

HPLC法同时测定5种常见中药材中齐墩果酸和熊果酸的含量

张家富^{1*} 夏伦祝¹ 汪永忠¹ 左冬^{1,2} (1.安徽中医学院第一附属医院国家中医药管理局中药制剂三级实验室, 合肥 230038 2.安徽中医学院, 合肥 230031)

中图分类号 R284.1;R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2012)27-2553-02
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2012.27.22

摘要 目的 建立测定含有齐墩果酸与熊果酸中药材的方法,并测定这些中药材中齐墩果酸与熊果酸的含量,为其品质评价提供依据。方法 采用高效液相色谱法。色谱柱为 Welch Materials Ultimate XB C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 检测波长为 210 nm, 流动相为甲醇-0.1%磷酸-三乙胺(86:14:0.05, V/V/V), 流速为 0.6 mL·min⁻¹。结果 齐墩果酸进样量在 0.330~3.300 μg 范围内与峰面积积分值呈良好线性关系($r=0.9998$), 平均加样回收率为 98.26%, RSD=0.47% ($n=6$); 熊果酸进样量在 0.390~3.900 μg 范围内与峰面积积分值呈良好线性关系($r=0.9994$), 平均加样回收率为 97.98%, RSD=0.50% ($n=6$)。结论 本方法简便、准确、重复性好, 可为含有齐墩果酸与熊果酸中药材的质量控制提供方法参考, 且本试验数据可为这些中药材的质量评价提供科学依据。

关键词 高效液相色谱法; 齐墩果酸; 熊果酸; 中药材; 含量测定

Simultaneous Determination of Oleanolic Acid and Ursolic Acid in 5 Common Chinese Medicinal Materials by HPLC

ZHANG Jia-fu, XIA Lun-zhu, WANG Yong-zhong, ZUO Dong (Third Level Laboratory of TCM Preparation, State Administration of TCM of PRC, The First Affiliated Hospital, Anhui College of TCM, Hefei 230038, China)

ZUO Dong (Anhui College of TCM, Hefei 230031, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the simultaneous determination of oleanolic acid and ursolic acid in Chinese medicinal material, and to provide scientific basis for quality evaluation. METHODS: HPLC method was adopted. Welch Materials Ultimate XB C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) column was used with the mobile phase consisted of methanol-0.1% phosphoric acid-triethylamine (86:14:0.05) at a flow rate of 0.6 mL·min⁻¹. The detection wavelength was set at 210 nm. RESULTS: The linear ranges of oleanolic acid and ursolic acid were 0.330~3.300 μg ($r=0.9998$) and 0.390~3.900 μg ($r=0.9994$). Average recoveries were 98.26% (RSD=0.47%, $n=6$) and 97.98% (RSD=0.50%, $n=6$). CONCLUSION: The method is simple, accurate, reproducible, and suitable for the quality control and quality evaluation of Chinese medicinal materials containing ursolic acid and oleanolic acid.

KEY WORDS HPLC; Ursolic acid; Oleanolic acid; Chinese medicinal material; Content determination

齐墩果酸和熊果酸为多种中药材共有的活性成分,其中齐墩果酸具有保肝、消炎、降糖、抗 HIV 和抗肿瘤等作用,熊果酸具有抑制血管生成、抗肿瘤、抗炎、抑菌、抗 HIV 等作用^[1]。本试验采用高效液相色谱(HPLC)法对含有齐墩果酸和熊果酸的 5 种常见中药材泽兰(*Lycopus lucidus*)、夏枯草(*Prunella vulgaris*)、枇杷叶(*Eriobotrya japonica*)、马鞭草(*Verbena officinalis*)和白花蛇舌草(*Hedyotis diffusa*)进行检测,旨在为含齐墩果酸和熊果酸中药材的质量控制方法及应用提供科学依据。

1 仪器与试剂

1100 HPLC 仪,包括 G1311A 泵、G1322 脱气机、G1313AZ 自动进样器、G1313A 柱温箱、G1315 DAD、Chemstation 色谱工作站(美国 Agilent 公司);BP221D 电子天平(德国 Sartorius 公司);KQ-250DB 数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);石英亚沸高纯水提取器(江苏金城教学仪器厂);KDC-16H 高速离心机(安徽科大创新中佳分公司)。

齐墩果酸和熊果酸对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为 110709-200304、110742-200516);水为重蒸水,甲醇

