

文章编号: 1674-8085(2018)03-0084-04

RP-HPLC-PDAD 法测定青叶胆中齐墩果酸和熊果酸的含量

王博龙^{1,2}, 张军雷^{1,2}, *邹盛勤^{1,2}

(1. 江西省天然药物活性成分研究重点实验室, 江西, 宜春 336000; 2. 宜春学院化学与生物工程学院, 江西, 宜春 336000)

摘要: **目的** 建立了青叶胆中齐墩果酸和熊果酸的反相高效液相色谱-光电二极管阵列检测器(RP-HPLC-PDAD)定量分析方法。**方法** 采用 95%乙醇为溶剂超声提取, 色谱柱为 Kromasil C₁₈ 柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm), 柱温 30 ℃。以甲醇:水:磷酸(88:12:0.15, v/v/v)为流动相等度洗脱, 流速 0.9 mL·min⁻¹, 采用光电二极管阵列检测器进行检测, 检测波长 210 nm。**结果** 齐墩果酸进样量在 0.1048~2.6200 μg 时, 与峰面积呈良好的线性关系($r = 0.9999$), 平均回收率为 96.9%, RSD 为 1.7%($n = 9$); 熊果酸进样量在 0.2304~5.7600 μg 时, 与峰面积呈良好的线性关系($r = 0.9999$), 平均回收率为 97.5%, RSD 为 1.5%($n = 9$)。**结论** 方法准确, 操作简便, 数据可靠, 可用于青叶胆中齐墩果酸和熊果酸的含量测定。

关键词: 青叶胆; 齐墩果酸; 熊果酸; 高效液相色谱法; 光电二极管阵列检测器

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

DOI:10.3969/j.issn.1674-8085.2018.03.017

CONTENT DETERMINATION OF OLEANOLIC ACID IN *SWERTIA MILEENSIS* BY RP-HPLC-PDAD

WANG Bo-long^{1,2}, ZHANG Jun-lei^{1,2}, *ZOU Sheng-qin^{1,2}

(1. Key Laboratory of Jiangxi Province for Research on Active Ingredients in Natural Medicines, Yichun, Jiangxi 33600, China;

2. College of Chemistry and Bioengineering, Yichun University, Yichun, Jiangxi 336000, China)

Abstract Objective: A precise and sensitive method for the determination of oleanolic acid and ursolic acid in *Swertia mileensis* was developed by RP-HPLC-PDAD. **Methods:** The two compounds were extracted by ultrasonic wave aided method with 95% ethanol solution, and separated on a Kromasil C₁₈ column (5 μm 4.6 mm × 250 mm) at 30 ℃. A isocratic program was carried out at a flow rate of 0.9 mL·min⁻¹ using methanol-water-phosphoric acid (88:12:0.15, v/v/v) as the mobile phase. **Results:** The photodiode array detector was used for qualitative and quantitative analysis and the detection wavelength was set at 210 nm. Oleanolic acid and ursolic acid showed good linear relationship with the peak area ($r = 0.99999$) at the range of 0.1048~2.6200 μg and 0.2304~5.7600 μg, respectively with the respective recovery rates of 96.9% and 97.5%, and RSD of 1.7% ($n = 9$) and 1.5% ($n = 9$). **Conclusion:** The proposed method is accurate, simple and promises to be applicable for the determination of oleanolic acid and ursolic acid in *S. mileensis*.

Key words: *Swertia mileensis*; oleanolic acid; ursolic acid; HPLC; photodiode array detector

收稿日期: 2018-03-03; 修改日期: 2018-04-17

基金项目: 国家“863”计划重点项目(2002AA2Z3217); 江西省研究生创新专项资金项目(YC2013-S286)

作者简介: 王博龙(1977-), 男, 陕西扶风人, 副教授, 博士, 硕士生导师, 主要从事药物临床前及临床有效性、安全性评价研究(E-mail: wblong77@126.com);

张军雷(1987-), 男, 安徽亳州人, 硕士生, 主要从事药物临床前及临床有效性研究(E-mail: ah-junlei@163.com);

*邹盛勤(1970-), 男, 江西奉新人, 教授, 主要从事天然产物活性成分提取与分析研究(E-mail: zsqycxy@163.com).

