

HPLC法测定岗梅中熊果酸和齐墩果酸的含量

肖彩虹^{1,2*}, 余以刚¹, 罗苑苑², 李尚³(1.华南理工大学轻工与食品学院, 广州 510641; 2.广州市黄埔区食品药品检验所, 广州 510700; 3.广东省工伤康复医院, 广州 510440)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)09-1261-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.09.39

摘要 目的:建立岗梅中熊果酸和齐墩果酸的含量测定方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为 Thermo-C₁₈, 流动相为甲醇-乙腈-0.1%冰醋酸(83:5:12, V/V/V), 流速为 0.7 ml/min, 柱温为 30 ℃, 检测波长为 210 nm, 进样量为 10 μl。结果:熊果酸和齐墩果酸的进样量分别在 0.200 4~4.008 μg($r=0.999\ 8$)、0.100 9~2.018 μg($r=0.999\ 6$)范围内与各自峰面积呈良好的线性关系;精密密度、稳定性、重复性试验的 RSD<2%;熊果酸和齐墩果酸的加样回收率分别为 98.85%、99.44%, RSD 分别为 1.88%、1.83% (n 均为 6)。结论:该方法准确、灵敏,可为岗梅的质量控制提供参考。

关键词 高效液相色谱法;岗梅;熊果酸;齐墩果酸;含量测定

Content Determination of Ursolic Acid and Oleanic Acid in Holly Root by HPLC

XIAO Cai-hong^{1,2}, YU Yi-gang¹, LUO Yuan-yuan², LI Shang³(1.College of Light Industry and Food, South China University of Technology, Guangzhou 510641, China; 2.Institute for Food and Drug Inspection of Guangzhou Huangpu District, Guangzhou 510700, China; 3.Guangdong Provincial Work Injury Rehabilitation Hospital, Guangzhou 510440, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the content determination of ursolic acid and oleanic acid in Holly Root. METHODS: HPLC method was adopted with the column of Thermo-C₁₈. The mobile phase was methanol-acetonitrile-0.1% glacial acetic acid (83:5:12, V/V/V) at the flow rate of 0.7 ml/min. The column temperature was 30 ℃, the detection wave length was set at 210 nm and the volume was 10 μl. RESULTS: There was a good linear relationship between the volume of ursolic acid and peak area in the range of 0.200 4-4.008 μg($r=0.999\ 8$) and oleanolic acid was in the range of 0.100 9-2.018 μg($r=0.999\ 6$). The RSDs of precision, stability, repeatability tests were less than 2%; the average recovery rates were 98.85% (RSD=1.88%, $n=6$) and 99.44% (RSD=1.83%, $n=6$). CONCLUSIONS: The method is accurate and sensitive which can provide reference for quality control of Holly Root.

KEYWORDS HPLC; Holly Root; Ursolic acid; Oleanic acid; Content determination

岗梅为冬青科植物梅叶冬青 *Ilex asprella* 的干燥根及茎的炮制加工品, 收载于《广东省中药材标准》, 其性寒味苦, 有清热解毒、生津止渴等功效, 临床一般用于治疗感冒发热、肺热咳嗽、咽喉肿痛等证^[1-3]。岗梅是我国南方常用中草药, 也是不少凉茶的主要原材料^[4]。岗梅主要含有三萜及其皂苷类化合物, 如乌索酸、熊果酸、齐墩果酸、坡模酸等成分^[5-6]。其中, 熊果酸和齐墩果酸互为异构体, 均为五环三萜酸, 两者功效相似, 均具有抗炎抗菌、保肝降酶、降血脂、抗氧化、调节免疫和抗癌等多种活性^[7-8]。目前, 关于岗梅中的熊果酸、齐墩果酸的含量测定尚未见相关文献报道。为此, 本研究采用高效液相色谱(HPLC)法测定岗梅中熊果酸和齐墩果酸的含量, 以为控制岗梅的药材质量提供参考。

1 材料

1.1 仪器

2695型HPLC仪, 配有2996型紫外检测器(美国Waters公司); xp26型百万分之一电子分析天平(瑞士梅特勒-托利多有限公司)。

* 副主任药师, 硕士。研究方向: 食品、药品成分研究及检测。电话: 020-82101513。E-mail: 657619206@qq.com

1.2 试剂

熊果酸对照品(批号: 110742-200516)、齐墩果酸对照品(批号: 110709-201206, 纯度: 94.9%)均购自中国食品药品检定研究院; 甲醇、乙腈、冰醋酸为色谱纯, 水为纯化水。

