

# 反相高效液相色谱法测定陆英中乌索酸和齐墩果酸含量

邹盛勤<sup>1</sup>, 刘传安<sup>2</sup> (1. 宜春学院生物工程研究所, 江西 宜春 336000; 2. 宜春学院理学院, 江西 宜春 336000)

**摘要:**目的 建立陆英药材中乌索酸和齐墩果酸含量的测定方法。方法 选用 Symmetry C<sub>18</sub> (3.9 mm × 150 mm, 5 μm) 色谱柱, 流动相甲醇-水 (88:12), 检测波长 220 nm, 流速 0.6 mL/min, 柱温 25℃。结果 乌索酸的线性范围 0.098 ~ 2.35 μg,  $r = 0.9999$ ; 齐墩果酸的线性范围 0.099 ~ 2.38 μg,  $r = 0.9997$ 。乌索酸和齐墩果酸平均回收率分别为 97.9% (RSD为 2.11%) 和 98.6% (RSD为 1.84%)。结论 本法可同时测定乌索酸和齐墩果酸含量, 具有准确、灵敏、数据可靠的优点, 可用于陆英药材的质量控制。

基金项目: 国家“863”计划重点资助项目 (2002AA2Z3217)。

作者简介: 邹盛勤 (1970 - ), 男, 江西奉新人, 大学本科, 副教授, 从事有机化工和生物医药研究。

## Determination of ursolic acid and oleanolic acid in *Sambucus chinensis* by RP-HPLC

ZOU Sheng-qin<sup>1</sup>, LIU Chuan-an<sup>2</sup> (1. Bioengineering Research Institute, Yichun University, Yichun 336000, China; 2. School of Science, Yichun University, Yichun 336000, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To develop a new method for determination of ursolic acid and oleanolic acid in *Sambucus chinensis* Lindl. **METHODS** The Symmetry C<sub>18</sub> (3.9 × 150 mm, 5 μm) was used as analytical column with methanol-water (88:12) as mobile phase. The detection wavelength was at 220 nm. The flow rate was 0.6 mL/min and the column temperature was 25°C. **RESULTS** The calibration curve of ursolic acid was linear over the range of 0.098 ~ 2.35 μg, the correlation coefficient was 0.9999. The calibration curve of oleanolic acid was linear over the range of 0.099 ~ 2.38 μg, the correlation coefficient was 0.9997. The average recoveries of ursolic acid and oleanolic acid were 97.9% (RSD = 2.11%) and 98.6% (RSD = 1.84%), respectively. **CONCLUSION** The content of ursolic acid and oleanolic acid can be simultaneously determined by HPLC. The method is accurate, sensitive and reliable, it can be used for quality control of medicinal materials of *Sambucus chinensis* Lindl.

**KEY WORDS:** *Sambucus chinensis* Lindl.; ursolic acid; oleanolic acid; RP-HPLC; determination

中药陆英 *Sambucus chinensis* Lindl. 为忍冬科接骨木属植物,又名八棱麻、接骨木、八里麻,多年生草本,产于我国南北各地,以根、茎、叶入药,是我国民间常用草药,有活血、散瘀、止痛、利尿、消肿等作用<sup>[1]</sup>。江西宜春应用陆英及其制剂治疗肝炎取得了显著效果,随后深入进行了药化、药理的研究,从陆英中提取分离出 α-香树脂醇 (α-amyrin), β-香树脂醇 (β-amyrin), β-谷甾醇 (β-sitosterol), 齐墩果酸 (oleanolic acid) 及乌索酸 (ursolic acid) 5 种成分,证实了陆英中乌索酸(熊果酸)的含量远远高于齐墩果酸的含量,乌索酸是陆英抗肝炎的主要活性成分<sup>[2,3]</sup>。其含量测定方法未见报道,为了控制陆英药材质量,我们研究建立了 RP-HPLC 法同时测定不同采收期或不同产地陆英药材中乌索酸与齐墩果酸的含量。

### 1 仪器与试剂

#### 1.1 仪器

Waters 高效液相色谱仪:600 泵,2478 紫外可见光检测器,7725I 进样阀,柱温箱,Millennium<sup>32</sup> 色谱管理系统;FA2004N 电子分析天平(上海天平仪器厂);TG16-WS 高速离心机(湖南赛特湘仪离心机仪器有限公司);0.45 μm 微孔滤膜。

#### 1.2 试剂

甲醇为色谱纯,乙醇、盐酸、氢氧化钠为分析纯,水为重蒸馏水。乌索酸和齐墩果酸对照品由中国药品生物制品检定所提供(批号分别为 110742-200314 和 110709-200311,供含量测定用)。陆英药材于 2002 年采自江西奉新、宜丰、高安、万载及袁州区,并经江西省药物研究所张海道研究员鉴定为陆英 (*Sambucus chinensis* Lindl.)。

