

★交流★

RP-HPLC同时测定党参中党参炔苷与苍术内酯 III^{*}

邹元锋, 刘莎, 陈兴福^{**}, 杨文钰, 刘江, 杜刚

(四川农业大学农学院, 雅安 625014)

摘要 目的: 建立同时测定党参中党参炔苷及苍术内酯II含量的 HPLC 分析方法。方法: 采用 Symmetry C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱, 流动相为乙腈 (A) - 水 (B), 梯度洗脱 (0~25 min, 10% A → 40% A; 25~35 min, 40% A → 100% A), 流速 0.8 mL · min⁻¹, 检测波长 220 nm, 柱温 30 °C, 进样量 10 μL。结果: 党参炔苷与苍术内酯II分离良好, 进样量分别在 0.076~1.52 μg (r = 0.9997) 与 0.088~1.76 μg (r = 0.9998) 范围内线性关系良好, 平均回收率分别为 99.8% (RSD = 1.1%) 及 100.1% (RSD = 0.94%)。结论: 该方法操作简便、准确, 具有良好的重复性, 可作为党参中党参炔苷与苍术内酯II同时测定的有效方法。

关键词: 党参; 党参炔苷; 苍术内酯 III; 反相高效液相色谱法

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2011)05-0923-04

RP-HPLC simultaneous determination of lobetyolin and atractylenolide III in Radix Codonopsis^{*}

ZOU Yuan-feng LIU Sha CHEN Xing-fu^{**}, YANG Wen-yu LIU Jiang DU Gang

(College of Agronomy, Sichuan Agriculture University, Ya'an 625014, China)

Abstract Objective To develop an RP-HPLC method for simultaneous determination of lobetyolin and atractylenolide III in Radix Codonopsis **Methods** Symmetry C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) was adopted, the mobile phase was acetonitrile and water with the linear gradient elution (0 min, 10% acetonitrile; 25 min, 40% acetonitrile; 35 min, 100% acetonitrile) at the flow rate of 0.8 mL · min⁻¹, the UV detector was set at 220 nm, the column temperature was 30 °C and the injection volume was 10 μL **Results** The resultant correlation coefficients of lobetyolin and atractylenolide III were 0.9997 and 0.9998 with range from 0.076 to 1.52 μg from 0.088 to 1.76 μg respectively. The average recoveries of lobetyolin and atractylenolide III were 99.8% with RSD of 1.1%, and 100.1% with RSD of 0.94%, respectively. **Conclusion** This method can be applied to the analysis of lobetyolin and atractylenolide III in Radix Codonopsis. The results indicated this method is simple, rapid and accurate.

Key words Radix Codonopsis; lobetyolin; atractylenolide III; RP-HPLC

党参是我国常用大宗药材之一, 具有补中益气、健脾益肺之功效。主治脾肺虚弱、气短心悸、食少便溏、虚喘咳嗽、内热消渴等症^[1]。党参主要含有多糖, 党参苷、II、III、IV, 党参炔苷, 苍术内酯类, 烯醇类, 氨基酸, 无机盐等。但关于党参的有效成分说法不一, 中国药典中规定了党参炔苷的薄层鉴别, 将其作为党参标志性成分之一。而 Chun-Feng Qiao 等^[2]对党参属 8 个种及其他属 4 个种的 44 份样品进行了分析, 结果显示除正品党参含有党参炔苷外, 作为代用

品的 5 个同属种也含有党参炔苷, 认为不可作为特征化学标示物单独用于党参的鉴定。1991 年, 王峥涛^[3]采用正相 HPLC 法对来自不同产地的党参属 19 种党参及 1 个变种素花党参进行了分析, 首次发现了具有抗炎活性的倍半萜内酯类化合物苍术内酯 III 党参 (山西)、灰毛党参 (*Codonopsis canescens*) 及球花党参 (*C. subglobosa*) 含有苍术内酯 III 其他种中未检出, 将苍术内酯 III 作为潞党的指标性成分。而庞维荣等^[4]的研究发现党参、素花党参及川党参中均含有苍

* 四川省科技富民强县专项行动计划项目

** 通讯作者 Tel: (0835) 2882612 E-mail: chenxf64@souhu.com

术内酯Ⅲ。因此检测党参中党参炔苷及苍术内酯Ⅱ含量对于党参质量控制有重要意义。目前分别检测党参炔苷与苍术内酯Ⅱ含量方法报道较多^[5,6],对于两者的同时测定却未见报道。本实验系统地考察了 RP-HPLC 法同时测定素花党参中党参炔苷及苍术内酯Ⅱ的方法学,为党参质量研究提供依据。

1 仪器与试剂

Agilent 1100 高效液相色谱仪 (Agilent G1311 四元液相泵, Agilent G1314A 可变波长检测器); KQ-400KDZ 数控超声波清洗器; MILLI-Q 型超纯水系统。

