

此外,甘草锌和氨来咕诺均集中在皮肤内部,透过皮肤的药量甚微,随着时间的延长,两药的量呈趋于稳定的状态。这一实验结果提示,甘草锌和氨来咕诺能够很好的透进皮肤,在溃疡表面发挥局部作用,并不需要进入到全身血液中,可以更快、更好地达到促进溃疡面愈合的治疗效果。

参考文献

- [1] 种清云. 中医药治疗口腔溃疡之我见 [J]. 陕西中医函授, 2001, 1(1): 18.
- [2] 刘亚梅, 季金坤, 刘青. 甘草锌治疗复发性口疮 36 例疗效观察 [J]. 齐鲁药事, 2005, 24(2): 118.
- [3] 卞志家, 刘衡, 王春龙, 等. 氨来咕诺经对兔口腔颊粘膜的渗透性 [J]. 中国药理学杂志, 2006, 41(9): 683.
- [4] Khandwala A, Richard G. Van Inwegen, et al. 5% Amlexanox oral paste, a new treatment for recurrent minor aphthous ulcers I: Clinical demonstration of acceleration of healing and resolution of pain [J]. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 1997, 83(2): 222-230.
- [5] Atul Khandwala, Richard G. Van Inwegen, Martha R. Charney, et al. 5% Amlexanox oral paste, a new treatment for recurrent minor aphthous ulcers II: Pharmacokinetics and demonstration of clinical safety [J]. Oral Surg Oral Med Oral Pathol, 1997, 83(2): 231-238.
- [6] 周东新. 口腔缓释粘附膜剂与粘附片剂的比较 [J]. 现代中药研究与实践, 2003, 17(6): 34-36.
- [7] 中国药典 [S]. 一部, 2005: 59.

(收稿日期 2009-12-24)

HPLC 法测定女贞叶乙醇提取物中的齐墩果酸与熊果酸

石静¹, 聂晶^{2*}, 冯钰琦¹

(1. 武汉大学化学与分子科学学院 化学系, 湖北 武汉 430072; 2. 湖北省食品药品监督检验研究院 中药室, 湖北 武汉 430064)

摘要:目的 建立 RP-HPLC 法同时测定女贞叶乙醇提取物中齐墩果酸与熊果酸的方法。方法 通过系统地考察温度、pH 值、甲醇-乙腈混有机相中甲醇的量对齐墩果酸、熊果酸保留时间和分离度的影响, 最终确定 HPLC 色谱条件为大连依利特 Kromasil C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱; 甲醇-乙腈-10 mmol/L 乙酸铵 (55:27:18) 为流动相, 体积流量为 1 mL/min, 检测波长为 205 nm, 柱温 20 ℃。结果 齐墩果酸与熊果酸分别在 0.300~3.00 μg、0.692~6.92 μg 线性关系良好; 加样平均回收率分别为 101.4%、100.2% (n=9)。结论 低温、中性 pH、甲醇-乙腈混有机相有利于齐墩果酸与熊果酸的分离。优化后的色谱方法分离度高, 重现性好, 可用于女贞叶乙醇提取物中齐墩果酸与熊果酸的测定。

关键词: 高效液相色谱; 女贞叶乙醇提取物; 齐墩果酸; 熊果酸

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

文章编号: 1674-5515(2010)03-0210-05

HPLC Determination of oleanolic acid and ursolic acid in ethanol extract of *Ligustrum lucidum* leaves

SHI Jing¹, NIE Jing², FENG Yu-qi¹

(1. College of Chemistry and Molecular Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072, China;

2. Hubei Institute for Food and Drug Control, Wuhan 430064, China)

Abstract: **Objective** To establish a RP-HPLC method for simultaneous quantitative determination of oleanolic acid and ursolic acid in ethanol extract of *Ligustrum lucidum* Ait. leaves. **Methods** Temperature, pH value and proportion of methanol and acetonitrile in organic phase were systematically studied on the influence of retention and resolution between oleanolic acid and ursolic acid. The optimized chromatographic condition was Kromasil C₁₈ column (250 mm×4.6 mm, 5 μm); methanol-acetonitrile-10 mmol/L

