

# UPLC-PDA 测定白术中两种活性成分 及不同产地药材质量研究<sup>\*</sup>

邢会香 张学花 刘红 肖秋霞 朱海俊 郭静<sup>\*\*</sup>

(青海普兰特药业有限公司,青海 西宁 810000)

**摘 要:**目的 建立白术中白术内酯Ⅱ、Ⅲ含量测定的超高效液相色谱(UPLC)方法,并分析 16 批不同产地药材的含量差异。方法 采用 CORTECS UPLC T3 色谱柱(100×2.1 mm,1.6 μm);乙腈-0.1% 磷酸溶液进行梯度洗脱;流速 0.35 mL·min<sup>-1</sup>;检测波长 220 nm;柱温 40℃。结果 白术内酯Ⅱ和白术内酯Ⅲ质量浓度线性范围分别为 0.4212~52.65 μg·mL<sup>-1</sup>( $r=1.0000$ )、0.4164~52.05 μg·mL<sup>-1</sup>( $r=1.0000$ );平均加样回收率分别为 102%、105%,RSD 均<2.0%;16 批不同产地药材中白术内酯Ⅱ、Ⅲ含量总和和差别较大,最大 0.122%、最小 0.014%,其中河北的较均一,其它产地差异较大。结论 所建 UPLC 方法可准确排除阴性干扰,且专属性强、重复性好,为今后《中国药典》控制白术质量奠定基础。

**关键词:**白术;白术内酯Ⅱ;白术内酯Ⅲ;超高效液相色谱法;产地

**中图分类号:**R284.1 **文献标识码:**A **文章编号:**2096-1340(2021)06-0067-06

**DOI:**10.13424/j.cnki.jsctcm.2021.06.015

白术是常用的补益药,为菊科植物白术(*Atractylodes macrocephala* Koidz.)的干燥根茎,性温,味甘、苦<sup>[1]</sup>,具有健脾益气、燥湿利水、止汗、安胎的功效,可用于脾虚食少,腹胀泄泻,痰饮眩悸,水肿,自汗,胎动不安<sup>[2]</sup>。白术的化学成分主要有挥发油、多糖、内酯类成分等<sup>[3]</sup>,内酯类成分具有抗炎、抗癌、促进营养物质吸收和调节胃肠道功能的作用<sup>[4]</sup>,《中华人民共和国药典》2015 年版<sup>[5]</sup>与 2020 年版<sup>[2]</sup>白术药材项下均未有含量检测项,故本研究选择白术内酯Ⅱ、Ⅲ为研究对象并建立其在白术中的含量测定方法。相关文献含量多以 HPLC 测定白术内酯类成分<sup>[6-9]</sup>,HPLC 进样体积大、流速大、分析时间长,本研究采用 UPLC-PDA 测定白术内酯类成分,较 HPLC 更节省时间、溶剂,且能通过峰纯度准确排除阴性干扰,提高检测灵敏度、缩短检验周期。采用本研究方法分析了 16 批市场主流药材的质量情况,也为药材的资源评价和合理使用提供科学参考。

## 1 材料

**1.1 仪器** ACQUITY UPLC H-CLASS 超高效液相

色谱仪(ACQUITY UPLC PDA eLambda 检测器, Waters);MS105 型(十万分之一)电子分析天平(METTLER TOLEDO);ML-204T-02 型(万分之一)电子分析天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司];JP-080ST 型超声清洗仪(深圳市洁盟清洗设备有限公司);TG16-WS 型高速离心机(常州金坛良友仪器有限公司)。

**1.2 药材与试剂** 白术内酯Ⅱ对照品(中国食品药品检定研究院,批号:111976-201501,纯度:99.9%);白术内酯Ⅲ对照品(中国食品药品检定研究院,批号:111978-201501,纯度:99.9%);白术药材共 16 批次,经鉴定均为菊科植物白术 *Atractylodes macrocephala* Koidz. 的干燥根茎;甲醇、乙腈均为进口色谱纯,磷酸等其他试剂均为分析纯,水为屈臣氏蒸馏水。

