高效液相色谱-蒸发光散射检测法同时测定 四君子丸中的 5 种有效成分

李春英^{1*}, 张晓军²

(1. 东北林业大学研究生部, 黑龙江 哈尔滨 150040 ; 2. 吉林省林业科学研究院, 吉林 长春 130033)

摘要 :建立了同时测定四君子丸中党参炔苷、茯苓酸、甘草酸、苍术内酯Ⅲ和白术内酯Ⅰ含量的高效液相色谱法。色谱条件为 :HIQ SIL C₁₈ V 色谱柱(250 mm × 4. 6 mm , 5 μm) ,以 0. 5% 冰乙酸-甲醇体系为流动相进行梯度洗脱 ,流速为 1. 0 mL/min ,采用蒸发光散射检测器检测 ,进样量为 10 μL ,柱温为 25 ℃ ,漂移管温度为 55 ℃ ,喷雾器加热级别为 60% ,载气为氮气 ,压力 0. 2 MPa。在上述条件下 ,党参炔苷、茯苓酸、甘草酸、苍术内酯Ⅲ和白术内酯Ⅰ的质量浓度分别在 0. 076 ~ 1. 21 , 0. 048 ~ 0. 76 , 0. 153 ~ 2. 45 , 0. 045 ~ 0. 72 和 0. 098 ~ 1. 56 g/L 时 ,质量浓度的对数值与色谱峰面积的对数值之间的线性关系良好 ;平均回收率在 97. 13% ~ 100. 25% 之间 ,相对标准偏差在 1. 23% ~ 2. 44% 之间。该方法简便、快速、准确 ,可用于四君子丸的质量控制。

关键词 :高效液相色谱 ;四君子丸 ;有效成分 ;中成药

中图分类号 :O658 文献标识码 :A 文章编号 :1000-8713(2010)01-0064-04

Simultaneous determination of five effective components in Sijunzi bolus using high performance liquid chromatography- evaporation light scattering detection

LI Chunying^{1*}, ZHANG Xiaojun²

(1. Graduate School of Northeast Forestry University , Harbin 150040 , China ;

2. Jilin Provincial Academy of Forestry Science , Changchun 130033 , China)

Abstract : A high performance liquid chromatographic (HPLC) method was developed for the simultaneous determination of lobetyolin , pachymic acid , glycyrrhizic acid , atractylenolide Ⅲ and atractylenolide I in Sijunzi bolus. The separation was performed on an HIQ SIL C₁₈ V column (250 mm × 4. 6 mm , 5 μm) with 0. 5% acetic acid-methanol as the mobile phase of gradient elution at a flow rate of 1. 0 mL/min. The detection was performed with an evaporation light scattering detector (ELSD) and the sample volume was 10 μL. The temperature of drift tube and heating grade of nebulizer was respectively set at 55 ℃ and 60% at 0. 2 MPa of pressure. Nitrogen gas was used as carrier gas. Under the optimized conditions , there were good linear relationships between the logarithm values of mass concentration and the peak areas of lobetyolin , pachymic acid , glycyrrhizic acid , atractylenolide Ⅲ and atractylenolide I in the ranges of 0. 076 - 1. 21 , 0. 048 - 0. 76 , 0. 153 - 2. 45 , 0. 045 - 0. 72 and 0. 098 - 1. 56 g/L , respectively. The recoveries of the five components were between 97. 13% and 100. 25% , the relative standard deviations (RSDs) were between 1. 23% and 2. 44%. This method is simple , rapid , accurate and suitable for the quality control of Sijunzi bolus.

Key words : high performance liquid chromatography (HPLC) ; Sijunzi bolus ; effective components ; Chinese patent medicine

* 通讯联系人 :李春英 , 博士 , 副研究员 , 研究方向为植物资源学。 E-mail : nefulcy@ 163. com.

