

反相高效液相色谱法同时测定车前草中熊果酸和齐墩果酸

王蓉^① 邹时英 李艳清 蒋涛

(四川理工学院材料与化学工程学院 四川省自贡市汇兴路学院街 180 号 643000)

摘要 利用超声-微波协同萃取技术从车前草中提取熊果酸与齐墩果酸, 研究建立了反相高效液相色谱法快速测定车前草中熊果酸与齐墩果酸含量的方法。采用安捷伦 C₁₈ 柱(4.6mm×250mm, 5μm) 色谱柱, 流动相为乙腈-0.5% 乙酸铵(体积比 80:20), 流速为 0.8mL/min, UV 检测波长 210nm。在该色谱条件下熊果酸与齐墩果酸能在 12min 内达到基线分离。熊果酸在 1.01—10.1μg 范围内线性关系良好, $r = 0.9995$, 平均加标回收率为 98.8%, 相对标准偏差 RSD 为 1.7% ($n = 5$); 齐墩果酸的峰面积与其质量浓度在 0.39—3.9μg 范围内呈良好的线性关系, $r = 0.9992$, 平均加标回收率为 97.9%, RSD 为 1.3% ($n = 5$)。该方法简便、快速、准确, 可用于车前草中熊果酸与齐墩果酸的含量测定。

关键词 熊果酸; 齐墩果酸; 车前草; 高效液相色谱

中图分类号: R914.1; O657.7+2

文献标识码: B

文章编号: 1004-8138(2011)04-1922-04

1 引言

车前草, 又名车前、牛舌菜、五根草、当道、鱼草等, 为车前科植物车前(*Plantago asiatica* L.) 或平车前(*Plantago depressa* Willd.) 的干燥全草^[1]。车前草主要含有熊果酸、齐墩果酸、桃叶珊瑚苷、黄酮等化学成分, 其资源丰富, 药理活性广泛, 有利水通淋、清热明目、护肝降压、降低血清胆固醇、祛痰、抗菌、抗炎、抗肿瘤等作用, 且毒副作用小, 有广阔的应用前景。现代药理研究表明^[2-4], 齐墩果酸具有抑菌、保肝、降酶、抑制血小板降低、增强免疫功能等方面的作用。熊果酸是很好的免疫增强剂, 具有较显著的免疫作用和抗致癌、诱导 F9 畸胎瘤细胞分化和抗血管生成作用, 可望成为低毒、有效的新型抗癌和抗艾滋病毒药物, 因而正日益受到众多学者的重视。齐墩果酸和熊果酸的性质接近, 分离难度大, 本文在参考前人工作^[5,6] 的基础上, 对流动相的组成和配比进行了优化, 实现了熊果酸和齐墩果酸基线分离, 建立了高效液相色谱法测定车前草中熊果酸、齐墩果酸含量的方法。

2 实验部分

2.1 主要实验仪器与试剂

Agilent 1200 系列高效液相色谱仪(美国安捷伦公司), 包括 Agilent 1200 系列在线真空脱气机、二元高压梯度泵、手动进样器、恒温柱温箱、二极管阵列检测器(DAD), Chem Station 色谱工作站; CW-2000 超声微波协同萃取仪(上海新拓微波溶样测试技术有限公司); UV-6 型紫外可见分光光度计(上海美谱达仪器有限公司); AR1140 型电子分析天平(上海奥豪斯国际有限公司); RE-2000 旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂)。

① 联系人, 手机: (0) 13778572669; E-mail: zgwangrong2008@126.com

作者简介: 王蓉(1979—), 女, 四川邛崃市人, 讲师, 硕士, 主要从事仪器分析、药物分析方面的研究工作。

收稿日期: 2010-09-23; 接受日期: 2010-11-04

熊果酸对照品(四川维克奇生物科技有限公司,批号:080403,纯度> 98%);齐墩果酸对照品(四川维克奇生物科技有限公司,批号:071214,纯度> 98%);乙酸铵(色谱纯);甲醇、乙腈为色谱纯;其余试剂均为分析纯。实验用水为高纯水。

2.2 实验方法

2.2.1 样品提取与制备

准确称取过 60 目筛后中药车前草粉末约 1.0g,置于超声微波协同萃取仪专用萃取瓶中,加入 10mL 95% 乙醇,设定微波功率为 85W,超声功率 50W,超声微波协同萃取 10min,萃取完成后用无水乙醇冲洗过滤。滤液旋转蒸发至干后,用甲醇洗涤并定容至 50mL 容量瓶中,放入冰箱冷藏。用 0.45μm 的针头过滤器过滤,取滤液作为供试品溶液。

2.2.2 对照品溶液的制备

齐墩果酸对照品的配制:准确称取齐墩果酸的标准品 7.80mg,用甲醇溶解定容至 10mL 的容量瓶中,摇匀,备用。

熊果酸对照品的配制:准确称取熊果酸的标准品 10.10mg,用甲醇溶解定容至 10mL 的容量瓶中,摇匀,备用。

2.2.3 液相色谱测定条件

色谱柱:安捷伦 C₁₈(4.6mm × 250mm, 5μm);流动相:乙腈:0.5% 乙酸铵= 80:20;流速:0.8mL/min;柱温:25℃;紫外检测波长:210nm;进样量:10μL。