作者简介 石静(1984—), 贵州省松桃县人, 硕士研究生, 主要从事中药有效成分提取分离及分析研究。

*** 通讯作者** 聂晶, Tel: 027-87272513, E-mail: niejingwh@sina.com

ammonium acetate (55 : 27 : 18) as mobile phase with flow rate 1.0 mL/min. The detection wavelength was 205 nm and column temperature was 20 °C. **Results** The linear ranges of oleanolic acid and ursolic acid were 0.300~3.00 µg, 0.692~6.92 µg respectively; the average recoveries were 101.4%, 100.2% ($n=9$) respectively. **Conclusion** Low temperature, neutral pH and mixed organic phase with methanol-acetonitrile can improve resolution of oleanolic acid and ursolic acid. The optimized method can achieve better resolution and reproducibility, and is suitable to determine the content of oleanolic acid and ursolic acid in ethanol extract of *Ligustrum lucidum* Ait. leaves.

Key words: HPLC; ethanol extract of *Ligustrum lucidum* Ait. Leaves; oleanolic acid; ursolic acid

女贞叶为木犀科植物女贞 *Ligustrum lucidum* Ait. 的干燥叶,其乙醇提取物主要活性成分为齐墩果酸与熊果酸^[1],用于治疗肝肾阴虚、阴虚阳亢证所致的原发性高血脂症^[2-3]。齐墩果酸、熊果酸为五环三萜类同分异构体,结构相似,性质相近,二者常以结合或游离的形式同时广泛存在于多科植物中,因此齐墩果酸与熊果酸的分离测定对中药的质量研究具有重要的意义。近年来,随着分离检测手段的多样化,已有采用高效液相色谱法对二者进行研究的报道,其中主要有高效液相色谱-紫外光检测法^[4]、高效液相色谱-蒸发光散射法^[5]、高效液相色谱-核磁共振^[6]等。本实验采用高效液相色谱-紫外光检测法,系统考察了 pH、温度、有机相中甲醇、乙腈比例对熊果酸与齐墩果酸分离的影响,为选择这类同分异构体化合物的色谱分离条件提供了参考。对女贞叶乙醇提取物中齐墩果酸与熊果酸的测定结果表明,该方法简便可行、灵敏、准确、重现性好。

1 仪器与试剂

HP-1100 型高效液相色谱仪 (Agilent 公司, 美国); 大连依利特 kromasil C₁₈ 液相色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 µm); METTLER TOLEDO AG135 电子天平; Sartorius BS-210s 电子天平。

齐墩果酸对照品 (批号 110709-200304), 熊果酸对照品 (批号 111567-200502), 均购自中国药品生物制品检定所。所有样品均由三九黄石制药厂提供, 批号为 080801、080802、081201、081202、090101、090102、090103、090104、090105; 甲醇、乙腈均为色谱纯 (美国 TEDIA); 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 对照品溶液的制备

分别精密称取齐墩果酸和熊果酸对照品 7.50、17.28 mg, 置 50 mL 量瓶中, 加甲醇制成 0.150

mg/mL 齐墩果酸和 0.346 mg/mL 熊果酸的混合溶液, 摇匀, 即得。

2.1.2 供试品溶液的制备

取女贞叶乙醇提取物 0.1 g, 精密称定, 置 100 mL 量瓶中, 加甲醇适量, 超声处理 (功率 250 W, 频率 33 kHz) 10 min, 放冷, 加甲醇至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