青叶胆来源于龙胆科植物青叶胆 (*Swertia mileensis* T. N. Ho et W. L. Shih) 的干燥全草^[1], 又名小青鱼胆、七疸药、肝炎草等, 味苦、微寒, 主要分布于云南、四川、广西和江西等南部各省区^[2]。青叶胆于 1977 年即被《中国药典》收载, 具有清肝利胆、清热利湿的功效, 用于黄疸尿赤、热淋涩痛等症^[3-4]。因青叶言其色, 胆者言其味, 色青绿而味苦如胆汁而得名^[2,5]。文献报道青叶胆的有效成分主要有獐牙菜苦苷、齐墩果酸、熊果酸和黄酮类成分等^[6], 其化学成分含量的测定方法主要有分光光度法及高效液相色谱法等^[7-9]。《中国药典》虽已收录青叶胆, 但鉴别项下只有齐墩果酸和獐牙菜苦苷 2 成分的薄层色谱定性鉴别, 而无主要化学成分的定量鉴别项^[3]。为完善中国药典中青叶胆的定量质量控制指标, 以齐墩果酸和熊果酸等三萜酸为青叶胆的主要药效成分, 本研究建立快速、可靠的高效液相色谱法定量方法, 同时测定了青叶胆中齐墩果酸和熊果酸的含量, 方法操作简便, 数据准确, 可为控制与评价青叶胆药材质量提供科学的依据。

1 仪器与试剂

Waters 高效液相色谱仪 (美国沃特世公司); CP225D 电子分析天平 (赛多利斯公司); SK2510HP 超声波清洗器 (上海科导超声仪器有限公司)。熊果酸、齐墩果酸对照品 (上海阿拉丁生化科技股份有限公司, 批号分别为: O110087,

U107242); 甲醇 (色谱纯); 乙醇、磷酸 (分析纯); 水为超纯水^[10]。青叶胆分别购自于广西、云南、江西, 经宜春学院周秀玲副教授鉴定为龙胆科植物青叶胆 *Swertia mileensis* T. N. Ho et W. L. Shih 的干燥全草。

2 方法与结果

2.1 对照品混合贮备液的配制

分别精密称定齐墩果酸、熊果酸对照品 2.62、5.76 mg, 置于 25 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 制成质量浓度为含齐墩果酸 $0.1048 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和熊果酸 $0.2304 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的对照品混合贮备液。

2.2 样品溶液的配制

青叶胆样品恒温干燥后粉碎备用。精密称取青叶胆各样品粉末 1.0 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 1 h, 冷却后称重, 用乙醇补足失重, 摇匀。进样前用 $0.45 \mu\text{m}$ 滤膜过滤。

2.3 色谱条件

选用 Kromasil C_{18} 柱 ($5 \mu\text{m}$, $250 \text{ mm}\times 4.6 \text{ mm}$); 流动相为 $\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}:\text{H}_3\text{PO}_4$ ($88:12:0.15$, v/v/v); 洗脱速度 $0.9 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$; 柱温为 $30 \text{ }^\circ\text{C}$ 。在 210 nm 检测波长下, 待测组分理论塔板数均大于 10000, 对称因子分别为 1.02、0.96, 分离度均大于 2.0。混合对照品和青叶胆样品溶液的色谱见图 1。