## 2 方法与结果

**2.1 色谱条件**<sup>[10-15]</sup> 色谱柱:CORTECS UPLC T3 (100×2.1 mm,1.6 μm);流速为 0.35 mL·min<sup>-1</sup>;检测波长为 220 nm;进样量为 5 μL;以乙腈为流动

<sup>\*</sup> 基金项目:西宁市科技计划项目(2019-Y-06)

<sup>\*\*</sup> 通讯作者:郭静,高级工程师。E-mail:wisemouse1@126.com

相 A,以 0.1% 磷酸溶液为流动相 B,按照表 1 进行梯度洗脱。理论板数按白术内酯Ⅲ峰计算应不低于 4500。

表 1 梯度洗脱程序

时间 (min)	流动相 A (%)	流动相 B (%)
0.0	44	56
1.0	44	56
2.0	36	64
3.5	36	64
4.0	43	57
8.0	43	57
9.0	90	10
12.0	90	10
13.0	44	56

2.2 溶液的制备

2.2.1 空白溶液 70% 甲醇水溶液。

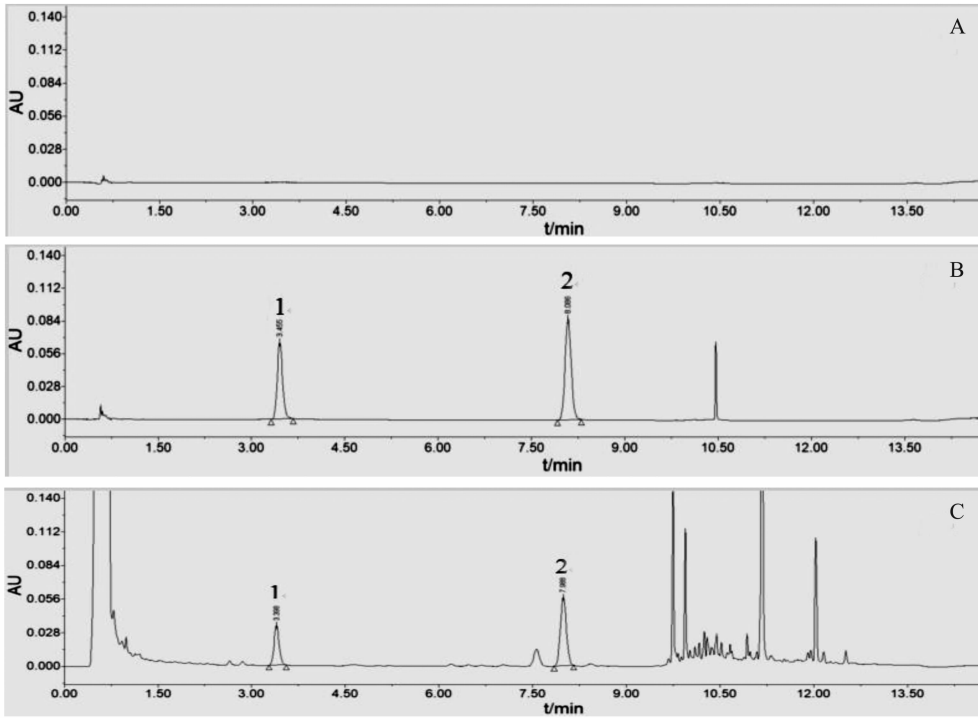
2.2.2 对照品溶液 精密称定白术内酯Ⅱ对照品 10.54 mg、白术内酯Ⅲ对照品 10.42 mg 分别置于 100 mL 容量瓶中,加 70% 甲醇水溶液使溶解并定容至刻度,摇匀,分别精密移取上述溶液各 10 mL 置于同一 100 mL 容量瓶中,加 70% 甲醇水溶液定容至刻度,摇匀,即得。

2.2.3 供试品溶液 取本品粉末(过三号筛)约

0.5 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入 70% 甲醇水溶液 50 mL,称定重量,超声处理 10 分钟,放冷,再称定重量,用 70% 甲醇水溶液补足减失的重量,摇匀,离心( $10000\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ , 5 min),滤过,取续滤液,即得,进样前用 0.22  $\mu\text{m}$  微孔滤膜过滤。