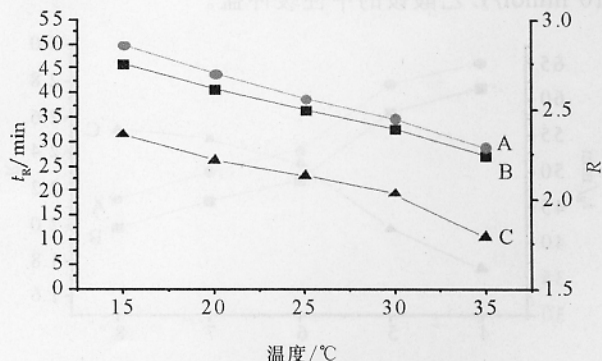
2.2 色谱条件的选择

2.2.1 测定波长的选择

分别取熊果酸与齐墩果酸对照品溶液, 于 200~400 nm 扫描, 确定最大吸收波长为 204 nm 和 206 nm。故选择检测波长为 205 nm。

2.2.2 温度的影响

有文献报道改变温度可改善离子型化合物的分离^[7-8], 因此采用“2.2.6”项下的色谱条件 (除柱温变化外), 考察了不同温度对齐墩果酸和熊果酸的分离度及保留时间的影响。结果表明随着温度降低, 两个化合物的保留时间均延长, 但分离度得到改善 (图 1)。综合考虑分离度及保留时间两个因素, 选择柱温为 20 °C。



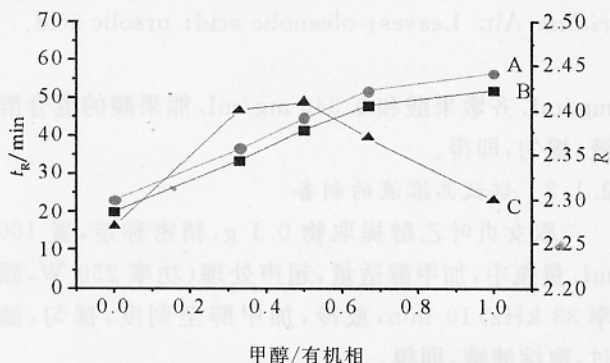
A-熊果酸 B-齐墩果酸 C-熊果酸与齐墩果酸的分离度

图 1 柱温对齐墩果酸与熊果酸保留时间及其分离度的影响

2.2.3 甲醇与乙腈比例的考察

以“2.2.6”项下的色谱条件 (除有机相比例变化

外),考察有机相中甲醇与乙腈的比例对熊果酸和齐墩果酸保留时间和分离度的影响,结果见图2。可以看出混合有机相更有利于齐墩果酸与熊果酸的分离,当甲醇-乙腈为1:1时,其分离度达最大,而当甲醇量增加到67%即甲醇-乙腈为2:1时,保留时间的变化趋于稳定。从分离度和重现性方面综合考虑,选择有机相中甲醇量为67%作为有机相。

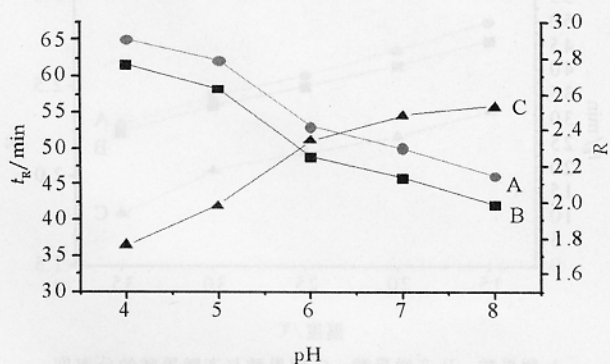


A-熊果酸 B-齐墩果酸 C-熊果酸与齐墩果酸的分离度

图2 有机相中甲醇比例对齐墩果酸和熊果酸保留时间及其分离度的影响

2.2.4 pH的影响

熊果酸与齐墩果酸为离子型化合物,其色谱保留时间受pH的影响较大。以“2.2.6”项下的色谱条件(除缓冲盐pH变化外),考察了不同pH值的水相对熊果酸和齐墩果酸保留时间和分离度的影响,结果见图3。随着pH值的增加,熊果酸与齐墩果酸的保留时间降低,且两者的分离度增大,说明随着离子化程度的增加,两者的分离得到改善。该现象与通过函数模型进行熊果酸与齐墩果酸色谱分离条件优化的pH值选择结果一致^[7]。因此最终选择10 mmol/L 乙酸铵的中性缓冲盐。



