

- [3] 杨秀东,冯乾坤,李婷婷,等.麻叶千里光化学成分及药理作用研究[J].长春中医药大学学报,2006,22(3):70-71.
- [4] 吴斌,吴立军,金史哲,等.麻叶千里光抗菌活性成分的研究[D].沈阳:沈阳药科大学,2004.
- [5] 王继彦,李丽静,张莲珠.HPLC法测定返魂草及其注射剂中绿原酸[J].中草药,2005,36(8):1166-1167.
- [6] 南敏伦,赫玉芳,刘静月,等.HPLC法测定不同产地返魂草中绿原酸的含量[J].沈阳药科大学学报,2008,25(2):119-121.
- [7] 杨海燕,孙海峰,汪爱国,等.醋酸乙酯萃取绿原酸过程研究[J].时珍国医国药,2006,17(11):2241-2242.

HPLC法测定不同产地5种中药材中熊果酸

赵庆春¹,杜占权²,张琳²,宋庆宇³,史国兵¹

(1. 沈阳军区总医院药剂科,辽宁 沈阳 110016; 2. 沈阳药科大学中药学院,辽宁 沈阳 110016; 3. 大连医科大学药学院,辽宁 大连 116027)

摘要:目的 运用高效液相色谱法对不同产地山楂、夏枯草、冬凌草、柿蒂和连翘中熊果酸的量进行测定。方法 采用高效液相色谱法,色谱柱:Kromasil C₁₈(200 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:乙腈-水-乙酸胺(69:31:0.6);体积流量:1 mL/min;检测波长:215 nm。结果 对比不同产地的5种药材,连翘中熊果酸的平均质量分数最高,达0.237%;山楂、夏枯草、柿蒂稍低,平均质量分数分别为0.180%、0.158%、0.212%;冬凌草最低,为0.124%。结论 本方法简便、准确、重现性好,可作为中药材中熊果酸的定量测定方法。

关键词:高效液相色谱法;熊果酸;山楂;夏枯草;冬凌草;柿蒂;连翘

中图分类号:R282.6 **文献标识码:**A **文章编号:**0253-2670(2009)11-1821-03

熊果酸(ursolic acid, UA)又名乌苏酸,属于 α -香树脂醇型(α -amyrin)五环三萜类化合物,存在于多种植物体内。已有研究表明,熊果酸具有镇静、消炎、抗菌、抗溃疡、降低血糖等多种生物效应,近年来发现熊果酸具有增强免疫、抗肿瘤、诱导癌细胞分化和抗血管生长的作用,同时熊果酸对肝炎、艾滋病的治疗还有较强的效果,是一种极具开发价值的植物活性成分^[1~3]。熊果酸在药用植物中分布广泛,现已从30多种药用植物中分离提取到熊果酸,本实验采用HPLC法针对文献报道^[4~6]中量较高的5种药材山楂、夏枯草、冬凌草、柿蒂和连翘中熊果酸的量进行了测定,以比较其量的高低,为熊果酸的进一步开发利用奠定基础。

1 仪器与试剂

Waters 510 高效液相色谱仪,紫外检测器(Waters 484 型),N2000 型色谱工作站(浙大智达信息工程有限公司);KQ3200 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

熊果酸对照品是从植物柿蒂中提取纯化得到,经IR、MS、¹H-NMR、¹³C-NMR 光谱鉴定结构,HPLC 归一化法测定质量分数在99.0%以上;药材山楂、夏枯草、冬凌草、柿蒂、连翘均采自其主产地,经沈阳药科大学孙启时教授鉴定,分别为蔷薇科植

物山楂 *Crataegus pinnatifida* Bunge 的干燥成熟果实、唇形科植物夏枯草 *Prunella vulgaris* L. 的干燥果穗、唇形科香茶菜属植物 *Rabdosia rubescens* (Hemsl.) Hara 的全草、柿树科植物柿 *Diospyros kaki* Thunb. 的干燥宿萼、木犀科植物连翘 *Forsythia suspensa* (Thunb.) Vahl 的干燥果实。甲醇、乙腈为色谱纯,水为纯化水,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件:色谱柱为 Kromasil C₁₈(200 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:乙腈-水-乙酸胺(69:31:0.6);体积流量:1 mL/min;进样量:10 μL。检测波长:215 nm;熊果酸与相邻峰分离度为1.7。

