

HPLC测定葶苈降血脂胶囊中熊果酸的含量

王威,李红岩,张慧丽,王艳艳(吉林省中医中药研究院,长春 130021)

摘要:目的 建立高效液相色谱法测定葶苈降血脂胶囊中熊果酸的含量。方法 采用 Diamonsil ODS 色谱柱;流动相为乙腈-甲醇-水(65:10:25,每 100 mL 加乙酸铵 0.5 g);检测波长为 220 nm。结果 熊果酸进样量在 1.592~7.960 μg 内与峰面积积分值呈良好的线性关系($r=0.9999$);平均加样回收率为 99.80%(RSD=1.89%, $n=6$)。结论 方法简便、准确,可作为该制剂的质量控制方法。

关键词:熊果酸;葶苈降血脂胶囊;高效液相色谱法

中图分类号:R17.77;R917.101 文献标识码:A 文章编号:1007-7693(2008)04-0331-03

Determination of Ursolic Acid in Tingli Jiangxuezhishi Capsules by HPLC

WANG Wei, LI Hong-yan, ZHANG Hui-li, WANG Yan-yan (Jilin Province Academy of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica, Changchun 130021, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish an HPLC method for the determination of ursolic acid in Tingli Jiangxuezhishi capsules.

METHODS The Diamonsil ODS column was used as the stationary phase with the mobile phase of acetonitrile-methanol-water (65:10:25, ammonium acetate 0.5 g·100 mL⁻¹). The detection wavelength was 220 nm. **RESULTS** The linear range of ursolic acid was 1.592~7.960 μg with the correlation coefficient 0.9999 between the injection quantity and the peak area. The average recovery was 99.80% with the RSD of 1.89% ($n=6$). **CONCLUSION** The method is convenient and accurate. It can be used for the quality control of ursolic acid in Tingli Jiangxuezhishi capsules.

KEY WORDS: ursolic acid; Tingli Jiangxuezhishi capsules; HPLC

葶苈降血脂胶囊是由葶苈子、山楂、茵陈、黄芩等 7 味中药组成的复方制剂。具有宣通导滞、通络散结、消痰渗湿。用于痰湿证引起的眩晕、四肢沉重、神疲少气、肢麻、胸闷、舌苔黄腻或白腻等症,临床见于高脂血症。熊果酸是山楂的活性成分,具有降血脂和抗氧化作用^[1]。原标准采用薄层扫描法测定熊果酸的含量,误差大、重复性差,且未将熊果酸和齐墩果酸分离,实际上测定的是两者的总含量。为了更好地控制制剂质量,本实验建立高效液相色谱法测定葶苈降血脂胶囊中熊果酸的含量,选择优化了提取方法和色谱条件,为该制剂的质量控制提供科学依据。

1 仪器与试剂

日本岛津 LC-10ATvp 溶剂输液泵, LC-10Avp 紫外检测器;日本岛津 2550UV 紫外分光光度计;德国赛多利斯 BP211D 分析天平。色谱柱 Diamonsil ODS(250 mm×4.6 mm, 5 μm),北京迪科马科学仪器有限公司;Hypersil ODS(250 mm×4.6 mm, 5 μm),大连依利特科学仪器有限公司;TSK gel ODS-80T_M(250 mm×4.6 mm, 5 μm),日本东洋株式会社。熊果酸对照品,批号:110742-200516,中国药品生物制品检定所提供。葶苈降血脂胶囊,通化金汇药业股份有限公司提供。乙腈、甲醇为色谱纯,美国 FISHER 公司;水为重蒸水;其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Diamonsil ODS 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈-甲醇-水(65:10:25,每 100 mL 加乙酸铵 0.5 g);检测波长:220 nm;流速:0.7 mL·min⁻¹。

2.2 对照品溶液的制备

精密称取熊果酸对照品适量,加甲醇制成每 1 mL 含 159.2 μg 的溶液,即得。

2.3 供试品溶液的制备

取葶苈降血脂胶囊内容物 8 g,混匀,取约 5 g,精密称定,置索氏提取器中,加乙醚适量,加热回流 4 h,提取液挥干,残渣用石油醚(30~60℃)浸泡 3 次,每次 30 mL(浸泡约 30 min),倾去石油醚(30~60℃)液,残渣加甲醇溶解,滤过,转移至 5 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,即得。

2.4 阴性对照溶液的制备

按处方制法制备缺少山楂药材的阴性对照样品,按供试品溶液的制备方法制成阴性对照溶液。

2.5 专属性试验

分别精密吸取供试品溶液、对照品溶液和阴性对照溶液各 20 μL ,按上述色谱条件进样,结果供试品色谱中,在与熊果酸对照品色谱相同的保留时间处有色谱峰,与其他组分能