A-熊果酸 B-齐墩果酸 C-熊果酸与齐墩果酸的分离度

图3 pH对齐墩果酸和熊果酸的保留时间及其分离度的影响

2.2.5 不同色谱柱对分离的影响

根据优化结果,最终选择流动相为甲醇-乙腈-

10 mmol/L 乙酸铵(55:27:18)。并按照优化后的色谱条件,考察了不同色谱柱对两成分分离的影响,结果表明依利特 Kromasil C_{18} (250 mm×4.6 mm, 5 μ m), SHIMADZU VP-ODS shim-pack (250 mm×4.6 mm, 5 μ m), Akasil- C_{18} (200 mm×4.6 mm, 5 μ m), CAPCELL PAK C_{18} (250 mm×4.6 mm, 5 μ m) 柱均能达到齐墩果酸和熊果酸的完全分离。最终选择色谱柱为大连依利特 Kromasil C_{18} (250 mm×4.6 mm, 5 μ m), 该色谱柱分离的色谱图峰形较好。

2.2.6 色谱条件

最终确定的色谱条件为:大连依利特 Kromasil C_{18} 液相色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μ m); 流动相为甲醇-乙腈-10 mmol 乙酸铵 (55:27:18), 检测波长为 205 nm, 体积流量为 1 mL/min, 柱温 20 $^{\circ}$ C, 进样量均为 10 μ L。

2.3 线性关系考察

分别吸取“2.1.1”项下的对照品溶液 2、5、10、15、20 μ L, 注入高效液相色谱仪, 记录各色谱峰的峰面积。以进样量为横坐标(X), 峰面积积分值为纵坐标(Y), 进行线性回归, 分别得到齐墩果酸的回归方程 $Y=111.8X-54.5$ ($r=0.9994$); 熊果酸回归方程为 $Y=232.9X-90.5$ ($r=0.9998$)。结果表明齐墩果酸和熊果酸分别在 0.300~3.000 μ g、0.692~6.920 μ g 线性关系良好。

2.4 专属性试验

照“2.2.6”项下色谱条件, 分别吸取供试品溶液及对照品溶液各 10 μ L 注入高效液相色谱仪, 色谱图见图4。结果表明本法专属性较好。

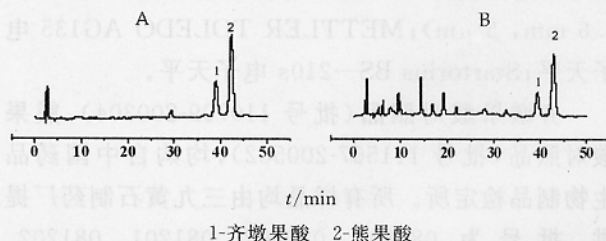


图4 对照品(A)和供试品(B)的HPLC图

2.5 精密度试验

取同一批供试品(批号 080801), 照“2.1.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.2.6”项下色谱条件进样6次, 每次 10 μ L, 测定, 结果齐墩果酸、熊果酸峰面积的RSD分别为1.9%、1.6%。

2.6 重现性试验

取同一批供试品(批号 080801) 6份, 照

“2.1.2”项下方法分别制备供试品溶液,按“2.2.6”项下色谱条件测定,结果齐墩果酸、熊果酸质量分数分别为8.33%、28.81%,RSD分别为2.1%、1.7%。

2.7 稳定性试验

吸取上述供试品溶液(批号080801),分别于0、2、4、6、8、10、12 h进样10 μ L,计算齐墩果酸、熊果酸峰面积的RSD分别为2.2%、1.9%($n=7$)。结