2.2 对照品溶液的制备:精密称取熊果酸对照品25 mg,置50 mL 量瓶中,用甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,配成0.5 mg/mL 的溶液。

2.3 供试品溶液的制备:将阴干的山楂、夏枯草、冬凌草、柿蒂、连翘样品置50℃下烘干3 h,粉碎,过40目筛,取各样品粉末10 g,精密称定,置量瓶中,加入80%乙醇100 mL,超声提取30 min,再浸泡2 h后滤过,滤渣按同样的方法再提取2次,合并滤液,45℃减压浓缩至干,用无水乙醇转移并定容至100 mL 量瓶中,摇匀,0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液作为供试品溶液。

收稿日期:2009-01-17

作者简介:赵庆春(1967—),主任药师,博士,硕士生导师,主要从事中药有效成分及其质量标准研究。

Tel:(024)28856205 13309882912 E-mail:zhaopc53@yahoo.com.cn

2.4 标准曲线的制备:精密量取 1、2、4、6、8 mL 对照品溶液,用无水乙醇定容至 10 mL,分别进样 10 μ L,记录峰面积。以峰面积(Y)对质量浓度(X)进行回归计算,得到回归方程为 $Y = 957\ 302 X + 4\ 871$, $r = 0.999\ 7$,结果表明熊果酸在 0.05~0.40 mg/mL 与峰面积呈良好的线性关系。

2.5 精密度试验:取对照品溶液 10 μ L,在上述色谱条件下重复进样 5 次,计算得熊果酸峰面积的 RSD 为 0.85%,表明仪器进样精密度良好。

2.6 稳定性试验:取 5 种药材的同一供试品溶液,在室温下分别于 0、2、4、8、16 h 进样 10 μ L,测得山楂、夏枯草、冬凌草、柿蒂、连翘 5 种中药材中熊果酸的峰面积 RSD 分别为 1.85%、1.69%、2.06%、1.12%、1.58%,表明样品溶液在 16 h 内稳定。

2.7 重现性试验:取同一批山楂药材,按供试品制

备方法配制 6 份样品溶液,分别进样 10 μ L,计算得熊果酸质量分数的 RSD 为 1.90%;夏枯草、冬凌草、柿蒂、连翘也按相同方法操作,计算得 RSD 分别为 1.53%、0.56%、1.68%、1.59%。

2.8 回收率试验:分别取山楂、夏枯草、冬凌草、柿蒂、连翘 5 种中药材的同一供试品溶液各 5 份,分别加入与样品量之比约为 1:1 的熊果酸对照品,在上述色谱条件下进行分析,计算回收率。结果山楂、夏枯草、冬凌草、柿蒂、连翘中熊果酸平均回收率分别为 98.32%、97.92%、98.48%、99.24%、97.84%,RSD 分别为 0.93%、1.14%、1.79%、1.09%、1.86%。

2.9 样品测定:分别精密吸取不同产地的山楂、夏枯草、冬凌草、柿蒂、连翘 5 种中药材的供试品溶液,在上述色谱条件下进样分析,色谱图见图 1。外标法计算样品中熊果酸的量,结果见表 1。