基本达到基线分离, $R > 1.5$; 阴性对照色谱中, 在与熊果酸对照品色谱峰相同的保留时间处无色谱峰, 见图 1。

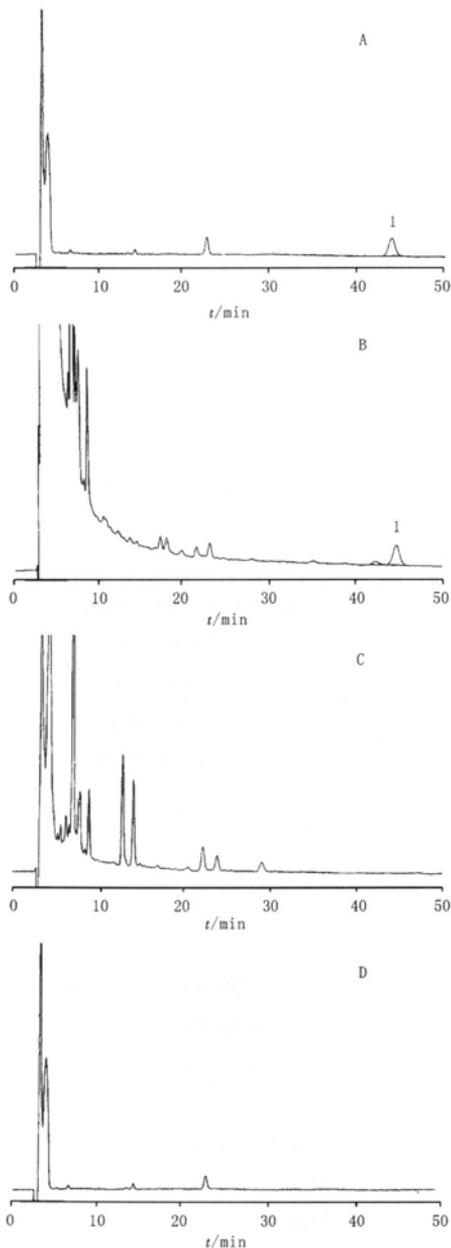


图 1 熊果酸对照品 (A)、葶苈降血脂胶囊 (B)、阴性对照 (C) 和溶剂 (D) HPLC 色谱图

1 - 熊果酸

Fig 1 HPLC Chromatograms of ursolic acid reference substance (A), Tingli Jiangxuezhhi capsules (B), negative sample (C), and solvent (D)

1 - ursolic acid

2.6 线性关系考察

精密称取熊果酸对照品适量, 加甲醇制成每 1 mL 含 796 μg 的溶液, 精密吸取 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mL, 分别置 2 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀。分别精密吸取各 20 μL 按上述色谱条件进样, 测定峰面积积分值。以峰面积积分值为纵坐标, 熊果酸对照品进样量为横坐标绘制标准曲线, 得回归方程 $Y = 81\ 619.9X - 5\ 244.9$, $r = 0.999\ 9$, 结果表明熊果酸

进样量在 1.592 ~ 7.960 μg 内与峰面积积分值呈良好的线性关系。

2.7 稳定性试验

精密吸取同一葶苈降血脂胶囊供试品溶液, 分别在 0, 4, 8, 24, 30 h 按上述色谱条件进样 20 μL , 测定熊果酸峰面积积分值, 计算得其 RSD 为 1.46%, 表明供试品溶液在 30 h 内基本稳定。

2.8 重复进样精密度试验

精密吸取同一葶苈降血脂胶囊供试品溶液 20 μL , 按上述色谱条件连续进样 6 次, 测定熊果酸峰面积积分值, 计算得其 RSD 为 1.98%。

2.9 重复性试验

取同一批号葶苈降血脂胶囊 (批号: 20050401) 6 份, 按样品测定方法进行测定, 计算得熊果酸的平均含量为 176.10 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$, RSD 为 2.44%。

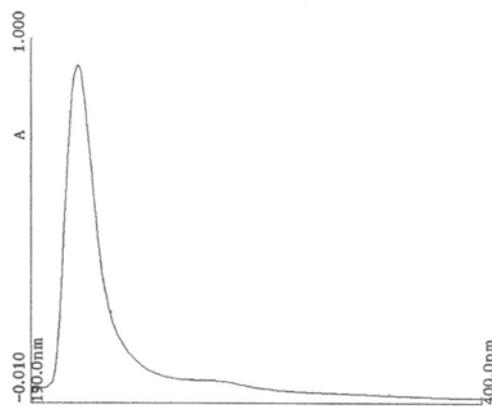


图 2 熊果酸紫外吸收图谱

Fig 2 UV absorption spectrum of ursolic acid

2.10 回收率试验

取同一批号葶苈降血脂胶囊 (批号: 20050401) 6 份, 每份 2.5 g, 精密加入熊果酸对照品溶液 3 mL, 挥干溶剂, 按样品测定方法进行测定, 计算得熊果酸的回收率为 99.80%, RSD 为 1.89%。

