

HPLC 测定哈蟆油中 4-胆甾烯-3-酮及胆固醇含量

王永生^{1,2}, 徐阳², 陈冰^{2,3}, 迟航¹, 曲晓波^{1*}

(1. 长春中医药大学, 长春 130117; 2. 吉林大学, 长春 130021;
3. 吉林农业科技学院, 吉林 吉林 132101)

[摘要] **目的:**采用高效液相法同时测定哈蟆油中 4-胆甾烯-3-酮和胆固醇。**方法:**使用 Agilent TC-C₁₈ 柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相甲醇-水(91.5:8.5), 柱温 35 °C, 体积流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 215 nm, 进样量 10 μL。**结果:**哈蟆油中 4-胆甾烯-3-酮进样量在 0.011 65~0.116 5 μg 呈良好的线性关系, 平均回收率为 100.0%, RSD 1.83% (n=6), 且稳定性、精密性及重复性均良好; 胆固醇进样量在 2.282~22.82 μg 成良好的线性关系, 平均回收率为 99.3%, RSD 1.19% (n=6), 且稳定性、精密性及重复性均良好。**结论:**该方法能够同时、准确、稳定、快速的测定哈蟆油中 4-胆甾烯-3-酮和胆固醇的含量。

[关键词] 哈蟆油; 4-胆甾烯-3-酮; 胆固醇; 高效液相色谱法

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)08-0076-03

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.2014080076

Determination of 4-Cholesten-3-one and Cholesterol in Oviductus Ranae by HPLC

WANG Yong-sheng^{1,2}, XU Yang², CHEN Bing^{2,3}, CHI Hang¹, QU Xiao-bo^{1*}

(1. Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, China;
2. Jilin University, Changchun 130021, China;
3. Jilin Agricultural Science and Technology College, Jilin 132101, China)

[Abstract] **Objective:** To determine the content of 4-cholesten-3-one and cholesterol in Oviductus Ranae by HPLC at the same time. **Method:** Agilent TC-C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) was used. The mobile phase consisted of methanol-water (91.5:8.5). The column temperature was maintained at 35 °C. The volumetric flow rate was set at 1.0 mL·min⁻¹. The UV detector was set at 215 nm. The sample size was 10 μL. **Result:** 4-cholesten-3-one was linear in the content range of 0.011 65-0.116 5 μg; the average recovery was 100.0%, RSD 1.83%. Cholesterol was linear in the content range of 2.282-22.82 μg; the average recovery was 99.3%, RSD 1.19%. **Conclusion:** The method, which is fast, accurate and stable, can simultaneously determine the content of 4-cholesten-3-one and cholesterol in Ranae Oviductus.

[Key words] Ranae Oviductus; 4-cholesten-3-one; cholesterol; HPLC

[收稿日期] 20121225(005)

[基金项目] 国家科技支撑计划(2011BAI03B07)

[第一作者] 王永生, 博士, 教授, 博士生导师, 从事中药有效成分研究, Tel: 0431-86172298, E-mail: 13944165683@163.com

[通讯作者] * 曲晓波, 博士, 教授, 博士生导师, 从事方向中药开发及药理学研究, Tel: 0431-86172508, E-mail: quxiaobo@hotmail.com

哈蟆油属于蛙科动物中国林蛙雌蛙的输卵管干制品, 又叫“哈士蟆油”、“林蛙油”。具有生津止咳、滋阴补阳、健脾养胃等功效, 是滋补品中的上等, 被誉为“东北药材三宝”之一^[1]。因其疗效甚佳, 所以在市场上价格急剧攀升, 但哈蟆油的优劣各异, 其质量控制方法尚不完善。作者已对哈蟆油的质量控制方法和有效成分的分离、合成研究多年, 且在国内外发表多篇有关文章^[2-5]。现采用 HPLC 法, 对哈蟆油中

4-胆甾烯-3-酮和胆固醇同时进行含量测定的研究,对哈蟆油质量进行控制^[6-14]。

1 材料

岛津 LC-10AT 型液相色谱仪(日本岛津制作所),KQ-250B 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司),AVW20D 型电子天平(日本岛津制作所),RE-200 型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂)。

胆固醇对照品(自制,纯度 >99%),4-胆甾烯-3-酮对照品(自制,纯度 >99%),甲醇为色谱纯级,石油醚、三氯甲烷、乙酸乙酯、乙醇为分析级,水为娃娃哈哈纯净水。