基金项目 :东北林业大学青年科研基金项目。

收稿日期 2009-05-18

四君子丸为四君子汤的现代剂型,由党参、白术、茯苓、炙甘草组成,被《中华人民共和国药典》(2005 版)记载^[1]。现代药理学研究证明,四君子汤可增强机体的抵抗力,调节机体各方面的功能,对垂体、心血管功能、消化道运动功能和免疫功能有明显的改善作用^[2]。四君子丸含有党参炔苷、茯苓酸、甘草酸、苍术内酯Ⅲ和白术内酯Ⅰ等主要活性成分^[3-7]。对于党参炔苷、茯苓酸、甘草酸、苍术内酯Ⅲ和白术内酯Ⅰ的定量分析方法,已有的文献报道均是对其中的一种或两种成分进行测定^[8-14],尚未见对上述 5 种活性成分同时测定的报道。按照药典^[1]的规定,对四君子丸的鉴定仅依靠薄层色谱法进行,结果比较粗放。本文对四君子丸中的上述 5 种活性成分同时进行了含量测定,可为四君子丸的全面质量控制提供实验依据。

1 实验部分

1.1 仪器与试药

高效液相色谱仪(美国 Waters 公司),包括 Delta 600 输液泵,2420 蒸发光散射检测器;Empower 色谱工作站。HIQ SIL C₁₈V 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm, 日本 KYATECH 公司)。甲醇(色谱纯, DIMA 公司),二次蒸馏水(自制),冰醋酸(分析纯);党参炔苷(天津一方科技有限公司)、苍术内酯Ⅲ(上海同田生物技术有限公司)、白术内酯Ⅰ(中国药品生物制品检定所)、茯苓酸(沈阳协合集团天然单体化合物工程研究中心)和甘草酸铵(中国药品生物制品检定所)对照品;党参、白术、茯苓、甘草均购于哈尔滨人民同泰药店;用于方法优化的四君子丸样品为自制,每丸平均质量为 3.0 g,符合中国药典对丸剂的各项规定要求。测定的四君子丸实际样品分别为 5 个药品生产厂家的产品。

1.2 对照品溶液的制备

分别精密称取党参炔苷、茯苓酸、甘草酸、苍术内酯Ⅲ和白术内酯Ⅰ对照品适量,分别配制质量浓度为 6.03, 3.78, 12.24, 3.62, 7.80 g/L 的储备液。将上述 5 种储备液各取 500 μL 混合、摇匀,即得含党参炔苷 1.21 g/L、茯苓酸 0.76 g/L、甘草酸 2.45 g/L、苍术内酯Ⅲ 0.72 g/L 和白术内酯Ⅰ 1.56 g/L 的混合对照品储备液。

1.3 供试品溶液的制备

取丸剂研碎,并称取 1.00 g,加入乙醇 15 mL,超声提取 30 min,过滤。滤渣再重复提取 2 次。合并提取液并浓缩,转移至 10 mL 容量瓶中,用乙醇定容,摇匀;取其中 1 mL 于 16 000 r/min 速率下离

心 10 min,上清液作为供试品溶液。

1.4 色谱条件

色谱柱:HIQ SIL C₁₈V 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相:0.5% 冰乙酸水溶液为流动相 A,甲醇为流动相 B;梯度洗脱程序:0-40 min, 80% A-20% A;流速:1.0 mL/min;进样量:10 μL;漂移管温度 55 ℃;喷雾器加热级别:60%;载气:氮气,压力 0.2 MPa;信号增益值 50。

2 结果与讨论

2.1 色谱条件的优化

2.1.1 检测器的选择

由于欲测定的样品中苍术内酯Ⅲ和白术内酯Ⅰ的紫外吸收比较弱,且苍术内酯Ⅲ含量较低,为了提高检测的灵敏度,本文采用蒸发光散射检测器检测。以信噪比(S/N)为指标,分别对蒸发光散射检测器的漂移管温度和载气压力进行了优化。结果在漂移管温度 55 ℃、载气压力 0.2 MPa(30 psi)时,可以获得最佳的信噪比。