2.11 样品测定

取 10 个批号葶苈降血脂胶囊, 制备供试品溶液, 精密吸取供试品溶液和对照品溶液各 20 μL , 按上述色谱条件进样测定, 外标一点法计算熊果酸的含量, 结果见表 1。

表 1 葶苈降血脂胶囊中熊果酸含量测定结果

Tab 1 Determination results of ursolic acid in Tingli Jiangxuezhhi capsules

批号	熊果酸含量 / $\mu\text{g} \cdot \text{粒}^{-1}$	批号	熊果酸含量 / $\mu\text{g} \cdot \text{粒}^{-1}$
20050101	53.19	20050801	65.06
20050201	71.81	20051101	52.30
20050301	48.94	20060301	73.50
20050601	48.29	20060401	71.80
20050701	48.32	20060901	46.94

3 讨论

3.1 熊果酸属于三萜酸, 在天然植物中与齐墩果酸共存, 为

一对同分异构体,结构极为相似,极性差异极小。含量测定方法主要有薄层扫描法^[2]和高效液相色谱法^[3-4],薄层扫描法经硫酸显色后进行定量,但熊果酸和齐墩果酸在薄层板上不易分离,实际上测定的是二者的总含量,且操作繁琐,重复性差。采用本实验中的高效液相色谱法成功地分离熊果酸和齐墩果酸,由于葶苈降血脂胶囊中齐墩果酸的含量低,故仅以熊果酸为指标进行含量测定。

3.2 测定波长的选择

取熊果酸对照品溶液,在200~400 nm波长范围内进行扫描,结果在208 nm波长处有最大吸收,在此波长处测定流动相基线噪音大。为减少流动相基线噪音,文献采用210 nm^[3],215 nm^[5],220 nm^[6]作为检测波长,经多次试验结果表明220 nm基线噪音小,故选择220 nm作为熊果酸的测定波长。

3.3 流动相和色谱柱的选择

试验比较了流动相乙腈-甲醇-水(65:10:25,每100 mL加乙酸铵0.5 g)、甲醇-水-冰醋酸-三乙胺(83:17:0.04:0.02)、乙腈-0.2%磷酸溶液(80:20),结果表明以乙腈-甲醇-水作为流动相可使熊果酸和齐墩果酸基本达到基线分离。试验比较了色谱柱Diamonsil ODS、Hypersil ODS、TSK gel ODS-80T₀的分离效果,结果表明对色谱柱有一定的选择性,以Diamonsil ODS色谱柱峰形最佳,分离度好,柱效高。

3.4 提取溶剂的选择

根据熊果酸的性质,在制备供试品溶液的过程中,比较了采用乙醚、三氯甲烷、乙酸乙酯提取,结果表明以乙醚作为

提取溶剂提取效果好。

3.5 采用高效液相色谱法测定葶苈降血脂胶囊中熊果酸的含量方法可行,线性关系、稳定性、精密度、重复性、回收率试验良好,可作为的葶苈降血脂胶囊质量控制方法。

REFERENCES

- [1] LI G H, SUN J Y, ZHANG X L, *et al.* Experimental studies on antihyperlipidemia effects of two compositions from hawthorn in mice[J]. *Chin Tradit Herb Drugs(中草药)*, 2002, 33(1): 50-52.
- [2] MA J, LIANG W, LI X W. Determination of ursolic acid in *Crataegus Pinnatifida*[J]. *Heilongjiang Med J(黑龙江医药)*, 2005, 18(4): 235-236.
- [3] DONG L P, LIU C L, LV F L, *et al.* Determination of ursolic acid in *Crataegus Pinnatifida* by HPLC[J]. *Chin Tradit Pat Med(中成药)*, 2006, 28(8): 1 207-1 208.
- [4] XIE Y, WU C H, XIE B J. Determination of ursolic acid and oleanolic acid in *Crataegus Pinnatifida* by HPLC-ELSD[J]. *Chin Tradit Herb Drugs(中草药)*, 2004, 35(12): 1 417-1 418.
- [5] CUI J, CHEN Y Y, ZHENG C H, *et al.* Determination of oleanolic acid and ursolic acid in *Fructus Ligustri lucidi* and *Zhenqiliyan granules* by HPLC[J]. *Chin J Pharm(中国医药工业杂志)*, 2006, 37(7): 496-497.
- [6] ZAI H Y, SHEN Y H, SI Y S, *et al.* HPLC determination of ursolic acid in *Shenzhajangjiangzhi tablets*[J]. *Chin J Pharm Anal(药物分析杂志)*, 2005, 25(2): 237-238.

收稿日期:2007-06-21