

DOI:10.3724/SP.J.1008.2012.01263

高效液相色谱法测定清肝散结颗粒中熊果酸及齐墩果酸的含量

赵亮¹, 王新霞¹, 黎越丹², 周瑾¹, 张海¹, 吕磊¹, 张国庆¹, 柴逸峰^{3*}

1. 第二军医大学东方肝胆外科医院药材科, 上海 200438
2. 解放军第161医院药械科, 武汉 430010
3. 第二军医大学药学院, 上海 200433

[摘要] **目的** 将本院协定处方清肝散结方制成颗粒剂后,对清肝散结颗粒中所含化学成分熊果酸及齐墩果酸进行含量测定,建立制剂质量控制方法。**方法** 采用高效液相色谱法,色谱柱 Chromsil-C₁₈ (4.6 mm×250 mm, 5 μm),流动相 A 相为 0.1%甲酸水溶液, B 相为甲醇, A : B = 12 : 88,流速为 1.0 ml/min,柱温 25℃,紫外检测波长 210 nm,进样量 50 μl,运行时间为 25 min。**结果** 熊果酸和齐墩果酸能够达到基线分离,二者分别在 6.1~97.6、6.4~102 μg/ml 范围内呈良好的线性关系($r > 0.999$),日内和日间精密度的均小于 2% ($n = 3$),平均回收率分别为 95.4% (RSD 1.54%, $n = 6$)、99.2% (RSD 1.97%, $n = 6$)。**结论** 该法简便、快捷,结果准确、重复性好,可用于清肝散结颗粒中熊果酸和齐墩果酸的质量控制。

[关键词] 清肝散结颗粒;熊果酸;齐墩果酸;高压液相色谱法

[中图分类号] R 917.7 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2012)11-1263-04

High performance liquid chromatography in determining ursolic acid and oleanolic acid contents in *Qinggansanjie* granules

ZHAO Liang¹, WANG Xin-xia¹, LI Yue-dan², ZHOU Jin¹, ZHANG Hai¹, LÜ Lei¹, ZHANG Guo-qing¹, CHAI Yi-feng^{3*}

1. Department of Pharmacy, Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438, China
2. Department of Pharmacy, No. 161 Hospital of PLA, Wuhan 430010, Hubei, China
3. School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[Abstract] **Objective** To establish a method for determining the contents of ursolic acid and oleanolic acid in *Qinggansanjie* granules for quality control of the preparation. **Methods** High-performance liquid chromatography with a diode-array detector (HPLC-DAD) was used for determination at the following conditions: The column was Chromsil-C₁₈ (4.6 mm×250 mm, 5 μm), mobile phase was A: 0.1% (V/V) formic acid solution, B: methanol, A : B = 12 : 88. The flow rate was 1.0 ml/min, the temperature of column was 25℃, the detection wavelength was set at 210 nm, the injection volume was 50 μl, and the running time was 25 min. **Results** Ursolic acid and oleanolic acid could be separated on baseline, with the linear range being 6.1-97.6 μg/ml for ursolic acid and 6.4-102 μg/ml for oleanolic acid. The results of intra-day and inter-day precisions were both within 2% ($n = 3$), and the average recovery was 95.4% (RSD 1.54%, $n = 6$) and 99.2% (RSD 1.97%, $n = 6$). **Conclusion** The present method is simple, rapid, accurate, and with satisfactory repeatability; it can be used for quality control of ursolic acid and oleanolic acid in *Qinggansanjie* granules.

[Key words] *Qinggansanjie* granules; ursolic acid; oleanolic acid; high pressure liquid chromatography

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2012, 33(11):1263-1266]

中药复方清肝散结方是第二军医大学东方肝胆外科医院中西医结合治疗科经长期临床实践总结得出的抗肝癌基本方,由猫人参、石见穿、白花蛇舌草及半枝莲等十四味中药组成。组方中猫人参、石见穿、白花蛇舌草及半枝莲为君药,

具有清热利湿,化痰解毒的功效;白术、茯苓及灵芝为臣药,具有扶正祛邪,健脾理气的作用;八月扎、平地木、柴胡、黄芩、茵陈及垂盆草为佐药,具有疏肝理气,清热祛湿的作用;甘草为使药,具有调和诸药,缓解毒性的作用。该方主要用