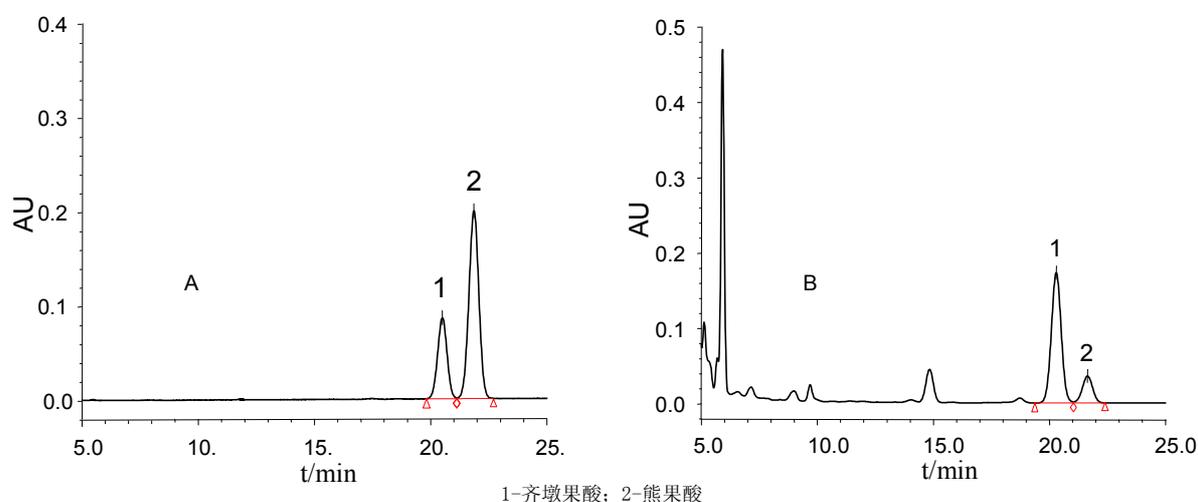


图 1 对照品混合贮备液(A)和青叶胆样品溶液(B) HPLC 色谱
Fig.1 HPLC chromatograms of reference substances(A) and samples(B)

2.4 精密度试验

用微量进样器吸取上述对照品混合溶液 10 μL , 平行进样 5 次, 积分后计算齐墩果酸和熊果酸的峰面积, 其 RSD 分别为 0.6 % ($n = 5$) 和 0.9 % ($n = 5$)。仪器精密度符合定量要求。

2.5 对照品的线性关系考察

用微量进样器精密吸取按“2.1”项下方法制备的对照品贮备液 1、5、10、15、25 μL 进样分析。按选定的色谱条件测定峰面积, 和相应对照品进样量绘制标准曲线。拟合后齐墩果酸线性回归方程为: $Y = 5.32 \times 10^5 X - 1.06 \times 10^4$ ($r = 0.9999$), 熊果酸线性回归方程为: $Y = 5.04 \times 10^5 X - 9.07 \times 10^3$ ($r = 0.9999$)。齐墩果酸进样线性范围为 0.1048~2.6200 μg , 熊果酸进样线性范围在 0.2304~5.7600 μg , 线性范围符合定量要求。

2.6 重复性考察

取青叶胆(江西)样品 6 份, 每份 1.0 g, 按“2.2”项下步骤制备样品溶液。精密吸取各样品溶液 10 μL , 进样, 测定其峰面积积分值, 通过线性回归方程计算待测组分的含量。齐墩果酸含量的 RSD 为 1.7% ($n = 6$), 熊果酸含量的 RSD 为

1.9% ($n = 6$), 方法重复性良好。

2.7 加样回收率试验^[10-11]

精密称取已知待测组分含量的青叶胆(江西)样品 9 份, 按高(120%)、中(100%)、低(80%)浓度分别加入相应对照品适量, 制备不同浓度的加标样品溶液。进样测定加标样品中齐墩果酸和熊果酸的总含量, 按回收率计算方法计算得齐墩果酸平均回收率为 96.5 %, RSD 为 1.4 %; 熊果酸平均回收率为 97.5 %, RSD 为 1.2 %。

2.8 峰纯度检测

为增强方法的定性能力, 选定检测波长、基线噪音及间隔起止时间等条件, 采用 Empower 软件适应性选件自动连续计算色谱图的纯度角和阈值, 并绘制纯度曲线和自动阈值曲线。当系统纯度角小于阈值时, 在噪音内光谱均匀分布, 色谱峰为纯组分; 当系统纯度角大于阈值时, 表示有色谱组分有重叠^[12]。对照品和样品纯度图中齐墩果酸和熊果酸峰的纯度角均小于自动阈值, 纯度线均匀的处于阈值线下方(见图 2), 表明此色谱分离条件下熊果酸、齐墩果酸及其他组分离良好, 待测组分色谱峰均为单一紫外吸收峰。

