

totoxic principles of *Phyllanthus niruri* herbs [J]. *Ethnopharmacology*, 1985, 14(1): 41.

- [5] Wang C J, Yuan D P, Chen W, et al. Effects of *Phyllanthus urinaria* L. on human hepatoma cells [J]. *Lishizhen J Tradit Chin Med Res* (时珍国药研究), 1997, 8(6): 499.
- [6] Thyagarajan S P, Thiruneelakan K, Subramanian S, et al. In vitro inactivation of HbsAg by *Eclipsaalba Hasskand Phyllanthus niruri* Linn. [J]. *Ind Med Res*, 1982, 76

(Suppl): 124.

- [7] Xu D W, Ma H L, Ren Z Y, et al. Effects of *Phyllanthus Amarus* on hepatitis B virus [J]. *Tianjin Med J* (天津医药), 1994 (12): 717.
- [8] Chen X H, Hu Y M, Liao Y Q. The protective effect of Chongqing *Phyllanthus urinaria* L. on CCL₄ damaged hepatocyte of rats [J]. *Pharm Clin Chin Mater Med* (中药药理与临床), 1994, 10(4): 17-18.

HPLC 法测定白术中的白术内酯 I、II、III

刘伟祥, 黎琼红*, 谢 晨, 段 启

(广东康美药业股份有限公司, 广东 普宁 515300)

白术为菊科植物白术 *Atractylodes macrocephala* Koidz. 干燥根, 主产于浙江、安徽、湖北、湖南等省。其性味甘、苦、温, 具有健脾益气, 燥湿利水, 止汗, 安胎的功效^[1]。主要含有挥发油成分和内酯类成分。其中内酯类成分具有抗炎、抗肿瘤作用^[2,3], 该类成分还具有调节胃肠道功能和促进营养物质吸收的功能, 尤以白术内酯 I 作用明显^[4]。为有效控制白术质量, 本实验采用 HPLC 法建立内酯类成分的定量分析方法。该方法可操作性强, 重现性好, 为更好地控制白术药材质量提供了科学依据。

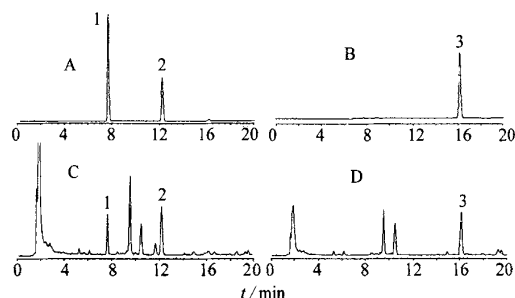
1 仪器与试剂

美国 Agilent 1100 高效液相色谱仪, 二极管阵列检测器, 1100 色谱工作站。白术内酯 I、II、III 对照品购自中国药品生物制品检定所, 批号分别是: 1396-060123、1397-060123、1398-060123。乙腈和甲醇均为色谱纯, 水为纯化水。药材购于不同产地, 经江西中医学院鉴定教研室鉴定为正品白术。

2 方法与结果

2.1 色谱条件: Dikma Kromasil C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 以乙腈为流动相 A, 水为流动相 B, 梯度洗脱程序为 (A): 0~16 min: 60%~76%; 16~18 min: 76%~100%; 18~30 min: 100%。体积流量为 1.0 mL/min, 柱温 25℃, 白术内酯 I、III 检测波长为 220 nm, 白术内酯 II 检测波长为 276 nm, 进样量 10 μL。理论塔板数以白术内酯 I 计算应不低于 5 000。色谱图见图 1。

2.2 对照品溶液的制备: 精密称取白术内酯 I、II、III 对照品 2.85、1.94、8.03 mg, 置于 25 mL 量瓶



1-白术内酯 III 2-白术内酯 I 3-白术内酯 II
1-atractylenolide III 2-atractylenolide I 3-atractylenolide II

图1 白术内酯 I、III (A, 220 nm)、白术内酯 II (B, 276 nm) 和样品 (C、D) HPLC 图谱

Fig.1 HPLC Chromatograms of atractylenolides I, III at 220 nm (A), II at 276 nm (B), samples at 220 nm (C), and 276 nm (D)

中, 用甲醇溶解定容至刻度, 制成含有白术内酯 I、II、III 分别为 0.114、0.078、0.321 mg/mL 的混标储备液, 即得。

2.3 供试品溶液的制备: 称取白术药材粉末 (过 3 号筛) 约 1 g, 置于 50 mL 锥形瓶中, 加入甲醇 40 mL, 超声 30 min, 滤过, 滤液浓缩至小体积, 以甲醇转移并定容至 10 mL 量瓶中, 摇匀, 得 100 mg/mL 的供试品溶液。

2.4 线性关系考察: 分别精密吸取白术内酯 I、II、III 对照品储备液 0.1、0.2、0.5、1.0、2.0、5.0、10.0 mL 加甲醇定容至 10 mL 量瓶中, 摇匀。在上述色谱条件下进行分析, 分别以色谱峰面积 (Y) 对质量浓度 (X) 绘制标准曲线。结果表明: 白术内酯 I、II、

收稿日期: 2006-11-10

作者简介: 刘伟祥, 男, 副主任药师, 主要从事药物新剂型研究。

* 通讯作者 黎琼红 (1979—), 女, 硕士研究生。Tel: (0663) 2920370 E-mail: kj6868kj@163.com

Ⅲ 分别在 1.14~114 $\mu\text{g/mL}$ 、0.776~77.6 $\mu\text{g/mL}$ 、3.21~321 $\mu\text{g/mL}$ 峰面积与质量浓度呈良好的线性关系,回归方程分别为 $Y=4\,350.8\,X+7.715$, $Y=2\,878.3\,X+5.228$, $Y=8\,038.7\,X+14.949$, 3 者相关系数 r 均为 0.999 9。