[收稿日期] 2012-09-12 **[接受日期]** 2012-10-18

[作者简介] 赵亮,主管药师. E-mail: zhaoliangphar@yahoo.com.cn

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 021-81871201, E-mail: yfchai@smmu.edu.cn

于湿热型原发性肝癌的治疗及预防肝癌切除后的复发。

组方君药中猫人参又名猫气藤、沙梨藤、糯米饭藤、痢草,其味苦、涩,性寒,归肺、胃经,具有清热解毒、消肿、祛风除湿的功效。主要用于骨髓炎、疮疡脓肿、风湿痹痛、肝硬化黄疸腹水、麻风病等,民间常用于治疗消化道肿瘤^[1-2]。石见穿系唇形科植物华鼠尾草的干燥地上部分,亦名小丹参、华鼠尾,民间主治噎膈、痰喘、赤白带、痢肿、瘰疬等症^[3-4]。白花蛇舌草为茜草科一年生草本植物白花蛇舌草的全草,其性甘寒,微苦,具有清热解毒、利尿消肿功效,现代药理研究表明具有抗肿瘤、抗菌、消炎等活性^[5-6],以上三味药材中均含有熊果酸(ursolic acid, UA)及齐墩果酸(oleanolic acid, OA)。半枝莲为唇形科黄芩属植物半枝莲的全草,主要功效为清热、解毒、散瘀、止血及利尿等,在临床上广为应用,黄酮类化合物在该植物中含量最多,包括野黄芩苷、野黄芩素等,并且为该药的主要有效成分^[7-8]。目前已证实,UA和OA具有非常广泛的生理、药理活性,两者广泛存在于植物中,具有保肝、抗炎、抗变态反应、抗病毒、抗菌和抗肿瘤等作用^[9-12]。UA和OA是化学立体结构基本相同的同分异构体,是一类生物活性广、不良反应甚低的活性成分。目前,对UA和OA的检测方法主要有高效液相紫外色谱法^[13-15]、液质联用^[16-17]及高效液相色谱-蒸发光散射检测法^[18-19]等。为了有效控制清肝散结颗粒的质量,本实验采用高效液相色谱紫外检测法对该制剂中君药所含的UA和OA进行含量测定,为该制剂建立快速、简便、结果准确、重复性好的质量控制方法。

1 仪器和试剂

1.1 仪器 Agilent 1100 系列高效液相色谱仪(美国安捷伦公司),包括 G1379A 真空脱气机、G1311A 四元泵、G1367A 自动进样器、G1316A 柱温箱和 G1315B DAD 检测器;色谱柱型号为 Chromsil-C₁₈ (4.6 mm×250 mm, 5 μm); KUDOS-SK2200H 超声器(上海科导超声仪器公司); METTLER AE240 型十万分之一电子天平(德国梅特勒公司); SB3200-T 超声波清洗器(上海市必能信超声有限公司); SORVALL Legend Micro 17 离心机(美国 Thermo 公司); 电热恒温水浴锅(上海跃进医疗器械厂); PW Ultra-pure 超纯水系统(香港 Heal Force 公司)。

1.2 试剂 猫人参 *Actinidia valvata* Dunn, 批号: 100901, 产地: 安徽; 石见穿 *Salvia chinensis* Benth, 批号: 100730, 产地: 山东; 白花蛇舌草 *Oldenlandia diffusa* (Willd.), 批号: 2010120466, 产地: 江苏; 半枝莲 *Scutellaria barbata* D. Don, 批号: 2010100028, 产地: 湖北; 白术 *Atractylodes macrocephala* Koidz, 批号: 100927, 产地: 浙江; 茯苓 *Poria cocos* (Schw.) Wolf, 批号: 100927, 产地: 安徽; 灵芝 *Ganoderma lucidum* (Leyss. ex Fr.) Karst, 批号: 100827, 产地: 安徽; 八月扎 *Akebia quinata* (Thunb.) Decne, 批号: 2010090033, 产地: 安徽; 平地木 *Ardisia japonica* (Thunb.) Blume, 批号: 100826, 产地: 江苏; 柴胡 *Bupleurum chinense* DC, 批号:

2010122501, 产地: 甘肃; 黄芩 *Scutellaria baicalensis* Georgi, 批号: 101019, 产地: 山东; 茵陈 *Artemisia capillaries* Thunb, 批号: 100224, 产地: 江苏; 垂盆草 *Sedum sarmentosum* Bunge, 批号: 100928, 产地: 安徽; 甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch, 批号: 2011020077, 产地: 安徽。药材均经第二军医大学药学院生药学教研室孙连娜副教授鉴定。对照品 UA 和 OA 购自中国药品生物制品检定所(纯度>98.0%)。乙醇、乙酸乙酯均为分析纯; 甲醇为色谱纯(美国, Honeywell 公司), 甲酸为色谱纯(美国, Sigma 公司), 水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 清肝散结颗粒的制备工艺 称取 60 倍处方量的药材共 13.2 kg, 用 10 倍量水煮沸提取 2 h, 过滤, 收集滤液, 滤渣用 8 倍量水煮沸提取 1.5 h, 过滤, 收集滤液, 弃掉滤渣, 合并两次滤液, 煮沸浓缩至浸膏, 得约 2 kg 浸膏, 按 1:2 加入辅料糊精约 4 kg, 制颗粒, 烘干得 3.2 kg 颗粒剂, 以每包 15 g 进行外小包装袋灌装, 共得 188 袋清肝散结方颗粒剂。

2.2 液相色谱条件 色谱柱为 Chromsil C₁₈ (4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相 A 相为 0.1% 甲酸水溶液, B 相为甲醇, A:B=12:88; 流速为 1.0 ml/min; 柱温 25℃; 紫外检测波长为 210 nm; 进样量 50 μl; 运行时间为 25 min。

2.3 供试品溶液的制备 精密称取清肝散结颗粒样品 15 g, 装入 250 ml 锥形瓶中, 加入 120 ml 甲醇, 超声处理 45 min, 过滤, 收集滤液, 滤渣加入 120 ml 甲醇, 超声 45 min, 过滤, 收集滤液, 合并 2 次滤液, 置蒸发皿中, 水浴 80℃ 挥干, 加甲醇溶解并转移至 5 ml 量瓶中, 定容。取此溶液置 1 650×g 离心 5 min, 取上清液过 0.45 μm 有机微孔滤膜, 取续滤液即得供试品溶液。

2.4 对照品储备液的制备 精密称取 UA 对照品 6.10 mg、OA 对照品 8.50 mg, 置 10 ml 量瓶中, 加入甲醇溶解并定容, 即得 UA 浓度 610 μg/ml、OA 浓度为 850 μg/ml 的对照品储备液, 置冰箱 4~10℃ 保存。

2.5 方法学考察

2.5.1 标准曲线的制备 采用逐级稀释法, 精密量取 UA 和 OA 对照品溶液适量, 置于 10 ml 量瓶中, 加入甲醇定容, 配制系列浓度对照品溶液。得 UA 为 6.1、12.20、24.40、48.80、73.20、97.60 μg/ml, OA 为 6.4、12.75、25.50、51.00、76.50、102.0 μg/ml 的系列混合对照品溶液。按 2.2 项下色谱条件进样分析, 以浓度为横坐标(X), 液相色谱峰面积为纵坐标(Y)进行线性回归, 得回归方程。UA: $Y=24.446X+12.552$, $r=0.9997$, 线性范围 6.1~97.60 μg/ml, OA: $Y=22.389X+17.696$, $r=0.9999$, 线性范围 6.4~102.0 μg/ml。

2.5.2 定量限及检测限 将 UA 和 OA 分别进行稀释, 按 2.2 项下色谱条件进样, 以信噪比为 10:1 时, 确定其最低定量限, UA 和 OA 的最低定量限分别为 6.100 μg/ml 和 6.375 μg/ml。以信噪比为 3:1 时, 确定其最低检测限, UA 和 OA 的最低检测限分别为 2.440 μg/ml 和 2.550 μg/ml。

2.5.3 系统适应性 按 2.2 项下色谱条件进样检测, 得液相色谱图, 见图 1C, OA 保留时间为 17.8 min, UA 保留时间为 18.9 min, 二者色谱分离度 >1.5 , UA 的色谱峰对称性为 0.96, 塔板数 $>8\ 000$, OA 的色谱峰对称性为 1.00, 塔板数 $>8\ 000$ 。

