

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

寿 旦, 戴诗文, 章建民, 李洪玉, 俞忠明

(浙江省中医药研究院, 浙江 杭州 310007)

摘要 :采用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。采用美国 Micro-tech Ultra plus II™ 微管柱通用型二元梯度高效液相色谱仪和 Microsil C₁₈ 微管色谱柱(150 mm × 1.0 mm),以甲醇-乙腈-水(A 相体积比为 90:5:5 ;B 相体积比为 55:5:40)为流动相,梯度洗脱,流速 50 μL/min,在 220 nm 波长下检测。在上述色谱条件下,3 种组分分离良好,在相应的进样质量范围内具有良好的线性关系。白术内酯Ⅲ、I 和苍术酮的加标回收率分别为 96.86%、97.13% 和 98.06% ;相对标准偏差分别为 1.63%、1.31% 和 0.39%。该法简便、快捷,能够用于白术的质量控制。

关键词 :微管液相色谱法 ;白术内酯Ⅲ ;白术内酯 I ;苍术酮 ;白术

中图分类号 :O658 文献标识码 :A 文章编号 :1000-8713(2008)05-0637-03 栏目类别 :技术与应用

Simultaneous determination of atractylenolide III , atractylenolide I and atractylon in *Artactylodis macrocephala* using microbore liquid chromatography

SHOU Dan , DAI Shiwen , ZHANG Jianmin , LI Hongyu , YU Zhongming

(Zhejiang Academy of Traditional Chinese Medicine , Hangzhou 310007 , China)

Abstract : A microbore liquid chromatography (microbore LC) has been developed for the simultaneous determination of atractylenolide III , atractylenolide I and atractylon in *Artactylodis macrocephala*. In the method , a Microsil C₁₈ column (150 mm × 1.0 mm) was used with the mobile phase containing methanol-acetonitrile-water for gradient elution , the flow rate was 50 μL/min , and the detection wavelength was set at 220 nm. Under the optimized separation conditions , every component was separated thoroughly. The relationships between the concentrations and the peak areas of the three components were all linear. The recoveries were 96.86% for atractylenolide III , 97.13% for atractylenolide I and 98.06% for atractylon , the relative standard deviations (RSD) were 1.63% , 1.31% and 0.39% , respectively. The method is simple , convenient , and can be used for the quality control of *Artactylodis macrocephala*.

Key words : microbore liquid chromatography (microbore LC) ; atractylenolide III ; atractylenolide I ; atractylon ; *Artactylodis macrocephala*

白术为菊科植物白术 *Artactylodes macrocephala* Koidz 的干燥根茎,性温,味苦、甘,归脾胃经。具有健脾益气、燥湿利水、止汗、安胎之功效^[1],为中医临床的传统用药,也是浙江产的道地药材“浙八味”之一。苍术酮、内酯类成分是白术抗炎、健脾的有效成分^[2,3],因而将苍术酮、白术内酯 I、Ⅲ作为含量指标进行白术品质的评价。中国药典(2005 年版)一部中“白术”项下仅有鉴别而无含量标准。

文献曾报道苍术酮含量的薄层扫描测定方法、白术内酯成分含量的液相色谱测定方法^[4-9],以及通过白术指纹图谱的研究所得到的白术总成分谱图^[10,11],但这些方法一般应用于药材的鉴定而非定量分析。同时测定白术的内酯成分及苍术酮含量的方法未见报道。本文采用微管液相色谱法建立了同时测定白术中白术内酯Ⅲ、白术内酯 I、苍术酮 3 种有效成分含量的方法,并应用于白术药材的品质评

价及优质种源的选择,取得了良好的成效。该方法的建立既体现了新的分析技术在白术有效成分测定中的探索,同时亦证实了其具有良好的应用价值。

1 实验部分

1.1 仪器与材料

Micro-tech Ultra-Plus II™ 常规柱/微管柱通用型二元梯度高效液相色谱仪(美国微仪公司); Finnigan Spectra system AS3000 自动进样器(美国 Thermo 公司); Linear UVIS 200 紫外-可见光检测器(美国微仪公司); 色谱工作站(杭州英谱公司)。所用试剂除甲醇、乙腈为色谱纯外,其余试剂均为分析纯;水为重蒸馏水。