2.1.2 流动相及洗脱程序的优化

本文的前期研究工作发现,四君子丸提取物的组成复杂,干扰成分多,欲测定的各组分的保留因子范围较宽,不适宜等度洗脱,因此选择了梯度洗脱。流动相分别选择甲醇-水(含冰乙酸)、甲醇-水(含磷酸)体系进行梯度洗脱试验,相对来说,前者比后者的分离度好,灵敏度高。应用不同梯度陡度(T)的甲醇-水(含冰乙酸)体系进行试验的结果表明,在 0-40 min,甲醇的体积比从 20% 升至 80%,即 T = 0.015 时,可在 40 min 内使所测定的组分分离。

为了考察冰乙酸的浓度对测定组分色谱行为的影响,在 T = 0.015 条件下,分别用 0~1.5% (体积分数)的冰乙酸进行梯度洗脱。结果表明,当以甲醇和 0.5% 冰乙酸水溶液为流动相时,各色谱峰的对称性较好,峰形尖锐,且各峰与相邻峰的分离度均大于 1.2,所以选择了 1.4 节所述的流动相条件。

2.2 系统的适用性

取供试品溶液 10 μL 进样,记录色谱图,党参炔苷、茯苓酸、甘草酸、苍术内酯Ⅲ和白术内酯Ⅰ的保留时间分别为 7.1, 11.6, 17.2, 23.4 和 26.5 min,各峰与相邻峰的分离度均大于 1.2。供试品及对照品的色谱图见图 1。

2.3 方法学考察

2.3.1 线性方程、检出限及精密度

将对照品储备液稀释成不同的浓度,按前述色谱条件测定峰面积,分别以各分析物色谱峰面积

图 1 (a)混合对照品和(b)供试品的色谱图
Fig. 1 Chromatograms of (a) a mixture of standards and (b) a sample of Sijunzi bolus

1. lobetyolin ; 2. pachymic acid ; 3. glycyrrhizic acid ; 4. atractylenoide Ⅲ ; 5. atractylenolide Ⅰ .

(*Y*)的对数值为纵坐标、质量浓度(*X* , g/L)的对数值为横坐标绘制标准曲线 ,得到党参炔苷、茯苓酸、甘草酸、苍术内酯Ⅲ和白术内酯Ⅰ的线性方程、相关系数和线性范围(见表 1)。取混合对照品储备液不断稀释后进样分析 ,以 3 倍信噪比确定检出限 ,结果见表 1。

取一定浓度的混合对照品溶液 ,分别进行峰面积和保留时间的日内及日间测定的精密度(以相对标准偏差(RSD)计)考察。在同一天连续进样 6 次 ,计算日内精密度 ;每份样品连续测定 6 d ,计算日间精密度 ,结果亦列于表 1。表 1 的结果表明 ,5 种分析物峰面积和保留时间的 RSD 均较小 ,表明方法的重复性良好。

表 1 5 种分析物的线性方程、线性范围、相关系数、检出限及精密度(*n* = 6)
Table 1 Regression equations , linear ranges , correlation coefficients , detection limits and precisions (*n* = 6) of the five analytes