2.5.4 专属性 每袋清肝散结颗粒相当于原处方量药材的 1/3, 称取 1/3 处方量的原药材, 不含猫人参、石见穿、白花蛇舌草及半枝莲, 置 250 ml 锥形瓶中, 加入 120 ml 甲醇, 超声 45 min, 过滤, 收集滤液, 滤渣加入 120 ml 甲醇, 超声 45 min, 过滤, 收集滤液, 合并 2 次滤液, 水浴挥干, 加入甲醇使溶解, 转移至 5 ml 量瓶中, 定容, $1\ 650\times g$ 离心 5 min, 取上清液过 $0.45\ \mu\text{m}$ 有机微孔滤膜, 按 2.2 项下色谱条件进样分析, 结果见图 1B, 检测到有低浓度的 UA 和 OA 色谱峰。以空白溶剂进样, 结果见图 1A, 未见 2 种成分的色谱峰。说明组方中除君药外, 还有其他药材也含有 UA 和 OA, 但相对实测样品而言其值甚低, 说明此 2 种化学成分在君药中含量较高, 为君药主要化学成分, 故以 UA 和 OA 的含量测定来控制该制剂质量具有一定的可靠性。

2.5.5 精密性 取混合对照品溶液, UA 浓度 6.1、48.8、97.6 $\mu\text{g/ml}$ 及 OA 6.4、51.0、102.0 $\mu\text{g/ml}$ 作为低、中、高 3 个浓度点, 按 2.2 项下色谱条件, 在 1 d 内分别进样 3 次, 以及连续 3 d 分别进样, 考察日内精密性和日间精密性, 结果 OA 日内精密性 RSD 分别为 1.24%、0.89%、0.56%, 日间精密性 RSD 分别为 0.88%、0.76%、0.19%; UA 日内精密性 RSD 分别为 1.96%、0.19%、0.32%, 日间精密性 RSD 分别为 1.61%、1.34%、0.23%。二者在 3 个不同浓度的日内、日间精密性均小于 2%。

2.5.6 重复性 精密称取 6 份清肝散结颗粒样品, 每份约 15 g, 分别置 250 ml 锥形瓶中, 按 2.3 项下制备供试品溶液, 按 2.2 项下色谱条件进样分析。结果 OA 平均浓度为 21.88 $\mu\text{g/ml}$, RSD 为 1.42%, UA 平均浓度为 49.60 $\mu\text{g/ml}$, RSD 为 1.82%, 重复性结果均小于 2%。

2.5.7 准确度 精密称取 6 份清肝散结颗粒样品, 每份约 7.5 g, 置 250 ml 锥形瓶中, 再分别精密加入 UA 浓度为 97.6 $\mu\text{g/ml}$ 及 OA 浓度为 102.0 $\mu\text{g/ml}$ 的对照品混合液 1 ml, 按 2.3 项下制备供试品溶液, 按 2.2 项下色谱条件进样分析, 计算加样回收率。OA 加样回收率为 101.9%, RSD 为 1.22%, UA 加样回收率为 99.67%, RSD 为 2.28%。

2.5.8 稳定性 称取清肝散结颗粒样品约 15 g, 按 2.3 项下制备供试品溶液, 分别于 0、2、6、12、24 h, 按 2.2 项下色谱条件进样分析, OA 的峰面积 RSD 为 1.64%, UA 的峰面积 RSD 为 1.59%, 显示 24 h 内稳定性良好。

2.6 样品的测定 精密称取 3 份清肝散结颗粒样品, 每份约 15 g, 置 250 ml 锥形瓶中, 按 2.3 项下制备供试品溶液, 按 2.2 项下色谱条件进样分析(色谱图见图 1D), 记录峰面积, 代入标准曲线计算样品浓度, 得清肝散结颗粒中 OA 的含量为 7.29 $\mu\text{g/g}$, RSD 为 2.46%, UA 含量为 16.37 $\mu\text{g/g}$, RSD 为 2.87%。