3 结果与讨论

3.1 检测条件的选择

紫外光度计检测显示(见图 1),熊果酸的最大吸收波长为 206nm,齐墩果酸最大吸收波长为 204nm,据此设定液相色谱检测波长为 204、206、210、215nm,在相同的条件下取适量样品加标溶液进样分析,观察出峰情况。结果表明,检测波长在 210nm 时,得到的色谱图熊果酸和齐墩果酸的峰面积较大,并且色谱图的基线稳定,故选择 210nm 为最佳测定波长。

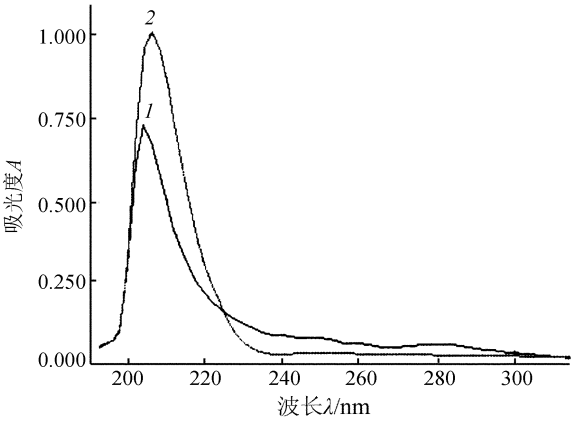


图 1 吸收曲线
1——齐墩果酸;2——熊果酸。

3.2 流动相的选择

熊果酸和齐墩果酸的性质极为相似,分离难度较大,为获得最佳分离效果,对流动相的组成和配比进行了选择。在流动相流速为 0.8mL/min,柱温 25℃条件下,考察不同配比的甲醇-水、甲醇-0.2% 磷酸水溶液、乙腈-0.5% 乙酸铵水溶液等流动相对熊果酸与齐墩果酸分离效果的影响。结果显示,乙腈-0.5% 乙酸铵的体积比为 80:20 时,熊果酸与齐墩果酸的分离效果最好,12min 内两个峰可以达到基线分离,且基线平稳,峰形对称,故确定流动相为乙腈-0.5% 乙酸铵(80:20, V/V)。标准品和样品色谱图见图 2。

3.3 校准曲线和检出限

分别准确移取熊果酸和齐墩果酸对照品溶液 0.10、0.20、0.40、0.60、0.80、1.00mL 于 1mL 的

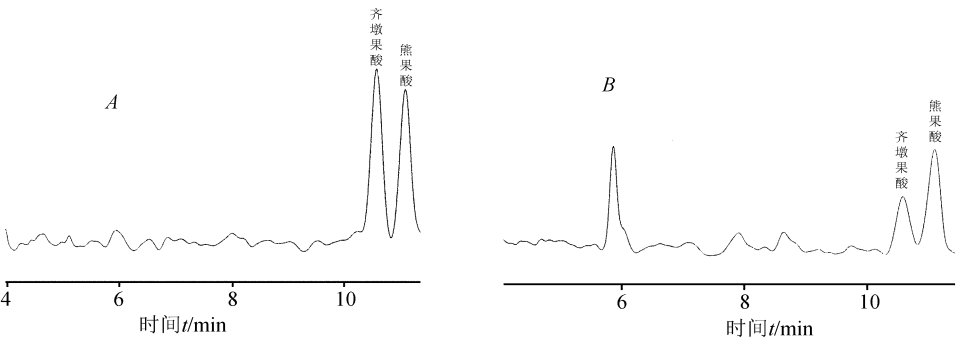


图 2 流动相为乙腈-0.5% 乙酸铵(80 : 20) 的标样和样品液相色谱图

A——标样液相色谱图; B——样品液相色谱图。

容量瓶中,用甲醇定容至 1mL。各移取 10 μ L 注入色谱仪,按上述色谱条件进行测定,以峰面积为纵坐标,对照品的进样量(μ g) 为横坐标,绘制校准曲线,得熊果酸回归方程 $y = 318.39x - 14.655$, $r = 0.9995$, 齐墩果酸的回归方程为: $y = 475.42x - 9.4875$, $r = 0.9992$ 。结果表明: 熊果酸和齐墩果酸分别在进样量 1.01—10.1 μ g 和 0.39—3.9 μ g 范围内呈良好的线性关系。根据 $S/N = 3$ 计算得熊果酸的检出限为: 0.175mg $\cdot$ L $^{-1}$, 齐墩果酸的检出限为: 0.125mg $\cdot$ L $^{-1}$ 。

3.4 重现性实验

准确称取同一批样品车前草粉末 5 份, 每份 1.0000g, 按 “2.2.1” 的实验方法制备供试品溶液, 分别吸取供试品溶液 10 μ L 注入色谱仪中测定含量, 计算方法标准偏差。结果显示, 熊果酸 RSD= 1.2% ($n = 5$), 齐墩果酸 RSD= 1.1% ($n = 5$), 方法重现性良好。

