

UPLC 法同时测定冬凌草中 5 种有效成分的含量

张静^{1,2}, 袁珂^{1*}, 金永春¹, 刘颖坤¹

(1. 浙江农林大学, 亚热带森林培育国家重点实验室培育基地, 临安 311300; 2. 河南中医学院药学院, 郑州 450008)

摘要 目的: 建立超高效液相色谱法同时测定冬凌草药材中冬凌草甲素、冬凌草乙素、迷迭香酸、齐墩果酸和熊果酸 5 个主要有效成分的含量。方法: 采用 WATERS UPLC 色谱系统, ACQUITY BEH Shield RP₁₈ 色谱柱(2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm); 流动相为 0.1% 甲酸甲醇溶液(A) - 0.1% 甲酸水溶液(B) 梯度洗脱(0 ~ 9 min, 70% A → 57% A; 9 ~ 10 min, 57% A → 48% A; 10 ~ 11 min, 48% A → 48% A; 11 ~ 14 min, 48% A → 14% A; 14 ~ 22 min, 14% A → 14% A) 流速 0.2 mL · min⁻¹; 检测波长为 250 nm (0 ~ 12.40 min 测定冬凌草甲素、冬凌草乙素和迷迭香酸) 和 210 nm (12.41 ~ 22.00 min 测定齐墩果酸和熊果酸); 柱温 23 °C。结果: 本方法可在 22 min 内完成 5 个成分的色谱分析, 且各成分色谱峰之间具有良好的分离度; 冬凌草甲素、冬凌草乙素、迷迭香酸、齐墩果酸和熊果酸的线性范围分别为 0.110 ~ 0.990 μg ($r=0.9997$)、0.012 ~ 0.108 μg ($r=0.9991$)、0.030 ~ 0.270 μg ($r=0.9993$)、0.011 ~ 0.099 μg ($r=0.9991$)、0.011 ~ 0.099 μg ($r=0.9996$); 平均加样回收率($n=9$) 分别为 100.9%、95.4%、102.1%、97.1%、99.0%。结论: 所建立的超高效液相色谱法简便快速, 结果准确可靠, 重复性好, 可用于冬凌草药材的质量控制与评价。

关键词: 超高效液相色谱法; 冬凌草; 冬凌草甲素; 冬凌草乙素; 迷迭香酸; 齐墩果酸; 熊果酸

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793(2011)04-0641-04

UPLC simultaneous determination of five effective constituents in *Rabdosia rubescens*ZHANG Jing^{1,2}, YUAN Ke^{*}, JIN Yong-chun¹, LIU Ying-kun¹

(1. The Nurturing Station for the State Key Laboratory of Subtropical Silviculture Zhejiang Agriculture and Forestry University, Lin'an 311300, China;

2. College of Pharmacy, Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China)

Abstract Objective: To establish a UPLC method for simultaneous determination of five effective constituents (oridonin, ponacidin, rosmarinic acid, oleanolic acid and ursolic acid) in different parts of *Rabdosia rubescens* from various sources. **Methods:** Five effective constituents were simultaneously determined by UPLC with ACQUITY BEH Shield RP₁₈ column (2.1 mm 100 mm, 1.7 μm) by gradient elution (0 - 9 min, 70% A → 57% A; 9 - 10 min, 57% A → 48% A; 10 - 11 min, 48% A → 48% A; 11 - 14 min, 48% A → 14% A; 14 - 22 min, 14% A → 14% A) using 0.1% methanoic acid in methanol (A) and 0.1% methanoic acid (B) as the mobile phase at the flow rate of 0.2 mL · min⁻¹; The detection wavelength was 250 nm (0 - 12.40 min) for oridonin, ponacidin, rosmarinic acid and 210 nm (12.41 - 22 min) for oleanolic acid and ursolic acid with column temperature at 23 °C. **Results:** Five effective constituents were separated clearly and respectively in 22 min, the linear ranges of oridonin, ponacidin, rosmarinic acid, oleanolic acid and ursolic acid was 0.110 - 0.990 μg ($r=0.9997$), 0.012 - 0.108 μg ($r=0.9991$), 0.030 - 0.270 μg ($r=0.9993$), 0.011 - 0.099 μg ($r=0.9991$), 0.011 - 0.099 μg ($r=0.9996$), respectively; The average recoveries ($n=9$) were 100.9%, 95.4%, 102.1%, 97.1%, 99.0%, respectively. **Conclusion:** The method is simple, accurate and can be used for quality control and evaluation of *Rabdosia rubescens*.