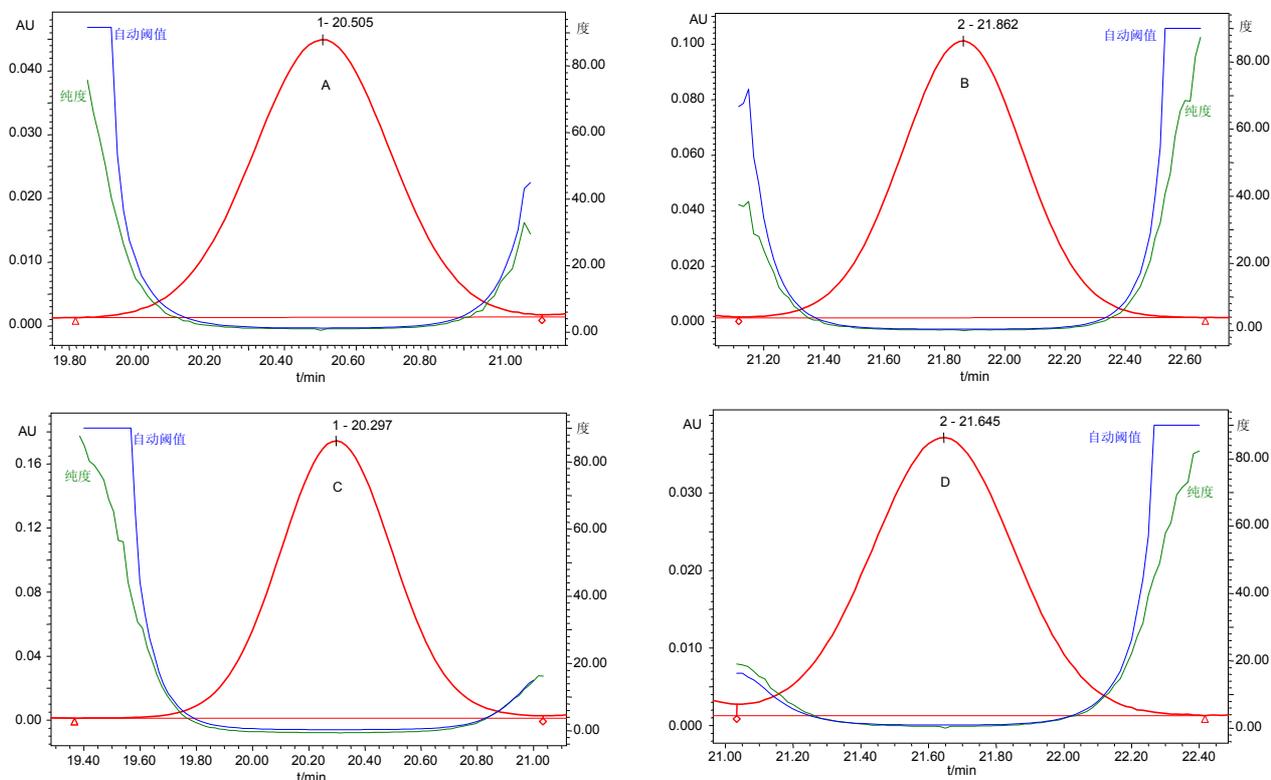


图 2 对照品(A,B)和样品溶液(C,D)中齐墩果酸(1)和熊果酸(2)的峰纯度分析

Fig.2 Peak purity analysis of oleanolic acid(1) and ursolic acid(2) in reference substances(A,B) and the samples(C,D)

2.9 稳定性考察

精密称定粉碎后的江西产青叶胆药材粉末 1.0 g, 制备样品测试溶液, 依次精密吸取供 10 μL , 于 0~12 h 内每间隔 2 h 进样 1 次, 测定齐墩果酸和熊果酸色谱峰峰面积, 2 个待测组分峰面积的 RSD 分别为 1.5 % 和 2.1 %, 待测组分在 12 h 内稳定^[13]。

2.10 样品含量测定

精密吸取不同产地青叶胆样品溶液各 10 μL , 进样, 重复 3 次, 测定样品溶液中齐墩果酸和熊果酸的峰面积, 根据组分积分值用线性方程计算待测组分的平均含量^[10]。测定结果见表 1。

表 1 青叶胆不同样品中齐墩果酸和熊果酸的含量测定结果 (% , n=3)

Table1 Content of oleanolic acid and ursolic acid in samples

产地	齐墩果酸	RSD	熊果酸	RSD
云南	0.178	0.9	0.134	1.0
江西	0.314	0.3	0.145	1.2
广西	0.801	0.5	0.184	0.6