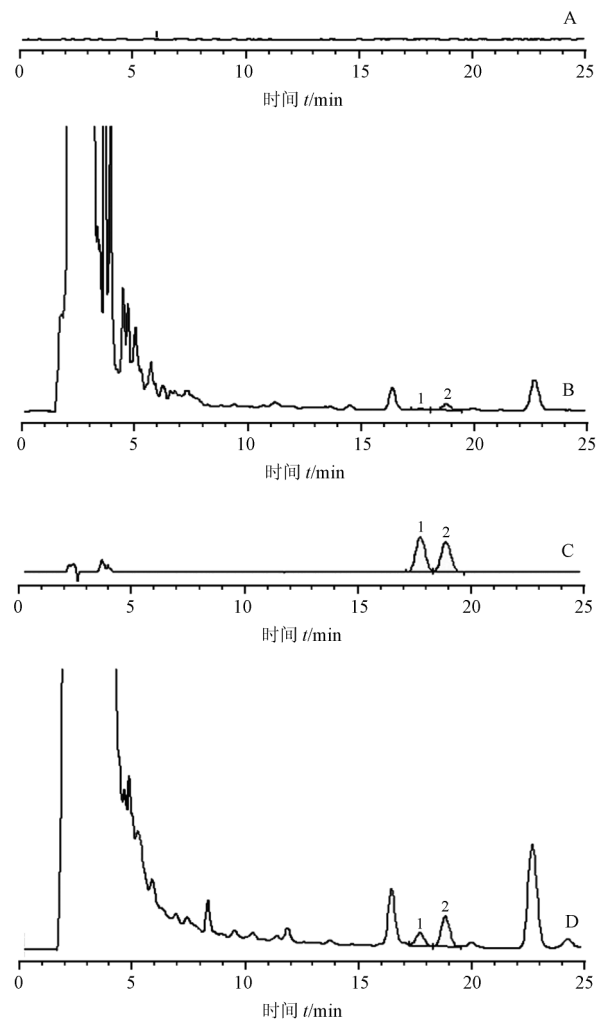


图 1 清肝散结颗粒高效液相色谱图谱

A: 空白溶剂; B: 空白样品(不含猫人参、石见穿、白花蛇舌草及半枝莲等君药); C: 混合对照品; D: 清肝散结颗粒. 1: 齐墩果酸; 2: 熊果酸

3 讨论

3.1 检测波长的选择 在 190~400 nm 全波长扫描, 结果发现 UA 和 OA 在 210 nm 处均有吸收且共同吸收最大, 同时可排除杂质对待测物的干扰, 故选择 210 nm 为检测波长。

3.2 流动相的考察 针对药物的特性选择流动相, 对多种流动相的不同比例进行了筛选, 用乙腈-水系统, OA 和 UA 不能得到很好的分离。以甲醇-水系统能够很好的分离 UA 和 OA, 在流动相中加入一定比例的酸有助于改善峰型, 提高分离度。经过对酸的种类、浓度的考察, 得出最佳流动相组成为: A 相为 0.1% 甲酸水溶液, B 相为甲醇, A : B = 12 : 88, 此条件下 OA 和 UA 在 20 min 内实现基线分离。

3.3 色谱柱的选择 由于 UA 与 OA 为同分异构体, 仅为甲基位置的改变, 色谱分离具有一定的难度。考察了色谱柱的不同填料颗粒类型 (Agilent SB-C₁₈、XDB-C₁₈、HC-C₁₈、TC-C₁₈、EC-C₁₈ 及 Chromsil-C₁₈)、不同内径 (4.6、3.0 及 2.1

mm)、不同填料粒径(5、3.5及2.7 μm)及不同色谱柱长(250、150及100 mm)的色谱柱对二者分离结果的影响,发现碳含量较高的色谱柱能够增加二者的分离度,提高色谱柱长、内径及填料粒径能够增加 UA 和 OA 与固定相的吸附作用力,提高色谱分离度,但时间延长。最终选定 Chromsil-C₁₈ (4.6 mm×250 mm,5 μm)色谱柱,UA 与 OA 在 20 min 内实现分离,分离度大于 1.5。

3.4 提取方法的优化 供试品溶液提取采用超声提取方法,考察提取溶剂种类(甲醇、乙醇、乙酸乙酯),超声时间(15、30、45 min)及溶剂体积(6、8、10 倍量)对其中 UA 和 OA 提取结果的影响,故设计三因素三水平正交试验进行提取条件优化。实验结果表明影响 UA 和 OA 提取结果的因素主次顺序都是溶剂种类>提取时间>溶剂倍数,最终选择 8 倍量甲醇为提取溶剂,超声提取 45 min。又考察了提取次数的影响,实验表明提取 2 次和 3 次的 UA、OA 含量都高于提取 1 次的结果,且提取 2 次和 3 次结果近乎相同,故选择提取 2 次为最优提取方案。