Key words: UPLC; *Rabdosia rubescens*; oridonin; ponacidin; rosmarinic acid; oleanolic acid; ursolic acid

冬凌草 *Rabdosia rubescens* (Hemsl.) Hara 为唇形科香茶菜属植物, 主要分布在黄河流域及其以南

广大地区。生于山坡路旁、林中及草地上, 在河南、安徽、江苏等省资源极其丰富。有关资料表明^[1,2],

* 通讯作者 Tel: (0571) 63743607; E-mail: yuan_ke001@163.com

冬凌草具有清热解毒、抗菌消炎、消肿止痛、抗肿瘤等作用,临床上主要用于治疗急、慢性咽喉炎、扁桃体炎等症。冬凌草化学成分复杂,含有从单萜、倍半萜到二萜、三萜等一系列萜类物质。冬凌草甲素与乙素^[3,4]是从冬凌草中提出的四环二萜类抗肿瘤成分,实验证明,冬凌草甲素具有明显的抗肿瘤活性,临床上多用于肝癌、食管癌及胰腺癌的治疗,并取得了一定疗效;冬凌草乙素也具有一定的抗肿瘤作用;迷迭香酸具有较好的抗菌、消炎、止痛的功效^[5];齐墩果酸和熊果酸也具有一定的抗肿瘤、抗炎、抗 HIV 等药理作用^[6,7]。

冬凌草以其丰富的资源优势,良好的药理活性已经成为目前常用的中草药,是具有广阔开发前景的药用资源。有关冬凌草中有效成分含量测定的报道,目前仅限于一两种成分的同时测定。本文建立了超高效液相色谱(UPLC)法含量测定方法,并对采自不同产地、不同部位的冬凌草中冬凌草甲素、冬凌草乙素、迷迭香酸、齐墩果酸和熊果酸 5 个有效成分进行了同时测定与分析,为更客观有效地控制及评价冬凌草药材的质量提供了参考依据。

1 仪器与试剂

ACQUITY UPLC 超高效液相色谱仪系统(美国 Waters 公司),配备二元溶剂管理器、自动进样器、PDA 二极管阵列检测器、二元高压泵,Masslynx V4.1 色谱工作站;Millipore Simplicity 型超纯水器(美国 Millipore 公司),AUTO SCIENCE 溶剂过滤装置,舒美 KQ2200DE 数控超声仪。

对照品冬凌草甲素、冬凌草乙素、迷迭香酸由本实验室分离制备(通过 IR、¹H NMR 和 ¹³C NMR、MS 测定,且通过峰面积归一化法标定纯度分别为 98.66%、98.32%、99.12%);齐墩果酸(批号 110709-200505)和熊果酸(批号 110742-200314)购自中国药品生物制品检定所;甲醇为色谱纯;水为超纯水;其他试剂均为分析纯。

冬凌草药材分别于 2008 年 6 月采自河南省济源太行山区和南阳伏牛山区,经浙江农林大学楼灿焕教授鉴定为唇形科植物冬凌草的全草,药材经 40℃ 干燥,粉碎,过 60 目筛备用。

2 方法和结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 混合对照品溶液 精密称取对照品冬凌草甲素、冬凌草乙素、迷迭香酸、齐墩果酸和熊果酸适量,用甲醇配制成浓度分别为 1.10 mg·mL⁻¹、0.12 mg·mL⁻¹、0.30 mg·mL⁻¹、0.11 mg·mL⁻¹、0.11

mg·mL⁻¹的对照品储备液;分别精密量取上述 5 种对照品储备液各 1 mL,置于同一 10 mL 量瓶中,并用甲醇定容,即得。

2.1.2 供试品溶液 精密称取干燥恒重并过 60 目筛的冬凌草药材粉末 2.0 g,置索氏提取器中,加 100 mL 甲醇提取至近无色(10 h)。滤过,将滤液减压浓缩至干,用适量石油醚浸泡脱色,挥干石油醚后,残渣用甲醇溶解,定容至 25 mL 量瓶中,用 0.45 μm 微孔滤膜过滤,即得。

2.2 色谱条件及系统适用性试验 色谱柱: ACQUITY BEH Shield RP18 色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.7 μm);流动相: 0.1% 的甲酸甲醇溶液(A) - 0.1% 的甲酸水溶液(B) 梯度洗脱(0~9 min, 70% A→57% A; 9~10 min, 57% A→48% A; 10~11 min, 48% A→48% A; 11~14 min, 48% A→14% A; 14~22 min, 14% A→14% A);流速: 0.2 mL·min⁻¹;检测波长: DAD 多波长检测 250 nm(0~12.40 min, 测定冬凌草甲素、冬凌草乙素和迷迭香酸)和 210 nm(12.41~22 min, 测定齐墩果酸和熊果酸);柱温 23℃。进样量: 1 μL。在上述色谱条件下,各相邻色谱峰之间的分离度均大于 1.5,拖尾因子在 0.95~1.05 之间;理论塔板数均大于 30000,满足定量要求。色谱图见图 1。

