

HPLC 法测定不同产地女贞叶中熊果酸的含量

王丽, 闫春生, 贾安, 信建豪, 黄涛 (黄河科技学院, 河南郑州 450006)

摘要 [目的]用高效液相色谱法(HPLC)考察5个不同产地女贞叶中熊果酸的含量。[方法]用高效液相色谱法所用色谱柱为十八烷基硅烷键合硅胶色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-甲醇-0.5%醋酸铵溶液(67:12:21), 检测波长为210 nm。[结果]方法学考察结果, 回归方程为 $Y=4.7155X+17.918$, $R^2=0.9994$, 熊果酸含量在5.21~125.12 μg/ml浓度范围内线性关系良好。用该方法测得5个不同产地女贞叶中熊果酸的含量存在差异, 其中上海市产的含量最高, 为2.1574 mg/g, 南阳唐河产的含量最低, 为0.8630 mg/g。[结论]同一采集时间, 不同产地的女贞叶因环境因素, 所含熊果酸的含量差异较大。

关键词 女贞叶; 熊果酸; HPLC; 含量测定

中图分类号 S567 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2014)28-09738-02

Determination of the Content of Ursolic Acid in Folium *Ligustrum lucidus* from Different Habitats by HPLC

WANG Li, YAN Chun-sheng, JIA An et al (Huanghe Science and Technology College, Zhengzhou, Henan 450006)

Key words [Objective] The content of ursolic acid in folium *Ligustrum lucidus* from different habitats was investigated by HPLC. [Method] Chromatographic column is eighteen alkyl silane bonded silica gel column chromatography (4.6 mm×250 mm, 5 μm), the mobile phase is acetonitrile-methanol-0.5% ammonium acetate (67:12:21), the detection wavelength is 210 nm. [Result] Methodological study results: the regression equation: $Y=4.7155X+17.918$, $R^2=0.9994$, the content of ursolic acid in 5.21~125.12 μg/ml, the concentration of the linear relationship is good. The content of ursolic acid in folium *Ligustrum lucidus* from different habitats exist differences, the highest content of Shanghai produced is up to 2.1574 mg/g, the lowest content produced in Nanyang Tanghe is 0.8630 mg/g. [Conclusion] At the same acquisition time, the content of ursolic acid in folium *Ligustrum lucidus* from different habitats has significant differences because of environmental factors.

Key words *Ligustrum lucidus*; Ursolic acid; HPLC; Content determination

女贞叶为木犀科植物女贞 *Ligustrum lucidus* Ait. 的叶^[1], 又名冬青叶、土金刚叶、爆竹叶^[2]。民间常用鲜女贞叶咀嚼慢咽的方法治疗口腔溃疡^[3-4]。《中药大辞典》载有女贞叶性平、味微苦、无毒, 具有祛风、明目、消炎消肿、祛瘀散结、生肌止痛及收敛防腐之功效。在民间应用很广, 主要用于滋阴止血^[5-6]。但目前, 关于女贞叶没有相关的质量标准, 为了更好地开发应用, 笔者特对其主要有效成分之一熊果酸的测定方法进行考察, 并选取5个不同产地的女贞叶, 对其熊果酸的含量进行比较, 为女贞叶质量标准的制定提供依据。

1 材料与方

1.1 材料 样品采自郑州市、上海市、新乡市、南阳唐河县、焦作武陟县5个不同地区, 分别编号20130801、20130802、20130803、20130804、20130805。经药理学教研室李勉教授鉴定为木犀科植物女贞 *Ligustrum lucidus* Ait. 的叶。8月底采摘, 清洗干净, 阴干, 粉碎, 过50目筛, 备用。以郑州市采集的女贞叶(编号20130801)为主要对象进行研究。

1.2 试剂 乙醇、乙酸铵(试剂均产自天津市分船化学试剂科技有限公司)为分析纯; 乙腈、甲醇为色谱纯; 熊果酸对照品(批号为110742—200313, 供含量测定用)由中国药品生物制品检定所提供。

1.3 试验仪器 Agilent 1200 LC 高效液相色谱仪(安捷伦科技有限公司, 生命科学与化学分析仪器部); 电子分析天平(梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司); 超声仪 KQ5200M(东莞市科桥超声波设备有限公司); 微孔滤膜(0.45 μm)水膜和有有机膜。