* 副主任药师。研究方向:中药药剂学与药理学。电话:0551-2838559。E-mail: zjf65@sina.com

为色谱纯,其他试剂均为分析纯。试验所用药材均由安徽中医学院第一附属医院药学部中草药房提供,并由该院药剂科李立华主任中药师鉴定为真品。

2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱: Welch Materials Ultimate XB C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 检测波长: 210 nm; 流动相: 甲醇-0.1%磷酸-三乙胺(86:14:0.05, V/V/V); 流速: 0.6 mL·min⁻¹; 柱温: 30℃。在此色谱条件下,齐墩果酸和熊果酸峰与其相邻峰的分离度均 > 1.5, 理论板数按齐墩果酸和熊果酸峰计算应 > 8 000。色谱见图 1。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液 精密称取齐墩果酸对照品 4.12 mg、熊果酸对照品 4.88 mg, 分别置 10 mL 容量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,备用。分别精密移取上述溶液各适量,置同一 25 mL 容量瓶中,用甲醇稀释至刻度,摇匀,制成每 1 mL 含齐墩果酸 0.165 mg、熊果酸 0.195 mg 的混合对照品溶液,过 0.22 μm 微孔滤膜,备用。

2.2.2 供试品溶液 取样品细粉约 0.5 g,精密称定,置 25 mL 容量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,密塞,称定重量,室温浸渍 1 h 后超声(功率: 150 W, 频率: 40 kHz) 20 min, 静置放冷后再称定重量,用甲醇补足减失的重量,移取适量溶液以 12 000

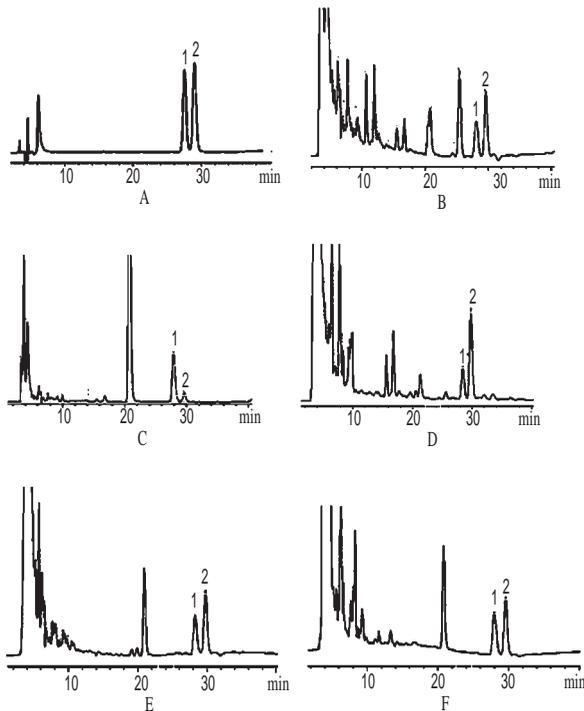


图1 高效液相色谱图

A. 混合对照品; B. 泽兰; C. 夏枯草; D. 枇杷叶; E. 马鞭草; F. 白花蛇舌草;
1. 齐墩果酸 2. 熊果酸

Fig 1 HPLC chromatograms

A. mixed control; B. *L. lucidus*; C. *P. vulgaris*; D. *V. officinalis*; E. *V. officinalis*; F. *H. diffusa*; 1. oleanolic acid 2. ursolic acid

$r \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min 取上清液 过 0.22 μm 微孔滤膜 即得。

2.3 方法学考察

2.3.1 线性关系考察 精密吸取混合对照品溶液 2.0、8.0、12.0、16.0、20.0 μL 按上述色谱条件分别进样测定。以峰面积积分值(Y)为纵坐标, 对照品进样量($X, \mu\text{g}$)为横坐标, 绘制标准曲线, 得齐墩果酸和熊果酸的回归方程分别为 $Y = 842.12X + 2.01$ ($r = 0.9998, n = 5$)、 $Y = 791X + 12.2$ ($r = 0.9994, n = 5$)。结果表明, 齐墩果酸和熊果酸的进样量分别在 0.330 ~ 3.300、0.390 ~ 3.900 μg 范围内与各自峰面积积分值呈良好线性关系。

2.3.2 精密度试验 精密吸取混合对照品溶液 20 μL 连续进样 6 次, 测定峰面积。结果, 齐墩果酸和熊果酸的 RSD 分别为 0.18% 和 0.30% ($n = 6$) 表明仪器精密度良好。

2.3.3 重复性试验 取同一批样品适量, 共 6 份, 分别按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液 照上述色谱条件进样测定峰面积 根据峰面积计算样品含量。结果, 齐墩果酸和熊果酸的 RSD 分别为 1.07% 和 1.31% ($n = 6$) 表明方法重复性良好。

2.3.4 稳定性试验 取同一供试品溶液适量, 分别于 0、4、8、16、32 h 进样测定峰面积。结果, 齐墩果酸和熊果酸的 RSD 分别为 0.27% 和 0.40% ($n = 5$) 表明供试品溶液在 32 h 内稳定性良好。