3 讨论

在不同产地的青叶胆样品中, 广西产样品中的齐墩果酸含量最高, 其含量为 0.801 %, 云南产样品中含量最低, 其含量为 0.178 %; 广西产样品中熊果酸含量最高, 其含量为 0.184 %, 云南产样品中最低, 其含量为 0.134 %。不同产地青叶胆中同分异构体齐墩果酸和熊果酸的含量差异较大, 但熊果酸含量均低于齐墩果酸, 2 组分含量均为广西 > 江西 > 云南。

由于齐墩果酸和熊果酸在结构式具有-COOH 基团, 在甲醇水溶液中存在电离现象, 磷酸的加入可抑制此现象的发生。本实验采用甲醇-水-磷酸体系 (88 : 12 : 0.15) 等度洗脱的分离效果和定性能力好, 峰形对称, 保留时间适中。且 PDAD 检测器可在紫外及可见光波长范围内进行三维数据采集 (色谱加光谱), 在以保留时间定性的基础上, 比对待测组分和对照品的光谱, 并分析其峰的纯度, 方法的定性能力大为增强^[14]。

本实验以云南、江西、广西等产地的青叶胆为实验材料, 对其活性成分齐墩果酸和熊果酸进行了

分离和含量测定, 方法定量准确, 简单易行, 回收率高, 可用于青叶胆中齐墩果酸和熊果酸含量的同时测定, 为控制与评价药材质量提供了科学依据。

参考文献:

- [1] 宋万志. 龙胆科的资源植物—“青叶胆”和“藏茵陈”[J]. 中药材, 1991, 14(5): 15-17.
- [2] 王建云, 范亚刚, 胡佳雪, 等. 青叶胆及其混淆品的生药鉴别[J]. 中药材, 1997, 20(6): 283-286.
- [3] 国家药典委员会. 中国药典(一部)[M]. 北京: 化学工业出版社, 2010: 182.
- [4] 郭爱华. 青叶胆獐牙菜属药用植物化学成分和药理作用的研究进展[J]. 山西中医学院学报, 2005, 6(1): 57-59.
- [5] 梁钜忠, 雷伟亚, 刘佩. 解痉止痛药—獐牙苦苣[J]. 新药与临床, 1985, 4(2): 58-59.
- [6] 李旭山, 江志勇, 王福生, 等. 青叶胆化学成分研究[J]. 中国中药杂志, 2008, 33(23): 2790-2793.
- [7] 郑一敏, 胥秀英, 傅善权. 弥勒獐牙菜药材不同部位獐牙菜苦苣与齐墩果酸的含量测定[J]. 中国中药杂志, 2004, 29(7): 709-710.
- [8] 张广明, 刘宗, 戴林东. 分光光度法测定青叶胆中獐牙菜苦苣含量[J]. 中药材, 1997, 20(6): 283-286.
- [9] 李耀利, 尚明英, 耿长安, 等. 云南产青叶胆及其习用品药材中 5 种成分的 HPLC 含量测定[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(9): 1394-1400.
- [10] 毛玲, 张秀秀, 韦国兵. HPLC 法测定吴茱萸中吴茱萸碱和吴茱萸次碱的含量[J]. 井冈山大学学报: 自然科学版, 2016, 37(2): 97-101.
- [11] 蔡晔芬, 黄清松. 反相高效液相色谱法测定不同产地虎刺中齐墩果酸和熊果酸的含量[J]. 中药材, 2012, 35(5): 694-696.
- [12] 黄芳, 康继宏, 郁建, 等. 色谱峰纯度的定性方法[J]. 色谱, 1995, 13(1): 33-37.
- [13] 宋玉鹏, 陈海芳, 谭舒舒, 等. 不同采收期江枳壳中柚皮素和橙皮素 HPLC 含量测定[J]. 井冈山大学学报: 自然科学版, 2017, 38(1): 83-87.
- [14] 邹盛勤, 吴正平. 高效液相色谱-二极管阵列检测器法测定扛板归不同部位中齐墩果酸和熊果酸的含量[J]. 药物分析杂志, 2011, 31(7): 1381-1384.