

HPLC 法测定茯苓皮中松苓新酸

闫雪生¹, 赵许杰², 韩媛媛²

1. 山东省中医药研究院, 山东 济南 250014

2. 山东中医药大学, 山东 济南 250355

摘要: 目的 建立茯苓皮中松苓新酸的 HPLC 测定方法。方法 采用高效液相色谱法, Lichrospher C₁₈ 色谱柱(200 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-0.5%磷酸水溶液(80:20), 检测波长为 242 nm, 体积流量为 1.0 mL/min, 柱温为 30 ℃, 进样量为 10 μL。结果 松苓新酸在 0.142 5~2.280 0 μg 与峰面积呈良好的线性关系($r=0.999\ 3$), 平均回收率为 101.83%, RSD 值为 1.45% ($n=6$)。结论 该方法操作简便, 稳定可行, 重复性好, 可用于茯苓皮中松苓新酸的测定。

关键词: 茯苓皮; 三萜类; 松苓新酸; 高效液相色谱

中图分类号: R286.02

文献标志码: A

文章编号: 1674-5515(2014)02-0166-03

DOI:10.7501/j.issn.1674-5515.2014.02.014

Determination of dehydrotrametenolic acid in peels of *Poria cocos* by HPLC

YAN Xue-sheng¹, ZHAO Xu-jie², Han Yuan-yuan²

1. Shandong Academy of Chinese Medicine, Jinan 250014, China

2. Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China

Abstract: Objective To establish an HPLC method for the determination of dehydrotrametenolic acid in the peels of *Poria cocos*. **Methods** HPLC was carried out on a Lichrospher C₁₈ column (200 mm×4.6 mm, 5 μm) with acetonitrile-0.5% phosphoric acid (80:20) as mobile phase. The detection wavelength was set at 242 nm. The injection volume was 10 μL at the flow rate of 1.0 mL/min. The column temperature was at 30 ℃. **Results** The calibration curve was linear over the range of 0.142 5—2.280 0 μg ($r=0.999\ 3$) for dehydrotrametenolic acid. The average recovery rate was 101.83% with RSD value at 1.45% ($n=6$). **Conclusion** The established method is rapid, sensitive, and accurate, and could be used for the determination of dehydrotrametenolic acid in the peels of *P. cocos*.

Key words: peels of *Poria cocos*; triterpenes; dehydrotrametenolic acid; HPLC

茯苓皮为多孔菌科真菌茯苓 *Poria cocos* (Schw.) Wolf.菌核的干燥外皮。味甘、淡, 性平, 归肺、脾、肾经, 具有利水消肿的作用^[1]。茯苓皮中主要有效成分为三萜类, 研究发现茯苓皮中的三萜类具有抗氧化^[2]、抑菌^[3]等作用。但是, 目前有关茯苓中三萜类成分分析及质量评价的文献报道比较少, 为了更好地控制茯苓皮的质量, 本实验采用 HPLC 法对茯苓皮中松苓新酸进行测定。

1 仪器与试剂

BP211D 赛多利斯电子天平(德国赛多利斯股份有限公司); Waters 高效液相色谱仪包括 Waters 600 泵, 996 二极管阵列检测器, Empower 色谱工作站(美

国 Waters 公司); HH—4 数显电子恒温水浴锅(江苏金坛市晶玻实验仪器厂)。

松苓新酸对照品(山东省中药新型制剂工程中心制备, 质量分数 98.0%); 茯苓皮药材分别来自安徽、云南、山东(批号分别为 130415、130313、130322), 经山东省中医药研究院林慧彬研究员鉴定为茯苓 *Poria cocos* (Schw.) Wolf.的干燥外皮; 乙腈、甲醇(色谱纯, 美国 DNK 公司); 磷酸(色谱纯, 天津市科密欧化学试剂有限公司); 蒸馏水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Lichrospher C₁₈ 色谱柱(200 mm×4.6 mm, 5

收稿日期: 2013-09-13

作者简介: 闫雪生(1964—), 男, 研究员, 研究方向为中药质量控制及新制剂研究。Tel: (0531)82948006 E-mail: tcmyxs@126.com

μm), 流动相为乙腈 - 0.5% 磷酸水溶液 (80 : 20), 检测波长为 242 nm, 体积流量为 1.0 mL/min, 柱温为 30 °C, 进样量为 10 μL。

2.2 对照品溶液的制备

精密称取松苓新酸对照品 2.28 mg, 置于 10 mL 量瓶中, 甲醇溶解并稀释至刻度, 得 228 μg/mL 的松苓新酸对照品溶液, 备用。

2.3 供试品溶液的制备

取茯苓皮粗粉约 1.0 g, 精密加入甲醇 50 mL, 称定质量, 加热回流 1 h, 放冷, 再称定质量, 用甲醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过。精密量取续滤液 2 mL, 蒸去溶剂, 转移至 10 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 0.45 μm 的微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