1.3 药材

岗梅药材购自广州仁和堂药业连锁药店及广州市大参林连锁药店, 经广东省工伤康复医院李尚副主任药师鉴定, 均符合《广东省中药材标准》(第一册)标准规定。

2 方法与结果

2.1 混合对照品溶液的制备^[9]

精密称取熊果酸对照品 10.02 mg、齐墩果酸对照品 5.316 mg, 置于同一 10 ml 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 得混合对照品贮备液。精密吸取混合对照品贮备液 2 ml, 置于 10 ml 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 制成每 1 ml 中分别含熊果酸 0.20 mg 和齐墩果酸 0.10 mg 的混合对照品溶液。

2.2 供试品溶液的制备

取药材粉末约 3 g, 精密称定, 置索氏提取器中, 加乙醚适量, 浸泡过夜, 加热回流 8 h, 提取液挥干乙醚, 残渣加甲醇使溶解, 转移至 5 ml 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 经 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

2.3 色谱条件及系统适用性试验

色谱柱: Thermo-C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-乙腈-0.1%冰醋酸 (83:5:12, V/V/V); 流速: 0.7 ml/min; 柱温: 30 ℃; 检测波长: 210 nm; 进样量: 10 μl。分别取混合对照品溶液、供试品溶液各 10 μl, 注入 HPLC 仪, 按上述色谱条件进样测定, 记录色谱图。理论板数以熊果酸峰计应不低于 2 000, 熊果酸峰和齐墩果酸峰分离度均 > 1.5。色谱见图 1。

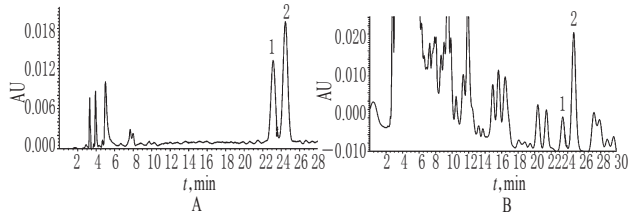


图 1 高效液相色谱图

A. 混合对照品; B. 供试品; 1. 齐墩果酸; 2. 熊果酸

Fig 1 HPLC chromatograms

A. mixed control; B. test samples; 1. oleanic acid; 2. ursolic acid

2.4 线性关系考察

精密吸取混合对照品贮备液 0.1、0.2、0.5、1.0、2.0 ml, 分别置于 5 ml 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 制成熊果酸质量浓度为 20.04、40.08、100.2、200.4、400.8 μg/ml, 齐墩果酸质量浓度为 10.09、20.18、50.45、100.9、201.8 μg/ml 的系列混合对照品溶液。精密吸取上述混合对照品溶液各 10 μl, 分别按“2.3”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积。以对照品的进样量(x, μg)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标, 绘制标准曲线, 得熊果酸回归方程为 $y = 539\ 369x - 55\ 109$ ($r = 0.999\ 8, n = 5$), 齐墩果酸回归方程为 $y = 545\ 603x - 5\ 142$ ($r = 0.999\ 6, n = 5$)。结果表明, 熊果酸、齐墩果酸的进样量分别在 0.200 4~4.008、0.100 9~2.018 μg 范围内与各自峰面积呈良好线性关系。

2.5 精密度试验

精密吸取混合对照品溶液 10 μl, 按“2.3”项下色谱条件重复进样 6 次, 记录峰面积。结果, 熊果酸、齐墩果酸峰面积的 RSD 分别为 1.18%、1.36% ($n = 6$), 表明仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验

精密吸取同一供试品溶液, 在室温下于配制后 1、2、4、8、12、24 h 按“2.3”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积。结果, 熊果酸、齐墩果酸峰面积的 RSD 分别为 1.05%、1.48% ($n = 6$), 表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.7 重复性试验

精密称取同一份样品各适量, 共 6 份, 分别按“2.2”项下方法制备供试品溶液, 再按“2.1”项下色谱条件进样测定。结果, 熊果酸、齐墩果酸含量的 RSD 分别为 1.23%、1.85% ($n = 6$), 表明本方法重复性良好。

2.8 加样回收率试验

精密称取已知含量的同一批样品各 1.5 g, 共 6 份, 分别精密加入 0.5 ml 混合对照品贮备液 (含熊果酸和齐墩果酸 0.501 0、0.252 2 mg), 按“2.2”项下方法制备供试品溶液, 再按“2.3”项下色谱条件进样测定, 计算加样回收率, 结果见表 1。

