

反相高效液相色谱法测定蒲公英中齐墩果酸的含量

李喜凤^{*}, 郝哲, 邱天宝, 余云辉, 杜云锋
(河南中医学院, 郑州 450008)

[摘要] 目的: 建立蒲公英中齐墩果酸的高效液相含量测定法。方法: 采用高效液相色谱法, Hypersil ODS₂ C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 柱温 30 ℃, 以甲醇-0.5% 磷酸 (pH = 3.5) (90:10) 为流动相, 流速 1.0 mL·min⁻¹ 检测波长 210 nm。结果: 齐墩果酸在 0.872 ~ 7.848 μg 范围内峰面积与进样量有良好的线性关系, 回归方程为: $Y = 6.9373X - 1.9894$, $r = 0.9999$, 平均回收率为 98.25%, RSD 为 1.54%。结论: 该法简便快速、准确, 重复性好, 有助于蒲公英质量控制方法的研究。

[关键词] 蒲公英; 齐墩果酸; 含量测定

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)05-0052-03

Determination of Oleanolic Acid in dandelion by RP-HPLC

LI Xi-feng^{*}, HAO Zhe, QIU Tian-bao, YU Yun-hui, DU Yun-feng
(Henan college of TCM, Zhengzhou, Henan 450008, China)

[Abstract] **Objective:** To establish the determination method for oleanolic acid in dandelion by HPLC. **Method:** HPLC was carried out on Hypersil ODS₂ C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) at 30 ℃ using methanol-0.5% H₃PO₄ (pH = 3.5) (90:10) as mobile phase with a flow rate of 1.0 mL·min⁻¹ and detection wavelength was at 210 nm. **Result:** The oleanolic acid was linear within the range of 0.872 ~ 7.848 μg. The average recovery was 98.25% and RSD was 1.54%. **Conclusion:** This method is useful for quality control of dandelion.

[Key words] dandelion; oleanolic acid; determination

蒲公英为菊科植物蒲公英 *T. mongolicum* Hand.-Mazz.、碱地蒲公英 *T. sinicum* Kitag. 或同属数种植物的干燥全草^[1], 其主要成分为咖啡酸、绿原酸、齐墩果酸、蒲公英甾醇、黄酮类、香豆素类及多糖、氨基酸、维生素、矿物质、果胶等, 药效学表明蒲公英有广谱抗菌、抗毒素、抗氧自由基及抗突变抗癌等作用。齐墩果酸的药理作用与蒲公英全草生物活性基本相关, 具有护肝降酶、降糖降脂、抗突变抗癌、对染色体损伤的保护等作用^[2], 但对于蒲公英中齐墩果酸的研究目前尚未见报道。本实验采用 RP-HPLC 法对蒲公英中齐墩果酸进行含量测定, 以期对蒲公英药材的全面质量控制提供参考。

1 仪器与试剂

DIONEX 高效液相色谱仪 DIONEX P-680 泵、ASI-100 自动进样器、PDA-100 检测器、CHROMELON 工作站 (美国 DIONEX 公司), YUEPING FA2004b 型电子天平 (上海越平科学仪器有限公司), KQ-100E 型数控超声清洗器 (巩义市英峪予华仪器厂), YUEXIN101AS-2 型不锈钢数显电热鼓风干燥箱 (上海浦东荣丰科学仪器有限公司)。甲醇为色谱纯 (天津四友), 水为娃哈哈纯净水, 其他试剂均为分析纯。

药材采购自不同地区, 经河南中医学院生药学科陈随清教授鉴定均为菊科植物蒲公英 *T. mongolicum* Hand-Mazz 的干燥全草。齐墩果酸对照品 (批号 110709-200505), 由中国药品生物制品检定所提供。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱为 Hypersil ODS₂ C₁₈ (4.6

[收稿日期] 2009-11-17

[基金项目] 河南省科技厅重点科技攻关资助项目 (062306100)

[通讯作者] * 李喜凤, Tel: (0371) 65575823; Email: hzsunshine@126.com

mm ×250 mm, 5 μm) 柱(大连依利特公司);流动相为甲醇-0.5%磷酸(pH=3.5)(90:10);流速为 1.0 mL·min⁻¹;检测波长为 210 nm;柱温为 30 ℃;进样量为 10 μL。

2.2 对照品溶液制备 精密称定齐墩果酸对照品适量,加甲醇制成每 1 mL 中含齐墩果酸 0.436 mg 的溶液,摇匀,过 0.45 μm 微孔滤膜,即得。见图 1。