2.3.5 加样回收率试验 取同一批已知含量的泽兰样品 6 份, 每份 0.25 g, 精密称定, 分别准确加入一定量的齐墩果酸和熊果酸对照品溶液, 按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液 照上述色谱条件进样测定峰面积, 计算加样回收率, 结果见表 1。

2.4 样品含量测定

取 5 种药材适量, 每种各 3 份, 分别按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液, 照上述色谱条件进样测定峰面积, 以外标法计算样品中齐墩果酸和熊果酸的含量, 结果见表 2。

3 讨论

表 1 加样回收率试验结果 ($n = 6$)

Tab 1 Results of recovery test ($n = 6$)

成分	称样量/g	样品含量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	$\bar{x}/\%$	RSD/%
齐墩果酸	0.251	0.399 1	0.412 5	0.804 9	98.38	98.26	0.47
	0.255	0.405 5	0.412 5	0.813 6	98.93		
	0.251	0.399 1	0.412 5	0.803 8	98.11		
	0.257	0.408 6	0.412 5	0.811 2	97.60		
	0.252	0.400 7	0.412 5	0.807 2	98.55		
熊果酸	0.251	0.399 1	0.412 5	0.803 3	97.99	97.98	0.50
	0.251	0.695 3	0.682 5	1.361 3	97.58		
	0.255	0.706 4	0.682 5	1.376 2	98.14		
	0.251	0.695 3	0.682 5	1.361 5	97.61		
	0.257	0.711 9	0.682 5	1.386 1	98.78		
0.252	0.698 0	0.682 5	1.363 9	97.57			
0.251	0.695 3	0.682 5	1.365 4	98.18			

表 2 样品含量测定结果 (% $n = 3$)

Tab 2 Content determination of samples (% $n = 3$)

药材	齐墩果酸	熊果酸	总含量	药材	齐墩果酸	熊果酸	总含量
泽兰	0.159	0.277	0.436	枇杷叶	0.252	0.851	1.102
马鞭草	0.153	0.278	0.438	白花蛇舌草	0.137	0.198	0.335
夏枯草	0.753	0.180	0.933				

中药材中齐墩果酸和熊果酸常常并存, 因其结构同属于五环三萜类化合物, 为同分异构体, 极性相似, 难以有效分离^[2]。笔者前期对多味药材以 HPLC 法单独测定以上 2 种成分时发现, 虽检测方法较多, 但色谱条件几乎难有重复, 且由于药材种类及其成分含量相差较大, 如本次测得夏枯草的齐墩果酸含量约是白花蛇舌草的 6 倍, 而枇杷叶的熊果酸含量远远高于其他几味药材, 故同时测定多味药材的检测方法普遍适用性较差。

本试验参考文献报道方法^[3-5]及前期试验结果, 首先选择在 210 nm 波长下同时测定以上 2 种成分, 这点与报道相符。再通过对流动相的研究, 选择甲醇-水、甲醇-(0.1% ~ 0.5%) 磷酸水溶液、甲醇-0.05% 三乙胺缓冲液、乙腈-水、乙腈-(0.1% ~ 0.5%) 磷酸水溶液等系统进行测定。结果表明, 采用甲醇-0.1% 磷酸, 加入少量缓冲液(0.05% 三乙胺)可使齐墩果酸、熊果酸达到基线分离, 且分离度 > 1.5。而流速与柱温的变化并不会使两峰的分离效果得到进一步优化。在药材含量差异较大的问题上, 可选择减少进样量来解决线性范围较窄的难题。

综上, 本方法操作简便, 灵敏度较高, 重复性、精密度与稳定性较好, 可为中药材有效成分的质量控制、评价及其单体筛选提供参考方法。

参考文献

- [1] 刘丹, 孟艳秋, 赵娟. 齐墩果酸与熊果酸结构修饰物的药理活性和构效关系研究进展[J]. 化学通报, 2007, 1: 14.
- [2] 张瑜, 谈献和, 崔小兵. HPLC 法测定不同产地白花蛇舌草中熊果酸和齐墩果酸的含量[J]. 北京中医药大学学报, 2010, 33(4): 274.
- [3] 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.
- [4] 徐珊, 邓旭坤, 陈斌. 马鞭草药材中齐墩果酸、熊果酸的 RP-HPLC 测定[J]. 南京中医药大学学报(自然科学版), 2006, 26(3): 165.
- [5] 杜丰玉, 陈钧, 许月明. 高效液相色谱法测定枇杷叶中熊果酸和齐墩果酸含量[J]. 中国医院药学杂志, 2008, 28(1): 21.

(收稿日期 2012-01-09 修回日期 2012-04-23)