2.4 专属性试验

将松苓新酸对照品溶液和茯苓皮供试品溶液按照上述色谱条件分别进样, 结果见图 1。供试品色谱图中, 在松苓新酸对照品色谱峰相应的位置上可见对应的色谱峰。

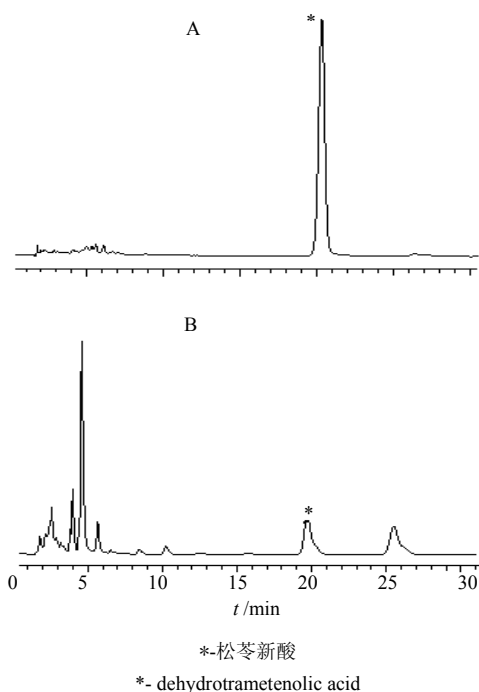


图 1 松苓新酸对照品 (A) 和茯苓皮 (B) 的 HPLC 色谱图
Fig. 1 HPLC of dehydrotrametenolic acid reference substance (A) and peels of *P. cocos* (B)

2.5 方法学考察

2.5.1 线性关系考察 分别精密吸取 228 μg/mL 松苓新酸对照品溶液适量置量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 制成 14.25、28.50、57.00、114.00、228.00 μg/mL

松苓新酸对照品溶液。上述色谱条件下分别进样 10 μL, 测定峰面积值。以进样质量为横坐标, 松苓新酸峰面积积分值为纵坐标, 绘制标准曲线, 得回归方程 $Y=232\ 126\ 8\ X-144\ 703$ ($r=0.999\ 3$), 结果表明松苓新酸在 0.142 5~2.280 0 μg 与峰面积呈良好的线性关系。

2.5.2 精密度试验 取批号 130415 样品制备的供试品溶液, 在上述色谱条件下, 连续进样 6 次, 测定松苓新酸峰面积, 计算得其 RSD 值为 0.53%。

2.5.3 稳定性试验 取批号 130415 样品制备的供试品溶液, 分别于 0、2、4、8、12、24 h 进样, 测定松苓新酸峰面积, 计算得其 RSD 值为 1.72% ($n=6$), 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.5.4 重复性试验 取批号 130415 的茯苓皮粗粉约 1 g, 精密称定, 平行 6 份, 制备供试品溶液。按照上述色谱条件, 进样 10 μL, 测定峰面积, 计算各样品中松苓新酸的质量分数, 结果其 RSD 值为 1.22% ($n=6$)。

2.5.5 回收率试验 取批号 130415 的茯苓皮粗粉约 0.5 g, 精密称定, 平行 6 份, 加入 228 μg/mL 对照品溶液 27 mL, 精密加入甲醇补足 50 mL, 称定质量, 加热回流 1 h, 放冷, 再称定质量, 用甲醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过。精密量取续滤液 2 mL, 蒸发溶剂, 转移至 2 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 用 0.45 μm 的微孔滤膜滤过, 取续滤液, 测定, 并计算得松苓新酸的平均回收率为 101.83%, RSD 值为 1.45% ($n=6$)。

2.6 样品测定

取不同产地的茯苓皮样品, 制备供试品溶液, 进样测定, 外标法计算茯苓皮中松苓新酸的质量分数, 结果见表 1。

表 1 不同产地茯苓皮中松苓新酸的测定结果 ($n=2$)
Table 1 Determination of dehydrotrametenolic acid in peels of *P. cocos* from different habitats ($n=2$)

批 号	松苓新酸/%
130415	1.23
130313	1.27
130322	0.65

测定结果表明, 不同产地茯苓皮中松苓新酸的质量分数以云南茯苓皮中最高, 安徽次之, 山东的较低。说明不同地区的茯苓皮药材中松苓新酸的差异很大。

3 讨论

3.1 提取条件的选择

本实验考察了 95%乙醇及甲醇的提取效果,结果表明甲醇的提取效果明显优于乙醇;进一步实验,以甲醇为溶剂分别加热回流提取 0.5、1、1.5、2 h,结果发现提取时间对测定结果影响的差异无显著性。为了节省时间,保证提取完全,故选择提取时间为 1 h。

3.2 色谱条件的选择

本实验通过结合其他茯苓三萜类成分测定的相关文献报道^[4-7],经选择优化,确定乙腈-0.5%磷酸水溶液为流动相,其比例为 80:20。

本研究建立了茯苓皮药材中三萜类成分松苓新酸的测定方法,线性关系及重复性良好,方法稳定,可作为茯苓皮中松苓新酸测定的方法。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2010: 224-225.
- [2] 程水明, 桂元, 沈思, 等. 茯苓皮三萜类物质抗氧化活性的研究 [J]. 食品科学, 2011, 32(9): 27-30.
- [3] 沈思, 李孚杰, 梅光明, 等. 茯苓皮三萜类物质含量的测定及其抑菌活性的研究 [J]. 食品科学, 2009, 30(1): 95-98.
- [4] 段启, 李霞兰, 王少军, 等. HPLC 法测定茯苓皮中茯苓酸 [J]. 中草药, 2006, 37(2): 284-285.
- [5] 王少军, 段启, 曹君, 等. 茯苓皮中三萜酸类成分 HPLC 指纹图谱的方法学研究 [J]. 中药新药与临床药理, 2005, 16(1): 53-55.
- [6] 夏焯, 杨春华, 刘静涵, 等. RP-HPLC 法测定中药茯苓皮中茯苓酸 A 和 3-表去氢土莫酸的含量 [J]. 药学进展, 2009, 33(6): 271-273.
- [7] 段启, 姚丽梅, 庄义修. 茯苓与茯苓皮中茯苓酸含量比较研究 [J]. 中药新药与临床药理, 2010, 21(6): 654-655.