苍术酮、白术内酯 I 及白术内酯 III 对照品为自制,经结构鉴定及纯度检查,含量达 98% 以上;白术样品均采自浙江磐安中药研究所白术药材基地,是源自全国各产区的种质在药材基地复种后的样品,经浙江省名老中药师鉴定均为正品。

1.2 色谱条件

Microsil C₁₈ 分析柱(150 mm × 1.0 mm)。流动相体系为甲醇-乙腈-水, A 相的体积比为 90:5:5, B 相的体积比为 55:5:40。梯度洗脱程序:0→15 min, 75% A; 15→20 min, 75% A→95% A; 20→35 min, 95% A; 35→40 min, 95% A→75% A; 40→50 min, 75% A。流速 50 μL/min。柱温 35 ℃。检测波长 220 nm。进样量 2 μL。

1.3 对照品溶液的制备

精密称取干燥至恒重的对照品白术内酯 I 6.0 mg, 白术内酯 III 6.0 mg 及苍术酮 6.1 mg, 分别置于 10 mL 量瓶中,加甲醇溶解并定容至刻度,摇匀,得对照品储备液。分别精密吸取白术内酯 I、白术内酯 III 对照品储备液各 1 mL 及苍术酮对照品储备液 6 mL 于 25 mL 量瓶中,加流动相 B 至刻度,摇匀,即得白术内酯 I 质量浓度为 0.024 g/L、白术内酯 III 质量浓度为 0.024 g/L 及苍术酮质量浓度为 0.146 4 g/L 的混合对照品溶液。

1.4 样品溶液的制备

精密称取干燥白术粗粉 0.4 g,置于 25 mL 量瓶中,加入 20 mL 甲醇超声提取 30 min,放冷,加入适量的甲醇至刻度,摇匀。用普通滤纸过滤,滤液经 0.2 μm 微孔滤膜过滤,滤液作为样品溶液。

2 结果与讨论

2.1 色谱方法的选择

微管液相色谱方法因溶剂消耗少、灵敏度高、优势,近年来在各种分析领域得到应用^[12,13]。在白

术的分析中,与常规液相色谱法相比,相同条件下采用微管液相色谱得到的分离度更高,基线漂移状况有了很大的改善。故选择采用微管液相色谱进行本文的研究。

2.2 流动相的选择

一般以含醇 90% 以上的溶剂作为流动相进行等度洗脱进行白术中主要成分苍术酮的分析^[14],该流动相与分离内酯的流动相在含醇比例上有较大的差异。本文根据文献报道,尝试以甲醇为流动相 A 相、水为流动相 B 相,以梯度洗脱(程序:0→20 min, 75% A; 20→35 min, 75% A→95% A; 35→40 min, 95% A; 40→50 min, 95% A→75% A)进行试验,结果组分分离不佳(见图 1-a)。调整梯度洗脱程序(0→10 min, 65% A; 10→20 min, 65% A→75% A; 20→35 min, 75% A→95% A; 35→40 min, 95% A; 40→50 min, 95% A→65% A)进行试验,3 种组分的分离效果得到改善,但基线漂移较大(见图 1-b);在流动相中加入乙腈,并将流动相 A 和 B 改为含有不同浓度有机溶剂的水溶液,减小了两相间的差异,使基线漂移及分离效果得到改善,进一步优化梯度洗脱程序,最终得到了基线较为平滑、组分分离良好的色谱图(见图 1-c)。