样品提取用甲醇为分析纯,流动相用乙腈 (Fisher 公司) 为色谱纯; 党参炔苷对照品 (上海博蕴生物科技有限公司, 批号 A0002, HPLC $\geq 98\%$), 苍术内酯Ⅱ对照品 (上海融禾医药科技发展有限公司, 批号 090317, HPLC $\geq 98\%$)。

药材样品采自九寨沟县党参不同种植区,经四川农业大学农学院陈兴福教授鉴定为素花党参 *Codonopsis pilosula* Nannf var *modesta* (Nannf) L. T. Shen, 药材清洗干净,置于 60 °C 恒温箱中烘干,粉碎过 60 目筛。

2 溶液制备

2.1 混合对照品溶液 精密称取对照品党参炔苷

及苍术内酯Ⅲ适量,分别置于 10 mL 量瓶中,用甲醇定容,过 0.45 μm 一次性滤膜,取滤液即得 0.76 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 党参炔苷对照品储备液及 0.88 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 苍术内酯Ⅱ对照品储备液。分别精密量取上述对照品储备液各 1.0 mL,置于同一 10 mL 量瓶中,用甲醇定容至刻度,摇匀,即得党参炔苷浓度为 0.076 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,苍术内酯Ⅲ浓度为 0.088 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的混合对照品溶液。

2.2 供试品溶液 取药材粉末约 0.5 g 精密称定,精密加入甲醇 10 mL,称定重量,超声提取 1 h (360 W, 40 kHz),放冷,再次称定重量,用甲醇补足减少的重量。过滤,滤液用甲醇定容至 10 mL 量瓶中,摇匀,用 0.45 μm 过滤,取续滤液即得。

3 色谱条件

采用 Symmetry C₁₈ (4.6 mm \times 250 mm, 5 μm) 色谱柱,流动相为乙腈 (A) - 水 (B),梯度洗脱 (0~25 min, 10% A \rightarrow 40% A; 25~35 min, 40% A \rightarrow 100% A),流速 0.8 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$,检测波长 220 nm,柱温 30 °C,进样量 10 μL 。色谱图见图 1。

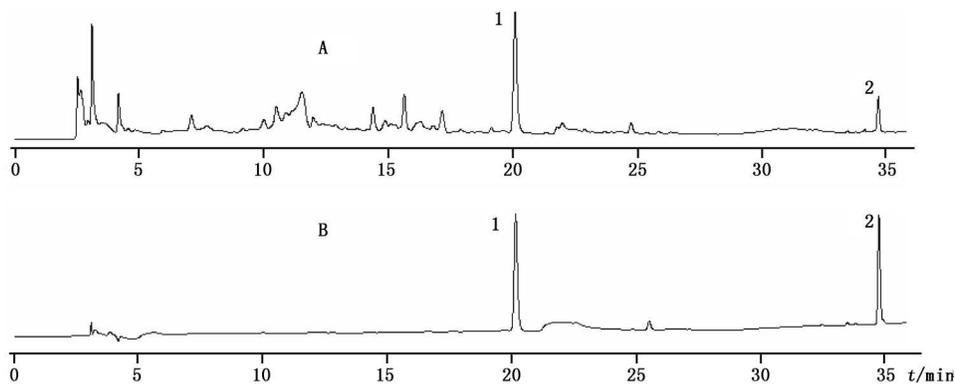


图 1 样品 (A) 和对照品 (B) HPLC 色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms of sample (A) and reference substances (B)

1 党参炔苷 (lobetyolin) 2 苍术内酯Ⅲ (atractylenolide III)

4 线性关系考察

分别精密吸取混合对照品溶液 1, 4, 8, 12, 16, 20 μL , 进样测定党参炔苷及苍术内酯Ⅱ峰面积的积分值。以进样量 X (μg) 为横坐标,以峰面积 Y 为纵坐标绘制标准曲线,党参炔苷及苍术内酯Ⅱ回归方程分别为:

$$Y = 1.311 \times 10^3 X + 73.13 \quad r = 0.9997$$

$$Y = 698.6X - 22.88 \quad r = 0.9998$$

表明党参炔苷及苍术内酯Ⅲ进样量分别在

0.076~1.52 μg 与 0.088~1.76 μg 范围内呈良好线性关系。

5 精密度试验

分别精密吸取混合对照品溶液 10 μL , 连续进样 6 次, 结果党参炔苷及苍术内酯Ⅲ峰面积的 RSD 分别为 0.63% 及 0.43%。

6 重复性试验

精密称取同一份样品 6 份, 按“2.2”项下方法制备供试品溶液, 进样测定。结果样品中党参炔苷及苍

术内酯II含量平均值 ($n = 6$) 分别为 $0.4660 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 及 $0.0581 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, RSD 分别为 1.9% 及 1.7%。