2.9 样品含量测定

精密称取不同产地的岗梅各适量, 按“2.2”项下方法制备供试品溶液, 再按“2.3”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积, 并采用外标法计算样品的含量, 结果见表 2。

表 1 加样回收率试验结果 ($n = 6$)

Tab 1 Result of recovery tests ($n = 6$)

待测成分	称样量, g	样品含量, g	加入量, g	测得量, g	加样回收率, %	平均加样回收率, %	RSD, %
熊果酸	1.532 3	0.490 3	0.501 0	0.981 5	98.04	98.85	1.88
	1.548 3	0.495 5	0.501 0	0.983 4	97.39		
	1.542 8	0.493 7	0.501 0	0.981 3	97.33		
	1.523 5	0.487 5	0.501 0	0.993 2	100.93		
	1.536 7	0.491 7	0.501 0	0.982 3	97.92		
	1.524 9	0.488 0	0.501 0	0.996 4	101.48		
齐墩果酸	1.532 3	0.260 5	0.252 2	0.506 0	97.35	99.44	1.83
	1.548 3	0.263 2	0.252 2	0.519 0	101.42		
	1.542 8	0.262 3	0.252 2	0.508 8	97.75		
	1.523 5	0.259 0	0.252 2	0.509 8	99.45		
	1.536 7	0.261 2	0.252 2	0.510 9	98.99		
	1.524 9	0.259 2	0.252 2	0.515 7	101.69		

表 2 样品含量测定结果 (%)

Tab 2 Result of content determination of samples (%)

编号	产地	熊果酸	齐墩果酸
1	广东普宁	0.030	0.007
2	广东从化	0.032	0.017
3	广东阳江	0.041	0.011
4	广西柳州	0.047	0.021
5	广西南宁	0.055	0.017

3 讨论

3.1 提取方法的考察

笔者曾比较了超声、加热回流后水解、冷浸和索氏提取 4 种提取方法。结果表明, 加热回流后水解和索氏提取测得样品的含量比其他 2 种方法高出许多, 且加热回流后水解和索氏提取的方法两者之间结果差异较小; 但采用加热回流后水解测得的样品杂质峰太多、基线不平、操作烦琐, 因此最终采用索氏提取的方法。笔者还比较了甲醇、无水乙醇、乙醚、甲醇-盐酸 4 种提取溶剂对测定结果的影响。结果, 以乙醚的提取率最高, 故选择乙醚作为提取溶剂。

3.2 流动相的选择

由于熊果酸与齐墩果酸为同分异构体, 结构与性质均极其相似, 分离测定较为困难。本研究分别采用了甲醇-水、甲醇-水-冰醋酸-三乙胺、甲醇-0.1%磷酸、甲醇-乙腈-0.1%冰醋酸为流动相进行试验, 结果以甲醇-乙腈-0.1%冰醋酸为流动相时的色谱峰峰形良好、分离效果最佳。在测定中, 流速对分离度的影响也比较大: 当流速为 1 ml/min 时, 熊果酸与齐墩果酸峰分离度只能达到 1.0; 而当流速降低到 0.7 ml/min 时, 分离度 > 1.5, 可达到基线分离。因此, 最终选择 0.7 ml/min 作为流速。

3.3 检测波长的选择

熊果酸甲醇溶液的最大吸收波长为 207 nm, 而齐墩果酸甲醇溶液的最大吸收波长为 206 nm, 二者混合液的最大吸收波长为 207 nm。但在 207 nm 波长下用 HPLC 法进行测定, 熊果酸峰和齐墩果酸峰分离度较差; 而在 210 nm 波长处, 熊果酸和齐墩果酸分离度 > 1.5, 基线平稳, 可同时检测两者含量, 并且具有较高的灵敏度。故最终选择 210 nm 作为检测波长。

3.4 其他

本研究结果显示, 不同产地的岗梅中熊果酸和齐墩果酸含量稍有不同。这可能是由于药材生长环境、采收时间、生产年限等不同, 导致结果出现差异; 也有可能是本研究所选岗梅

葡萄糖酸依诺沙星注射液无菌检查方法的建立及验证

刘 栋*, 汤长明(解放军第153中心医院药械科, 郑州 450042)

中图分类号 R927.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)09-1263-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.09.40

