

# RP-HPLC 法测定二至丸中齐墩果酸的含量

朱卫丰\*, 罗玲英, 左铮云, 杨宗保, 吴德智

(江西中医学院现代中药制剂教育部重点实验室, 南昌 330004)

**[摘要]** 目的: 建立二至丸中齐墩果酸的含量测定的方法。方法: 采用 Venusil X B P-C<sub>18</sub> 柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 以甲醇-0.4% 乙酸铵溶液(83:17)为流动相, 检测波长 210 nm, 柱温 25 °C, 流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>。结果: 齐墩果酸在 0.1004 ~ 1.807 μg 呈线性关系( $r = 0.9998$ ), 平均回收率为 99.7% (RSD 1.75%)。结论: 此方法操作简便、可靠, 重现性好, 专属性强, 能有效控制该制剂的质量。

**[关键词]** 二至丸; 齐墩果酸; 高效液相色谱法

**[中图分类号]** R 284.1 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2010)06-0101-03

## Determination of Oleanolic Acid in Erzhi Pills by RP-HPLC

ZHU Wei-feng\*, LUO Ling-ying, ZUO Zheng-yun, YANG Zong-bao, WU De-zhi

(Key Laboratory of Modern Preparation of TCM, Ministry of Education, Nanchang 330004, China)

**[Abstract]** **Objective:** To develop a RP-HPLC method to determine the contents of oleanolic acid in Erzhi Pills. **Method:** The samples was separated on a Venusil X B P-C<sub>18</sub> column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), using methanol-0.4% ammonium acetate solution (83:17) as the mobile phase with flow rate of 1 mL·min<sup>-1</sup> and detection at 210 nm. The column temperature was maintained at 25 °C. **Result:** the linear range of oleanolic acid was at 0.1004 ~ 1.807 μg ( $r = 0.9998$ ). The average recovery of oleanolic acid was 99.7%, RSD 1.75% ( $n = 6$ ). **Conclusion:** The method is simple, accurate, and can be used for quality evaluation of Erzhi Pills.

**[Key words]** Erzhi Pills; oleanolic acid; RP-HPLC

二至丸是由女贞子(蒸)、墨旱莲二味中药组方制成的中药制剂, 具有补益肝肾, 滋阴止血功效, 用于肝肾阴虚, 眩晕耳鸣, 咽干鼻燥, 腰膝痠痛, 月经量多等症, 收载于《中国药典》中药成方制剂。《中国药典》2005 年版(一部)<sup>[1]</sup> 收载对其君药女贞子的含量测定方法为薄层扫描法测定齐墩果酸的含量, 但因女贞子中同时还含有熊果酸, 为齐墩果酸的同分异构体, 化学结构与性质极为相似, 以薄层色谱扫描法定量时, 齐墩果酸与熊果酸两者无法分离导致含量测定不准确<sup>[2]</sup>, 且采用薄层扫描法进行含量测定, 操作繁琐, 精密度和重现性都比较差, 本实验采用高效液相色谱法测定二至丸中齐墩果酸含量, 操

作简便、可靠, 重复性好, 专属性强, 能有效控制该制剂的质量。

### 1 仪器与试剂

仪器 Agilent 1200 液相色谱系统(美国), G1314B VWD 紫外检测器, Agilent 色谱工作站, Sartorius BS124S 电子分析天平; SK5210LHC 型双频数显超声机(功率 200 W, 频率 40 kHz。上海科导超声仪器有限公司)。齐墩果酸对照品(中国药品生物制品检定所, 含量测定用, 批号 110709-200505); 二至丸(自制); 甲醇为色谱纯, 乙酸铵为分析纯, 水为重蒸馏水。

### 2 方法与结果

**2.1 色谱条件** 色谱柱 VenusilXBP-C<sub>18</sub> (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 甲醇-0.4% 乙酸铵溶液(83:17); 检测波长 210 nm; 流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>; 柱温 25 °C; 峰面积外标法定量。在上述色谱条件

