

## RP-HPLC 法同时测定鹿蹄草中齐墩果酸和熊果酸的含量<sup>Δ</sup>

邹浩杰<sup>1\*</sup>, 邹盛勤<sup>2#</sup>(1. 奉化市中医院, 浙江 奉化 315500; 2. 宜春学院化学与生物工程学院, 江西 宜春 336000)

中图分类号 R284.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)43-4074-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.43.14

**摘要** 目的: 建立同时测定鹿蹄草中齐墩果酸和熊果酸含量的方法。方法: 采用反相高效液相色谱法。色谱柱为 Kromasil C<sub>18</sub> (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-水-磷酸(88:12:0.15, V/V/V), 流速为 0.9 ml/min, 柱温为 30 ℃, 检测波长为 210 nm。结果: 齐墩果酸进样量在 0.462~4.620 μg 时, 与峰面积积分值呈良好的线性关系( $r=0.999\ 98, n=6$ ), 平均加样回收率为 98.6%, RSD=2.1% ( $n=6$ ); 熊果酸进样量在 1.064~10.640 μg 时, 与峰面积积分值呈良好线性关系( $r=0.999\ 99, n=6$ ), 平均加样回收率为 98.5%, RSD=2.2% ( $n=6$ )。结论: 该方法操作简单、结果准确、重复性好, 适用于鹿蹄草中齐墩果酸和熊果酸含量的同时测定。  
**关键词** 鹿蹄草; 齐墩果酸; 熊果酸; 反相高效液相色谱; 含量测定

### Simultaneous Determination of Oleanolic Acid and Ursolic Acid in *Pyrolae herba* by RP-HPLC

WU Hao-jie<sup>1</sup>, ZOU Sheng-qin<sup>2</sup>(1. Fenghua Municipal Hospital of TCM, Zhejiang Fenghua 315500, China; 2. College of Chemistry and Bioengineering, Yichun University, Jiangxi Yichun 336000, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To establish a method for the content determination of oleanolic acid and ursolic acid in *Pyrolae herba*. METHODS: RP-HPLC method was adopted. The separation was achieved on a Kromasil C<sub>18</sub> (250 mm×4.6 mm, 5 μm) column with mobile phase consisted for methanol-water-phosphoric acid (88:12:0.15, V/V/V) at the flow rate of 0.9 ml/min. The column temperature was set at 30 ℃, and the detection wavelength was maintained at 210 nm. RESULTS: The linear range of oleanolic acid were 0.462-4.620 μg ( $r=0.999\ 98, n=6$ ) with an average recovery of 98.6% (RSD=2.1%,  $n=6$ ); the linear range of ursolic acid were 1.064-10.640 μg ( $r=0.999\ 99, n=6$ ) with an average recovery of 98.5% (RSD=2.2%,  $n=6$ ). CONCLUSIONS: The method is simple, accurate and repeatable, and is suitable for content determination of oleanolic acid and ursolic acid in *P. calliantha*.

**KEYWORDS** *Pyrola calliantha*; Oleanolic acid; Ursolic acid; RP-HPLC; Content determination

鹿蹄草为鹿蹄草科植物 *Pyrola calliantha* H. Andres 或普通鹿蹄草 *P. decorata* H. Andres 的干燥全草, 又名鹿衔草、破血丹等, 具有祛风湿、强筋骨、止血、止咳等功效, 临床上一般用于治疗风湿痹痛、肾虚腰痛、腰膝无力、月经量过多、久劳咳嗽<sup>[1]</sup>等。现代药理学研究表明, 鹿蹄草具有明显的抗菌、抗炎、抗肿瘤、抗氧化、降糖、降脂、保护心脑血管等作用<sup>[2]</sup>。鹿蹄草主要含有醌类、酚类、黄酮类、三萜类等化学成分<sup>[3-4]</sup>, 其中三萜类成分主要为齐墩果酸和熊果酸, 两者互为同分异构体, 通常以游离或结合为苷的形式广泛存在植物界<sup>[5]</sup>。齐墩果酸和熊果酸均具有降血糖、降血脂、抗肿瘤、抗炎、抗菌、保肝等功效<sup>[6-8]</sup>。目前, 关于鹿蹄草化学成分的研究报道较多, 但同时测定鹿蹄草中齐墩果酸和熊果酸含量的方法则鲜有报道。2010 年版《中国药典》(一部) 收录的鹿蹄草含量测定项下仅以水晶兰苷的含量为测定指标, 而无其主要活性成分三萜酸类的含量测