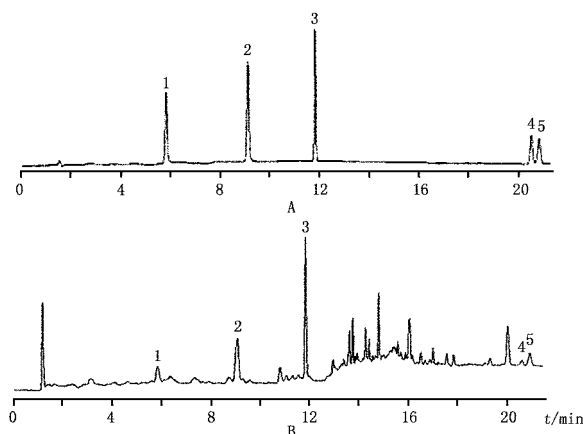


图 1 对照品(A)及样品(B)的色谱图

Fig 1 Chromatograms of reference substances(A) and sample(B)

1. 冬凌草乙素(ponicidin) 2. 迷迭香酸(rosmarinic acid) 3. 冬凌草甲素(oridonin) 4. 齐墩果酸(oleanolic acid) 5. 熊果酸(ursolic acid)

2.3 线性范围、最低定量限和检测限 依次精密量取“2.1.1”项下的混合对照品溶液 1, 3, 5, 7, 9 μL, 分别按照“2.2”项下的色谱条件进样测定各成分的峰面积积分值。以进样量(μg)为横坐标,峰面积积分值为纵坐标绘制标准曲线,冬凌草甲素、冬凌草乙素、迷

迭香酸、齐墩果酸和熊果酸的线性回归方程及相关系数见表1。5个有效成分的线性关系良好。将“2.1.1”项下的混合对照品溶液用甲醇逐级稀释后,以3倍噪

音($S/N \geq 3$)计算检测限(LOD),以10倍噪音($S/N \geq 10$)计算最小定量限(LOQ),结果见表1。

表1 5个成分标准曲线测定结果及检测限和定量限

Tab 1 Regression data, limit of detection and limit of quantification of five components

成分 (components)	回归方程 (regression equation)	r	线性范围 (linear range) / μg	LOD /ng	LOQ /ng
冬凌草甲素(oridonin)	$Y = 4.00 \times 10^6 X - 2.82 \times 10^4$	0.9997	0.110 ~ 0.990	0.4	0.8
冬凌草乙素(ponacidin)	$Y = 6.37 \times 10^6 X - 4.67 \times 10^4$	0.9991	0.012 ~ 0.108	0.3	0.6
迷迭香酸(rosmarinic acid)	$Y = 6.25 \times 10^6 X - 7.83 \times 10^4$	0.9993	0.030 ~ 0.270	0.3	0.6
齐墩果酸(oleanolic acid)	$Y = 1.96 \times 10^6 X - 1.85 \times 10^4$	0.9991	0.011 ~ 0.099	0.6	1.2
熊果酸(ursolic acid)	$Y = 1.33 \times 10^6 X + 4.18 \times 10^4$	0.9996	0.011 ~ 0.099	0.5	1.0

2.4 精密度的试验 取“2.1.1”项下的混合对照品溶液,按照“2.2”项下的色谱条件,连续进样6次,分别记录5种化合物的峰面积,计算得冬凌草甲素、冬凌草乙素、迷迭香酸、齐墩果酸和熊果酸的RSD分别为1.8%、0.8%、1.0%、1.7%、1.4%,说明精密密度良好。

2.5 重复性试验 分别精密称定同一产地的冬凌草药材粉末约2.0 g 6份,按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,照“2.2”项下的色谱条件进样分析,求得冬凌草甲素、冬凌草乙素、迷迭香酸、齐墩果酸和熊果酸含量平均值分别为0.313%、0.054%、0.135%、0.039%、0.051%; RSD分别为1.9%、1.2%、1.0%、1.6%、1.2%。

