
- [8] 张靓琦,贾 英,罗 洁,等. 超高效液相色谱法同时测定茯苓中去氢土莫酸等 6 种活性成分的含量 [J]. 中国药学杂志, 2012, 47(13): 1080-1083.
- [9] 徐 榕,姚 晨,许 津. HPLC 法测定茯苓中去氢土莫酸的含量 [J]. 药物分析杂志, 2007, 27(7): 1002-1003.
- [10] 夏 烨,杨春华,刘静涵,等. RP-HPLC 法测定中药茯苓皮中茯苓酸 A 和 3-表去氢土莫的含量 [J]. 药学进展, 2009, 33(6): 271-273.
- [11] 邓 芬,方 红,王克勤,等. 茯苓中去氢土莫酸含量测定 [J]. 中国药师, 2008, 11(7): 821-823.
- [12] 钟凌云,段 启,龚千锋. 反相高效液相色谱法测定茯苓中茯苓酸的含量 [J]. 中国中医药信息杂志, 2005, 12(12): 47-48.