1.4 试验方法

1.4.1 色谱条件。 色谱柱为十八烷基硅烷键合硅胶色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-甲醇-0.5%醋酸铵溶液(67:12:21), 检测波长为210 nm, 流速为1.0 ml/min, 柱温40℃, 进样量20 μl。

1.4.2 对照品溶液制备和标准曲线绘制。 精密称取熊果酸10 mg, 加75%乙醇制成浓度为0.25 mg/ml的对照品溶液, 摇匀, 即可。精密量取储备液相应量, 然后用75%乙醇依次稀释对照品溶液, 其浓度分别为5.21、10.42、20.82、41.64、93.28、125.12 μg/ml, 分别进样20 μl, 记录测定峰面积, 以浓度为横坐标、峰面积为纵坐标绘制标准曲线。

1.4.3 供试品溶液制备。 取样品粉末各1 g, 精密称定置10 ml具塞锥形瓶中, 加入75%乙醇10 ml, 超声提取30 min置于室温中放冷后, 加入75%乙醇定容, 摇匀, 滤过取续滤液, 以0.45 μm微孔滤膜滤过后作为供试品溶液。

2 结果与分析

2.1 对照品与样品的高效液相色谱峰图 从图1可以看出, 在相同的色谱条件下, 样品在对照品相同的出峰时间($t=12.9$ min)也有一个峰出现, 说明该峰即为样品中熊果酸的峰, 且该条件下样品中熊果酸的峰与相邻峰的分度较大, 说明此条件适合该样品测定熊果酸。

2.2 对照品溶液制备和标准曲线绘制 以浓度为横坐标、峰面积为纵坐标绘制标准曲线, 由图2可见, 其回归方程为 $Y=4.7155X+17.918$ ($R^2=0.9994$), 表明熊果酸含量在5.21~125.12 μg/ml浓度范围内线性关系良好。

2.3 稳定性试验 取同一供试品溶液分别在0、1、2、4、8 h进样20 μl, 测定峰面积并计算RSD值。结果发现, 在0、1、2、4、8 h进样测得同一样品中熊果酸的峰面积分别为1 832.40、

基金项目 黄河科技学院校级立项(KYZR201311)。

作者简介 王丽(1979-), 女, 河南邓州人, 讲师, 硕士, 从事中药质量标准的研究。

收稿日期 2014-08-26

1 814.60、1 640.00、1 638.20、1 765.98,其RSD为4.8%,表明

该样品中熊果酸在8 h内是稳定的。

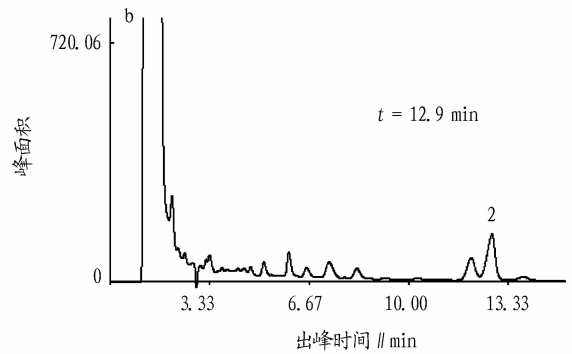
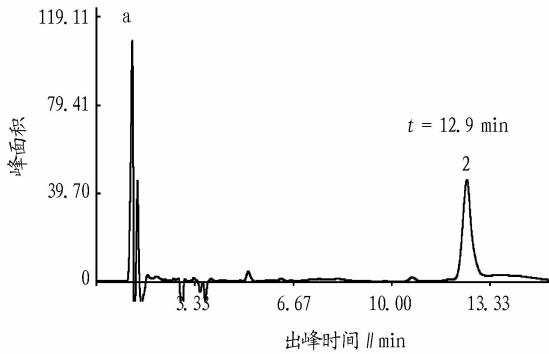