### 2 方法与结果

#### 2.1 溶液的配制

2.1.1 对照品溶液的配制 精确称取乌索酸对照品 19.6 mg,齐墩果酸对照品 19.8 mg,分别置于 10 mL 量瓶中,用甲

醇溶解并稀释至刻度,摇匀,制成含乌索酸 1.96 mg/mL 和齐墩果酸 1.98 mg/mL 的对照品溶液,备用。

2.1.2 样品溶液的配制 采用酸解乙醇回流法提取。分别称取干燥至恒重的陆英药材 2.0g,置于圆底烧瓶中,加入体积分数为 95% 乙醇 60 mL 及体积分数为 20% 盐酸 2 mL,水浴加热回流提取 2 h。过滤,滤液用饱和氢氧化钠溶液调 pH 值为 5,定量转移至 100 mL 量瓶中,乙醇定容,摇匀。取 2 mL 于离心机 (3000 r/min) 中离心 5 min,上清液用 0.45 μm 微孔滤膜过滤,得样品溶液。

#### 2.2 色谱条件

色谱柱为 Symmetry C<sub>18</sub> 柱 (3.9 mm × 150 mm, 5 μm, 美国 Waters 公司),流动相为甲醇-水 (88:12),流速 0.6 mL/min,检测波长为 220 nm,柱温 25°C。数据处理为外标法峰面积定量<sup>[4]</sup>。对照品 HPLC 谱图见图 1(a)。

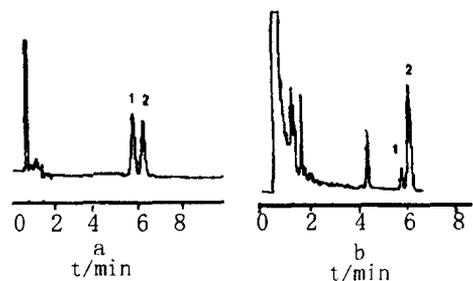


图 1 对照品和样品的 HPLC 谱图

Fig 1 HPLC chromatograms of standard and sample

a. 对照品 b. 陆英样品 1. 齐墩果酸 2. 乌索酸

a. standard b. sample 1. oleanolic acid 2. ursolic acid

#### 2.3 线性关系试验

分别吸取乌索酸和齐墩果酸对照品溶液 25, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600 μL 至 10 mL 量瓶中,用甲醇定容,摇匀,得乌索酸和齐墩果酸对照品系列混合溶液。各精密吸取

20  $\mu\text{L}$  进样,平行三次,按上述色谱条件测定峰面积。以峰面积平均值对样品进样量 ( $\mu\text{g}$ ) 进行线性回归,得乌索酸回归方程为:  $Y=4.60 \times 10^5 X+1.29 \times 10^4$ ,  $r=0.9999$ ; 齐墩果酸回归方程为:  $Y=5.17 \times 10^5 X+2.74 \times 10^4$ ,  $r=0.9997$ 。表明当乌索酸进样量在  $0.098 \sim 2.35 \mu\text{g}$ , 齐墩果酸进样量在  $0.099 \sim 2.38 \mu\text{g}$  之间时,线性关系良好。

#### 2.4 精密度试验

以同一对照品混合溶液进样,每次 20  $\mu\text{L}$ ,重复进样 5 次,分别测定峰面积数值,计算得乌索酸峰面积 RSD 为 1.30%, 齐墩果酸峰面积 RSD 为 0.92%。

#### 2.5 重现性试验

精密称取干燥至恒重的同一批陆英样品 5 份(每份 2.0 g),按“2.1.2”项下样品溶液配制方法制备,进样量为 20  $\mu\text{L}$ ,测定峰面积,计算得乌索酸峰面积 RSD 为 1.76%, 齐墩果酸峰面积 RSD 为 2.13%。

#### 2.6 回收率测定

采用加样回收法测定。精密称取已知乌索酸与齐墩果酸含量的陆英 5 份,加入乌索酸、齐墩果酸对照品适量,按“2.1.2”项下样品溶液配制方法提取处理,进样 20  $\mu\text{L}$ ,测定峰面积,用外标法计算乌索酸与齐墩果酸含量,得乌索酸的平均回收率为 97.9%, RSD 为 2.11%; 齐墩果酸的平均回收率为 98.6%, RSD 为 1.84%。结果见表 1、表 2。

表 1 陆英中乌索酸回收率测定结果

Tab 1 The experimental results of the recoveries of ursolic acid in *Sambucus chinensis* Lindl.

样品量 /g	样品中含量 /mg	对照品加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
1.007	3.47	3.53	6.95	98.6		
0.998	3.44	3.53	6.91	98.3		
1.016	3.51	3.53	6.93	96.9	97.9	2.11
1.032	3.61	3.53	7.04	97.2		
0.981	3.38	3.53	6.86	98.6		

表 2 陆英中齐墩果酸回收率测定结果

Tab 2 The experimental results of the recoverise of oleanolic acid in *Sambucus chinensis* Lindl.