哈蟆油(*Ranae oviductus*),购于2007年6月,经长春中医学院姜大成教授鉴定为蛙科动物中国林蛙的输卵管干制品,来源及批号见表1。

表1 不同产地哈蟆油中胆固醇和4-胆甾烯-3-酮的含量测定

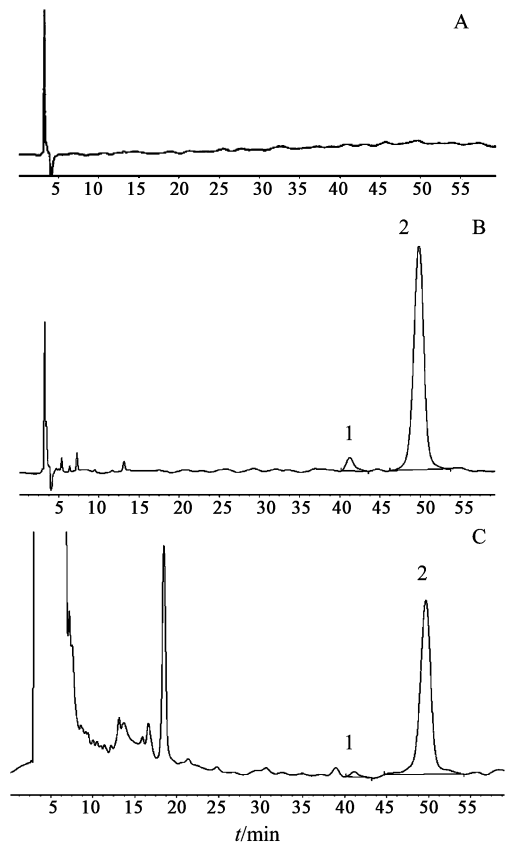
mg·g ⁻¹				
No.	产地	批号	胆固醇	4-胆甾烯-3-酮
样品1	桦甸	20070601	3.07	0.008 01
样品2	靖宇	20070602	2.84	0.007 91
样品3	黑龙江	20070603	3.78	0.006 35
样品4	内蒙古	20070604	2.01	0.005 10
样品5	青海	20070605	3.03	0.006 12
样品6	山东	20070606	2.11	0.005 44

2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适应性试验 Agilent TC-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相甲醇-水(91.5:8.5),柱温 35 °C,体积流速 1.0 mL·min⁻¹,检测波长 215 nm,进样量 10 μL。理论塔板数按4-胆甾烯-3-酮/胆固醇计算均不低于 2 000。在此条件下,4-胆甾烯-3-酮/胆固醇与其他物质分离度均符合药典规定,见图1。

2.2 对照品溶液的配制 精密称取4-胆甾烯-3-酮对照品 11.65 mg,置 100 mL 量瓶中,用甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,制备成 0.116 5 g·L⁻¹的4-胆甾烯-3-酮对照品溶液。再精密称取胆固醇对照品 11.41 mg,置 10 mL 量瓶中,精密吸取4-胆甾烯-3-酮对照品溶液 0.5 mL 于量瓶中,用甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,即为4-胆甾烯-3-酮质量浓度 0.005 825 g·L⁻¹和胆固醇质量浓度 1.141 g·L⁻¹的混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液的配制 取过 60 目筛的哈蟆油粉约 3 g,精密称定,加 200 mL 的石油醚超声提取约 30 min,分离药渣,再将药渣加入 200 mL 石油醚提取约 30 min,并用 50 mL 石油醚洗涤药渣,合并石油



A. 阴性对照;B. 对照品;C. 样品;

1. 4-胆甾烯-3-酮;2. 胆固醇

图1 哈蟆油 HPLC 色谱

醚提取液,蒸干,用色谱甲醇溶解后,过 0.22 μm 滤器,并用甲醇定容于 10 mL 量瓶中。

2.4 线性关系考察 精密吸取对照品溶液 2, 6, 10, 14, 18, 20 μL, 分别注入高效液相色谱仪,记录色谱峰面积。以色谱峰面积(Y)对溶液浓度(X)作图,分别得到4-胆甾烯-3-酮的回归方程为 $Y = 4\ 165.5X - 858.78$ ($r = 0.999\ 6$),表明4-胆甾烯-3-酮进样量在 0.011 65 ~ 0.116 5 μg 呈良好的线性关系,胆固醇的回归方程为 $Y = 890\ 484X + 6\ 600$ ($r = 0.999\ 6$),表明胆固醇进样量在 2.282 ~ 22.82 μg 成良好的线性关系。

2.5 精密度试验 精密吸取对照品溶液 10 μL,重复进入高效液相色谱仪 6 次,分别测得4-胆甾烯-3-酮和胆固醇色谱峰面积的 RSD 1.48%, 1.59%,表明此方法精密度良好。

2.6 稳定性考察 分别在 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24 h 时,精密吸取哈蟆油样品(批号 20070601)制备的供试品溶液 10 μL,注入高效液相色谱仪中进行含量测定,分别测得4-胆甾烯-3-酮和胆固醇色谱峰面积的 RSD 1.56%,表明供试品溶液中4-胆甾烯-3-酮和

胆固醇在 24 h 内稳定。

2.7 重复性试验 取哈蟆油样品(批号 20070601) 6 份,每份约 3 g,精密称定,按 2.3 项下制备供试品溶液,依法进行含量测定,分别测得 4-胆甾烯-3-酮和胆固醇色谱峰面积,并计算出其含量的 RSD 1.78%,1.64%,表明此方法重复性良好。

