

HPLC 法测定参苓健体粉中去氢土莫酸、去氢茯苓酸、茯苓酸、白术内酯Ⅲ和白术内酯 I

桂元¹, 薛承斌², 詹继东¹, 刘承简¹, 黄沁¹, 王砾^{1*}

1. 华中科技大学校医院 内科, 湖北 武汉 430074
2. 华中科技大学校医院 药剂科, 湖北 武汉 430074

摘要: 目的 建立梯度洗脱联合波长切换高效液相色谱 (HPLC) 法对参苓健体粉中去氢土莫酸、去氢茯苓酸、茯苓酸、白术内酯Ⅲ和白术内酯 I 同时进行测定。方法 采用 Venusil MP C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈 - 0.05% 磷酸溶液, 梯度洗脱; 检测波长: 210 nm (0~19 min, 检测去氢土莫酸、去氢茯苓酸和茯苓酸)、220 nm (19~35 min, 检测白术内酯Ⅲ和白术内酯 I); 体积流量: 0.8 mL/min; 柱温: 30 °C; 进样量为 10 μL。结果 去氢土莫酸、去氢茯苓酸、茯苓酸、白术内酯Ⅲ、白术内酯 I 质量浓度分别在 4.62~92.40 μg/mL ($r=0.9997$)、3.80~76.00 μg/mL ($r=0.9999$)、5.76~115.20 μg/mL ($r=0.9999$)、3.95~79.00 μg/mL ($r=0.9998$)、5.05~101.00 μg/mL ($r=0.9996$) 与峰面积关系良好; 回收率分别为 99.24%、97.75%、98.66%、98.49%、99.10%, RSD 值分别为 1.23%、1.79%、1.66%、0.80%、1.25%。结论 建立的方法操作简便、结果可靠, 可用于参苓健体粉的质量控制。

关键词: 参苓健体粉; 去氢土莫酸; 去氢茯苓酸; 茯苓酸; 白术内酯Ⅲ; 白术内酯 I; 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(2016)09 - 1331 - 04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2016.09.004

Determination of dehydrotumulosic acid, dehydropachymic acid, pachymic acid, atracylenolide III, and atracylenolide I in Shenling Jianti Powder by HPLC

GUI Yuan¹, XUE Cheng-bin², ZHAN Ji-dong¹, LIU Cheng-jian¹, HUANG Qin¹, WANG Li¹

1. Department of Internal Medicine, Hospital of Huazhong University of Science and Technology, Hubei Wuhan, 430074
2. Department of Pharmacy, Hospital of Huazhong University of Science and Technology, Hubei Wuhan, 430074

Abstract: Objective To develop an HPLC - wavelength switching method for simultaneous determination of dehydrotumulosic acid, dehydropachymic acid, pachymic acid, atracylenolide III, and atracylenolide I in Shenling Jianti Powder. **Method** The Venusil MP C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) was adopted; the mobile phase was acetonitrile - 0.05% phosphoric acid solution with gradient elution, with a flow rate of 0.8 mL/min. The column temperature was set at 30 °C, and injection volume was 10 μL. **Results** Dehydrotumulosic acid, dehydropachymic acid, pachymic acid, atracylenolide III and atracylenolide I had good linearity in the ranges of 4.62 — 92.40 μg/mL ($r=0.9997$), 3.80 — 76.00 μg/mL ($r=0.9999$), 5.76 — 115.20 μg/mL ($r=0.9999$), 3.95 — 79.00 μg/mL ($r=0.9998$), and 5.05 — 101.00 μg/mL ($r=0.9996$), respectively. The average recoveries were 99.24%, 97.75%, 98.66%, 98.49%, and 99.10% with RSD of 1.23%, 1.79%, 1.66%, 0.80%, and 1.25%, respectively. **Conclusion** The method is rapid and with high accuracy which can be applied to the quality control of Shenling Jianti Powder.