2.3 系统适用性试验 按照 2.2 方法分别制备得到对照品溶液和供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件进行测定,记录色谱。结果显示对照品连续进样 5 针,白术内酯Ⅱ和白术内酯Ⅲ峰面积的 RSD 分别为 0.1%、0.1%,保留时间的 RSD 分别为 0.3%、0.4%,对照品和供试品溶液中白术内酯Ⅱ和白术内酯Ⅲ色谱峰与前后杂质峰分离度均大于 1.50,白术内酯Ⅲ色谱峰的理论塔板数均不小于 4500,提示该色谱系统适用性良好。

2.4 专属性试验 按照 2.2 方法分别制备得到空白溶液、对照品溶液、供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件进行测定,记录色谱,见图 1。结果显示空白溶液对主色谱峰无干扰,对照品和供试品溶液中主色谱峰保留时间一致。另采用 PDA 检测器对对照品溶液、供试品溶液中的主色谱峰进行峰光谱扫描和纯度检测。结果显示对照品和供试品溶液中主色谱峰纯度角度小于纯度阈值,纯度符合要求,具体数据见表 2,本试验提示该方法专属性良好。



注:A. 空白溶液;B. 白术内酯Ⅱ和白术内酯Ⅲ对照品;C. 供试品溶液;1. 白术内酯Ⅲ;2. 白术内酯Ⅱ

图 1 白术及其对照品高效液相色谱图

表2 白术和对照品主色谱峰纯度角度和纯度阈值列表				
主色谱峰名称	白术内酯Ⅲ		白术内酯Ⅱ	
	纯度角度	纯度阈值	纯度角度	纯度阈值
对照溶液	0.267	0.757	0.277	0.670
供试品溶液	1.537	3.482	1.264	2.765

2.5 线性关系考察

**2.5.1 白术内酯Ⅱ对照品线性关系考察** 精密称定白术内酯Ⅱ对照品 10.54 mg,加 70% 甲醇水溶液制成 105.3  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的白术内酯Ⅱ对照品母液。分别精密量取适量上述母液,稀释配制成浓度为 0.4212、2.106、10.53、31.59、52.65  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的系列对照品溶液。按 2.1 项下色谱条件进行测定,记录色谱。以质量浓度( $X, \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )为横坐标、峰面积( $Y$ )为纵坐标进行线性拟合,得回归方程  $Y = 56920X + 19.391 (r = 1.0000)$ 。结果表明,白术内酯Ⅱ在 0.4212 ~ 52.65  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  线性关系良好。

**2.5.2 白术内酯Ⅲ对照品线性关系考察** 精密称定白术内酯Ⅲ对照品 10.42 mg,加 70% 甲醇水溶液制成 104.1  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的白术内酯Ⅲ对照品母液。分别精密量取适量上述母液,稀释配制成浓度为 0.4164、2.082、10.41、31.23、52.05  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的系列对照品溶液。按 2.1 项下色谱条件进行测定,记录色谱。以质量浓度( $X, \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )为横坐标、峰面积( $Y$ )为纵坐标进行线性拟合,得回归方程  $Y = 37992X + 20.82 (r = 1.0000)$ 。结果表明,白术内酯Ⅲ在 0.4164 ~ 52.05  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  线性关系良好。

**2.6 重复性试验** 由实验员(甲)分别取白术(河北省保定市安国西伏落镇,批号:B201)药材粉末(过三号筛)约 0.5 g,平行 6 份样品,精密称定,按照 2.2.3 方法制备得到 6 份供试品溶液。按 2.1 项下色谱条件进行测定,记录色谱。结果白术内酯Ⅱ和白术内酯Ⅲ平均含量分别为 0.069% 和 0.050%,RSD 分别为 1.1%、1.1%,提示该方法重复性良好。