定标准<sup>[1]</sup>。为此, 笔者建立了反相高效液相色谱(RP-HPLC)法同时测定鹿蹄草中齐墩果酸和熊果酸含量的方法, 旨在为鹿蹄草的质量控制和进一步开发利用提供科学依据。

### 1 材料

#### 1.1 仪器

HPLC 仪, 包括 515 双泵、2996 型光电二极管阵列检测器和 Empower 中文色谱数据工作站(美国 Waters 公司); RO-MB-10D 型高纯水机(杭州永洁达膜分离设备厂); CP225D 型电子分析天平(德国 Sartorius 公司); DHG-9140A 型电热恒温鼓风干燥箱(上海恒科技仪器有限公司); FY177 型高速万能粉碎机(天津市泰斯特仪器有限公司); SK2510HP 型超声波清洗器(上海科导超声仪器有限公司, 功率: 250 W, 频率: 59 kHz)。

#### 1.2 药材

鹿蹄草购自安徽、云南和江西, 经宜春学院陈武教授鉴定为鹿蹄草科植物 *P. herba* 的全草。

#### 1.3 试剂

齐墩果酸和熊果酸对照品(中国食品药品检定研究院, 批号分别为: 110742-200314、110709-200304); 甲醇为色谱纯(国药集团化学试剂有限公司); 乙醇为分析纯(江西洪都生物化

Δ 基金项目: 国家高新技术研究发展计划(863 计划)课题项目(No.2002AA232317)

\* 副主任中药师。研究方向: 药物分析。E-mail: nbwhj302@163.com

# 通信作者: 教授, 硕士。研究方向: 药物分析。E-mail: zsqy-cxy@163.com

学有限公司);磷酸为分析纯(上海化学试剂有限公司一厂)。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱:Kromasil C<sub>18</sub>(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:甲醇-水-磷酸(88:12:0.15, V/V/V);流速:0.9 ml/min;柱温:30 ℃;检测波长:210 nm;进样量:10 μl。以齐墩果酸和熊果酸计,理论板数均大于10 000;分离度>1.9;对称因子分别为1.03和0.99。色谱见图1。

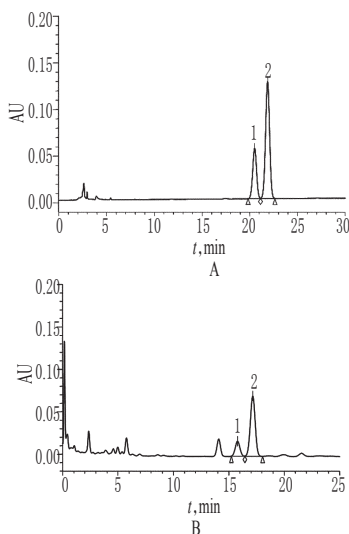


图1 高效液相色谱图

A.混合对照品;B.鹿蹄草;1.齐墩果酸;2.熊果酸

Fig 1 HPLC chromatograms

A.mixed control;B.*P. calliantha*;1.oleanolic acid;2.ursolic acid

### 2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液 分别精密称取齐墩果酸和熊果酸对照品2.31、5.32 mg,置10 ml量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,制成含每1 ml含齐墩果酸0.231 mg和熊果酸0.532 mg的对照品混合溶液。

2.2.2 供试品溶液 取鹿蹄草样品适量,置恒温干燥箱中于70 ℃下干燥6 h,用高速粉碎机粉碎,分别精密称取鹿蹄草样品粉末各约3 g(安徽:3.094 0 g,云南:3.095 4 g,江西宜春:3.095 1 g,江西樟树:3.069 4 g),分别置100 ml具塞锥形瓶中,加95%乙醇50 ml,称定质量,超声提取1 h,冷却,再次称定,用95%乙醇补足减失的质量,摇匀,经0.45 μm微孔滤膜滤过,取续滤液作为供试品溶液。

### 2.3 线性关系考察

用微量注射器分别精密吸取齐墩果酸和熊果酸对照品混合溶液2.0、6.0、10.0、15.0、20.0 μl,按上述色谱条件进样测定,记录峰面积,采用外标法进行定量分析。以对照品的进样量(x, μl)为横坐标,峰面积积分值(y)为纵坐标,进行线性回归,得齐墩果酸的回归方程为 $y=5.32 \times 10^5 x - 1.06 \times 10^4$ ( $r=0.999\ 98$ ),熊果酸的回归方程为 $y=5.04 \times 10^5 x - 9.07 \times 10^3$ ( $r=0.999\ 99$ )。结果表明,齐墩果酸和熊果酸进样量在0.462~4.60 μg、1.064~10.640 μg范围内与各自峰面积积分值呈良好线性关系。