**[收稿日期]** 2009-10-15

**[通讯作者]** \* 朱卫丰, Tel: (0791) 7119011, E-mail: zwflady@tom.com

下,齐墩果酸和熊果酸获得了基线分离。对照品、供试品及阴性样品的色谱图分别见图 1~3。

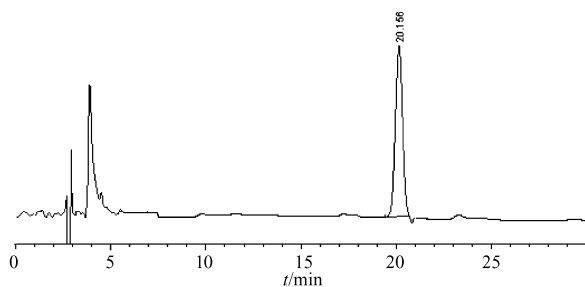


图 1 齐墩果酸对照品色谱

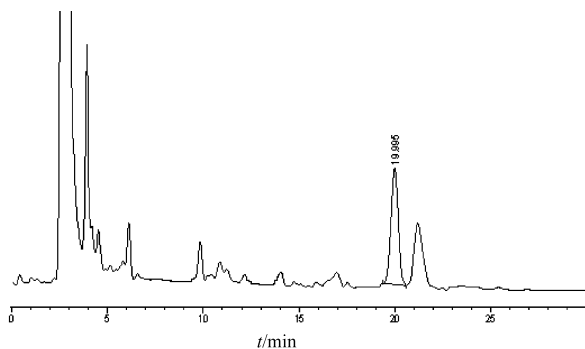


图 2 二至丸样品色谱图

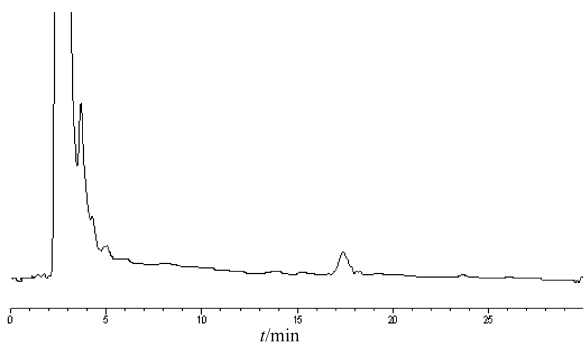


图 3 阴性样品色谱图

**2.2 对照品溶液的制备** 精密称取齐墩果酸对照品 10.04 mg, 置 100 mL 量瓶中, 加甲醇溶解定容, 摇匀, 制成 1 mL 含 100.4 μg 齐墩果酸对照品溶液。

**2.3 供试品溶液的制备** 取本品适量, 研细, 取约 0.1 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 25 mL, 密塞, 称定质量, 超声处理 30 min (功率 200 W, 频率 40 kHz), 放冷, 再称定质量, 用甲醇补足减失的重量, 摇匀, 滤过, 取续滤液用 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

**2.4 线性关系考察** 精密量取对照品储备液 0.5, 1.0, 3.0, 5.0, 7.0, 9.0 mL 置 10 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀。按上述色谱条件依次进样 20 μL, 以进样量为横坐标, 以峰面积积分值 (Y) 为纵坐

标, 绘制标准曲线, 得回归方程为  $Y = 4.96 \times 10^2 X + 4.32 \times 10$ ,  $r = 0.9998$ 。结果表明, 齐墩果酸在 0.1004 ~ 1.807 μg 线性关系良好。

**2.5 精密度试验** 吸取齐墩果酸对照品溶液 20 μL, 重复测定 6 次, 峰面积的 RSD 1.66%。

**2.6 稳定性试验** 吸取同一供试品溶液 20 μL, 分别于 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 进样, 测定峰面积的 RSD 0.92%。表明在 24 h 内供试品溶液仍保持稳定。

**2.7 重复性试验** 精密称取同一批样品 6 份, 按 2.3 方法操作, 进行 HPLC 测定, 计算质量分数为 8.234 mg·g<sup>-1</sup>, RSD 1.29%。

**2.8 加样回收率试验** 精密称取 6 份已知含量的同批的样品约 50 mg, 分别加入齐墩果酸对照品溶液各 4.1 mL, 按 2.3 方法制备后, HPLC 测定, 记录峰面积, 计算回收率, 结果见表 1。

表 1 齐墩果酸加样回收率试验

称样量 /mg	样品含量 /mg	实测值 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
49.57	0.408 2	0.811 7	98.0		
49.63	0.408 7	0.815 6	98.9		
49.49	0.407 5	0.812 8	98.5		
50.02	0.411 9	0.833 6	102.5	99.7	1.75
49.47	0.407 3	0.815 8	99.2		
49.98	0.411 5	0.827 9	101.2		

注: 加入量均为 0.4116 mg。

**2.9 样品测定** 按上述方法测定 3 批样品中齐墩果酸的含量, 结果分别为 8.250, 8.270, 8.266 mg·g<sup>-1</sup>。

### 3 讨论

**3.1 流动相的选择** 女贞子中同时还含有熊果酸, 为齐墩果酸的同分异构体, 化学结构与性质极为相似, 两者很难分离。曾采用乙腈: 水 (95:5) 作为流动相, 齐墩果酸与熊果酸不能完全分离。通过加入适量乙酸铵调节流动相 pH, 可抑制齐墩果酸和熊果酸的解离, 改善色谱峰的峰形。当流动相的比例优化为甲醇-0.4% 乙酸铵溶液 (87:13) 时齐墩果酸和熊果酸获得了基线分离 (图 1)。况且甲醇价廉易得, 故本实验采用此流动相条件。

**3.2 提取溶剂的选择** 比较了甲醇、乙醇溶液作为溶剂的提取效果, 结果表明, 用甲醇作为溶剂提取效果好。

(下转第 104 页)