Analyte	Regression equation *	Correlation coefficient	Linear range/ (g/L)	Detection limit/ (mg/L)	RSD (Intra-day)/%		RSD (Inter-day)/%	
					Peak area	Retention time	Peak area	Retention time
Lobetyolin	lg <i>Y</i> = 1. 406 lg <i>X</i> + 8. 647	0. 9992	0. 076 – 1. 21	4. 73	0. 84	1. 01	1. 25	1. 45
Pachymic acid	lg <i>Y</i> = 1. 287 lg <i>X</i> + 6. 302	0. 9996	0. 048 – 0. 76	2. 97	0. 67	0. 94	0. 95	1. 42
Glycyrrhizic acid	lg <i>Y</i> = 1. 178 lg <i>X</i> + 5. 673	0. 9997	0. 153 – 2. 45	4. 79	0. 91	0. 96	1. 32	1. 36
Atractylenoide Ⅲ	lg <i>Y</i> = 1. 3431 lg <i>X</i> + 6. 854	0. 9997	0. 045 – 0. 72	5. 63	1. 05	0. 98	1. 43	1. 52
Atractylenolide Ⅰ	lg <i>Y</i> = 0. 983 lg <i>X</i> + 5. 714	0. 9995	0. 098 – 1. 56	6. 09	0. 98	1. 07	1. 29	1. 65

* *Y* : peak area ; *X* : mass concentration , g/L.

按 1. 3 节的方法平行制备 6 份供试品 ,测定并计算 5 种有效成分的含量 ,党参炔苷、茯苓酸、甘草酸、苍术内酯Ⅲ和白术内酯Ⅰ含量的 RSD 分别为 2. 25% , 1. 87% , 1. 58% , 1. 65% 和 1. 72% ,表明方法的重现性良好。

2.3.2 供试品溶液的稳定性

取新制备的同一份供试品溶液 ,分别在室温下放置 0 , 1 , 2 , 4 , 8 , 12 , 24 h 后进样分析。党参炔苷、茯苓酸、甘草酸、苍术内酯Ⅲ和白术内酯Ⅰ峰面积的 RSD 分别为 1. 25% , 1. 67% , 1. 19% , 1. 43% 和 1. 38% ,表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.3.3 加标回收率

精密称取自制的丸剂 12 份 ,分为 4 组 ,每组 3 份。每组样品中分别精密加入混合对照品储备液 0 , 20 , 50 , 100 μL ,按所建立的方法进行供试品溶液的制备和测定 ,计算党参炔苷、茯苓酸、甘草酸、苍术内酯Ⅲ和白术内酯Ⅰ的含量 ,计算各组分的回收率 ,结果见表 2。

表 2 结果表明 ,所有组分的加标回收率在 97. 13% ~ 100. 25% 范围内 ,RSD 均小于 2. 44% ,说明本方法准确可靠。

表 2 样品中 5 种成分的加标回收率(*n* = 3)
Table 2 Spiked recoveries of the five components in a sample (*n* = 3)

Component	Added/ mg	Found/ mg	Recovery/ %	RSD/ %
Lobetyolin	0	0. 628	–	1. 53
	0. 121	0. 747	98. 57	1. 59
	0. 302	0. 928	99. 56	1. 41
	0. 603	1. 227	99. 34	1. 86
Pachymic acid	0	0. 123	–	1. 46
	0. 076	0. 198	98. 99	1. 98
	0. 189	0. 312	100. 17	1. 23
	0. 378	0. 501	99. 96	1. 47
Glycyrrhizic acid	0	2. 967	–	1. 34
	0. 245	3. 212	100. 25	1. 23
	0. 612	3. 573	99. 04	1. 65
	1. 224	4. 156	97. 13	1. 52
Atractylenoide Ⅲ	0	0. 016	–	1. 36
	0. 072	0. 087	99. 64	2. 04
	0. 181	0. 192	98. 43	2. 18
	0. 362	0. 350	97. 26	2. 44
Atractylenolide Ⅰ	0	1. 259	–	1. 37
	0. 157	1. 414	98. 99	1. 84
	0. 392	1. 652	100. 24	1. 79
	0. 784	2. 023	97. 42	1. 48

2.4 样品的测定

分别取 5 个厂家生产的四君子丸,按 1.3 节的

方法操作,取供试品溶液 10 μL 进样分析,并计算丸剂中 5 种成分的含量,结果见表 3。

表 3 四君子丸中 5 种有效成分的含量(n =3)
Table 3 Contents of the five effective components in Sijunzi bolus (n =3)

