

薄层色谱法分离齐墩果酸和熊果酸

严华, 王宝琴, 鲁静

(中国药品生物制品检定所, 北京 100050)

摘要 目的: 建立薄层色谱原位预处理-薄层色谱法鉴别药材中的齐墩果酸和熊果酸。方法: 选取中国药典 2005 年版一部收载的、以齐墩果酸或熊果酸为鉴别指标的 11 味中药材, 取供试液适量分别点于同一薄层板上, 将点样斑点首先以 1% 碘-二氯甲烷溶液进行预处理, 再以环己烷-二氯甲烷-乙酸乙酯-冰醋酸 (20: 5: 8: 0.1) 为展开剂展开, 以 10% 硫酸乙醇溶液为显色剂, 105℃ 加热显色, 日光检视。结果: 此方法可同时检出药材中含有齐墩果酸和熊果酸的情况, 齐墩果酸和熊果酸 R_f 值分别为 0.54 和 0.38。结论: 本方法适用于分离鉴别药材中的齐墩果酸与熊果酸, 为质量标准的制定提供了新的思路。

关键词: 薄层原位预处理-薄层色谱法; 齐墩果酸; 熊果酸; 鉴别

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2009)12-2168-03

TLC separation of oleanolic and ursolic acids

YAN Hua WANG Bao-qin LU Jing

(National Institute for the Control of Pharmaceutical and Biological Products Beijing 100050 China)

Abstract Objectives Create an in-situ pretreatment TLC method to separate oleanolic acid and ursolic acid in Chinese material medicas collected in ChP 2005, which use oleanolic acid or ursolic acid as an indicator to test. **Method** The samples were treated directly on the chromatographic plate by 1% iodine solution in methylene dichloride and developed with the mobile phase consisting of cyclohexane-methylene dichloride-ethyl acetate-glacial acetic acid (20: 5: 8: 0.1). The plates were sprayed with 10% ethanol solution of sulfuric acid and heated to 105℃ for 5 min. **Results** Oleanolic acid and ursolic acid were detected in the Chinese material medicas that contain them. The R_f of Oleanolic acid and ursolic acid were 0.54 and 0.38 and they were effectively separated. **Conclusion** The results were found to be satisfactory. The method can be used to identify oleanolic acid and ursolic acid in Chinese material medicas simultaneously.

Key words oleanolic acid; ursolic acid; in situ pretreatment; TLCS

齐墩果酸和熊果酸为一对物理、化学性质极为相近的同分异构体, 常同时存在于某些常用药材中。笔者总结有关含齐墩果酸、熊果酸的药材的大量文献时发现, 一些药材既有报道测定齐墩果酸的, 也有报道测定熊果酸的, 因未对分离的成分进行结构确证, 所以测定的是否是同一个成分不得而知。一些药材采用高效液相色谱法、气相色谱法等可分离并同时测定药材中的齐墩果酸和熊果酸的含量, 结果较为可靠。中国药典 2005 年版一部 (以下简称药典) 收载的以齐墩果酸或熊果酸为检验指标的药材中, 有些已有文献报道同时含有单一成分齐墩果酸与熊果酸两种成分, 如药典规定以齐墩果酸为检测指标的大枣^[1]、女贞子^[2, 3], 以熊果酸为检测指标的

连钱草^[4, 5]、马鞭草^[6, 7]、山茱萸^[8, 9]、山楂^[10, 11]、夏枯草^[12]等, 均有报道同时含有 2 种成分。

薄层色谱法具有简便、易行、专属、灵敏等特点, 但对中药中齐墩果酸和熊果酸这对同分异构体的分离则极为困难, 目前尚未有采用薄层色谱法同时鉴别药材中齐墩果酸和熊果酸的文献报道。本文建立了薄层原位预处理-TLC 法同时鉴别药材中齐墩果酸和熊果酸的方法, 选择中国药典一部中收载的 11 个以齐墩果酸或熊果酸为检验指标的药材进行了薄层鉴别, 结果表明, 这些药材中凡文献报道含 2 个成分的药材均可采用此方法进行鉴别。