7 稳定性试验

精密吸取同一供试品溶液, 在室温下放置, 分别于 0, 4, 8, 12, 16, 24 h 进样测定。结果党参炔苷及苍术内酯 III 峰面积的 RSD 分别为 1.4% 及 1.3%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

8 回收率试验

称取已知含量(党参炔苷含量为 $0.2243 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 苍术内酯II含量为 $0.0768 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$)的药材 0.25 g 6 份, 精密称定, 分别加入党参炔苷对照品储备液 70 μL , 苍术内酯II对照品储备液 20 μL , 按“2.2”项下方法制备供试溶液, 按“3”项色谱条件测定, 计算得到党参炔苷及苍术内酯 II 的平均回收率分别为 99.8% 及 100.1%, RSD 分别为 1.1% 及 0.94%。

9 样品测定

分别精密吸取混合对照品及供试品溶液各 10 μL , 按“3”项色谱条件进样测定, 以外标法计算样品中党参炔苷及苍术内酯 III 的量, 结果见表 1。

表 1 九寨沟县不同种植区党参中党参炔苷及苍术内酯 III 的测定 ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, $n = 3$)

Tab 1 Determination of lobetyolin and atractylenolide III of Radix Codonopsis from Jiuzhaigou county different planting area

种植区 (area)	党参炔苷 (lobetyolin)	苍术内酯 III (atractylenolide III)
安乐乡甲勿村 (Jiawu village, Anle countryside)	1 0.2243 2 0.2635 3 0.3277	0.0768 0.0420 0.0197
郭元乡水田村 (Shuitian village, Guoyuan countryside)	1 0.1652 2 0.1005 3 0.1748 4 0.1837	0.0214 0.0173 0.0246 0.0124
永丰乡双龙村 (Shuanglong village, Yongfeng countryside)	1 0.3242 2 0.5193 3 0.6122 4 0.5735	0.0445 0.0192 0.0213 0.0149

由表 1 可以看出, 党参炔苷含量以采自永丰乡双龙村的样品最高, 为 $0.6122 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 苍术内酯 III 含量以采自安乐乡甲勿村的样品最高, 为 $0.0768 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。各样品含量采用 SPSS17.0 进行方差分析, 结果表明, 不同种植区党参的样品党参炔苷极显著差异。相同种植区内, 除郭元乡外, 党参炔苷含量差异

极显著。不同种植区党参样品的苍术内酯 III 含量差异极显著, 相同种植区内的样品中苍术内酯 III 含量差异极显著。

10 讨论

10.1 供试品溶液制备方法的确定 中国药典中党参薄层鉴别样品的提取溶剂为甲醇^[1], 关于苍术内酯 III 含量测定的文献报道, 提取溶剂也多为甲醇^[7], 因此采用甲醇为提取溶剂。比较超声提取时间 20 30 40 50 60 70 min, 发现 20~50 min 均提取不完全, 60 min 与 70 min 提取率比较接近, 考虑时间成本选择 60 min, 比较料液比 1:10 1:20 1:30 1:40 结果表明当料液比为 1:20 时, 已经提取完全, 因此料液比确定为 1:20。通过对比发现, 回流提取与超声提取方法所得党参炔苷及苍术内酯 III 含量无显著差异, 考虑节省时间和能源问题, 选择超声提取方法。

10.2 检测波长的选择 党参炔苷的最大吸收波长为 267 nm, 在 220, 283, 253, 241 nm 处均有吸收; 苍术内酯 III 最大吸收波长为 220 nm, 在 267 nm 处无吸收。经对比, 在 267 nm 与 220 nm 处所测得党参炔苷含量无明显差异; 在 220 nm 处, 党参炔苷与苍术内酯 III 分离良好, 故选择 220 nm 为检测波长。

10.3 流动相选择 分别对甲醇-水、乙腈-水等流动相进行了考察, 并考察了等度洗脱及不同比例梯度洗脱条件, 最终以乙腈-水为流动相进行梯度洗脱 (0~25 min, 10% A \rightarrow 40% A; 25~35 min, 40% A \rightarrow 100% A), 样品的分离较好, 且重复性良好。

10.4 不同种植区含量比较 对不同种植区党参样品含量测定, 结果表明, 九寨沟县不同种植区所采党参样品的党参炔苷含量差异极显著, 苍术内酯 III 含量差异显著, 即使采自相同种植区的不同种植村的党参样品的苍术内酯 III 含量差异也达到极显著水平。由此可以看出, 九寨沟县不同种植区所产党参的质量参差不齐。有资料显示^[8] 九寨沟县党参种植区地理分布范围广, 缺乏规范化栽培技术, 种植区及种植户间栽培管理技术差异较大。由此可知, 党参中党参炔苷及苍术内酯 III 的积累不但与区域自然条件有关, 还可能与栽培技术及田间管理有联系。这也在一定程度上显示了建立规范化栽培技术的重要性, 规范化栽培技术是确保药材质量稳定性及可控性的重要因素之一。因此, 对于九寨沟县党参种植区而言, 建立规范化栽培技术稳定亟待进行。

