

# HPLC 测定左归丸中齐墩果酸与熊果酸含量

张汶婕\*, 管大平, 钱世兵

(安徽省铜陵市食品药品检验所, 安徽 铜陵 244000)

**[摘要]** 目的: 建立 HPLC 测定左归丸中齐墩果酸、熊果酸含量的方法。方法: 采用反相高效液相色谱法, Sunfire C<sub>18</sub> 柱, 甲醇-水 (85:15) (磷酸二氢钠调 pH 6.5), 流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 检测波长 215 nm, 柱温 25 °C。结果: 齐墩果酸在 0.05 ~ 1.0 μg 线性关系良好 ( $r=0.9999$ ), 回收率 97.7% (RSD 1.39%,  $n=6$ ); 熊果酸在 0.1 ~ 2.0 μg 线性关系良好 ( $r=0.9999$ ), 回收率 98.3% (RSD 0.82,  $n=6$ )。结论: 方法可用于左归丸中熊果酸、齐墩果酸的含量测定。

**[关键词]** 左归丸; 齐墩果酸; 熊果酸; 高效液相色谱法; 含量测定

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)05-0092-03

## Determination of Ursolic Acid and Oleanolic Acid in Zuogui Wan by HPLC

ZHANG Wen-jie\*, GUAN Da-ping, QIAN Shi-bing

(Tongling Institute for Food and Drug Control, Tongling 244000, China)

**[Abstract]** **Objective:** To establish a HPLC method for the determination of ursolic acid and oleanolic

**[收稿日期]** 20111005(002)

**[通讯作者]** \* 张汶婕, 硕士学位, 主管药师, 从事中药检验工作, Tel: 0562-2831625, E-mail: zhangwenjie 85@163.com

### 4 讨论

中药中微量元素与其功效存在着一种必然联系, 它们在功效中占的地位不容低估。许多事实证明, 无机成分的药理作用及活性, 在发挥药物疗效方面, 有着十分重要的作用<sup>[9]</sup>。有学者测定了 7 种补益中药的微量元素, 结果表明, 补血、补气中药铁、锰、锌、铜的含量较高<sup>[10]</sup>。本实验选用元胡药材具有活血、散瘀、理气止痛等功效, 从药理作用来看, 铁元素含量应该较高, 这和我们的实验结果一致。方差分析说明喷施铁元素肥料对元胡药材有效成分含量有一定提高, 且相对于锰、铜、锌元素, 铁元素的影响作用显著。

### [参考文献]

- [1] 中国植物志编辑委员会. 中国植物志. 第 32 卷[M]. 北京: 科学出版社, 1999: 475.
- [2] 谢学建, 张俊慧, 马爱华. 微量元素与中药功效关系[J]. 时珍国医国药, 1999, 10(10): 79.
- [3] 韩建萍, 梁宗锁, 张文生. 微量元素对丹参生长发育及有效成分的影响[J]. 植物营养与肥料学报, 2005,

11(4): 560.

- [4] 董诚明, 徐鹏, 苏秀红, 等. 锌对冬凌草产量及其有效成分含量的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(3): 58.
- [5] 张明昶, 麻秀萍, 徐文芬. 微量元素与六味地黄丸组方关系研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(8): 100.
- [6] 孙曙光, 刘伟, 董诚明. 施肥方法对栽培柴胡有效成分含量的影响[J]. 时珍国医国药, 2010, 21(12): 3288.
- [7] 许祖刚, 赵长星, 王月福. 施钾量对北沙参根有效成分含量变化的影响[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(31): 15241.
- [8] 张秀玥, 李明荣, 张启东, 等. 不同微肥施用量对白及产量及品质的影响[J]. 贵州农业科学, 2009, 37(2): 31.
- [9] 秦俊法, 林宣贤. 中国的中药微量元素研究[J]. 广东微量元素科学, 2010, 17(12): 1.
- [10] 邵红, 边才苗. 7 种补益中药微量元素的含量及溶出率测定[J]. 广东微量元素科学, 2002, 9(11): 51.

[责任编辑 蔡仲德]

acid in Zuogui Wan. **Method:** The method was applied with Sunfire  $C_{18}$  column by methanol-water (25:75, adjust pH to 6.5 with sodium dihydrogen phosphate) as the mobile phase, with the flow rate  $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ . The column temperature was maintained at  $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$  and the UV detection wavelength was set at 215 nm. **Result:** Oleanolic acid was linear in the range of  $0.05\text{-}1.0 \text{ }\mu\text{g}$  ( $r = 0.9999$ ), the average recovery was 97.7% (RSD 1.39,  $n = 6$ ). Ursolic acid was linear in the range of  $0.1\text{-}2.0 \text{ }\mu\text{g}$  ( $r = 0.9999$ ), the average recovery was 98.3% (RSD 0.82,  $n = 6$ ). **Conclusion:** The method can be used for determination of oleanolic acid and ursolic acid in Zuogui Wan.