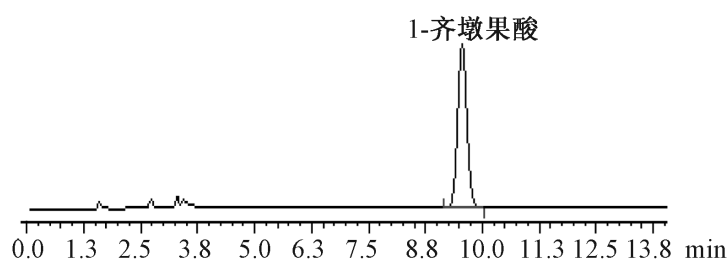


图 1 对照品色谱图

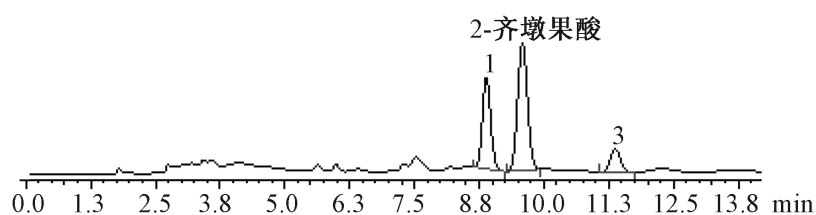


图 2 供试品色谱图

2.3 供试品溶液制备 取蒲公英样品适量于 60 ℃干燥后粉碎,过三号筛。精密称定粉末 2 g,加 35% HCl 20 mL 酸水解 4 h,将药渣洗至中性,70 ℃干燥。将干燥药渣置锥形瓶中,加三氯甲烷 25 mL,超声 30 min(40 KHz, 100 W),提取 3 次,滤过,合并滤液置蒸发皿中蒸干,甲醇定容至 10 mL 量瓶中,过 0.45 μm 微孔滤膜,即得。见图 2。

2.4 标准曲线绘制 精密吸取齐墩果酸对照品溶液 2, 6, 10, 14, 18 μL 进样,以齐墩果酸的峰面积积分为纵坐标,以进样量为横坐标,绘制标准曲线,计算回归方程: $Y=6.9373X-1.9894$, $r=0.9999$,线性范围为 0.872 ~7.848 μg。

2.5 精密度试验 取同一样品溶液,连续进样 5 次,每次 10 μL,测得齐墩果酸峰面积的 RSD 为 0.81%,表明该方法精密度良好。

2.6 稳定性试验 精密吸取同一批供试品溶液,分别于 0, 2, 4, 6, 8, 10 h 进样 10 μL,测得齐墩果酸峰面积的 RSD 值为 0.62%,表明样品溶液在 10 h 内稳定。

2.7 重复性试验 精密称定同一批次样品 2 g,共 5 份,按 2.3 项下制备供试品溶液,进样 10 μL,测定齐墩果酸含量的 RSD 值为 0.99%,表明该方法重复性良好。

2.8 加样回收率试验 精密称取已知齐墩果酸含量的蒲公英药材 9 份,每份约 1 g,按高,中,低 3 种浓度分别加入适量齐墩果酸对照品溶液,按照 2.3 项下供试品处理方法制备样品溶液,进样 10 μL,测定含量,计算加样回收率,结果见表 1。

表 1 齐墩果酸加样回收率试验(n=3)

No.	称样量 /g	样品含量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
1	0.999 4	1.282 0	1.002 8	2.208 4	96.65		
2	0.996 8	1.278 7	1.002 8	2.235 6	97.99		
3	1.010 2	1.295 9	1.002 8	2.198 8	95.65		
4	1.014 0	1.300 8	1.308 0	2.596 6	99.53		
5	1.009 6	1.295 1	1.308 0	2.600 4	99.90	98.25	1.54
6	1.013 6	1.300 2	1.308 0	2.610 3	100.08		
7	1.012 0	1.298 2	1.569 6	2.789 6	97.27		
8	1.005 6	1.290 0	1.569 6	2.815 4	98.45		
9	1.012 2	1.298 5	1.569 6	2.830 2	98.68		

2.9 样品含量测定 取待测 5 批样品,按照 2.3 项下供试品处理方法进行处理,平行 3 份,按上述色谱条件测定,用外标法计算样品含量。结果见表 2。

表 2 样品含量测定(n=3)

No.	样品来源	齐墩果酸含量 /%
1	河南周口鹿邑	0.036 37
2	南阳南召	0.023 60
3	洛阳龙域湾	0.021 64
4	山东菏泽麟州大药店	0.250 36
5	北京同仁堂大药店	0.128 28

3 讨论

3.1 检测波长的选择 经 PDA 检测器所获得的齐墩果酸 UV 光谱图,齐墩果酸的最大吸收波长为 200.5 nm,因甲醇在 205 nm 处比 210 nm 吸收强一倍,为了减少干扰又尽量不降低灵敏度,故选用 210 nm 作为检测波长。

3.2 提取溶剂的选择 实验中曾用甲醇、乙醇、三氯甲烷溶剂对样品的提取进行考察,发现乙醇提取物中的杂质较多,三氯甲烷提取物中的杂质最少,故选用三氯甲烷作为提取溶剂。

3.3 流动相的选择 实验曾对甲醇-水(88:12)、甲醇-0.5%磷酸水(90:10)、甲醇-水-冰乙酸-三乙胺(90:10:0.03:0.06)、甲醇-水-磷酸-三乙胺(90:10:0.02:0.04)等色谱系统进行考察,结果以甲醇-0.5%磷酸水(90:10)流动相分离效果最好。

3.4 有文献报道,蒲公英对 CCl₄ 诱导的大鼠肝细