$\beta$  位的亚甲基碳信号;30.75 ~ 30.23, 26.10, 23.71, 为一系列的亚甲基碳信号;14.4 为末端甲基碳信号。结合相对分子质量为 256, 对照文献<sup>[4-5]</sup>, 确定晶 I 分子式为  $C_{16}H_{32}O_2$ , 为十六烷酸(棕榈酸)。

化合物 II: 白色颗粒状结晶(甲醇), mp 66 ~ 68 °C。EI-MS  $m/z$ : 284  $[M]^+$ ,  $^1H-NMR$  ( $CDCl_3$ , 500 MHz)  $\delta$ : 0.88 (3H, t,  $J = 6.5$  Hz), 为末端甲基信号峰; 1.26 (28H, m), 为 14 个亚甲基信号峰; 1.63 (2H, m), 为处于羧基  $\beta$  位的亚甲基信号峰, 2.34 (2H, t,  $J = 7.5$  Hz), 为羧基  $\alpha$  位的亚甲基信号峰, 在高场区没有不饱和氢信号, 提示该化合物为长链脂肪酸。 $^{13}C-NMR$  ( $CDCl_3$ , 500 MHz)  $\delta$ : 178.5, 为羧基碳信号; 33.8, 为羧基  $\alpha$  位碳信号; 31.93, 为羧基  $\beta$  位的亚甲基碳信号; 29.69 ~ 29.08, 24.72, 22.68, 为一系列的亚甲基碳信号; 14.1 为末端甲基碳信号。结合相对分子质量为 284, 确定晶 II 分子式为  $CH_3(CH_2)_{16}COOH$ , 为十八烷酸。

化合物 III: 淡黄色细针状结晶(甲醇), mp 341 ~ 343 °C。EI-MS  $m/z$ : 269  $[M-H]^-$ 。 $^1H-NMR$  (500 MHz,  $DMSO-d_6$ )  $\delta$ : 7.93 (2H, d,  $J = 8.7$  Hz, 2', 6'-H); 6.94 (2H, d,  $J = 8.7$  Hz, 3', 5'-H); 6.77 (1H, s, 3-H); 6.49 (1H, d,  $J = 2$  Hz, 8-H); 6.20 (1H, d,  $J = 2$  Hz, 6-H)。 $^{13}C-NMR$  (500 MHz,  $DMSO-d_6$ )  $\delta$ : 181.66

(C-4); 163.88 (C-2); 163.70 (C-7); 161.16 (C-9); 160.70 (C-4'); 157.32 (C-5); 128.42 (C-2', C-6'); 121.25 (C-1'); 115.85 (C-3', C-5'); 103.71 (C-10); 103.94 (C-3); 98.67 (C-6); 93.92 (C-8)。根据  $^{13}C-NMR$  及  $^1H-NMR$  数据, 为典型的黄酮类结构。与文献对照<sup>[6-7]</sup>, 确定晶 III 为芹菜素。

[参考文献]

[1] 宋立人, 等. 现代中药学大辞典[M]. 下册. 北京: 人民卫生出版社, 2001: 1751.  
[2] 闫世才, 田瑄. 海州常山叶挥发性化学成分研究[J]. 兰州大学学报: 自然科学版, 2003, 39(3): 105.  
[3] 郭峰, 闫世才. 超临界  $CO_2$  流体萃取技术对海州常山叶挥发性化学成分研究[J]. 天水师范学院学报, 2004, 24(5): 29.  
[4] 杜彰礼, 殷志奇, 叶文才, 等. 楮叶乙醇提取物石油醚部分的化学成分研究[J]. 海峡药学, 2007, 19(5): 77.  
[5] 李兰芳, 王涛, 张文彦, 等. 白羊草化学成分的研究[J]. 沈阳药科大学学报, 2000, 17(4): 269.  
[6] 徐燕, 梁敬钰. 苦苣菜的化学成分[J]. 中国药科大学学报, 2005, 36(5): 411.  
[7] 梁龙, 刘昌瑜, 李光玉. 丝瓜叶化学成分的研究[J]. 药学学报, 1996, 31(2): 122.

[责任编辑 顾雪竹]

(上接第 102 页)

**3.3 提取方法的选择** 以甲醇作为溶剂, 比较了超声提取、加热回流提取、索氏提取的提取效果, 结果发现索氏提取 5 h 齐墩果酸含量略高一些, 甲醇超声提取、加热回流提取两种方法对齐墩果酸的提取没有显著性差异, 综合考虑采用更易于操作的超声提取法制备样品。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 一部. 北京: 化学工业出版社, 2005: 31.  
[2] 罗朵生, 郭姣. 高效液相色谱法与薄层扫描法测定女贞子中齐墩果酸含量的比较[J]. 时珍国医国药, 2008, 19(6): 1411.

[责任编辑 顾雪竹]