Component	Sample A		Sample B		Sample C		Sample D		Sample E	
	Content/ (mg/g)	RSD/ %	Content/ (mg/g)	RSD/ %	Content/ (mg/g)	RSD/ %	Content/ (mg/g)	RSD/ %	Content/ (mg/g)	RSD/ %
Lobetyolin	0.664	2.24	0.689	2.12	0.594	2.10	0.46	1.88	0.528	2.35
Pachymic acid	0.095	2.28	0.102	2.00	0.101	2.28	0.131	1.74	0.140	2.05
Glycyrrhizic acid	3.303	1.68	1.928	1.74	2.064	1.73	2.119	1.79	3.570	1.33
Atractylenoide III	0.004	1.78	0.008	2.06	0.009	1.57	0.010	1.61	0.007	1.41
Atractylenolide I	1.342	1.54	0.814	1.62	0.794	1.56	1.144	1.49	1.107	2.12

3 结语

本文所建立的反相高效液相色谱-蒸发光散射检测梯度洗脱方法能够准确、灵敏地同时测定四君子丸中党参炔苷、茯苓酸、甘草酸、苍术内酯Ⅲ和白术内酯Ⅰ的含量,测定结果可靠,为四君子丸的质量控制提供了简单、有效的检测手段。

参考文献：

[1] Pharmacopoeia Commission of People 's Republic of China. Pharmacopoeia of People 's Republic of China : Part 1. Beijing : Chemical Industry Press (国家药典委员会. 中华人民共和国药典 : 一部. 北京 : 化学工业出版社), 2005 : 420

[2] Liu Y. [PhD Dissertation]. Beijing : Peking Union Medical College (刘扬. [博士学位论文]. 北京 : 中国协和医科大学), 2006

[3] Song D , Wang Z T , Li L Y , et al. Journal of Emergency in Traditional Chinese Medicine (宋丹,王峥涛,李隆云,等. 中国中医急症), 2008 , 17(7) : 963

[4] Li C Q , He L C , Dong H Y , et al. J Ethnopharmacol , 2007 , 114(2) : 212

[5] Zhao G Z , Hong X Z , Dai S W , et al. China Pharmacy (赵

桂芝,洪学智,戴诗文,等. 中国药房), 2009 , 20 (3) : 230

[6] Yasukawa K , Kaminaga T , Kitanaka S , et al. Phytochemistry , 1998 , 48(8) : 1357

[7] Lin J C , Cherng J M , Hung M S , et al. Antivir Res , 2008 , 79(1) : 6

[8] Hennell J R , Lee S , Khoo C S , et al. J Pharm Biomed Anal , 2008 , 47(3) : 494

[9] Sun Q W , He S Z , Huang M. Lishizhen Medicine and Materia Medica Research (孙庆文,何顺志,黄敏. 时珍国医国药), 2007 , 18(8) : 1931

[10] Hao G M , Li H X , Zhao C J , et al. Journal of Shenyang Pharmaceutical University (郝桂明,李欢欣,赵春杰,等. 沈阳药科大学学报), 2002 , 19(5) : 337

[11] Shou D , Dai S W , Zhang J M , et al. Chinese Journal of Chromatography (寿旦,戴诗文,章建民,等. 色谱), 2008 , 26(5) : 637

[12] Su T M , Wang M J , Wu J Z , et al. Strait Pharmaceutical Journal (宿廷敏,王敏娟,吴锦忠,等. 海峡药学), 2008 , 20(6) : 71

[13] Duan Q , Li X L , Wang S J , et al. Chinese Traditional and Herbal Drugs (段启,李露兰,王少军,等. 中草药), 2006 , 37(2) : 284

[14] Zhang L , Liu Z L , Song Z Q , et al. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae (张玲,刘振丽,宋志前,等. 中国实验方剂学杂志), 2007 , 13(6) : 4