2.8 加样回收率试验 取胆固醇对照品 6 份,每份约 11 mg,精密称定,分别加入 6 份约 3.5 g 的哈蟆油样品(批号 20070601)中。取 4-胆甾烯-3-酮对照品 6 份,每份约 11 mg,精密称定,分别置 100 mL 量瓶中,用甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,精密吸取溶液 0.5 mL 于 10 mL 量瓶中,用甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,分别加入 6 份约 6.5 g 的哈蟆油样品(批号 20070601)中。按 2.3 项下制备供试品溶液,并进行含量测定,计算回收率。胆固醇的平均回收率为 99.3%,RSD 1.19%(n=6),4-胆甾烯-3-酮的平均回收率为 100.0%,RSD 1.83%(n=6),表明此方法回收率良好,见表 2。

表 2 哈蟆油样品中胆固醇和 4-胆甾烯-3-酮的加样回收率测定

成分	样品中量	加入量	测得量	回收率	平均值	RSD
	/μg	/μg	/μg	/%	/%	/%
胆固醇	10 710	11 120	21 710	98.9	99.3	1.19
	10 640	11 320	22 110	101.3		
	10 730	11 450	22 140	99.7		
	10 810	11 250	21 910	98.7		
	10 610	11 430	21 790	97.8		
	10 540	11 610	22 100	99.6		
4-胆甾烯-3-酮	52.14	55.15	106.20	98.0	100.0	1.83
	52.38	54.45	105.55	97.6		
	53.21	54.95	108.22	100.1		
	52.92	54.20	108.15	101.9		
	51.91	54.75	107.18	100.9		
	52.32	56.05	109.24	101.6		

2.9 样品测定 取不同产地哈蟆油样品,按照制备供试品方法制备,分别精密吸取对照品和供试品溶液各 10 μL,注入液相色谱仪器中,依法进行含量测定,记录色谱峰面积,并按照外标法计算供试品溶液中胆固醇和 4-胆甾烯-3-酮的含量,见表 2。

3 讨论

采用不同比例的甲醇与水(90:10,91.5:8.5,93:7)作为流动相进行试验,结果表明,(91.5:8.5)可以将胆固醇和 4-胆甾烯-3-酮很好的分离,且保留时间适中,峰形良好。

经过单因素实验证明,在检测波长 215 nm 时,适合胆固醇和 4-胆甾烯-3-酮的吸收,能够较准确的测定胆固醇和 4-胆甾烯-3-酮的含量。

使用不同的提取介质对哈蟆油提取进行考察,发现石油醚比三氯甲烷、乙酸乙酯、乙醇更能有效的、大量的将哈蟆油中的胆固醇和 4-胆甾烯-3-酮提取出来。

胆固醇和 4-胆甾烯-3-酮都是哈蟆油中具有重要药效的物质,这两种物质对于评价哈蟆油质量的优劣有重要作用,且他们性质稳定,优劣产品中含量差异很大。经实验室长期研究发现,不同时间采购的同地哈蟆油质量也略有不同,其中胆固醇的含量也有所差别。经过试验证明,本方法能快速、有效、准确的测定哈蟆油中胆固醇和 4-胆甾烯-3-酮的含量,此方法对于哈蟆油质量控制具有很大的意义,也同时对哈蟆油质量标准的建立,做了极好的补充。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:239.

[2] 王永生,姜大成,孟勤,等. HPLC 测定哈蟆油中十六烷酸胆甾醇酯含量研究[J]. 中国中药志,2005,30(13):990.

[3] 白雪媛. 哈蟆油 HPLC 指纹图谱的研究及其在真伪鉴别中的应用[D]. 长春中医药大学,2007.

[4] 王永生,曹玉恒,王哲,等. HPLC 测定哈蟆油中胆固醇含量的研究[J]. 中成药,2008,09:1402.

[5] 陈彦超. 哈蟆油中甾体类化合物的研究[D]. 长春中医药大学,2011.

[6] 韩桂茹,赵志军,许红辉,等. 多种药材与制剂中大黄酚与大黄素含量测定改进方法[J]. 药物分析杂志,2008,03:461.

[7] 张晓莉,李玉婷,王亚贤,等. 红花多糖的提取与含量测定[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,07:19.

[8] 耿旦,马雯芳,甄汉深,等. RP-HPLC 测定桑椹中芦丁的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,14:63.

[9] 夏从龙,周浓,种佳. HPLC 测定不同厂家牛黄消炎片中 5 种蒽醌类衍生物的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,02:83.

[10] 涂华,陈碧琼,张燕军. 天然类黄酮物质的提取工艺研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,06:277.

[11] 于启平. 浅谈哈蟆油的预防营养价值[J]. 中国医药指南,2010,12:36.

[12] 于洋洋. 名贵中药哈蟆油的质量评价研究(II)[D]. 长春中医药大学,2010.

[13] 陈丽娟,时坤,李健明,等. 哈蟆油质量控制体系研究进展[J]. 中药材,2011,05:820.

[14] 姜大成,肖井雷. 名贵中药哈蟆油质量评价的初步研究[J]. 吉林中医药,2010,05:429.

[责任编辑 顾雪竹]