1 仪器与试剂

CAMAG ATS-IV 全自动薄层点样仪; CAMAG

Reporter II薄层成像系统; WinCAT工作软件; 双槽薄层展开缸。对照品齐墩果酸(批号: 110709-200505)、熊果酸(批号: 110742-200519)和对照药材川木通(批号: 121409-200401)、大枣(批号: 121040-200304)、女贞子(批号: 121041-200302)、槲寄生(批号: 121038-200403)、连钱草(批号: 121386-200401)、牛膝(批号: 121066-200504)、马鞭草(批号: 121002-200202)、山茱萸(批号: 121495-200702)、山楂(批号: 121138-200704)、夏枯草(批号: 120993-200604)均由中国药品生物制品检定所提供; 珠子参购于云南, 由本所中药标本馆过立农老师作基原鉴定; 碘为化学纯, 其余试剂为分析纯; HPLC硅胶 G薄层预制板(20 cm × 10 cm), 德国 MACHERY-NAGEL。

2 方法与结果

2.1 混合对照品溶液的制备 分别取齐墩果酸对照品、熊果酸对照品适量, 加无水乙醇溶解, 制成每 1 mL 各含 1 mg 的溶液, 作为对照品溶液, 另分别吸取齐墩果酸和熊果酸对照品溶液, 按 (1:1) 比例混

合, 制成每 1 mL 各含 0.4 mg 的混合溶液, 即得。

2.2 供试品溶液的制备 取大枣药材粗粉 2.0 g 置具塞锥形瓶中, 加入乙醇 30 mL, 超声 (50 Hz 300 W) 提取 30 min, 过滤, 药渣加入乙醇, 同法重复提取 1 次, 合并提取液, 蒸干, 残渣加无水乙醇 2 mL 使溶解, 转移至 2 mL 离心管中, 于 5000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 取上清液作为大枣供试液。另取女贞子等 10 个药材粉末各 2.0 g 同法制备药材供试液。

2.3 薄层原位预处理及薄层条件 吸取齐墩果酸对照品溶液 4 μL, 熊果酸对照品溶液 2 μL, 齐墩果酸和熊果酸混合对照品溶液 5 μL, 分别吸取 11 种供试品溶液各 5~15 μL, 分别点于同一硅胶 G 薄层板上。将薄层板点样的一端浸入 1% 碘-二氯甲烷溶液长约 12~15 mm, 使溶液浸过迅速取出, 立即覆以一玻璃板, 30 min 后取下玻璃板, 热风吹 2~3 min, 挥去薄层板上残留的溶液。以环己烷-三氯甲烷-乙酸乙酯-冰醋酸 (20:5:8:0.1) 为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 喷以 10% 硫酸乙醇溶液, 于 105 °C 加热至斑点显色清晰, 日光检视, 见图 1。

