

RP-HPLC 同时测定茅莓中齐墩果酸和熊果酸

邹盛勤*, 黄浩

(宜春学院化学与生物工程学院, 江西省天然药物活性成分研究重点实验室, 江西 宜春 336000)

[摘要] 目的:建立茅莓中齐墩果酸和熊果酸的反相高效液相色谱分析方法。方法:Kromasil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相甲醇-1.0% 磷酸溶液(90:10),流速 1.0 mL·min⁻¹,检测波长 210 nm,柱温 30 ℃。结果:齐墩果酸、熊果酸分别在 0.136 8~1.368 0, 0.212 8~2.218 0 μg 线性关系良好,平均回收率($n=6$)分别为 97.5% (RSD 1.6%) 和 96.9% (RSD 1.4%)。结论:方法准确,操作简便,数据可靠,可用于茅莓中齐墩果酸和熊果酸的含量测定。

[关键词] 茅莓; 齐墩果酸; 熊果酸; 反相高效液相色谱法; 含量测定

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2012)11-0079-03

[DOI] CNKI:11-3495/R.20120327.2700.021 [网络出版时间] 2012-03-27 17:07

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20120327.1707.021.html>

Simultaneous Determination of Oleanolic Acid and Ursolic Acid
in *Rubus parvifolius* by RP-HPLC

ZOU Sheng-qin*, HUANG Hao

(College of Chemistry and Bioengineering of Yichun University, Key Laboratory of Jiangxi Province
for Research on Active Ingredients in Natural Medicines, Yichun 336000, China)

[Abstract] **Objective:** To develop a RP-HPLC method for simultaneous determination of oleanolic acid and ursolic acid in *Rubus parvifolius*. **Method:** The separation was achieved on a Kromasil C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) at 30 ℃ using methanol-phosphoric acid solution (90:10) as the mobile phase at a flow rate of 1.0 mL·min⁻¹, 210 nm as the detection wavelength. **Result:** The linear ranges of oleanolic acid and ursolic acid were from 0.136 8 to 1.368 0 μg and 0.212 8 to 2.218 0 μg, respectively. The average recoveries ($n=6$) for oleanolic acid and ursolic acid were 97.5% (RSD 1.6%), 96.9% (RSD 1.4%), respectively. **Conclusion:**

[收稿日期] 20110731(011)
[基金项目] 国家高技术研究发展计划项目(2002AA2Z3217)
[第一作者] 邹盛勤, 硕士, 教授, 从事天然产物活性成分提取与分析研究, Tel:13507058127, E-mail: zsqycxy@sohu.com

[参考文献]

(19):1504.

[4] 侯媛媛,黄晓婧,晁若冰. HPLC 同时测定丹参及其制剂中 4 种酚酸类成分的含量[J]. 中国药学杂志, 2009,43(19):1108.

[5] 张正付,陈鸿珊,李卓荣. HPLC 法同时测定滇丹参和丹参中 5 个活性酚酸的含量(英文)[J]. 中国药学杂志,2010(19):271.

[1] 王莉,赵明波,何文顺,等. HRPLC-UV 法同时测定丹参中酚酸类成分的含量[J]. 中国中药杂志,2009,34(19):2481.

[2] 张慧娴,杜守颖,陆洋,等. HPLC 同时测定丹参水溶性及脂溶性 5 种成分的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(15):34.

[3] 罗世英,钟志国,林坚涛,等. HPLC 同时测定丹参水溶性 3 组分的含量[J]. 中国药学杂志,2009,43

[责任编辑 蔡仲德]

The proposed method is accurate , simple and applicable for determination of oleanolic acid and ursolic acid in *R. parvifolius*.

[**Key words**] *Rubus parvifolius*; oleanolic acid; ursolic acid; RP-HPLC; content determination