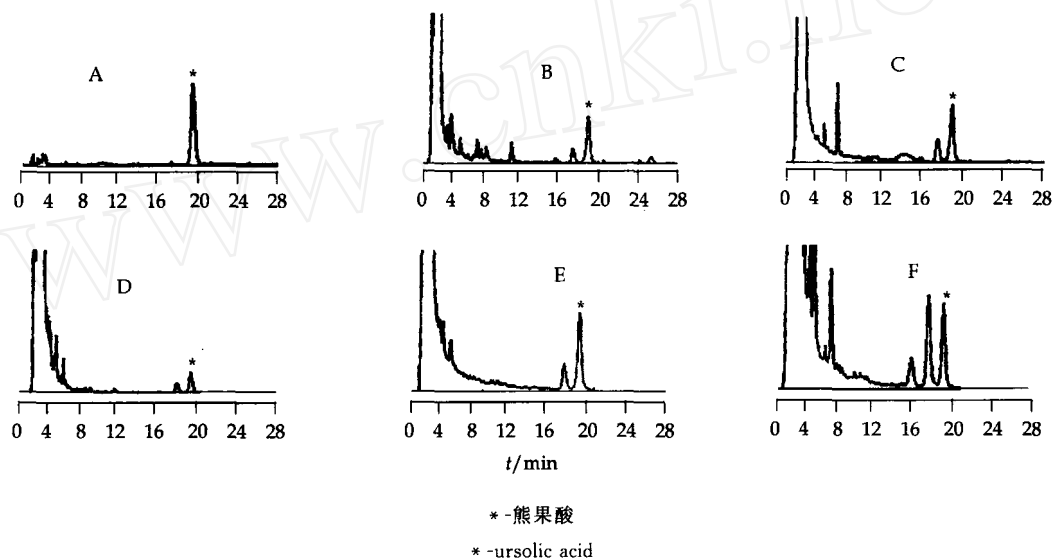


图 1 熊果酸对照品(A)、山楂(B)、夏枯草(C)、冬凌草(D)、柿蒂(E)、连翘(F)的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC Chromatograms of ursolic acid reference substance (A), *Fructus Crataegi* (B), *Spica Prunellae* (C), *Rabdosia Rubecens* (D), *Calyx Kaki* (E), and *Fructus Forsythiae* (F)

从表 1 可以看出,所测 5 种中药材中,连翘中熊果酸的量最高,达 0.237%;山楂、夏枯草、柿蒂稍低,分别为 0.180%、0.158%、0.212%;冬凌草最低,为 0.124%。

3 讨论

3.1 提取条件的选择:熊果酸为非极性成分,其在甲醇、无水乙醇、氯仿等不同的提取溶媒中溶解性都非常好^[7],考虑到毒性以及工业化生产的需要,选择了 80% 乙醇作为提取溶媒、超声提取 30 min 的提取方法。

3.2 分离条件的选择:根据文献报道^[7~9]熊果酸的分离多选用十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂的色谱柱,当流动相条件为乙腈-0.05%磷酸(92:8)时,峰形虽然得到改善,但是熊果酸与其相邻组分(齐墩果

酸)不能达到基线分离;而当流动相条件为乙腈-甲醇-水-乙酸胺(60:14:28:0.6)时,熊果酸的保留时间长,并且流动相复杂,配制较繁琐。本实验通过优化流动相条件,改为乙腈-水-乙酸胺(69:31:0.6),在此条件下,熊果酸的保留时间为 18.2 min 左右,基线平稳,噪音较小,并且与齐墩果酸能够达到基线分离。

从分析结果上看,冬凌草和山楂中熊果酸的量与文献报道^[4,5]差异比较大,可能与产地、采收时间有关。柿蒂、连翘、夏枯草的测定结果与文献比较,熊果酸的量比较接近,并且这些药材资源丰富,价格低廉,适合于提取熊果酸,用于开发利用。

熊果酸具有多种药效作用而被广泛应用于制药

表 1 不同产地和采集时间 5 种中药材中熊果酸的测定 (n=2)

Table 1 Determination of ursolic acid in five traditional Chinese medicinal materials from various habitats and collection periods (n=2)

样品	药材产地	采集时间	熊果酸/%	平均质量分数/%
山楂	辽宁锦州	2004-10	0.151	0.180
	山西运城	2005-11	0.112	
	河南焦作	2004-10	0.180	
夏枯草	河北石家庄	2005-10	0.203	0.158
	山东平邑	2006-10	0.272	
	江苏连云港	2006-04	0.162	
	安徽亳州	2006-03	0.133	
	浙江温州	2007-04	0.150	
冬凌草	河南焦作	2007-05	0.212	0.124
	山东淄博	2007-04	0.110	
	四川绵阳	2007-03	0.180	
	山西太谷	2006-06	0.098	
	河南焦作	2006-06	0.106	
	河南济源	2006-06	0.141	
	河南淇县	2006-06	0.161	
连翘	河北邯郸	2007-07	0.115	0.237
	山西太原	2006-10	0.230	
	河南焦作	2005-10	0.271	
	陕西西安	2004-11	0.264	
	山东淄博	2006-10	0.199	
柿蒂	河北石家庄	2006-10	0.219	0.212
	安徽亳州	2006-12	0.220	
	河北石家庄	2005-11	0.203	
	河南焦作	2006-12	0.210	
	山东淄博	2006-12	0.197	
	浙江温州	2007-12	0.231	

和临床,本实验通过高效液相色谱法对不同产地的 5 种中药材中熊果酸量进行测定并加以比较,同时为《中国药典》提供了柿蒂的定量测定方法。此方法可应用于熊果酸研究、开发和生产过程中。