### 2.4 精密度试验

分别精密吸取对照品混合溶液10 μl,按上述色谱条件平行进样5次,记录色谱图。结果,齐墩果酸和熊果酸峰的RSD分别为0.9%和0.7%( $n$ 均为5),表明仪器精密度良好。

### 2.5 重复性试验

取同一鹿蹄草样品(安徽)6份,每份各约3.0 g,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按上述色谱条件进样测定,记录色谱图,采用外标法计算样品含量。结果,齐墩果酸和熊果酸含量的RSD分别为1.2%和0.9%( $n$ 均为6),表明该方法的重复性良好。

### 2.6 稳定性试验

取同一供试品(江西宜春)溶液,分别于0、2、4、8、12、16、20 h按上述色谱条件进样测定,记录色谱图。结果,齐墩果酸和熊果酸的RSD分别为1.3%和0.7%( $n$ 均为7),表明供试品溶液至少在20 h内稳定。

### 2.7 加样回收率试验

精密称取已知含量的同一鹿蹄草样品(江西宜春)适量,共9份,每份各约1.5 g,按高、中、低质量浓度分别加入齐墩果酸和熊果酸对照品适量,再按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,进样测定,记录色谱图,重复3次,计算加样回收率,结果见表1。

表1 加样回收率试验结果( $n=9$ )

Tab 1 Results of recovery tests( $n=9$ )

组分	样品含量,mg	加入量,mg	测得量,mg	回收率,%	$\bar{x}$ ,%	RSD,%
齐墩果酸	1.955	0.960	2.931	101.7	98.6	2.1
	1.967	0.960	2.880	95.1		
	1.970	0.960	2.922	99.2		
	1.956	1.920	3.798	95.9		
	1.953	1.920	3.877	100.2		
	1.989	1.920	3.891	99.1		
	1.953	2.880	4.829	99.9		
	1.957	2.880	4.786	98.2		
	1.945	2.880	4.782	98.5		
	熊果酸	8.973	4.330	13.321		
9.033	4.330	13.110	94.2			
9.044	4.330	13.366	99.8			
8.977	8.660	17.332	96.5			
8.967	8.660	17.672	100.5			
9.132	8.660	17.556	97.3			
8.964	12.990	21.703	98.1			
8.848	12.990	21.767	99.5			
8.927	12.990	21.922	100.0			

### 2.8 样品含量测定

精密吸取4批鹿蹄草样品(安徽、云南、江西宜春和江西樟树)制备的供试品溶液,按上述色谱条件进样测定,每批平行测定3份,记录峰面积,计算样品含量。结果,4批样品中齐墩果酸的质量分数分别为0.122 0%、0.098 1%、0.130 3%、0.132 7%( $n=3$ ),熊果酸的质量分数分别为0.566 3%、0.425 7%、0.598 1%、0.606 2%( $n=3$ )。

## 3 讨论

由本试验结果可知,不同产地的鹿蹄草中两种三萜酸的含量存在一定差异,其中江西樟树产样品中齐墩果酸和熊果酸的质量分数最高,分别为0.132 7%和0.606 2%;云南产样品质量分数最低,分别为0.098 1%和0.425 7%。

齐墩果酸和熊果酸均属于五环三萜类化合物,结构和极性相似,因此在色谱柱上的保留时间相近而难以完全分离。本试验采用RP-HPLC法,以甲醇-水-磷酸(88:12:0.15, V/V/V)为流动相,同时测定了鹿蹄草中的两种三萜酸类成分齐墩果酸和熊果酸,柱效高,分离度均>1.9,且峰形对称,可以有效地

# 丁桂活络凝胶膏的质量标准研究<sup>Δ</sup>

郭宏彦\*, 涂 禾, 刘中均, 胡 恒(四川省骨科医院, 成都 610041)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)43-4076-03  
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.43.15

**摘要** 目的:建立丁桂活络凝胶膏的质量标准。方法:采用薄层色谱(TLC)法鉴别制剂中的木香、羌活、独活;采用高效液相色谱法测定制剂中延胡索乙素的含量;色谱柱为 Waters Symmetry Shield C<sub>18</sub>(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为甲醇-0.1%磷酸溶液(pH6.0, 50:50, V/V),流速为1.0 ml/min,检测波长为280 nm,柱温为25 ℃,进样量为10 μl。结果:木香、羌活、独活的TLC图斑点清晰、分离度好。延胡索乙素的质量浓度在10.58~52.90 μg/ml范围内与峰面积积分值呈良好线性关系( $r=0.9999$ );精密性、稳定性、重复性试验的RSD均≤0.72%,平均加样回收率为100.07%,RSD=0.65%( $n=9$ )。结论:所建质量标准可用于丁桂活络凝胶膏的质量控制。