Key words: Shenling Jianti Powder; dehydrotumulosic acid; dehydropachymic acid; pachymic acid; atracylenolide III; atracylenolide I; HPLC

参苓健体粉是由茯苓、白术(漂)、莲子(去心)、明党参、薏苡仁(炒)、白扁豆(炒)、山药(炒)、广藿香、砂仁、甘草 10 味中药加工而成的散剂, 具

有补气健脾、和胃渗湿的功效, 主要用于消化不良、食欲不振、面黄肌瘦, 精神疲乏, 慢性腹泻等疾病的治疗。该制剂收载于《卫生部颁药品标准》中药

收稿日期: 2016-06-17

作者简介: 桂元(1980—), 女, 硕士, 主治医师, 主要从事心血管、肾病、急诊等药理学相关研究工作。

*通信作者 王砾(1964—), 男, 副主任医师, 主要从事慢病药理学相关研究工作。

成方制剂第8册,但是标准仅规定了制法、性状和理化鉴别,没有其他检测项目^[1]。方中茯苓利水渗湿、健脾、宁心,主要成分有去氢土莫酸、去氢茯苓酸和茯苓酸^[2];方中白术健脾益气、燥湿利水,主要成分有白术内酯III和白术内酯I^[2]。由于该制剂由10味中药组成,多指标控制能更好地反映其质量,因此本实验采用梯度洗脱联合波长切换 HPLC 法对参苓健体粉中指标性成分去氢土莫酸、去氢茯苓酸、茯苓酸、白术内酯III和白术内酯I同时进行了测定,为有效控制参苓健体粉的质量提供了依据。

1 仪器与试剂

Agilent 1100 系列四元梯度泵高效液相色谱仪(美国安捷伦公司);XS205DU 电子天平(梅特勒-托利多仪器有限公司);KQ3200DB 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

去氢土莫酸(批号 6754-16-1,质量分数 98.0%, 2~8 °C 避光保存)、去氢茯苓酸(批号 77012-31-8,质量分数 98%)、茯苓酸(批号 29070-92-6,质量分数 98%)对照品均购于成都克洛玛生物科技有限公司;白术内酯III(批号 111978-201501,质量分数 99.9%,冷冻保存)、白术内酯I(批号 111975-201501,质量分数 92.6%,冷冻保存,使用前无需处理)对照品均购于中国食品药品检定研究院;参苓健体粉购于湖南富兴飞鸽药业有限公司,规格 15 g/袋,批号分别为 1511163、1512093、1512223;乙腈为色谱纯,磷酸为分析纯,水为重蒸馏水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

采用 Venusil MP C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈(A)-0.05%磷酸溶液(B),梯度洗脱^[3-5], 0~7 min, 52.0%A, 7~19 min, 52.0%→60.0%A, 19~28 min, 60.0%→75.0%A, 28~35 min, 75.0%→52.0%A;检测波长:210 nm^[6]

(0~19 min, 检测去氢土莫酸、去氢茯苓酸和茯苓酸)、220 nm^[7-9] (19~35 min, 检测白术内酯III和白术内酯I);体积流量:0.8 mL/min;柱温:30 °C;进样量为 10 μL。

2.2 对照品溶液的制备

分别精密称取去氢土莫酸、去氢茯苓酸、茯苓酸、白术内酯III和白术内酯I对照品适量,用甲醇溶解,分别制成含去氢土莫酸 0.462 mg/mL、去氢茯苓酸 0.380 mg/mL、茯苓酸 0.576 mg/mL、白术内酯III 0.395 mg/mL、白术内酯I 0.505 mg/mL 的单一对照品储备溶液。再分别依次量取各对照品储备液 2.5、1.5、2.5、2.0、1.0 mL,置同一 50 mL 量瓶中,用甲醇稀释至刻度,摇匀,即得混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备

取参苓健体粉约 9.0 g,精密称定,置 50 mL 量瓶中,加入甲醇 45 mL,超声提取 40 min,放冷,用甲醇加至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.4 阴性样品溶液的制备

按参苓健体粉的处方,分别制备缺茯苓和白术的阴性样品,按供试品溶液的制备项下的方法制成相应的阴性样品溶液。

2.5 线性范围考察

分别精密吸取对照品储备液各 0.1、0.2、0.5、1.0、2.0 mL,置于同一 10 mL 量瓶中,用甲醇稀释至刻度,摇匀,即得系列混合对照品溶液。按照上述方法进样测定,以质量浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,绘制标准曲线,得回归方程,见表 1。