2.5 精密度试验:精密吸取同一供试品溶液,在上述色谱条件下连续进样 6 次,分别测定白术内酯 I、II、III 的峰面积,结果 RSD 分别为:0.36%、0.27%、0.69%。

2.6 重现性试验:取同一样品 6 份各约 1.0 g,精密称定,按“2.3”项下操作,按上述色谱条件测定各样品的峰面积,计算各对照品的质量分数,白术内酯 I、II、III 的 RSD 分别为:1.95%、2.36%、2.45%。

2.7 稳定性试验:取同一供试品溶液,分别于 0、1、2、4、8、12、24、36、48 h 在上述色谱条件下进样分析。白术内酯 I、II、III 的 RSD 分别为:1.51%、0.78%、0.60%,结果表明供试品在 48 h 内稳定。

2.8 加样回收率试验:称取已测定量的同一药材粉末约 0.5 g,精密称定,分别精密按相当于药材中白术内酯 I、II、III 的 50%、100%、150% 的量加入混标溶液,按“2.3”项下操作,配制成高、中、低及空白 4 个水平的加样供试品溶液,在上述色谱条件下进样分析,计算回收率。白术内酯 I、II、III 的平均回收率分别为 97.92%、103.15%、100.78%,RSD 分别为:0.67%、0.68%、4.64% ($n=3$)。

2.9 样品测定:按上述方法对 13 批白术药材进行测定,进样量为 10 μL ,以外标法计算白术内酯 I、II、III 的量。结果见表 1。

3 讨论

3.1 本研究对 13 批不同产地的白术药材进行了内酯类成分的测定。结果表明,不同产地的白术药材中白术内酯 I、II、III 的量差异较大,相同产地药材量也有较大的差异,说明应对白术药材进行质量控制。从表 1 可见,白术内酯 I 的量除 3 批样品外均大于 0.150 mg/g;内酯 II 除此 3 批外均大于 0.200 mg/g;内酯 III 只有 1 批小于 0.100 mg/g,而除此 3 批外,内酯 I、II、III 的量总计均大于 0.500 mg/g。因此初步规定白术药材的内酯类成分的量限度为白术内酯 I、II、III 分别不得小于 0.150、0.200、0.100 mg/g,而 3 者总计不得少于 0.500 mg/g。

表 1 不同产地白术中白术内酯 I、II、III 的检测结果 ($n=4$)

Table 1 Determination of atractylenolides I, II, and III in *A. macrocephala* from different habitats ($n=4$)

产地 (批号)	白术内酯 I / ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	白术内酯 II / ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	白术内酯 III / ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	总量 // ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)
江西修水 (051110)	0.347	0.288	0.653	1.288
江西修水 (060615)	0.183	0.634	0.410	1.227
浙江东阳 (060602)	1.055	0.232	2.386	3.672
浙江缙云 (060602)	0.433	0.478	0.426	1.338
浙江磐安 (060526)	0.203	0.382	0.370	0.955
浙江新昌 (060526)	0.106	0.168	0.129	0.402
浙江缙云 (051225)	1.000	0.302	1.827	3.129
浙江磐安 (041012)	0.057	0.188	0.110	0.355
重庆酉阳 (051126)	0.126	0.378	0.138	0.642
湖南岳阳 (050605)	0.163	0.297	0.160	0.620
湖北利川 (051130)	0.177	0.332	0.138	0.647
浙江金华 (050625)	0.045	0.198	0.069	0.312
湖北恩施 (051201)	0.196	0.300	0.268	0.764

3.2 检测波长的选择:经过 Agilent 1100 DAD 三维图谱分析,内酯 I、III 在 220 nm 处有最大吸收,白术内酯 II 在 276 nm 处有最大吸收,为了能在一个条件下检测,因此选择同时检测两个波长信号。

3.3 流动相的选择:本实验曾经试过乙腈-水、甲醇-水等不同的流动相系统,发现甲醇-水系统可获得较好峰形和适合的极性范围;为了能同时测定 3 个内酯成分,尝试了不同的流动相比比例,结果以上述流动相梯度洗脱程序,获得较好的分离,3 个成分的分离度均大于 1.5,拖尾因子在 0.95~1.05。

3.4 提取方法的选择:分别考察了甲醇、乙醇、醋酸乙酯、丙酮等不同提取溶剂,超声、回流等不同提取方式,并进行了提取时间为 30 min、1、2 h,提取次数为一次、两次的考察,结果表明,以甲醇超声 30 min 一次即可提取完全,与长时间的提取结果相差很小,因此确定该提取方法。

References:

- [1] Ch P (中国药典) [S]. Vol I. 2005.
- [2] Endo K, Toguchi T, Toguchi F, et al. Antiinflammatory principle of *Atractylodes rhizomes* [J]. *Chem Pharm Bull*, 1979, 27: 2954.
- [3] Tang D F, Hao Y H, Liu Z Y, et al. The constituents of the essential oil from rhizome of *Atractylodes macrocephala* produced in Pingjiang and their antitumor effect [J]. *Chin Pharm Bull* (药学报), 1984, 19(9): 43.
- [4] Li W. Study on quality of *Atractylodes macrocephala* Koidz. - Determination of 2 atractylenolides by HPLC [J]. *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 2001, 21(3): 170-172.