[**Key words**] Zuogui Wan; ursolic acid; oleanolic acid; HPLC; content

左归丸的处方来源于《景岳全书》卷五十一·新方八阵,由山茱萸、熟地黄、菟丝子、牛膝、龟板胶、鹿角胶、山药、枸杞 8 味中药组成,具滋肾补阴功用,用于真阴不足导致的头晕目眩,腰酸腿软,舌红少苔,脉细等证。原标准中未收载含量测定项。文献报道仅见薄层扫描法测定其中熊果酸含量<sup>[1]</sup>。本文采用 HPLC,以甲醇-水-磷酸二氢钠为流动相,可使左归丸中熊果酸与齐墩果酸较好分离,定量准确、快速。

## 1 仪器与试剂

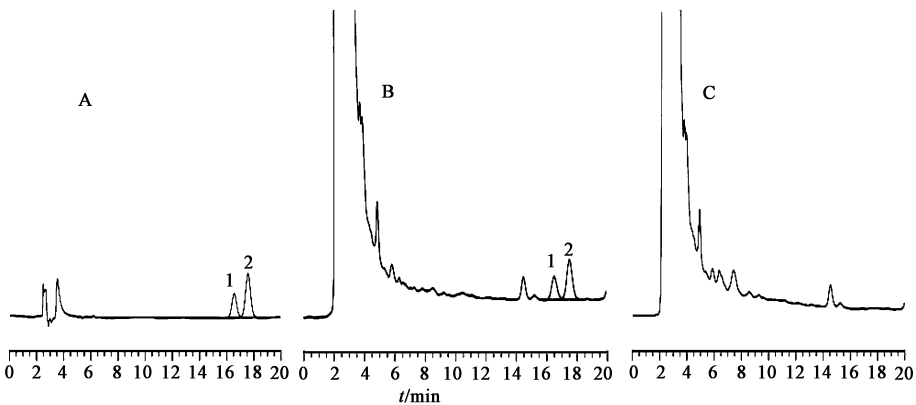
Waters 2695 高效液相色谱仪, Waters 2489UV/visible Detector 紫外检测器, Waters Millennium32 工作站,齐墩果酸对照品(中国药品生物制品检定所,批号 110709-200505)、熊果酸对照品(中国药品生

物制品检定所,批号 110742-200518),左归丸(河南宛西制药股份有限公司,批号 090106,101001)。甲醇为色谱纯,磷酸二氢钠为分析纯,水为超纯水。

## 2 方法与结果

**2.1 色谱条件** 色谱柱 Sunfire  $C_{18}$  柱( $4.6 \text{ mm} \times 250 \text{ mm}, 5 \text{ }\mu\text{m}$ ),甲醇-水(85:15)(磷酸二氢钠调 pH 6.5)为流动相,流速  $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ,检测波长 215 nm,柱温  $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ,进样量  $10 \text{ }\mu\text{L}$ 。在上述条件下齐墩果酸、熊果酸分离良好,见图 1。

**2.2 对照品溶液的制备** 精密称取齐墩果酸对照品、熊果酸对照品适量,加甲醇制成含齐墩果酸  $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、熊果酸  $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的混合溶液,摇匀,即得。



A. 对照品溶液; B. 样品溶液; C. 阴性对照溶液; 1. 齐墩果酸; 2. 熊果酸

图 1 左归丸 HPLC 图谱

**2.3 样品溶液的制备** 取左归丸样品,研碎,取约 2.5 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇 5 mL,称定质量,超声处理 30 min,放冷,再称定质量,用甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

**2.4 阴性对照溶液的制备** 取处方中除山茱萸外的其余成分制成不含山茱萸的阴性对照品,按 2.3 项下的制备方法处理得阴性对照溶液。

## 2.5 方法学考察

**2.5.1 线性关系考察** 精密吸取齐墩果酸对照品、

熊果酸对照品混合溶液 1.0, 2.0, 5.0, 10.0, 15.0, 20.0  $\mu\text{L}$ ,在上述色谱条件下进样,测定峰面积,以对照品量为自变量,峰面积为因变量,得回归方程分别为  $Y = 12\ 942X - 5\ 741, r = 0.9999 (n = 6)$ ;  $Y = 23\ 816X - 10\ 973, r = 0.9999 (n = 6)$ ;齐墩果酸对照品在  $0.05 \sim 1.0 \text{ }\mu\text{g}$ ,熊果酸对照品在  $0.1 \sim 2.0 \text{ }\mu\text{g}$  线性关系良好。

