

# 甲肿消制剂及其含药血清中熊果酸的含量测定

崔翰明\*, 程慧平, 刘喜明, 陈双厚, 朱晓芸  
(中国中医科学院广安门医院, 北京 100053)

[摘要] 目的: 建立甲肿消制剂及灌胃给予甲肿消后大鼠血清中的熊果酸含量测定方法。方法: 采用 RP-HPLC/UV 法测定熊果酸的含量, 色谱柱: Agilent HC C<sub>18</sub> 柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 和 Easyguard 保护柱, 流动相为甲醇: 0.4% 乙酸水溶液(88: 12), 检测波长为 210 nm, 流速 1 mL·min<sup>-1</sup>。结果: 制剂及大鼠血清中熊果酸的回收率分别为(100.54 ± 0.24)%、(96.77 ± 0.92)%, 熊果酸在(3.535~ 141.4) μg·mL<sup>-1</sup> 的浓度范围内线性良好。每克制剂含熊果酸 80.87 μg, 灌胃给予甲肿消后大鼠血清中熊果酸浓度为 13.74 μg·mL<sup>-1</sup>。结论: 本方法快速、简便、准确, 可用于测定制剂及血清中熊果酸的含量。

[关键词] 熊果酸; 固相萃取; 反相高效液相色谱; 含量测定

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2008)03-0010-03

## Determination of Ursolic Acid in Jia Zhong Xiao Preparation and Serum of Rat

CUI Han-ming\*, CHENG Hui-ping, LIU Xi-ming, CHEN Shuang-hou, ZHU Xiao-yun  
(Guang'anmen Hospital, China Academy of Chinese Medical Science, Beijing 100053, China)

[Abstract] **Objective:** The determination method of Ursolic acid in Jia Zhong Xiao preparation and blood serum of rat was established. **Methods:** The RP-HPLC/UV method was applied as follows: Agilent HC C<sub>18</sub> column(4.6 mm × 250 mm, 5 μm) and Easyguard column, methanol: 0.4% acetic acid solution(88: 12) as a mobile phase with flow rate of 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, UV detection at 210 nm. **Results:** The mean recovery rates of Ursolic acid in preparation and serum were (100.54 ± 0.24)% and (96.77 ± 0.92)%, respectively. The linearity of Ursolic acid was shown in the range of (3.535 ~ 141.4) μg·mL<sup>-1</sup>. The Ursolic acid in preparation and serum were 80.87 μg·g<sup>-1</sup> and 13.74 μg·mL<sup>-1</sup>. **Conclusion:** The method was simply, reliable and rapidness. It's quite suitable to be used in the analysis of Ursolic acid in Jia Zhong Xiao preparation and blood serum of rat.

[Key words] ursolic acid; SPE; RP-HPLC; determination

甲肿消处方由夏枯草、土贝母等组成, 按适当工艺制备成浓度为 3 g·mL<sup>-1</sup> 饮片的浸膏剂。动物和临床试验证明本制剂具有较好的化痰散结, 治疗甲亢型甲状腺肿大的作用。但其作用途径与机理尚不清楚。夏枯草中所含的有效成分熊果酸是一种五环三萜类化合物, 有研究表明熊果酸具有镇静、抗炎、抗菌、免疫增强、抗癌等多种活性<sup>[1]</sup>。因此, 我们采用

反相高效液相色谱法建立了制剂和大鼠血清中的熊果酸(夏枯草)的含量测定方法, 为进一步阐明本方治疗甲亢的机理提供分析方法。

### 1 材料

**1.1 仪器** LC-10A 液相色谱仪和 SPD-10A 紫外检测器(日本岛津公司); XW-80A 涡旋混合器; PHS-25 型酸度计; TGL-16G 台式高速离心机; ME215P 型分析天平(Sartorius); Agilent HC C<sub>18</sub> 柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm)(安捷伦公司); Easyguard 保护柱(迪马公司); 固相萃取小柱(C<sub>18</sub>, 200 mg, 60 μm, 3 mL, 瓦里安公司)。

**1.2 动物** 体重(330 ± 20)g 的雄性 Wistar 大鼠(医

[收稿日期] 2007-06-13

[基金项目] 国家自然科学基金(30371786)。

[通讯作者] \* 崔翰明; Tel: (010) 88001470; E-mail: cuiyaoshi@163.com.