**2.7 中间精密度试验** 由另外一名实验员(乙)分别取白术药材粉末(过三号筛)约 0.5 g,平行 6

份样品,精密称定,按照 2.2.3 方法制备得到 6 份供试品溶液。按 2.1 项下色谱条件用另一台 G18QSM448A 超高压相色谱仪进行测定,记录色谱。结果甲乙两名实验员在不同仪器上测得白术内酯Ⅱ和白术内酯Ⅲ含量的 RSD 分别为 2.4%、3.6%,提示该方法中间精密度良好,具体数据见表 3。

表3 中间精密度试验结果( $n=9$ )

样品	白术内酯Ⅲ		白术内酯Ⅱ	
	质量分数(%)	RSD(%)	质量分数(%)	RSD(%)
甲-1	0.051		0.069	
甲-2	0.050		0.068	
甲-3	0.051		0.068	
甲-4	0.050		0.069	
甲-5	0.050		0.069	
甲-6	0.051	3.6	0.070	2.4
乙-1	0.053		0.070	
乙-2	0.050		0.071	
乙-3	0.053		0.074	
乙-4	0.056		0.071	
乙-5	0.053		0.071	
乙-6	0.053		0.071	

**2.8 加样回收试验** 取已知含量的白术药材粉末(过三号筛)约 0.25 g,平行 9 份样品,分为 3 组,分别加入 3 个质量分数水平(50%、100% 和 150%)的白术内酯Ⅱ和白术内酯Ⅲ对照品。按照 2.2.3 项下溶液制备方法制备得到 9 份供试品溶液。按 2.1 项下色谱条件进行测定,记录色谱并计算加样回收率,结果见表 4。

**2.9 稳定性试验** 取 2.2.3 项下供试品溶液适量,分别置于室温下放置 0、1、2、4、6、8、12、24 h 时按 2.1 项下色谱条件进行测定,记录色谱。结果供试品中白术内酯Ⅱ和白术内酯Ⅲ色谱峰峰面积的 RSD 值分别为 1.2% 和 0.7%。结果表明供试品在 70% 甲醇水溶液中 24 h 内稳定性良好,具体数据见表 5。

**2.10 耐用性试验** 本研究中耐用性试验是通过

微调测试条件中的单个变量观察结果的不受影响程度,改变的测试变量包括流动相组成、流速、柱温、色谱柱。结果表明该方法耐用性良好,具体数据见表 6。

**2.11 样品含量测定** 取 16 批次白术样品适量,按照 2.2.3 方法制备供试品溶液,再按 2.1 项下色谱条件进行测定,双样双针,记录色谱并计算样品含量,结果见表 7。

表 4 回收率试验结果( $n=9$ )

成分	编号	样品含量(μg)	加入量(μg)	测得量(μg)	回收率(%)	平均回收率(%)	RSD(%)
白术内酯Ⅱ	1	175.8	84.24	261.1	101	102	0.69
	2	175.2	84.24	261.3	102		
	3	176.3	84.24	262.0	102		
	4	169.3	168.48	342.1	103		
	5	169.6	168.48	343.0	103		
	6	170.2	168.48	342.4	102		
	7	168.5	252.72	427.8	103		
	8	168.0	252.72	428.0	103		
	9	169.0	252.72	426.9	102		
白术内酯Ⅲ	1	122.6	83.28	209.4	104	105	1.0
	2	122.3	83.28	209.5	105		
	3	123.0	83.28	210.1	105		
	4	118.1	124.92	250.4	106		
	5	118.4	124.92	250.6	106		
	6	118.8	124.92	251.4	106		
	7	117.6	208.2	333.2	104		
	8	117.2	208.2	332.8	104		
	9	117.9	208.2	332.2	103		

表 5 稳定性试验结果

放置时间(h)	白术内酯Ⅱ		白术内酯Ⅲ	
	峰面积	RSD(%)	峰面积	RSD(%)
0	383859	1.2%	193022	0.7%
1	384443		193669	
2	384865		193732	
4	385911		193781	
6	388021		193753	
8	389215		194685	
12	391044		195558	
24	397208		197471	