2.6 稳定性试验 取“2.1.2”项下的同一供试品溶液,室温放置,分别于0、5、10、15、20、24 h,照“2.2”项下的色谱条件进样分析,求得冬凌草甲素、冬凌草乙素、迷迭香酸、齐墩果酸和熊果酸峰面积的RSD分别为0.2%、0.8%、0.3%、1.1%、0.8%。结果表明供试品溶液在24 h内稳定。

2.7 加样回收率 精密称取已测知含量的南阳产

冬凌草全草粉末9份,每3份为一组,每份约1.0 g,精密称定,分别按样品中冬凌草甲素、冬凌草乙素、迷迭香酸、齐墩果酸和熊果酸含有量的80%、100%、120%,精密加入混合对照品溶液适量,按“2.1.2”项下方法制备所需溶液,按“2.2”项下的色谱条件进样,计算回收率。结果冬凌草甲素、冬凌草乙素、迷迭香酸、齐墩果酸和熊果酸低浓度回收率($n=3$)分别为100.8%、95.0%、102.7%、96.5%、97.5%; RSD分别为2.0%、0.4%、1.4%、1.4%、2.2%。中浓度回收率($n=3$)分别为100.9%、95.3%、100.1%、95.7%、99.1%; RSD分别为1.4%、0.8%、0.6%、1.4%、1.8%。高浓度回收率($n=3$)分别为100.9%、96.0%、103.4%、99.1%、100.5%; RSD分别为1.0%、0.9%、1.6%、1.7%、1.5%。低、中、高浓度平均回收率($n=9$)分别为100.9%、95.4%、102.1%、97.1%、99.0%。

2.8 样品测定 取不同产地的冬凌草药材粉末约2.0 g,精密称定,按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.2”项下的色谱条件进样测定,用外标法计算冬凌草中5种有效成分的含量,结果见表2。

表2 不同产地不同部位冬凌草中5个成分的含量测定结果(% $n=3$)

Tab 2 Contents of 5 components in different parts of *Rabdosia rubescens* from various sources

来源 (sources)	部位 (parts)	冬凌草甲素 (oridonin)	冬凌草乙素 (ponacidin)	迷迭香酸 (rosmarinic acid)	齐墩果酸 (oleanolic acid)	熊果酸 (ursolic acid)
济源(Jiyuan)	叶(leaves)	0.603	0.097	0.270	0.071	0.097
南阳(Nanyang)	叶(leaves)	0.509	0.094	0.139	0.064	0.085
济源(Jiyuan)	茎(stems)	0.153	0.034	0.045	0.028	0.039
南阳(Nanyang)	茎(stems)	0.142	0.028	0.031	0.027	0.036
济源(Jiyuan)	全草(whole plants)	0.390	0.061	0.209	0.048	0.057
南阳(Nanyang)	全草(whole plants)	0.313	0.054	0.135	0.039	0.051

3 讨论

3.1 供试品溶液制备方法的确定 分别考察了不

同极性的提取溶剂(甲醇、乙醚)和不同的提取方法(超声法、索氏法),并对提取时间和提取溶剂的用

量进行了优化 结果发现采用 100 mL 甲醇索氏提取 10 h 冬凌草甲素、冬凌草乙素、迷迭香酸、齐墩果酸和熊果酸 5 个成分均达到较高的提取率。

3.2 检测波长的选择 由于冬凌草甲素的最大吸收波长为 240 nm, 冬凌草乙素的最大吸收波长为 232 nm, 迷迭香酸的最大吸收波长为 325 nm, 齐墩果酸与熊果酸的最大吸收波长为 210 nm, 且在上述色谱条件下冬凌草甲素、冬凌草乙素和迷迭香酸的保留时间在 13 min 之前, 齐墩果酸和熊果酸的保留时间在 20 min 之后, 因此为提高方法的灵敏度, 减少干扰 本实验设定程序变化检测波长 0 ~ 12.40 min 为 250 nm, 12.41 ~ 22 min 为 210 nm。

3.3 流动相的选择 比较了甲醇-水、甲醇-甲酸水、甲酸甲醇-甲酸水等洗脱系统, 发现流动相的弱酸性环境有助于熊果酸与齐墩果酸的分离, 且可改善峰形, 但过多的酸对分离度的提高并无影响, 0.1% 甲酸甲醇-0.1% 甲酸水(86:14) 即可使熊果酸与齐墩果酸的分离度达到 1.5 以上, 且 0.1% 甲酸甲醇-0.1% 甲酸水系统亦可使冬凌草甲素、冬凌草乙素和迷迭香酸的分离度达到 1.5 以上, 因此采用 0.1% 甲酸甲醇-0.1% 甲酸水为本试验的流动相。