科院动物中心,合格证号:SCXK-2005-0013)。

**1.3 药品和试剂** 夏枯草、土贝母、连翘、穿山甲和白僵蚕药材购自燕京饮片厂,熊果酸(批号:200111)、齐敦果酸(批号:200304)对照品由中国药检所提供;甲醇、乙腈、醋酸等试剂均为色谱用试剂;水为高纯水。

## 2 方法与结果

**2.1 甲肿消制剂和大鼠含药血清的制备** 甲肿消制剂的制备:按夏枯草、土贝母、连翘、穿山甲和白僵蚕 10:3:5:1:1 比例配制,加 10 倍量水煎煮提取 3 次,过滤,合并滤液,浓缩得浓度为生药  $3 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的浸膏剂。大鼠含药血清的制备:选取体重( $330 \pm 20$ )g 的雄性 SD 大鼠 30 只,其中 20 只按生药  $15 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  的剂量灌胃给予甲肿消浸膏剂,10 只按体重给予同容积生理盐水,2 次/d,连续 7 次,末次灌胃后 1 h,用玻璃毛细管自乙醚麻醉大鼠眼底采血,收集血样于离心试管中,放置 2 h 促凝,  $1500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 10 min,吸取上清液,  $0.22 \mu\text{m}$  滤膜过滤,滤液即为含药血清和空白血清,  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  冷冻保存。

### 2.2 甲肿消和大鼠含药血清中熊果酸的含量测定方法

**2.2.1 甲肿消样品的前处理方法** 精密称取甲肿消浸膏约 3 g,分别用无水乙醇(15, 15, 10 mL)超声(300 W, 55 KHz)提取 3 次,每次 5 min,滤过,合并滤液,加无水乙醇定容至 50 mL。精密量取 10 mL,减压除去溶剂,残渣加入甲醇适量,超声溶解,定容至 2 mL,  $0.45 \mu\text{m}$  滤膜过滤,取续滤液作为含量测试液。

**2.2.2 血清样品中熊果酸的前处理方法** 冻存血清于室温解冻备用。选取  $\text{C}_{18}$  SPE 柱先用 2 mL 甲醇冲洗,再用 2 mL 纯水冲洗活化;精密量取血清 1 mL 上样,弃去流出液,用 2 mL 纯水冲洗,再用 1 mL 甲醇洗脱,收集甲醇洗脱液作为色谱供试液。

**2.2.3 色谱条件** 色谱柱:Agilent HC  $\text{C}_{18}$  分析柱(4.6 mm  $\times$  250 mm, 5  $\mu\text{m}$ )和 Easyguard 保护柱;流动相:甲醇:0.4% 醋酸水溶液(88:12);流速:  $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ;检测波长:210 nm;进样 10  $\mu\text{L}$ ;结果见图 1。

**2.2.4 标准曲线的测定** 精密称取熊果酸对照品 7.07 mg,用无水乙醇配制成浓度为  $141.4 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的标准溶液,然后分别用无水乙醇稀释制成熊果酸浓度为 7.07, 17.675, 35.35, 70.7, 106.05  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的系列溶液,按 2.2.3 色谱条件测定,以熊果酸的峰面积

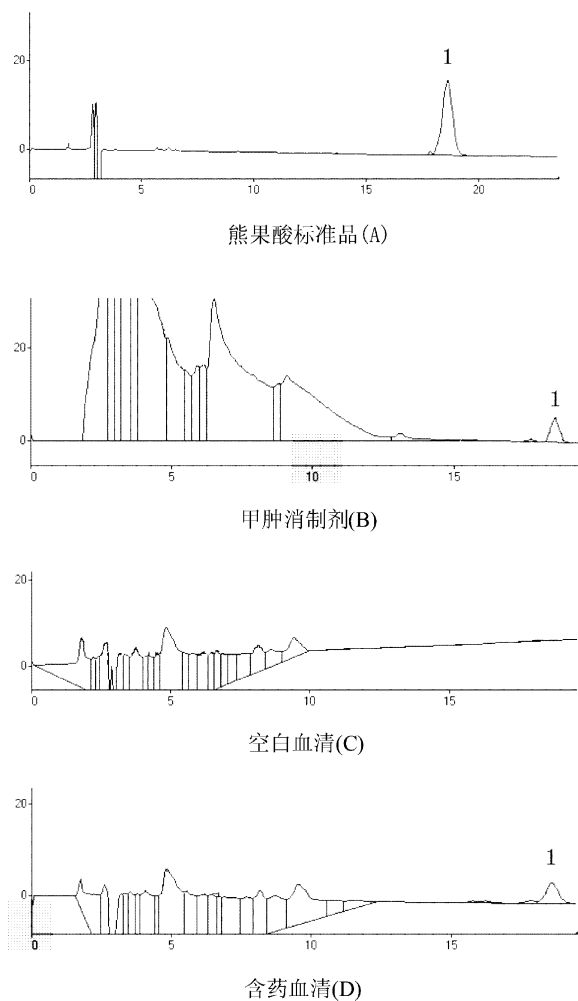


图 1 熊果酸(A)、甲肿消(B)及空白血清(C)和含药血清(D)色谱图

Fig. 1 The chromatograms of Ursolic acid (A), Jia Zhong Xiao preparation (B), blank (C) and contained drug (D) of blood serum of rat