3.5 稳定性实验

取供试品溶液, 在室温下放置 0、4、8、12、24、36h, 吸取 10 μ L 注入色谱仪中测定含量, 计算方法标准偏差, 结果显示, 熊果酸 RSD= 0.16% ($n = 5$), 齐墩果酸 RSD= 0.23% ($n = 5$), 表明供试品溶液在 36h 内稳定性良好。

3.6 加标回收率实验

准确称取已知含量的过筛车前草粉末 1.0000g, 分别加入 5.0mg 的熊果酸和齐墩果酸对照品, 按样品溶液的制备方法制备供试品溶液, 吸取 10 μ L 进样分析, 计算加标回收率, 结果熊果酸平均加标回收率为 98.8%, RSD 为 1.7% ($n = 5$), 齐墩果酸的平均加标回收率为 97.9%, RSD 为 1.3% ($n = 5$)。

3.7 样品分析

分别取 3 种不同的车前草样品粉末, 按 2.2 中的样品制备与测定方法进行提取检测, 每份样品平行测定 3 次, 由回归方程计算样品中熊果酸和齐墩果酸的含量, 结果见表 1。

表 1 样品测定结果 (n= 3)

样品序号	熊果酸含量(%)	齐墩果酸含量(%)
1	3.09	1.31
2	3.38	1.45
3	2.92	1.03

4 结论

车前草中熊果酸与齐墩果酸均为三萜类化合物, 其结构、性质相似, 分离难度大。本文选用安捷

仑 C₁₈ 色谱柱, 乙腈-0.5% 乙酸铵 (80 : 20, V/V) 为流动相, 熊果酸与齐墩果酸在 12min 内达到基线分离, 且基线平稳, 峰形对称。方法用于车前草中熊果酸与齐墩果酸的测定, 回收率与精密度均满足分析要求。

参考文献

- [1] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中国药典(I 部) [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1985. 50.
- [2] 张彤, 柳淑玉, 柳晨. 车前草的药理作用及临床应用进展[J]. 时珍国医国药, 2005, 16(1): 67.
- [3] 孙燕, 袁瑞荣, 吴西居等. 齐墩果酸的促免疫作用[J]. 中国临床药理学杂志, 1988, 4(1): 26—31.
- [4] 王奇, 芦柏震. 齐墩果酸的研究进展[J]. 中国药房, 2008, 19(9): 711—712.
- [5] 顾学芳, 田澍, 黄丹. 苦丁茶中熊果酸和齐墩果酸的提取及含量测定[J]. 食品研究与开发, 2008, 29(5): 96—98.
- [6] 范成杰, 刘友平, 陈鸿平. 乌梅药材中齐墩果酸和熊果酸的高效液相色谱含量测定[J]. 时珍国医国药, 2008, 19(8): 1843—1884.

Simultaneous Determination of Ursolic Acid and Oleanolic Acid in Herba Plantaginis by RP-HPLC

WANG Rong ZOU Shi-Ying LI Yan-Qing JIANG Tao

(Department of Material and Chemical Engineering, Sichuan University of Science and Engineering,
Zigong, Sichuan 643000, P. R. China)

Abstract Ursolic acid and oleanolic acid were extracted from herba plantaginis by ultrasonic-microwave synergistic extraction technology, and a method for fast simultaneous the determination the contents of ursolic acid and oleanolic acid in herba plantaginis was established by reversed phase-high performance liquid chromatography (RP-HPLC). The Agilent C₁₈ column (4.6mm × 250mm, 5μm) was used with acetonitrile-0.5% ammonium acetate solution (80 : 20, V/V) as the mobile phase at the flow rate of 0.8mL/min, and UV detection wavelength was at 210nm. The baselines of ursolic acid and oleanolic acid separated in 12 min under these chromatographic conditions. The calibration curves of ursolic acid and oleanolic acid were linear in the range of 1.01—10.1μg ($r = 0.9995$) and 0.39—3.9μg ($r = 0.9992$), respectively. The average recoveries were 98.8% and 97.9%, and the RSD were 1.7% ($n = 5$) and 1.3% ($n = 5$), respectively. The method is simple, quick and accurate, that can be used for simultaneous the determination of the contents of oleanolic acid and ursolic acid in herba plantaginis.

Key words Ursolic Acid; Oleanolic Acid; Herba Plantaginis; HPLC

过期《光谱实验室》期刊免费赠送启事

本部尚有一些过期 (2007 及以前) 的期刊, 凡同行中有需要者均可免费赠送, 但邮费 (含包扎费和人工费) 自付, 每 6 本 (不同卷、期) 为 1 个单元, 约重 2.0—2.5kg, 收费 (可用邮票支付) 20 元。

有意者来信告知收件人姓名及详细地址, 同时将邮票放在信封中挂号寄来。

联系地址: 北京市延庆石河营东街 10 号楼 201 室 光谱实验室编辑部 何 霜, 邮政编码: 102100, 电话: (010) 52513126。

光谱实验室编辑部