表 6 耐用性试验结果

测试变量		白术内酯Ⅱ		白术内酯Ⅲ	
		平均含量(μg·g <sup>-1</sup> )	RSD(%)	平均含量(μg·g <sup>-1</sup> )	RSD(%)
流动相组成	乙腈-0.09% 磷酸	699	0.9	518	1.2
	乙腈-0.10% 磷酸	690		530	
	乙腈-0.11% 磷酸	702		520	
流速(mL·min <sup>-1</sup> )	0.34	688	0.2	529	0.2
	0.35	690		530	
	0.36	690		528	
柱温(℃)	39	691	0.08	529	0.3
	40	690		530	
	41	691		527	
色谱柱	ACQUITY UPLC HSS T <sub>3</sub> (100×2.1 mm,1.8 μm)	701	1.1	532	0.6
	ACQUITY UPLC BEH C <sub>18</sub> (100×2.1 mm,1.7 μm)	704		526	
	CORTECS UPLC T <sub>3</sub> (100×2.1 mm,1.6 μm)	690		530	

表 7 白术样品中白术内酯Ⅱ和白术内酯Ⅲ含量测定结果(*n* = 2)

批次	产地	白术内酯Ⅱ 质量分数(%)	白术内酯Ⅲ 质量分数(%)	白术内酯Ⅱ和白术内酯Ⅲ 质量分数总和(%)
1	浙江省金华市磐安县玉山镇	0.070	0.052	0.122
2	浙江省金华市磐安县尚湖镇	0.012	0.010	0.022
3	浙江省金华市磐安县窈川乡	0.014	0.012	0.026
4	浙江省金华市磐安县窈川乡	0.025	0.024	0.049
5	浙江省金华市磐安县玉山镇	0.012	0.016	0.028
6	河北省保定市安国郑章镇	0.024	0.024	0.048
7	河北省保定市安国大王店镇	0.038	0.039	0.077
8	河北省保定市安国伍仁桥镇	0.041	0.036	0.077
9	河北省保定市安国石佛镇	0.022	0.023	0.045
10	河北省保定市安国西伏落镇	0.032	0.028	0.060
11	安徽省亳州市譙城区华佗镇	0.038	0.057	0.095
12	安徽省亳州市譙城区芦庙镇	0.007	0.007	0.014
13	安徽省亳州市譙城区古井镇	0.045	0.070	0.115
14	安徽省亳州市譙城区魏岗镇	0.031	0.065	0.096
15	安徽省亳州市譙城区十八里镇	0.015	0.020	0.035
16	安徽省亳州市譙城区譙东镇	0.012	0.009	0.021

3 讨论

3.1 检测波长的选择 对白术内酯Ⅱ和白术内酯Ⅲ对照品溶液分别进行 190 ~ 400 nm 扫描,结果

白术内酯Ⅱ在 221 nm 处有最大吸收,白术内酯Ⅲ在 193,220 nm 处有最大吸收,兼顾白术内酯Ⅱ和白术内酯Ⅲ的最大吸收,最终选择 220 nm 为检测

波长。

**3.2 色谱条件的选择** 本研究考察了柱温、流速、进样体积对色谱峰分离的效果,结果当柱温 30 ℃、流速 0.30 mL · min<sup>-1</sup>、进样体积 10 μL 时峰形均未达到要求,柱温 40 ℃、流速 0.35 mL · min<sup>-1</sup>、进样体积 5 μL 时峰形符合要求。

**3.3 提取条件的选择** 查阅文献,提取条件有甲醇、乙醇等溶剂超声或回流处理<sup>[9,16-20]</sup>,故本研究考察了不同比例和不同类别的提取溶剂(30%、50%、70% 甲醇水溶液,50% 乙腈水溶液和 50% 乙醇水溶液)进行提取,同时考察了不同提取方式(超声和回流)、不同提取时间(10、20、30 min)和不同溶剂量(10、25、50、100 mL)对白术内酯Ⅱ和白术内酯Ⅲ含量的影响,结果发现提取溶剂和溶剂量对结果有较显著的影响,而提取方式和提取时间对含量结果影响较小,因此最终确定最佳提取条件为 50 mL 70% 甲醇水溶液超声提取 10 min。