参考文献

- 1 ChP(中国药典). 2010 VolI (一部): 264
- 2 Qiao Chun-feng, He Zhen-dan, Han Quan-bin, et al. The use of lobetyolin and HPLC-UV fingerprints for quality assessment of Radix Codonopsis. *J Food Drug Anal*, 2007, 15(3): 258
- 3 WANG Zheng-tao(王峥涛), XU Guo-jun(徐国钧), NAMBA Tsuneo(难波恒雄), et al. HPLC analysis of atractylenoid III in the roots of Codonopsis plants(党参中苍术内酯 III 的 HPLC 分析). *J China Pharm Univ*(中国药科大学学报), 1991, 23(1): 48
- 4 PANG Wei-ming(庞维荣), SHUANG Shao-min(双少敏), LIU Yang-qing(刘养清). Study on correlation between atractylenoid and lobetyolin in decoction pieces of *Codonopsis pilosula* (RP-HPLC 法测定党参内酯和党参炔苷的含量及相关性研究). *World J Integr Tradit West Med*(世界中西医结合杂志), 2008, 3(2): 89
- 5 LISong(李松), LONG Long(隆龙). The quality standard research of *Codonopsis pilosula* granule(党参颗粒的质量标准研究). *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药), 2008, 37(8): 1173
- 6 LI Zhong-hua(李中华), HU Yan(胡燕), LIU Qiang(刘强). Comparison of the contents of atractylenoid III in Dangshen that two detectors determined(两种检测器测定党参中苍术内酯 III 含量的比较). *J Gansu Coll Tradit Chin Med*(甘肃中医学院学报), 2005, 22(5): 45
- 7 HAO Gui-ming(郝桂明), LI Huan-xin(李欢欣), ZHAO Chun-jie(赵春杰), et al. Determination of the content of atractylenoid III in the *Codonopsis pilosula* (Franch.) Nannf by RP-HPLC(反相高效液相色谱法测定党参中苍术内酯 III 的含量). *J Shenyang Pharm Univ*(沈阳药科大学学报), 2002, 19(5): 337
- 8 ZOU Yuan-feng(邹元锋), CHEN Xing-fu(陈兴福), CAO Chao-sheng(曹朝生), et al. Survey on the production status of Radix Codonopsis in Jizhaigou county(九寨沟县党参生产现状调查). *Sci Technol Sichuan Agric*(四川农业科技), 2008(11): 43

(本文于 2010 年 6 月 21 日收到)

《俞永新论文集》已出版

中国食品药品检定研究院李云龙院长组织编辑的《俞永新论文集》由中国人口出版社于 2010 年 9 月出版。2010 年中国药品生物制品检定所(中检所)迎来了她 60 华诞。在中检所 60 华诞之际, 编辑出版老一代中检人的论著文集, 让人们了解中国药检人的奋斗历程, 从对历史的回顾中看看中检人在药检领域的发展过程的拼搏与付出。中检所涉及多学科的药品检验检测及相关专业, 前辈们在各个专业领域的成绩均是中检所的宝贵财富。收集整理这些财富, 系统而忠实地记录中检人在各专业的成就和历程。论著集的收集编辑工作, 以体现专业性为主线, 反映团队成就为宗旨, 并以年代代表人物冠以书名编辑成册。

《俞永新论文集》以俞永新院士为核心, 收集俞永新院士及与其他作者合著论文 244 篇, 包括乙型脑炎病毒和疫苗类 87 篇, 出血热病毒和疫苗类 91 篇, 狂犬病病毒和疫苗类 18 篇, 虫媒病毒和疫苗类 25 篇, 综述 23 篇。此外还收集了俞永新院士主编及参与编辑的书籍 10 部。论文以全文刊载并尊重原文, 著作刊载前言或序、著者、目录或书名摘要。对论文有贡献的中检所的专家作者还有李河民、王太江、教坚、吴慧英、郎书惠、朱荫耕、严子林、聂子林、李雪东、罗惠蓉等。对书籍有贡献的中检所前辈们还有李河民、李德富、袁曾麟、聂子林、周国安、黄建、张华远、辜清吾等。本论著集的编辑出版亦蕴涵了对所有参与工作的老专家们为中检所发展所作贡献的敬重。

本书定价 298.00 元。联系人: 刘小帅; 电话: 010-67095201; 地址: 100050 北京市东城区天坛西里 2 号中国食品药品检定研究院《药物分析杂志》编辑部