**2.5.2 精密度试验** 精密吸取同一份样品溶液,连续进样 5 次,结果齐墩果酸对照品、熊果酸对照品峰

面积的 RSD 分别为 0.52% ,0.29% ,表明仪器精密度良好。

**2.5.3 稳定性试验** 按样品溶液的制备方法制得样品溶液,分别于配制后 0,2,4,8,12,24 h 测定,齐墩果酸对照品、熊果酸对照品峰面积的 RSD 分别为 0.59% ,0.36% ,表明样品溶液在 24 h 内稳定。

**2.5.4 重复性试验** 称取同一样品 5 份,按 2.3 项

下的制备方法制备,测定,RSD 分别为 0.62% ,0.55% ,表明样品的重现性良好。

**2.5.5 加样回收试验** 精密称取同一批号样品(101001)6 份,加入稀释 1 倍后的对照品混合溶液 5 mL,按 2.3 方法制备并测定,计算回收率,结果见表 1,2。齐墩果酸、熊果酸的回收率分别为 97.7% (RSD 1.39% ),98.3% (RSD 0.82% )。

表 1 齐墩果酸回收率试验(n=6)

No.	称样量/g	样品中含量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
1	2.499 9	0.132	0.125	0.252	96.2	97.7	1.39
2	2.499 8	0.132	0.125	0.254	97.7		
3	2.499 8	0.132	0.125	0.253	97.0		
4	2.500 7	0.132	0.125	0.254	97.0		
5	2.499 9	0.132	0.125	0.255	98.5		
6	2.498 7	0.132	0.125	0.257	100.0		

表 2 熊果酸回收率试验(n=6)

No.	称样量/g	样品中含量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
1	2.499 9	0.227	0.250	0.472	97.8	98.3	0.82
2	2.499 8	0.227	0.250	0.474	98.6		
3	2.499 8	0.227	0.250	0.474	98.6		
4	2.500 7	0.227	0.250	0.475	98.7		
5	2.499 9	0.227	0.250	0.470	96.9		
6	2.498 7	0.227	0.250	0.475	99.1		

**2.6 样品测定** 取左归丸 2 批,按 2.3 方法制备样品溶液,分别精密吸取稀释 1 倍后的对照品溶液与样品溶液各 10 μL,注入液相色谱仪,测得样品中齐墩果酸含量分别为 0.050,0.053 mg·g<sup>-1</sup>;熊果酸含量分别为 0.103,0.091 mg·g<sup>-1</sup>。

### 3 讨论

齐墩果酸与熊果酸为山茱萸中主要活性成分,实验中比较了 70% 甲醇超声提取,70% 甲醇回流提取,甲醇超声提取,甲醇回流提取等方法,结果表明,甲醇超声提取方法成分含量较高,杂质较少。

根据文献报道<sup>[2-5]</sup>,考察了甲醇-水体系与乙腈-水体系,发现甲醇-水-磷酸氢二钠系统比甲醇-水-醋酸、乙腈-水-醋酸、乙腈-水-乙酸铵等系统好,样品峰形较好,成分峰之间分离度、成分峰与其他峰的分离度均大于 1.5,且成本较低。但要注意磷酸氢二钠在甲醇-水(85:15)中溶解度较小,故色谱柱温度需不低于流动相配制温度。

齐墩果酸甲醇液与熊果酸甲醇液 λ<sub>max</sub> 均小于

210 nm。在 210 nm 波长下,流动相中甲醇的紫外吸收干扰较大,基线不稳,故选择 215 nm 作为检测波长。

### [参考文献]

[1] 邱震,周家才. 薄层扫描法测定左归丸中熊果酸含量[J]. 安徽医药, 2008, 12 (8): 698.

[2] 李琴韵,张雷. HPLC 测定左归颗粒中熊果酸和齐墩果酸含量[J]. 中国中药杂志, 2005, 30 (4): 308.

[3] 徐德然,丁晴,王峥涛. HPLC 法测定山茱萸及知柏地黄丸中齐墩果酸、熊果酸的含量[J]. 中草药, 2002, 33 (11): 996.

[4] 彭旖,王秀峰,王志刚,等. 熊果酸与齐墩果酸高效液相色谱分离条件优化[J]. 广州化学, 2006, 31 (4): 26.

[4] 陈宝龙,冯坤,郑朝华,等. 山楂中熊果酸与齐墩果酸的测定[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16 (5): 73.

[责任编辑 蔡仲德]