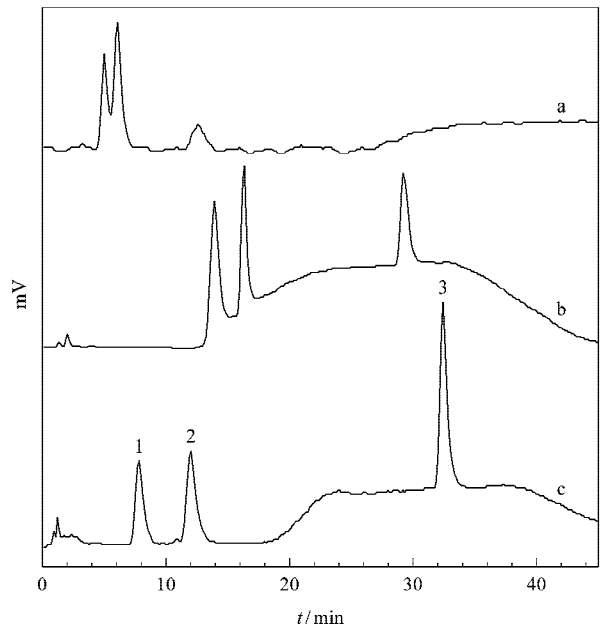


图 1 不同流动相条件下对照品的微管液相色谱图

a. 流动相 A, 甲醇; 流动相 B, 水; 梯度洗脱程序: 0→20 min, 75% A; 20→35 min, 75% A→95% A; 35→40 min, 95% A; 40→50 min, 95% A→75% A。 b. 流动相 A, 甲醇; 流动相 B, 水; 梯度洗脱程序: 0→10 min, 65% A; 10→20 min, 65% A→75% A; 20→35 min, 75% A→95% A; 35→40 min, 95% A; 40→50 min, 95% A→65% A。 c. 流动相 A, 甲醇-乙腈-水(体积比为 90:5:5); 流动相 B, 甲醇-乙腈-水(体积比为 55:5:40); 梯度洗脱程序: 0→15 min, 75% A; 15→20 min, 75% A→95% A; 20→35 min, 95% A; 35→40 min, 95% A→75% A; 40→50 min, 75% A。

1. 白术内酯 III; 2. 白术内酯 I; 3. 苍术酮。

2.3 标准曲线与线性范围

精密吸取白术内酯Ⅰ、白术内酯Ⅲ及苍术酮对照品储备液,分别配制成不同浓度的混合对照品溶液,按上述色谱条件各进样 2 μL 进行分离测定,以峰面积 Y 为纵坐标,进样量 X (μg) 为横坐标进行线性回归,得到 3 种组分的工作曲线(见表 1)。结果显示,在表 1 所示进样量范围内,3 种组分的线性关系良好。

表 1 3 种成分的工作曲线和线性范围

组分	线性回归方程*	线性范围/μg	r
白术内酯Ⅲ	$Y = 15557.9X - 185.3$	1.2 ~ 14.4	0.9999
白术内酯Ⅰ	$Y = 27186.3X - 20629.7$	1.2 ~ 14.4	0.9998
苍术酮	$Y = 2927.3X - 8815.6$	7.3 ~ 87.8	0.9998

* Y : 峰面积; X : 进样质量, μg。

2.4 回收率

取已知含量的样品(安徽亳州样品) 15 份,5 份为一组,每份约 0.2 g,精密称定后置于 25 mL 量瓶中,按高、中、低比例分别加入一定量的对照品,然后按照样品溶液的制备方法操作,制得加标样品溶液。在选定的色谱条件下测定回收率,白术内酯Ⅲ、白术内酯Ⅰ与苍术酮的平均回收率分别为 96.86%, 97.13% 和 98.06%,相对标准偏差(RSD)分别为 1.63%, 1.31% 和 0.39%。

2.5 溶液的稳定性

将样品溶液分别放置 1, 2, 3, 4, 5, 10 h 后进样测定,记录峰面积,结果显示样品溶液在 10 h 内稳定。同时经实验证实苍术酮对照品溶液在测定时间内基本稳定,符合含量测定的要求。