茅莓为蔷薇科悬钩子属植物,广泛分布于河北、山西、陕西、四川及华东各省区^[1]。茅莓根、茎、叶及全草均可药用,具有清热凉血、散结止痛、利尿消肿等功效,常用于治疗肠炎、肝脾肿大、黄疸、慢性肝炎、跌打肿痛、风湿骨痛、泌尿系统感染等^[2]。药理实验表明,茅莓的水提物具有止血和活血化瘀作用,并且已成功用于治疗冠心病、心绞痛等多种心血管疾病^[3]。目前,茅莓化学成分的研究主要集中于茅莓总皂苷的提取及组分的分离鉴定,王先荣等^[4]用正丁醇萃取茅莓根的水提醇沉提取物,再经硅胶柱色谱和薄层色谱从中分离出 2 个三萜皂苷结晶成分,即悬钩子皂苷 R₁ 和苦莓苷 F₁。谭明雄^[5]等将茅莓根乙酸乙酯萃取物经硅胶柱色谱分离,从其根部乙醇提取物中乙酸乙酯部位分离得到 5 个化合物,分别为 β-谷甾醇、蔷薇酸、2α,3α,19α,23-四羟基乌索-12-烯-28-酸、β-胡萝卜素和悬钩子皂苷,表明茅莓总皂苷主要由三萜皂苷及苷元组成。但茅莓中三萜酸类成分齐墩果酸和熊果酸的分离和含量测定方法尚未见文献报道。本实验采用超声辅助提取,建立反相高效液相色谱法同时测定茅莓样品中齐墩果酸和熊果酸的含量,为茅莓化学成分的研究及样品中齐墩果酸和熊果酸的定量分析提供科学依据。

1 仪器与试剂

Waters 系列高效液相色谱仪(美国 Waters 公司,包括双 515 泵,2996 光电二极管阵列检测器,Empower 中文色谱数据工作站),RO-MB-10D 型高纯水机(杭州永洁达膜分离设备厂),CP225D 型电子分析天平(德国 Sartorius 公司),SK2510HP 型超声波清洗器(上海科导超声仪器有限公司)。

甲醇(色谱纯,国药集团化学试剂有限公司),齐墩果酸、熊果酸对照品(中国药品生物制品检定所提供,批号分别为 110709-200304,110742-200314),其余试剂均为分析纯。茅莓(YCU-MM201101~YCU-HZ201103 标本存放于宜春学院生药标本室)购自江西省宜春市,经宜春学院肖道安讲师鉴定为蔷薇科悬钩子属植物茅莓 *Rubus parvifolius* L. 的干燥全草。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Kromasil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250

mm,5 μm),甲醇-1.0% 磷酸溶液(90:10),流速 1.0 mL·min⁻¹,检测波长 210 nm,柱温 30 ℃。以齐墩果酸和熊果酸计,理论塔板数分别为 10 918,11 267,齐墩果酸和熊果酸分离度为 2.4,对称因子分别为 1.041 285,1.031 056,外标法定量分析。对照品和样品色谱见图 1。

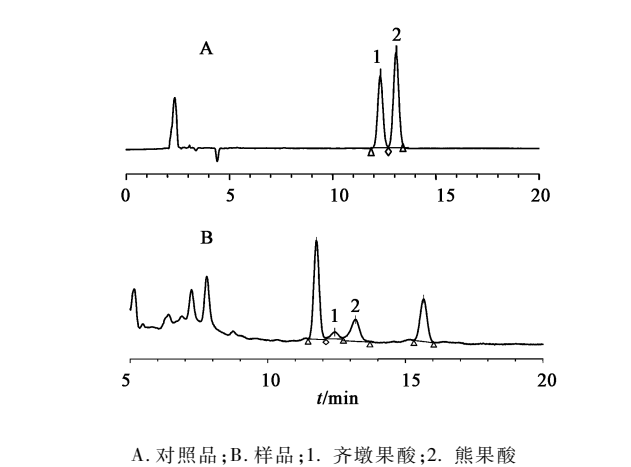


图 1 齐墩果酸和熊果酸对照品(A)和茅莓样品(B) HPLC

2.2 溶液配制

2.2.1 对照品溶液 分别精密称定齐墩果酸、熊果酸对照品 3.42,5.32 mg,置于 50 mL 量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,制成含齐墩果酸 0.068 4 g·L⁻¹和熊果酸 0.106 4 g·L⁻¹的对照品混合溶液。

2.2.2 样品溶液 茅莓样品置恒温干燥箱中于 70 ℃下干燥 6 h,粉碎后过 80 目筛。精密称取茅莓各样品粉末约 5.0 g,分别置于 50 mL 具塞锥形瓶中,加入 95% 乙醇 50 mL,称重。超声提取 30 min,冷却后用乙醇补足损失质量,摇匀,用 0.45 μm 滤膜过滤,取续滤液作为样品溶液。

2.3 精密度试验 分别精密吸取齐墩果酸和熊果酸对照品混合溶液 10 μL,平行进样 5 次,以峰面积计算色谱系统精密度,齐墩果酸和熊果酸峰面积 RSD 分别为 0.7% (n=5),0.6% (n=5)。说明进样方法和仪器精密度良好。