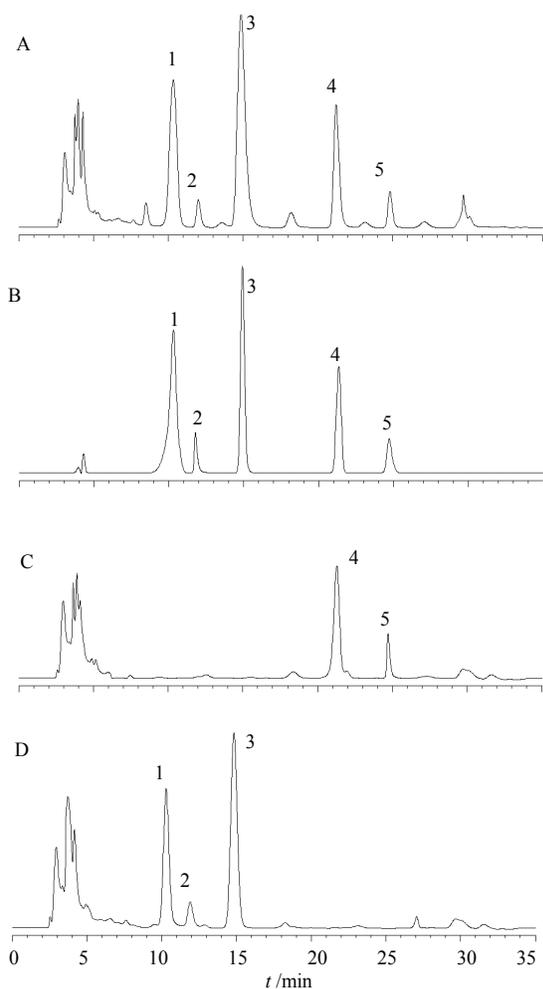
2.6 专属性试验

精密吸取混合对照品溶液、供试品溶液和阴性样品溶液各适量,进样测定。结果显示,各阴性样品溶液的色谱图中,在所测去氢土莫酸、去氢茯苓酸、茯苓酸、白术内酯III和白术内酯I对应的位置无干扰,色谱图见图 1。

表 1 线性关系考察

Table 1 Linear relationship test

成分	回归方程	r	线性范围/(μg·mL ⁻¹)
去氢土莫酸	$Y=1.7632 \times 10^6 X-117.9$	0.999 7	4.62~92.40
去氢茯苓酸	$Y=3.5716 \times 10^5 X+385.2$	0.999 9	3.80~76.00
茯苓酸	$Y=2.1319 \times 10^6 X+299.0$	0.999 9	5.76~115.20
白术内酯 III	$Y=1.6027 \times 10^6 X-248.2$	0.999 8	3.95~79.00
白术内酯 I	$Y=4.2431 \times 10^5 X+402.3$	0.999 6	5.05~101.00



1-去氢土莫酸 2-去氢茯苓酸 3-茯苓酸 4-白术内酯III 5-白术内酯 I
 1-dehydrotumulosic acid 2-dehydropachymic acid 3-pachymic acid
 4-atraclyenolide III 5-atraclyenolide I

图1 参苓健体粉(A)、混合对照品(B)、缺茯苓阴性样品(C)、缺白术阴性(D)色谱图

Fig. 1 HPLC Chromatograms of Shenling Jianti Powder (A), mixed reference substances (B), negative sample without *Poria* (C), and negative sample without *Atractylodis Macrocephalae Rhizoma* (D)

2.7 精密度试验

取混合对照品溶液,连续进样6次,测定峰面积,结果去氢土莫酸、去氢茯苓酸、茯苓酸、白术内酯III和白术内酯I峰面积的RSD值分别为0.92%、1.05%、0.99%、1.07%、1.13%。

2.8 重复性试验

取批号1511163参苓健体粉样品6份,制备供试品溶液,进样测定峰面积,分别计算去氢土莫酸、去氢茯苓酸、茯苓酸、白术内酯III和白术内酯I的质量分数,结果其RSD值分别为1.62%、1.24%、1.56%、1.69%、1.74%。