摘要 目的:建立和验证葡萄糖酸依诺沙星注射液的无菌检查方法。方法:根据2010年版《中国药典》,采用薄膜过滤法,以0.1%蛋白胍水溶液为冲洗液,考察在不同冲洗液量和在培养基中加入中和剂时,6种阳性对照菌的生长情况。结果:在冲洗液量为每管300 ml、每次冲洗100 ml,使用含0.2 mol/L Mg^{2+} 的培养基时,所有阳性对照菌均生长良好。结论:最终确立的葡萄糖酸依诺沙星注射液的无菌检查方法为以大肠埃希菌为阳性对照菌,采用0.1%蛋白胍水溶液冲洗3次(每次100 ml),经薄膜过滤后加入含 Mg^{2+} 培养基。本法简便、冲洗量相对较少,是葡萄糖酸依诺沙星注射液一种较为理想的无菌检查方法。

关键词 葡萄糖酸依诺沙星注射液;无菌检查;方法验证;阳性对照菌;中和剂

Establishment and Validation of the Method of Sterility Test for Enoxacin Gluconate Injection

LIU Dong, TANG Chang-ming (Dept. of Pharmacy, No. 153 Central Hospital of PLA, Zhengzhou 450042, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish and validate the method of sterility test for Enoxacin gluconate injection. METHODS: According to *Chinese Pharmacopoeia* (2010 edition), membrane filtration method was used and 0.1% peptone water was used as flushing liquid. The growth of 6 positive control bacteria was observed and investigated with different volumes of flushing liquid or adding neutralization into culture medium. RESULTS: All of 6 positive control bacteria grew normally with 300 ml flushing liquid in each tube (100 ml each time) and culture medium containing 0.2 mol/L Mg^{2+} . CONCLUSIONS: The sterility test for Enoxacin gluconate injection was finally established with the positive bacteria of *Escherichia coli*, flushing three times by 0.1% peptone solution (100 ml each time) and adding medium containing Mg^{2+} after membrane filtration. The method is simple with less flushing liquid relatively. It is an ideal method for the sterility test of Enoxacin gluconate injection.

KEYWORDS Enoxacin gluconate injection; Sterility test; Method validation; Positive control; Neutralization

依诺沙星为第三代喹诺酮类药物,在临床上广泛用于敏感菌所致的咽喉、支气管、肺、尿路、前列腺等部位感染^[1]。由于葡萄糖酸依诺沙星注射液抑菌活性较强,去除其抑菌活性成为无菌检查的关键步骤。笔者严格按照2010年版《中国药典》(二部)附录XI H“无菌检查法”中的原则性要求进行试验^[2],采用

增加冲洗液量和在培养基中加入能与喹诺酮类药物发生络合反应的中和剂(Mg^{2+} 或 Mn^{2+})的方法去除供试品的抑菌活性^[2-11],并分别进行了验证,从而建立一种适用于葡萄糖酸依诺沙星注射液的无菌检查方法。

1 材料

样品为根、茎混用,根、茎中各成分所占比例不同也可能导致结果出现差异,具体原因有待以后进一步研究探讨。

综上所述,该方法准确、灵敏,可为岗梅的质量控制提供参考。

参考文献

- [1] 广东省食品药品监督管理局. 广东省中药材标准: 第一册[S]. 广州: 广东科技出版社, 2004: 111-113.
- [2] 何蓉蓉, 栗原博, 宝丽, 等. 王老吉凉茶对应激小鼠糖代谢机能及体内过氧化状态的影响[J]. 中成药, 2008, 30(8): 1111.
- [3] 黄锦茶, 陈丰连, 陈海明, 等. HPLC法测定不同产地岗梅药材中坡模酸的含量[J]. 中药新药与临床药理, 2011, 22(6): 679.

- [4] 何文江, 赵钟祥, 林朝展, 等. 梅叶冬青根的化学成分研究[J]. 华西药学杂志, 2012, 27(1): 51.
- [5] 朱伟群, 晏桂华, 李沛波. 岗梅水提取物抗炎作用的实验研究[J]. 广东药学院学报, 2007, 23(3): 304.
- [6] 何少璋, 张一萍, 喻丽元. 岗梅对微生物的作用研究[J]. 现代医院, 2008, 8(5): 12.
- [7] 廖清贵. 齐墩果酸天然药物的开发[J]. 四川林业科技, 1999, 20(4): 68.
- [8] Subbaramaish K. Ursolic acid inhibits cyclooxygenase-2 transcription in human mammary epithelial cells [J]. *Cancer Res*, 2000, 69(9): 2399.
- [9] 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(27): 2537.

(收稿日期:2014-01-22 修回日期:2014-03-05)

(编辑:孙冰)

* 主管药师, 硕士。研究方向: 医院制剂研发与质量控制。
E-mail: liudong13673546650@163.com