3.4 流速的选择 试验中发现流速对齐墩果酸和熊果酸的分离效果影响较大。将流速分别控制在 0.1 mL · min⁻¹、0.2 mL · min⁻¹、0.3 mL · min⁻¹、0.4 mL · min⁻¹ 进行试验: 当流速在 0.2 mL · min⁻¹ 时, 熊果酸与齐墩果酸的分离效果最好, 因此选定流速为 0.2 mL · min⁻¹。

3.5 柱温的选择 试验中发现柱温对齐墩果酸和熊果酸分离效果影响较大。将柱温分别控制在 23 °C、25 °C、30 °C、35 °C 进行试验。当柱温保持在 25 °C 以上时, 调整流动相比比例和流速, 均不能达到基线分离; 调整柱温至 23 °C 时, 色谱峰的保留时间稍有后延, 但分离度达到 1.80。结果表明低柱温有利于分离, 本文选择柱温为 23 °C。

3.6 测定结果分析 本文以冬凌草甲素、冬凌草乙素、迷迭香酸、齐墩果酸和熊果酸 5 个有效成分为考察指标, 对采自河南省济源太行山区和南阳伏牛山区 2 个产地冬凌草药材的不同部位中 5 个有效成分的含量进行了考察。从测定结果可以看出, 5 个有效成分的含量存在较大的差异, 其中冬凌草甲素的

含量最高, 其次为迷迭香酸, 而冬凌草乙素、齐墩果酸与熊果酸的含量均较低; 在 2 个产地冬凌草药材的不同部位中, 叶中 5 个有效成分的含量均为最高, 茎中 5 个有效成分的含量均较低, 但齐墩果酸与熊果酸在各部位中的含量差异较小; 在 2 个产地冬凌草药材中, 济源太行山区冬凌草的有效成分含量较南阳伏牛山区冬凌草的稍高。

3.7 小结 传统的 HPLC 方法由于所用液相色谱柱效较低, 分离时间较长, 而 UPLC 的出现解决了这一技术难题, 它有着传统 HPLC 所不能比拟的超高压柱效的分离能力和分离速度, 在分离效果近似或更好的情况下, 能大大缩短样品运行的时间。本研究所建立的 UPLC 方法具有方法快速、准确、高效的特点, 可用于冬凌草药材质量控制的有效手段。

参考文献

- 1 ZHANG Tan-mu(张覃木). Recent research of *Rabdosia rubescens* on anti-tumor effect(冬凌草抗肿瘤作用的研究近况). *Chin J Oncol*(中华肿瘤杂志) 1982 4(3): 322
 - 2 JIN Zhu(金珠), ZHOU Li-li(周丽莉). Determination of oridonin and ponidicin in *Rabdosia rubescens* by HPLC(高效液相色谱法测定冬凌草中冬凌草甲素及冬凌草乙素的含量). *Lishizhen Med Mater Med Res*(时珍国医国药) 2004 15(6): 321
 - 3 YUAN Ke(袁珂), WU Chong-zhen(吴崇珍), ZHANG Xiao-ming(张晓明) et al. HPLC in quantitative determination of oridonin and ponidicin in the *Rabdosia rubescens*(高效液相色谱法同时测定冬凌草中冬凌草甲、乙素的含量). *Chin J Mod Appl Pharm*(中国现代应用药学) 2004 21(3): 213
 - 4 DAI Yi(戴一), SUN Long-ru(孙隆儒). Progress on rubescensine A and B(冬凌草甲素、乙素的研究进展). *Food Drug*(食品与药品) 2008 10(9): 72
 - 5 WU Jian-zhang(吴建章), YU Jian-ping(郁建平), ZHAO Dong-liang(赵东亮). Progress in the research on rosmarinic acid(迷迭香酸的研究进展). *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发) 2005 17(3): 383
 - 6 LIU Dan(刘丹), MENG Yan-qiu(孟艳秋), ZHAO Juan(赵娟). Recent advance in the study on derivatives of oleanolic acid and ursolic acid(齐墩果酸与熊果酸结构修饰物的药理活性和构效关系研究进展). *Chem commun*(化学通报) 2007 70(1): 14
 - 7 ZOU Sheng-qin(邹盛勤), CHEN Wu(陈武). Determination of ursolic acid and oleanolic acid in *Rabdosia rubescens* by RP-HPLC(反相高效液相色谱法测定冬凌草中乌索酸和齐墩果酸的含量). *Lishizhen Med Mater Med Res*(时珍国医国药) 2007 18(7): 1577
- (本文于 2010 年 7 月 5 日收到)