果表明供试品溶液在12 h内稳定性较好。

2.8 加样回收试验

取已知量的供试品(批号080801)共9份,分别精密加入一定量齐墩果酸与熊果酸对照品溶液,照“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.2.6”项下色谱条件测定。结果齐墩果酸、熊果酸的平均回收率分别为101.4%、100.2%,RSD分别为1.5%、1.9%,详见表1。

表1 女贞叶乙醇提取物中齐墩果酸与熊果酸加样回收率试验

成分	取样量/mg	样品/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
齐墩果酸	50.8	4.54	6.32	10.91	100.8	101.4	1.5
	50.1	4.48	6.32	10.83	100.5		
	49.6	4.43	6.32	10.70	99.2		
	49.3	4.41	4.33	8.79	101.2		
	50.4	4.51	4.33	8.90	101.4		
	50.3	4.50	4.33	8.86	100.7		
	49.5	4.43	2.10	6.59	102.9		
	49.8	4.45	2.10	6.59	101.9		
	50.2	4.49	2.10	6.68	104.3		
	50.8	14.51	22.29	36.88	100.4	100.2	1.9
熊果酸	50.1	14.31	22.29	36.78	100.8		
	49.6	14.17	22.29	36.71	101.1		
	49.3	14.08	14.48	29.11	103.8		
	50.4	14.39	14.48	28.56	97.9		
	50.3	14.37	14.48	28.63	98.5		
	49.5	14.14	7.43	21.68	101.5		
	49.8	14.22	7.43	21.56	98.8		
	50.2	14.34	7.43	21.70	99.1		

2.9 样品的测定

取女贞叶乙醇提取物9批,每批样品取2份,按照“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,测定,以外标法计算齐墩果酸和熊果酸的量,结果见表2。

表2 样品测定结果

批号	齐墩果酸/%	熊果酸/%
080801	8.94	28.56
080802	8.19	27.82
081201	14.48	29.11
081202	12.99	27.99
090101	11.58	24.93
090102	12.64	27.74
090103	14.38	27.10
090104	14.84	29.05
090105	14.77	29.98

3 讨论

3.1 中药提取物产业是从中药产业中分化出来的新兴领域,它体现了中药产业的技术进步和中药现代化的要求。女贞叶乙醇提取物中三萜化合物总量超过70%,其中熊果酸、齐墩果酸的总量在35%~45%。

3.2 本实验系统地考察温度、pH值、甲醇-乙腈混

合有机相中甲醇的量对齐墩果酸、熊果酸保留时间和分离度的影响,结果表明低温、中性pH、甲醇-乙腈混合有机相有利于齐墩果酸与熊果酸的分离。优化后的色谱方法分离度高、重现性好,可用于齐墩果酸与熊果酸的测定及女贞叶乙醇提取物的质量控制。

参考文献

- [1] 姚平,何宗玉,闫光凡,等.大孔吸附树脂纯化女贞子中齐墩果酸和熊果酸的研究[J].中草药,2007,36(10):1498-1501.
- [2] 国家药典委员会.国家食品药品监督管理局国家药品标准新药转正标准第38册[S].2004:67-70.
- [3] 张岩,黄文秀,陈文武,等.女贞子对去卵巢大鼠钙代谢及维生素D依赖型基因表达的影响[J].中草药,2006,37(4):558-561.
- [4] Li EN, Luo JG, Kong LY. Qualitative and quantitative determination of seven triterpene acids in *Eriobotrya japonica* Lindl. by high-performance liquid chromatography with photodiode array detection and mass spectrometry [J]. Phytochem Anal, 2009, 20(4): 338-343.
- [5] 李涛,赫武常,许长根,等. HPLC-ELSD法测定不同产地女贞子中齐墩果酸和熊果酸的含量 [J]. 中药材, 2005, 28(5): 391-393.