样品量 /g	样品中含量 /mg	对照品加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
1.007	0.41	0.99	1.41	101.0		
0.998	0.41	0.99	1.38	98.0		
1.016	0.42	0.99	1.38	97.0	98.6	1.84
1.032	0.42	0.99	1.41	100.0		
0.981	0.40	0.99	1.36	97.0		

#### 2.7 样品测定

按 2.1.2 项下样品溶液配制方法提取处理得样品溶液,进样 20  $\mu\text{L}$  测定峰面积,用外标法计算乌索酸和齐墩果酸含量。样品 HPLC 谱图见图 1(b),不同采收期和不同产地陆英药材中乌索酸和齐墩果酸含量测定结果见表 3、表 4。

表 3 不同采收期陆英中乌索酸与齐墩果酸含量 ( $n=5$ )

Tab 3 The content of ursolic acid and oleanolic acid in *Sambucus chinensis* Lindl. in various collecting periods ( $n=5$ )

药材采收月份 (奉新)	乌索酸含量 /%	RSD /%	齐墩果酸含量 /%	RSD /%
1	0.276	0.35	0.029	1.32
3	0.297	0.82	0.034	0.92
5	0.345	1.76	0.041	2.30
7	0.326	2.10	0.038	1.76
9	0.246	1.39	0.026	2.13
11	0.262	0.68	0.031	1.42

表 4 不同产地陆英中乌索酸与齐墩果酸含量 ( $n=5$ )

Tab 4 The content of ursolic acid and oleanolic acid in *Sambucus chinensis* Lindl. in different collecting places ( $n=5$ )

药品采收地 (5月)	乌索酸含量 /%	RSD /%	齐墩果酸含量 /%	RSD /%
奉新	0.345	1.76	0.041	2.30
宜丰	0.319	0.99	0.035	1.13
高安	0.341	1.17	0.038	1.42
万载	0.323	1.28	0.029	1.15
袁州区	0.315	1.52	0.034	1.26

### 3 讨论

3.1 由于乌索酸和齐墩果酸均属五环三萜酸,且为同分异构体,两者极性几乎无差别,因此在薄层板上很难将两种成份分离开,从而难于建立薄层扫描法对其进行准确测定。而这两种天然成分在植物中往往同时共存,因此建立 HPLC 法同时测定乌索酸和齐墩果酸含量具有重要意义。

3.2 乌索酸和齐墩果酸在流动相中的最大吸收波长为 202.2 nm 和 203.4 nm,由于在短波长处溶剂甲醇也有末端吸收,故选取 220 nm 为测定波长,既能降低基线噪音,又可以保证检测器的灵敏度<sup>[5]</sup>。

3.3 在 2.0 g 陆英样品中分别加入体积分数为 95% 乙醇或甲醇 60 mL 及体积分数为 20% 盐酸 2 mL,分别回流提取 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 h,测定提取液中乌索酸和齐墩果酸含量,2.0 h 后,随回流时间的延长,提取液中乌索酸和齐墩果酸含量基本不变,表明样品中乌索酸和齐墩果酸已提取完全,乙醇和甲醇提取效率基本相同,但甲醇提取杂质峰较多,影响乌索酸和齐墩果酸的分离,故确定用乙醇回流提取 2.0 h。

3.4 从表 3、表 4 可知,同一产地 5 月、7 月份采收的陆英药材中乌索酸和齐墩果酸含量较高,与其他月份采收的样品有较大差别,5~7 月份为最佳采收期;不同产地同一采收期陆英药材中乌索酸和齐墩果酸含量基本相同。测定结果表明,不同采收期或不同产地陆英药材中的乌索酸含量均远远高于齐墩果酸含量,从而证实乌索酸是陆英中抗肝炎的主要活性成分。

3.5 采用 HPLC 法测定陆英药材中乌索酸与齐墩果酸的含量,方法简便,准确灵敏,可以作为控制陆英药材质量的方法。

#### 参考文献

[1] 江苏新医学院. 中药大词典(下册)[M]. 上海: 上海人民出版社  
中国现代应用药学杂志 2005 年 8 月第 22 卷第 4 期

社, 1977: 2456.

- [ 2 ] 陈武,熊筱娟,李开泉,等.乌索酸治疗急性病毒性肝炎的临床研究——附 102例报告 [ J].宜春医专学报, 2001, 13(1): 1.
- [ 3 ] 陈武,李开泉,熊筱娟,等.陆英抗肝炎活性成分的研究 [ J].南昌大学学报, 2001, 25( 2 ): 165.

- [ 4 ] 袁珂,董留民. HPLC法测定冬凌草中熊果酸与齐墩果酸的含量 [ J].中国实验方剂学杂志, 1998, 4( 6 ): 1.
- [ 5 ] 袁珂,李根林,李俊芝,等.车前草中熊果酸、齐墩果酸的 HPLC测定 [ J].中草药, 1999, 30(12): 901.

收稿日期: 2003-06-10