2.4 重复性试验 取茅莓样品 5 份,每份各约 2.5 g,按 2.2 项下方法制备样品溶液。精密吸取各样品溶液 20 μL,进样,测定其峰面积积分值,外标法计算含量。齐墩果酸和熊果酸含量的 RSD 分别为 1.8% (n=5),2.2% (n=5)。结果表明,样品制备方法重复性良好。

2.5 加样回收率试验 精密称取已知齐墩果酸和熊果酸含量的茅莓样品 6 份,每份约 3.0 g,分别加入对照品适量,制备样品溶液,进样测定含量,齐墩果酸和熊果酸平均回收率测定结果见表 1。

表 1 2 种成分加样回收率测定

组分	样品 含量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均 回收率 /%	RSD /%
齐墩果酸	0.405	0.422	0.820	98.3	97.5	1.7
	0.408	0.422	0.813	95.8		
	0.412	0.422	0.819	96.4		
	0.396	0.422	0.807	97.2		
	0.408	0.422	0.832	100.5		
	0.400	0.422	0.810	97.0		
熊果酸	1.126	1.250	2.355	98.1	96.9	1.3
	1.134	1.250	2.326	94.9		
	1.145	1.250	2.349	96.0		
	1.101	1.250	2.322	97.4		
	1.134	1.250	2.360	97.9		
	1.112	1.250	2.332	97.3		

2.6 线性关系试验 精密吸取齐墩果酸和熊果酸对照品混合溶液 2,6,10,14,20 μL 进样分析,按色谱条件测定峰面积,以对照品的进样量为横坐标,峰面积为纵坐标,绘制标准曲线,得齐墩果酸回归方程为 $Y = 5.04 \times 10^5 X - 2.09 \times 10^4$ ($r = 0.999\ 9$),熊果酸回归方程为 $Y = 4.45 \times 10^5 X - 1.97 \times 10^4$ ($r = 0.999\ 8$)。表明齐墩果酸进样量在 0.136 8 ~ 1.368 0 μg,熊果酸进样量在 0.212 8 ~ 2.218 0 μg 时,线性关系良好。

2.7 样品含量测定 精密吸取制备的样品溶液各 20 μL 进样,平行 3 次,测定齐墩果酸和熊果酸峰面积积分值,外标法计算齐墩果酸和熊果酸的平均含量。测定结果见表 2。

3 讨论

结果表明,在茅莓不同样品中,齐墩果酸含量最

表 2 茅莓不同样品中齐墩果酸和熊果酸的含量测定

mg·g ⁻¹		
No.	齐墩果酸	熊果酸
1	0.109 0	0.221 5
2	0.064 0	0.261 9
3	0.134 5	0.373 3

高为 0.134 5 g·mg⁻¹,最低为 0.064 0 g·mg⁻¹;熊果酸含量最高为 0.373 3 g·mg⁻¹,最低为 0.221 5 g·mg⁻¹。但熊果酸含量均明显高于齐墩果酸,3 个样品中熊果酸平均含量为齐墩果酸的 2.8 倍。从结果不难发现,茅莓样品中熊果酸和齐墩果酸的含量均较低,且不同样品中 2 组分含量差别较大。

在流动相中加入少量磷酸消除了色谱峰拖尾现象,齐墩果酸和熊果酸的对称因子分别为 1.04,1.03。分析时采用等度洗脱,流动相为甲醇-1.0%磷酸溶液时样品中各个色谱峰分离度较好,齐墩果酸和熊果酸分离度为 2.4,且保留时间适中。本实验建立的反相高效液相色谱法可同时测定茅莓中齐墩果酸和熊果酸的含量,样品处理简单,提取效率高,待测组分无其他杂质的干扰。方法简便、快速,分离效果好,数据准确可靠,为茅莓中齐墩果酸和熊果酸的定量分析及质量控制提供了科学依据。

[参考文献]

[1] 江苏新医学院. 中药大辞典:下册[M]. 上海:上海科学技术出版社,1986:2652.
[2] 朱志华,张惠勤,袁永军. 茅莓的药理研究[J]. 中国中药杂志,1991,4(1):19.
[3] 张均智,莫刚,杨成芳,等. 茅莓正丁醇组分的抗炎作用[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(8):204.
[4] 谭明雄,王恒山,黎霜,等. 中药茅莓化学成分研究[J]. 广西植物,2003,23(3):282.
[5] 王先荣,杜安全,王红萍. 中药茅莓化学成分的研究[J]. 中国中药杂志,1994,19(8):485.

[责任编辑 蔡仲德]