图1 对照品(a)和样品(b)熊果酸的HPLC图谱

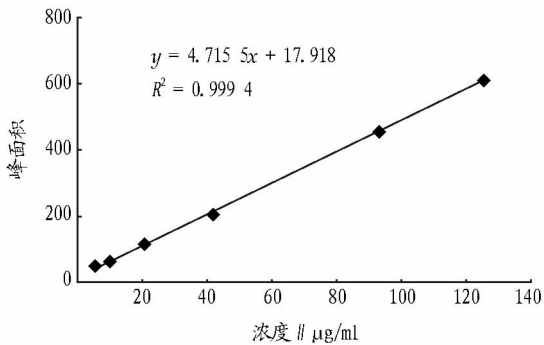


图2 对照品溶液标准曲线

2.4 精密度试验 通过取对照品溶液(熊果酸0.25 mg/ml)重复进样5次,每次进样20 μl,测定对照品的峰面积分别为2 197.43、2 098.64、2 057.08、2 106.09、2 027.22,其RSD值为2.7%,表明所用仪器精密度良好。

2.5 加样回收率试验 精密称定已测知熊果酸含量的女贞叶供试品6份,分别精密加入熊果酸0.7 mg,按照“1.4.3”项方法进行提取和含量测定。结果发现(表1),熊果酸的平均加样回收率为95.01%,RSD为0.2%。符合相关要求。

表1 加样回收率试验

取样量 g	熊果酸量 mg	加入量 mg	测定量 mg	回收 率//%	平均回 收率//%	RSD %
0.400 0	0.600	0.702	1.290	98.29		
0.401 1	0.602	0.712	1.274	94.38		
0.400 3	0.600	0.704	1.264	94.31		
0.400 2	0.600	0.721	1.281	94.45	95.01	0.2
0.400 5	0.601	0.718	1.278	94.29		
0.400 8	0.601	0.709	1.270	94.36		

2.6 样品含量测定 精密称定5个产地的女贞叶样品各3份,按照“1.4.3”项下样品处理,得供试液,20 μl注入高效液相色谱仪,测定峰面积,用外标法计算供试品中熊果酸的含量。由表2可见,不同产地,女贞叶中熊果酸的含量差异较大。其中上海市产的女贞叶中熊果酸含量最高,为2.157 4

mg/g;其次是新乡市产的女贞叶,含量为2.027 3 mg/g;郑州市产的女贞叶含量为1.570 7 mg/g;焦作武陟县产的女贞叶含量是1.067 mg/g;南阳唐河县产的女贞叶中熊果酸含量最低,为0.863 0 mg/g。

表2 样品含量测定

样品产地	第1份	第2份	第3份	平均值
郑州市	1.779 0	1.362 1	1.570 9	1.570 7
上海市	2.374 6	2.024 9	2.072 7	2.157 4
新乡市	1.775 5	1.977 6	2.329 0	2.027 3
南阳唐河县	0.855 3	0.873 7	0.859 9	0.863 0
焦作武陟县	0.981 2	1.132 0	1.090 5	1.067 9

3 结论

(1)通过对HPLC法的方法学进行考察,结果得到回归方程为 $Y = 4.7155X + 17.918$ ($R^2 = 0.9994$),熊果酸含量在5.21 ~ 125.12 μg/ml浓度范围内线性关系良好;且样品稳定,仪器精密度和样品的加样回收率均达到了相关要求,说明该方法灵敏、可靠、准确。

(2)通过对选取的5个不同产地的女贞叶中熊果酸的含量进行分析计算,结果发现女贞叶中熊果酸的含量差异较大。其中,上海市产的女贞叶中熊果酸含量最高,为2.157 4 mg/g,南阳唐河县产的女贞叶中熊果酸含量最低,为0.863 0 mg/g,说明不同产地因温度、水分、土壤等不同,药材中的化学成分的含量存在差异。这也为女贞叶质量标准的制定提供依据。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典,一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:43.
- [2] 胡同瑜. 实用中药品种鉴别[M]. 北京:人民军医出版社,2012:545.
- [3] 田凤鸣,张咸远. 中国奇方全书[M]. 北京:科技出版社,2011:1266.
- [4] 史书达. 中国民间秘验偏方大成[M]. 3版. 苏峰:内蒙古科学技术出版社,2012:1022.
- [5] 徐谨,罗玲英,吴铁容. 二至丸的临床应用与剂量关系研究[J]. 亚太传统医药,2011,7(1):131-136.
- [6] 王长春,王永春,刘珊. 浅谈女贞子药性特点与配伍运用[J]. 山东中医药大学学报,2013,37(3):188-189.