参考文献:

[1] 熊斌,雷志勇,陈虹. 熊果酸药理学研究进展[J]. 国外医学:药学分册,2004,31(3):133-136.
 [2] 肖坤福,郑云法,刘成左,等. 熊果酸的研究进展[J]. 时珍国医国药,2005,16(12):1298-1300.
 [3] 李国章,于华忠,曹庸. 薄层扫描法测定三种中药材中熊果酸的含量[J]. 甘肃中医学院学报,2006,23(2):51-53.
 [4] 陈荣,廖晓峰. 富含熊果酸药材的分布及加工[J]. 现代食品科技,2006,22(1):203-204.
 [5] 王鹏,张忠义,吴忠. 熊果酸在药用植物中的分布及药理作用[J]. 中药材,2000,23(11):717-722.
 [6] 相延英,杨光. 常用中药中齐墩果酸和熊果酸的含量测定[J]. 中国医院药学杂志,2004,24(5):316-318.
 [7] 颜苗,刘韶,杜方麓,等. 苦丁茶中熊果酸含量的测定[J]. 湖南中医学院学报,2006,26(1):45-47.
 [8] 鞠建华,周亮,郑瑞霞,等. 高效液相色谱法测定中药枇杷叶中熊果酸的含量[J]. 中国药理学杂志,2003,38(9):657-659.
 [9] 郑一敏,胥秀英,杨艳红,等. HPLC 法测定柿蒂中齐墩果酸和熊果酸的含量[J]. 药学实践杂志,2005,23(3):163-165.

RP-HPLC 同时测定桔梗中去芹糖桔梗皂苷 D 与桔梗皂苷 D

李伟¹,王梓¹,刘志²,张伟¹,张晶¹,郑毅男^{1*}

(1. 吉林农业大学中药材学院,吉林 长春 130118; 2. 吉林农业大学农业现代化研究所,吉林 长春 130118)

摘要:目的 为了更加科学、准确地控制中药桔梗的质量,建立了同时测定桔梗中去芹糖桔梗皂苷 D 与桔梗皂苷 D 量的反相高效液相色谱法。方法 桔梗用 70% 乙醇超声提取,采用 Hypersil ODS2 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm),乙腈-水为流动相,体积流量 1.0 mL/min;检测波长 210 nm,柱温 30 ℃,以外标法检测。结果 去芹糖桔梗皂苷 D 与桔梗皂苷 D 可以达到基线分离,平均回收率分别为 97.81% 和 98.22%。结论 首次报道了反相高效液相色谱同时测定桔梗中去芹糖桔梗皂苷 D 与桔梗皂苷 D 的定量测定方法,该方法操作简单,结果稳定可靠,可作为中药桔梗的质量控制依据。

关键词:桔梗;去芹糖桔梗皂苷 D;桔梗皂苷 D;RP-HPLC

中图分类号:R282.6 文献标识码:A 文章编号:0253-2670(2009)11-1823-03

桔梗为桔梗科 (Campanulaceae) 植物桔梗 *Platycodon grandiflorum* (Jacq.) A. DC. 的干燥根^[1]。桔梗中含有大量的五环三萜皂苷类成分,其中桔梗皂苷 D (platycodin D) 一直被作为桔梗质量控制的指标性化合物^[2],也有学者报道了不同来源桔梗中桔梗皂苷 E 的 HPLC-ELSD 测定^[3]。笔者

在桔梗的化学成分研究中,去芹糖桔梗皂苷 D (deapio-platycodin D) 作为主要皂苷类成分被分离得到^[4]。药理研究表明,去芹糖桔梗皂苷 D 具有抑制胰脂肪酶活性及抗肿瘤活性^[5,6]。查阅有关文献,虽然桔梗中桔梗皂苷 D 的 HPLC 分析已有报道^[7~9],但去芹糖桔梗皂苷 D 的分析测定尚未见报

收稿日期:2009-01-17

基金项目:吉林农业大学科研启动基金;长春净月开发区科技 3 项经费 (NO. 2007B001)

作者简介:李伟 (1980—),男,满族,助教,在读博士,主要研究方向为天然产物化学与新药研究。

E-mail: liwei7727@126.com

* 通讯作者 郑毅男 Tel: (0431) 84533304-8011 E-mail: zhenyinan@tom.com