**3.4 不同产地药材质量的差异** 本研究采用 UPLC-PDA 对浙江省、河北省、安徽省不同地区的白术药材同时测定了白术内酯Ⅱ和白术内酯Ⅲ的含量,结果发现 16 批药材中浙江省金华市磐安县玉山镇和安徽省亳州市谯城区古井镇的白术内酯Ⅱ和白术内酯Ⅲ总含量较高,但该两个省其它地区药材含量均参差不齐,差异较大,只有产地河北的整体均一性较好。虽白术为浙江省的道地药材,但整体含量偏低的较多,这可能与药材采收时间、生长年限等因素有关。

综上所述,该方法操作简单,节省成本,可以同时测定白术中白术内酯Ⅱ和白术内酯Ⅲ的含量且重复性、准确度及耐用性良好,本研究为今后中国药典增加含量测定指标,控制白术药材质量奠定了良好的基础。

#### 参考文献

[1] 李家实. 中药鉴定学[M]. 上海:上海科学技术出版社,1996.  
[2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(1部)[M]. 北京:中国医药科技出版社,2020:108.  
[3] 段启,许冬谨,刘传祥,等. 白术的研究进展[J]. 中草药,2008,39(5):800-802.  
[4] 李伟. 白术的有效物质及质量研究[D]. 南京:南京中医药大学,2001.

[5] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(1部)[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:103-104.  
[6] 祁银涛,杨杰,李建娟,等. 白术药材质量标准研究[J]. 时珍国医国药,2012,23(5):1260-1262.  
[7] 王知青,尹华,王玲,等. 白术的质量评价研究[J]. 中华中医药学刊,2011,29(4):823-825.  
[8] 张程荣,曹岗,丛晓东,等. 白术化学成分和质量控制研究进展[J]. 中华中医药杂志,2011,26(10):2328-2331.  
[9] 邝俊维,卿萍,周子虬,等. HPLC 法同时测定白术中白术内酯Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ的含量[J]. 湖南师范大学自然科学学报,2017,40(6):55-60.  
[10] 张兵,张丽娜,韩鹏军,等. 白术中 3 种内酯成分的含量测定及指纹图谱研究[J]. 天津中医药大学学报,2018,37(5):411-415.  
[11] 许舒颜. 不同地区白术饮片中白术内酯的含量测定[J]. 江西中医药,2015,46(5):56-57.  
[12] 王小平,杨丽珠,陈育青,等. 多波长高效液相法同时测定土炒白术中 3 种白术内酯含量[J]. 中国中医药科技,2019,26(1):44-47.  
[13] 叶燕,程雪梅,俞桂新,等. 白术药材 HPLC 指纹图谱研究[J]. 江苏中医药,2009,41(4):59-60.  
[14] 李木子,王京辉,郭洪祝,等. HPLC 法测定白术饮片中多种化学成分的含量[J]. 药物分析杂志,2017,37(9):1585-1592.  
[15] 张英丰,朱黎霞,梁东辉,等. HPLC 同时测定黄芪白术药对提取物毛蕊异黄酮苷、白术内酯Ⅰ、白术内酯Ⅲ含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(9):86-89.  
[16] 尹华,王知青,王玲,等. HPLC-DAD 波长切换法同时测定白术中白术内酯Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ和苍术酮的含量[J]. 中华中医药杂志,2013,28(1):233-236.  
[17] 闫晗,孙媛媛,于治国,等. HPLC 法同时测定白术药材中白术内酯Ⅰ等 4 种有效成分的含量[J]. 沈阳药科大学学报,2015,32(9):699-702.  
[18] 张东,周其. HPLC 法测定白术药材中白术内酯Ⅰ和白术内酯Ⅲ含量[J]. 北方药学,2017,14(3):1-2.  
[19] 刘玉强,甄毕贤,才谦. 不同地区白术药材及饮片中白术内酯Ⅱ的含量测定[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(4):120-122.  
[20] 谢丽静,高秋芳,杨昊钰. 不同方法炮制后白术功效指标含量变化比较[J]. 中国药业,2019,28(2):13-16.

(收稿日期:2020-08-03 编辑:宋蓓)