**关键词** 丁桂活络凝胶膏剂;延胡索乙素;木香;羌活;独活;薄层色谱法;高效液相色谱法

## Study on Quality Standard of Dinggui Huoluo Gel Paste

GUO Hong-yan, TU He, LIU Zhong-jun, HU Heng(Sichuan Orthopedics Hospital, Chengdu 610041, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To establish the quality standard of Dinggui huoluo gel paste. METHODS: *Aucklandia lappa*, *Notopterygium incisum* and *Heracleum hemsleyanum* were identified by TLC. The content of tetrahydropalmatine was determined by HPLC. The determination was performed on Waters Symmetry Shield C<sub>18</sub>(250 mm×4.6 mm, 5 μm) column with mobile phase consisted of methanol-0.1% phosphoric acid (pH6.0, 50:50, V/V) at the flow rate of 1.0 ml/min. The detection wavelength was set at 280 nm. The column temperature was 25 ℃, and the sample size was 10 μl. RESULTS: TLC spots of *A. lappa*, *N. incisum* and *H. hemsleyanum* were clear and well-separated. The linear range of tetrahydropalmatine was 10.58-52.90 μg/ml ( $r=0.9999$ ). RSDs of precision, stability and reproducibility tests were all lower than 1.72%. The average recovery of 100.07% (RSD=0.65%,  $n=9$ ). CONCLUSIONS: The established quality standard can be used for the quality control of the preparation.

**KEYWORDS** Dinggui huoluo gel paste; Tetrahydropalmatine; *Aucklandia lappa*; *Notopterygium incisum*; *Heracleum hemsleyanum*; TLC; HPLC

丁桂活络膏是四川省骨科医院自制制剂,在临床已有50多年的使用史,疗效确切。该制剂由延胡索、羌活、独活、当归、木香、山奈、红花、川芎、白芷、续断、细辛、冰片、樟脑等中药组成,具有通经活络、逐风散寒的功效,一般用于跌打损伤、运动创伤中后期,症见关节疼痛、肌肉酸楚、麻木等。为了提高该制剂的疗效,我院结合现代药剂学知识,将丁桂活络膏改

为载药量、溶出度更高的凝胶膏剂(《中国药典》(一部)附录I)<sup>[1]</sup>。本试验参考2010版《中国药典》(一部)的方法<sup>[1]</sup>,采用薄层色谱(TLC)法对方中木香、羌活、独活进行定性鉴别,并采用高效液相色谱(HPLC)法对丁桂活络凝胶膏剂中延胡索的活性成分延胡索乙素进行测定<sup>[1-2]</sup>,以为该制剂的质量控制提供参考。

将两者分开。

综上所述,本方法简单、准确,精密度和重复性良好,可为鹿蹄草药材的质量控制提供科学依据。

### 参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 2010年版. 北京:中国医药科技出版社, 2010:304.
- [2] 王军宪, 张莉, 吕修梅, 等. 普通鹿蹄草化学成分的研究[J]. 中草药, 2003, 34(4):307.
- [3] 盛华刚. 鹿衔草的化学成分与药理作用研究进展[J]. 西北

- 药学杂志, 2012, 27(4):383.
- [4] 石娟, 王军宪. 鹿衔草化学成分的再研究[J]. 天然产物研究与开发, 2002, 14(1):37.
- [5] 李宏杨, 刘国民, 刘飞, 等. 熊果酸及五环三萜同类物的研究进展[J]. 湖南工业大学学报, 2009, 23(5):18.
- [6] 周志勇, 袁丁. 齐墩果酸药理作用研究进展[J]. 中国医院药学杂志, 2008, 28(23):2031.
- [7] 高大威. 齐墩果酸抗糖尿病作用及其机理研究[D]. 秦皇岛:燕山大学, 2007.
- [8] 张家富, 夏伦祝, 汪永忠, 等. HPLC法同时测定5种常见中药材中齐墩果酸和熊果酸的含量[J]. 中国药房, 2012, 23(27):2553.

Δ 基金项目:科技部科研院所技术开发研究专项资金项目(No.2012EG145135)

\* 副主任中药师。研究方向:医疗机构制剂研发。电话:028-87050716。E-mail: 535831843@qq.com

(收稿日期:2013-09-03 修回日期:2013-12-06)