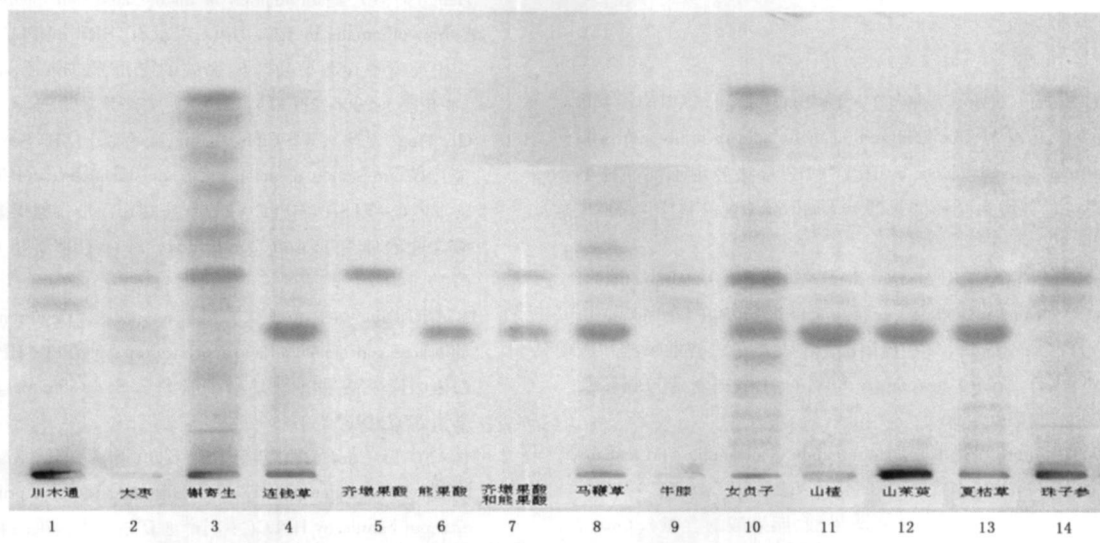


图 1 11 种药材 TLC 图谱

Fig 1 TLC Chromatogram of Chinese traditional material

1. 川木通 (Caulis clematidis armandii) 2. 大枣 (Fructus jujubae) 3. 槲寄生 (Herba visci) 4. 连钱草 (Herba glehnmiae) 5. 齐墩果酸 (oleanolic acid) 6. 熊果酸 (ursolic acid) 7. 齐墩果酸与熊果酸 (oleanolic acid and ursolic acid) 8. 马鞭草 (Herba verbenae) 9. 牛膝 (Radix achyranthis bidentatae) 10. 女贞子 (Fructus ligustri lucidi) 11. 山楂 (Fructus crataegi) 12. 山茱萸 (Fructus corni) 13. 夏枯草 (Spica prunellae) 14. 珠子参 (Rhizoma panacis majoris)

3 讨论

3.1 中国药典在各药材项下对药材供试液的制备方法有不同的规定, 采用的提取溶剂有甲醇、乙醇、乙酸乙酯、正丁醇、乙醚等, 提取方法有超声或回流, 还有采用药材水提取液加正丁醇萃取的方法, 笔者在归纳文献报道测定药材中齐墩果酸、熊果酸的提

取方法后, 采用同一方法, 即乙醇超声提取, 结果各药材中含有的齐墩果酸或熊果酸的情况均可在 TLC 色谱上检出。

3.2 由 TLC 图谱可见, 川木通、槲寄生、牛膝、珠子参, 4 个药材中仅检出齐墩果酸, 这 4 个药材尚未有文献报道含有熊果酸; 大枣、女贞子、连钱草、马鞭

草、山茱萸、山楂、夏枯草 7 个药材中均同时检出齐墩果酸和熊果酸,此结果也与文献报道的、含有 2 种成分的情况一致。

3.3 中国药典规定以齐墩果酸为单一指标检测的药材,从薄层色谱齐墩果酸斑点的大小、颜色上可见齐墩果酸的含量高于熊果酸,以熊果酸为单一检测指标的药材中,熊果酸的含量高于齐墩果酸。

3.4 随着化学分离检测技术手段的日新月异,人们对齐墩果酸、熊果酸在药材中的分布有了新的认识,本方法对我国传统中药的检测具有重要意义,使长久以来困扰中药检测中难以对齐墩果酸和熊果酸这对同分异构体作出确定的问题得到了解决。由此为进一步建立药材中检测指标的问题奠定了科学的基础。

3.5 本方法不仅适用于药材中齐墩果酸、熊果酸的检测,对一些含有 2 种成分的中药成方制剂中亦适用,如二至丸、山楂化滞丸等,并建议应对此类药材质量标准做进一步的研究,使中药质量标准更加完善。