A 和浓度 C 作图,进行线性回归,得标准曲线方程:  $A = 8299.7C + 5594.8$ ,  $r^2 = 0.9992$ ,熊果酸在(7.07 ~ 141.4)  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的浓度范围内线性良好。

取熊果酸浓度为  $141.4 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的标准溶液,分别精密量取一定量加入空白血清使熊果酸浓度分别为 3.535, 7.07, 14.14, 28.28, 35.35, 70.7  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,按 2.2.2 和 2.2.3 操作,记录熊果酸的峰面积,以峰面积 A 和浓度 C 作图,进行线性回归,得标准曲线方程:  $A = 8577.9C - 7939.5$ ,  $r^2 = 0.9994$ ,血清样品中熊果酸在(3.535 ~ 70.7)  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的浓度范围内线性良好。

**2.2.5 精密度和回收率测定** 取熊果酸浓度为  $70.7 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的样品溶液,按 2.2.3 色谱条件测定 3 次,将峰面积代入标准曲线方程计算熊果酸的浓度,与配制浓度比较,计算精密度,相对标准偏差(RSD)

为 0.24%。

取熊果酸浓度为  $70.7 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  的样品溶液加入空白制剂中, 分别按 2.2.1 和 2.2.3 操作, 测定 3 次, 将峰面积代入标准曲线方程计算熊果酸的浓度, 计算回收率为  $(100.54 \pm 0.24)\%$ 。

取熊果酸浓度为  $7.07 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  的血清样品溶液, 按 2.2.2 和 2.2.3 操作, 记录熊果酸的峰面积, 将峰面积代入标准曲线方程计算浓度, 与配制浓度比较, 计算平均回收率为  $(96.77 \pm 0.92)\%$  ( $n=3$ ), 精密度 RSD 为  $0.92\%$  ( $n=3$ )。

**2.2.6 甲肿消制剂和大鼠血清样品中熊果酸的测定** 精密称取甲肿消浸膏 3.088 g, 按 2.2.1 和 2.2.3 操作; 精密量取灌胃给予甲肿消后的大鼠血清 1 mL, 按 2.2.2 和 2.2.3 操作; 分别记录熊果酸的峰面积, 将峰面积代入标准曲线方程计算浓度, 每克制剂含熊果酸  $80.87 \mu\text{g}$ , 灌胃给予甲肿消后的大鼠血清中熊果酸浓度为  $13.74 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

### 3 讨论

制备含药血清过程中所用器具应热压灭菌, 试验中应采用无菌操作方法, 血样不可使用肝素等抗凝剂, 静置约 2 h 等待血液自然凝固后, 离心可得到含药血清<sup>[2,3]</sup>。

试验中考察了氯仿、甲醇和无水乙醇等提取溶剂和提取方法, 发现以无水乙醇为提取溶剂, 采用超声方法提取率高, 杂质干扰少<sup>[4]</sup>。由于夏枯草中同

时含有熊果酸和齐墩果酸两种结构近似的同分异构体, 二者结构均为五环三萜类化合物, 仅有 1 个甲基位置不同, 试验中采用 2005 版药典夏枯草项下的色谱分析方法未能将其完全分开(分离度 R 为 1.1–1.2)。因此试验中考察了多种配比的流动相, 发现流动相中加入一定量磷酸或醋酸可以有效改善分离度<sup>[5]</sup>, 经过优选确定流动相为甲醇: 0.4% 醋酸水溶液(88: 12); 试验中同时考察了多种色谱柱, 其中 Agilent HC C<sub>18</sub> 柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱可以将熊果酸与齐墩果酸完全分开( $R > 1.5$ ), 保留时间、分离度和峰形也较好。

### [参考文献]

- [1] 肖坤福, 郑云法, 刘成左, 等. 熊果酸的研究进展[J]. 时珍国医国药, 2005, 16(12): 1298-1300.
- [2] 宋 珏, 路 通, 谢 林, 等. 以血清药理学方法研究黄连解毒汤对小鼠的药效动力学[J]. 中草药, 2005, 36(5): 709-713.
- [3] 廖琼峰, 李 继, 吴筱妹, 等. 反相高效液相色谱法测定陆英中齐墩果酸和熊果酸的含量[J]. 药物分析杂志, 2005, 25(7): 781-783.
- [4] 赵永席, 马国营, 梁 恒. RP-HPLC-ELSD 测定山茱萸中齐墩果酸与熊果酸的含量[J]. 中成药, 2005, 27(11): 1314-1316.
- [5] 刘荣华, 余伯阳, 邱声祥, 等. 山楂叶中熊果酸的 HPLC 法比较分析[J]. 中成药, 2005, 27(3): 318-322.