本文建立了高效液相色谱紫外检测法测定清肝散结颗粒中 UA 和 OA 含量的方法,并对该方法进行了全面的方法学考察,通过正交试验对前处理条件进行了优化。验证了该方法对清肝散结颗粒中 UA 和 OA 进行质量控制的可行性和有效性。该方法简便、快捷、结果准确、重复性好,可用于对清肝散结颗粒中 OA 和 UA 的质量控制。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

[1] 袁珂,朱建鑫,张耀,斯金平. 猫人参化学成分的研究[J]. 中草药,2008,39:505-507.
 [2] 丁丽丽,王顺春,王峥涛. 猫人参化学成分的研究[J]. 中国中药杂志,2007,32:1893-1895.
 [3] 雷涛,孟繁钦,王艳芳,吴宜艳. 石见穿化学成分及药理研究进展[J]. 中国医药导报,2010,7: 9-10,23.
 [4] 王业玲,李占林,刘涛,柳航,华会明. 石见穿化学成分的分离与鉴定[J]. 沈阳药科大学学报,2009,26:110-111,156.
 [5] 钟辉. 不同产地白花蛇舌草中熊果酸和齐墩果酸的含量测定

[J]. 中医药学报,2010,38:105-108.
 [6] 方岩雄,张永成,陈敏敏,郑穗华,张煜. 抗肿瘤药物白花蛇舌草及其活性成分[J]. 中成药,2004,26:577-579.
 [7] 林敬明,刘煜,罗荣城. 半枝莲的化学成分及其抗肿瘤作用的研究现状[J]. 中药材,2006,29:407-410.
 [8] 米璇,朱若华. 毛细管胶束电动色谱法分离测定中药半枝莲中的7种有效成分[J]. 色谱,2010,28:209-214.
 [9] 张明发,沈雅琴. 齐墩果酸和熊果酸的抗微生物和原虫药理研究进展[J]. 抗感染药学,2010,7:153-156.
 [10] 杜瑜,李焕德. 齐墩果酸的研究进展[J]. 中国药房,2006,17:304-306.
 [11] 张明发,沈雅琴. 齐墩果酸和熊果酸的抗糖尿病药理[J]. 上海医药,2010,31:347-350.
 [12] 夏国豪. 熊果酸抗肿瘤作用研究进展[J]. 国外医学肿瘤学分册,2002,29:420-422.
 [13] 郭淑英,冯波. HPLC法同时测定夏枯草中齐墩果酸和熊果酸的含量[J]. 中国药房,2010,21:2537-2539.
 [14] 张海丰,孙健,滕坤,朱俊义. HPLC法同时测定刺五加果实中齐墩果酸和熊果酸的含量[J]. 中国药物警戒,2010,7:708-710.
 [15] Lee M K, Ahn Y M, Lee K R, Jung J H, Jung O S, Hong J. Development of a validated liquid chromatographic method for the quality control of *Prunellae spica*; determination of triterpenic acids [J]. Anal Chim Acta,2009,633:271-277.
 [16] Huang L Y, Chen T, Ye Z, Chen G. Use of liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization-ion trap mass spectrometry for identification of oleanolic acid and ursolic acid in *Anoetochilus roxburghii* (wall.) Lindl [J]. J Mass Spectr, 2007,42:910-917.
 [17] Shen D, Pan M, Wu Q, Park C, Juliani H R, Ho C, et al. LC-MS method for the simultaneous quantitation of the anti-inflammatory constituents in oregano (*Origanum species*) [J]. J Agric Food Chem,2010,58:7119-7125.
 [18] 丁家欣,张秋海,李先端,李淑莉,刘泓. 高效液相色谱-蒸发光散射法测定马鞭草中齐墩果酸与熊果酸的含量[J]. 分析仪器,2011:26-29.
 [19] 张博,秦蓓,李金娟,曹儒. RP-HPLC-ELSD法测定连翘中齐墩果酸及熊果酸的含量[J]. 光谱实验室,2010,27:2541-2544.

[本文编辑] 尹茶