参考文献

- 1 WANG Xiang-hong(王向红), CUI Tong(崔同), QI Xiao-jun(齐小菊), *et al* Ursolic acid and oleanolic acid in jujube and wild jujube from different places by HPLC (HPLC 法测定不同品种枣及酸枣中的齐墩果酸和熊果酸). *Food Sci* (食品科学), 2002, 23(5): 137
- 2 ZHOU Jing(周静), LIU Yuan-sheng(刘垣升). Determination of content of oleanolic acid and ursolic acid in Fructus Ligustri lucidi by gas chromatography(气相色谱法测定女贞子中齐墩果酸和熊果酸的含量). *Chin J New Drugs Clin Res* (中国新药与临床杂志), 2003, 22(10): 596
- 3 JIANG Tie-jun(江铁军). Determination of oleanolic acid and ursolic acid in Fructus ligustris lucidi by RP-HPLC (SPE-RP-HPLC 法测定女贞子药材中齐墩果酸、熊果酸的含量). *Chin J Guangdong Coll Pharm* (广东药学院学报), 2007, 23(5): 513
- 4 WANG Qing(王庆), DUAN Jin-ao(段金傲), QIAN Da-wei(钱大玮), *et al* Analysis and evaluation of triterpenic acid and anthoxanthin contents in Cat's-foot grown in different areas(不同产

地连钱草中三萜酸类及黄酮类成分的分析与评价). *Acta Univ Med Nanjing* (南京中医药大学学报), 2006(1): 44

- 5 ZHANG Qian-jun(张前军), YANG Xiao-sheng(杨小生), ZHU Hai-yan(朱海燕), *et al* Chemical constituents of glehnia longituba(连钱草化学成分研究). *Nat Prod Res Devel* (天然产物研究与开发), 2006, (18)1: 55
- 6 XU Shan(徐珊), DENG Xu-kun(邓旭坤), CHEN Bin(陈斌), *et al* Determination of oleanolic acid and ursolic acid in verbena officinalis L. using RP-HPLC(马鞭草药材中齐墩果酸、熊果酸的 RP-HPLC 测定). *Acta Univ Med Nanjing* (南京医科大学学报)(自然科学版), 2006, 26(3): 165
- 7 XIE Wan-bin(谢晚彬), ZOU Sheng-qin(邹盛勤), CHEN Wu(陈武). Determination of ursolic acid and oleanolic acid in Verbena officinalis L. by RP-HPLC(反相高效液相色谱法同时测定马鞭草中乌索酸和齐墩果酸的含量). *Lishizhen Med Materia Med Res* (时珍国医国药), 2008, 19(5): 1061
- 8 WANG Rui(王瑞), WANG Shu-mei(王淑美), LIANG Sheng-wang(梁生旺), *et al* Separation and determination of oleanolic acid and ursolic acid from comus officinalis by capillary electrophoresis 胶束电动毛细管色谱法分离分析山茱萸中齐墩果酸和熊果酸). *J Chin Med Mater* (中药材), 2007, 30(8): 946
- 9 ZHANG Yong-xi(赵永席), MA Guo-ying(马国营), LIANG Heng(梁恒). Determination of ursolic acid and oleanolic acid in Comus officinalis by RP-HPLC-ELSD (RP-HPLC-ELSD 测定山茱萸中齐墩果酸与熊果酸的含量). *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 2005, 27(11): 1314
- 10 XIE Ying(谢颖), WU Chun-hong(吴春红), XIE Bao-jin(谢宝金). Determination of ursolic acid and oleanolic acid in Hawthorn by HPLC-ELSD (HPLC-ELSD 法测定山楂中熊果酸和齐墩果酸含量的研究). *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2004, 35(12): 1407
- 11 HUANG Qiu-mei(黄秋妹), LI Zong(李宗). Determination of ursolic acid and oleanolic acid in Hawthorn by HPLC (HPLC 法测定山楂中熊果酸和齐墩果酸的含量). *Straits Pharm J* (海峡药学), 2007, 19(3): 43
- 12 HUANG Li-xia(黄丽霞), CHEN Yan(陈彦), JIA Xiao-bin(贾晓斌), *et al* Determination of Ursolic acid in spica prunellae from different habitat by HPLC(不同产地夏枯草中熊果酸和齐墩果酸的含量比较). *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 2008, 30(9): 256

(本文于 2009 年 5 月 13 日收到)