2.6 精密度

精密称取干燥白术粗粉 5 份,每份约 0.4 g,按照样品溶液的制备方法制备精密度试验样品溶液。精密吸取上述溶液各 2 μL 进行测定,所测得的白术内酯Ⅲ、白术内酯Ⅰ和苍术酮峰面积的 RSD 分别为 1.52%, 1.35% 和 1.09%。

2.7 样品测定

精密吸取样品溶液 2 μL 进行测定,计算样品中 3 种有效成分的含量,结果见表 2。色谱图见图 2。

表 2 白术样品中 3 种组分的含量测定 mg/g

样品产地	α(白术内酯Ⅲ)	α(白术内酯Ⅰ)	α(苍术酮)
浙江省磐安林峰	1.43	0.99	3.06
浙江省天目山	1.74	1.23	1.68
安徽省亳州	1.56	1.24	3.09
浙江省天台石梁	0.16	0.15	11.05
江西省安福	0.15	0.26	7.90

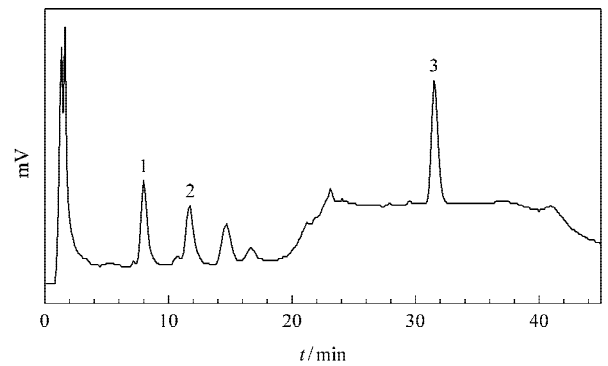


图 2 样品的微管液相色谱图

1. 白术内酯Ⅲ; 2. 白术内酯Ⅰ; 3. 苍术酮。

3 结论

以苍术酮、白术内酯Ⅲ和Ⅰ为测定指标,采用微管液相色谱法建立了同时测定白术中 3 种主要成分含量的方法。方法学考察结果显示各项考察指标符合含量测定的要求;将其应用于药材材质复种、栽培中的质量评价,可以获得优质种源;测定结果稳定,具有良好的可操作性与重复性。

实验结果显示:仅以 3 个组分中任一组分的含量作为指标评价白术的品质不够客观和全面。同时发现白术中苍术酮与内酯成分的含量间存在某种规律,我们将进一步探讨其内在规律。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中国药典(2005年版),一部. 北京:化学工业出版社,2005:68
- [2] 周德文,周立勇. 国外医药:植物药分册,1996,11(3):120
- [3] 李伟,文红梅,崔小兵,等. 南京中医药大学学报,2006,22(6):366
- [4] 文红梅,李伟,吴皓,等. 中国中药杂志,1997,22(11):662
- [5] 李伟,文红梅,张爱华,等. 中成药,2000,22(12):837
- [6] 刘胜姿,魏万之,邱细敏,等. 湖南中医学院学报,2004,24(4):29
- [7] 邱细敏,唐小异,刘胜姿,等. 湖南师范大学学报:医学版,2004,24(1):47
- [8] 于永明,宋长义,贾天柱. 中成药,2005,27(6):669
- [9] 李伟,文红梅,崔小兵,等. 中国中药杂志,2006,31(19):1600
- [10] 黎琼红,马兴田,谢晨,等. 中草药,2007,38(6):929
- [11] 郭方道,黄兰芳,周邵云. 色谱,2007,25(1):43
- [12] Sun Y C, Chen Y J, Tsai Y N. Microchemical Journal, 2007, 86(1):140
- [13] Lanckmans K, Clinckers R, Van Eekhaut A. J Chromatogr B, 2006, 831(1/2):205
- [14] 郝延军,桑育黎,李宝林,等. 中成药,2007,29(6):895