2.9 稳定性试验

取批号1511163参苓健体粉样品,制备供试品溶液,在室温下放置0、2、4、6、8、12h,进样测定去氢土莫酸、去氢茯苓酸、茯苓酸、白术内酯III和白术内酯I的峰面积值,计算得其RSD值分别为0.98%、1.04%、0.96%、1.06%、1.17%。结果显示供试品溶液在室温下12h内很稳定。

2.10 回收率试验

取批号1511163参苓健体粉样品6份,每份约4.5g,精密称定,分别精密加入混合对照品溶液25mL,制备供试品溶液,进样,测定5个成分的峰面积值,计算平均回收率,结果去氢土莫酸、去氢茯苓酸、茯苓酸、白术内酯III和白术内酯I的平均回收率分别为99.24%、97.75%、98.66%、98.49%、99.10%,RSD值分别为1.23%、1.79%、1.66%、0.80%、1.25%。

2.11 样品测定

取3批参苓健体粉样品,制备供试品溶液,进样测定,采用外标法计算去氢土莫酸、去氢茯苓酸、茯苓酸、白术内酯III和白术内酯I的质量分数,结果见表2。

表2 参苓健体粉中去氢土莫酸、去氢茯苓酸、茯苓酸、白术内酯III和白术内酯I的测定结果(n=3)

Table 2 Determination of dehydrotumulosic acid, dehydropachymic acid, pachymic acid, atracylenolide III, and atracylenolide I in Shenling Jianti Powder (n=3)

批号	质量分数/(mg·g ⁻¹)				
	去氢土莫酸	去氢茯苓酸	茯苓酸	白术内酯III	白术内酯I
1511163	0.122	0.061	0.168	0.087	0.059
1512093	0.139	0.073	0.181	0.069	0.062
1512223	0.105	0.057	0.152	0.093	0.067

3 讨论

实验中分别对样品的提取方式加热回流、超声处理、索氏提取进行了对比考察,结果表明不同提取方式时所测各组分质量分数差异不大。考虑到操作的便捷性,选取超声提取方式对样品进行处理;又对提取溶剂(甲醇、70%甲醇)和超声提取时间(30、40、50 min)进行了考察,最终确定提取方法为甲醇超声提取 40 min。

实验同时考察了多个流动相体系(乙腈-0.1%磷酸溶液、乙腈-0.5%磷酸溶液、乙腈-0.05%磷酸、甲醇-0.1%甲酸溶液),最终优选出乙腈-0.05%磷酸溶液洗脱程序。

实验建立了波长切换 HPLC 梯度洗脱法同时测定参苓健体粉中去氢土莫酸、去氢茯苓酸、茯苓酸、白术内酯III和白术内酯 I 5 个成分,操作简便、结果可靠,可用于参苓健体粉的质量控制。

参考文献

- [1] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 卫生部颁药品标准 [M]. 中药成方制剂第八册. 北京: 人民卫生出版社, 1993: 107.
- [2] 中国药典 [S]. 一部. 2015: 103, 240.
- [3] 车爽, 李清, 霍艳双, 等. 波长转换 RP-HPLC 法同时测定茯苓不同部位中 5 种三萜酸含量 [J]. 药学学报, 2010, 45(4): 494-497.
- [4] 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.
- [5] 寿旦, 戴诗文, 李洪玉, 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 和苍术酮 [J]. 色谱, 2008, 26(5): 637-639.
- [6] 高晓霞, 于治国, 赵云丽, 等. HPLC 法同时测定茯苓中去氢茯苓酸和茯苓酸的含量 [J]. 沈阳药科大学学报, 2010, 27(4): 295-298.
- [7] 刘青青, 金传山, 黄力, 等. 不同加工工艺对白术中白术内酯 I 和白术内酯 III 含量的影响 [J]. 安徽中医学院学报, 2012, 31(1): 58-61.
- [8] 李犴, 何丹, 杨常成. 高效液相色谱法测定白术中白术内酯 I, II 和 III 的含量 [J]. 中南药学, 2014, 12(1): 70-73.
- [9] 刘玉强, 才谦. 50 批不同来源白术药材及饮片中白术内酯 I 和白术内酯 III 含量的 HPLC 法测定 [J]. 药物分析杂志, 2012, 32(7): 1249-1252.