- [6] Kontogianni V G, Exarchou V, Troganis A, *et al.* Rapid and novel discrimination and quantification of oleanolic and ursolic acids in complex plant extracts using two-dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy—Comparison with HPLC methods [J]. *Anal Chim Acta*, 2009, 635(2): 188-195.
- [7] Snyder L R, Kirkland J J, Glajch J L, *et al.* Practical HPLC Method Development [M]. New York: Wiley-Interscience, 1997: 325.
- [8] Hancock W S, Chloupek R C, Kirland J J, *et al.* Temperature as a variable in reversed-phase high-performance liquid chromatographic separation of peptide and protein samples [J]. *J Chromatogr A*, 1994, 686(1): 31-43.
- [9] 彭 旂, 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): 26-30.

(收稿日期 2010-02-26)

肃清丸的质量标准研究

李广松, 顾宇虹, 康荣明, 刘志惠, 韩 娜, 殷 军

(沈阳药科大学中药学院, 辽宁 沈阳 110016)

摘要:目的 制定肃清丸质量控制标准。方法 采用薄层色谱法对肃清丸中的金银花、玄参、当归、黄芪、地榆、甘草、连翘进行定性鉴别, 采用高效液相色谱法测定肃清丸中绿原酸的量。色谱柱为 Luna C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-0.4%磷酸溶液(10:90), 柱温 30℃, 体积流量为 1.0 mL/min, 检测波长为 328 nm。结果 金银花、玄参、当归、黄芪、地榆、甘草、连翘薄层色谱斑点清晰, 重现性好, 无干扰; 绿原酸在 5.4~54.0 μg/mL 线性关系良好, 平均回收率为 99.77%, RSD=1.59% (n=6)。结论 所建立的定性和定量方法结果准确、可靠、重现性好, 可用于肃清丸的质量控制。

关键词:肃清丸; 质量控制; 定性分析; 薄层色谱; 绿原酸; 定量分析; 高效液相色谱

中图分类号: R927.11

文献标识码: A

文章编号: 1674-5515(2010)03-0214-06

Study on quality standard for Suqing Pills

LI Guang-song, GU Yu-hong, KANG Rong-ming, LIU Zhi-hui, HAN Na, YIN Jun

(College of Traditional Chinese Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

Abstract: **Objective** To establish the quality standard for Suqing Pills. **Methods** TLC was applied to identify *Flos Lonicerae*, *Radix Scrophulariae*, *Radix Angelicae Sinensis*, *Radix Astragali*, *Radix Sanguisorbae*, *Radix Glycyrrhizae*, and *Fructus Forsythiae*. HPLC was applied to determine the contents of chlorogenic acid in the prescription, in which Luna C₁₈ column (250 mm×4.6 mm, 5 μm) was used. The mobile phase consisted of acetonitrile-0.4% phosphoric acid (10:90) solution, and the flow rate was 1.0 mL/min. Column temperature was at 30 °C and the detection wavelength was set at 328 nm. **Results** The spots on TLC plates were clear without interference in the blank reference. The linearity range of chlorogenic acid was 5.4—54.0 μg/mL, the average recovery of chlorogenic acid was 99.77%, and RSD was 1.59% (n=6). **Conclusion** The established method is accurate, feasible and reproducible. It can be used for the quality standard control of Suqing Pills.

Key words: Suqing Pills; quality control; qualitative analysis; TLC; chlorogenic acid; quantitative analysis; HPLC

肃清丸是由金银花、玄参、当归、黄芪、地榆、甘草、连翘等组成的中药水丸制剂, 由阜新市中医医院制剂室监制, 具有清热解毒、凉血止血、止泻的功效,

用于湿热蕴脾所致泄泻, 症见腹泻、脓血便、腹痛、里急后重、肛门灼热、尿赤、舌红苔黄腻、脉滑数, 溃疡性结肠炎见上述证候者。经多年临床应用证实, 肃