

## UPLC 法同时测定冬凌草中 5 种有效成分的含量

张静<sup>1,2</sup>, 袁珂<sup>1\*</sup>, 金永春<sup>1</sup>, 刘颖坤<sup>1</sup>

(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 RP<sub>18</sub> 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<sup>-1</sup>; 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<sup>1,2</sup>, YUAN Ke<sup>\*</sup>, JIN Yong-chun<sup>1</sup>, LIU Ying-kun<sup>1</sup>

(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, ponicedin, 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 RP<sub>18</sub> 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<sup>-1</sup>; The detection wavelength was 250 nm (0-12.40 min) for oridonin, ponicedin, 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, ponicedin, 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; ponicedin; 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<sup>[1,2]</sup>,

\* 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<sup>[3,4]</sup>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<sup>[5]</sup>;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<sup>[6,7]</sup>。

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 仪器与试药

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、<sup>1</sup>H NMR 和 <sup>13</sup>C 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<sup>-1</sup>、0.12 mg·mL<sup>-1</sup>、0.30 mg·mL<sup>-1</sup>、0.11 mg·mL<sup>-1</sup>、0.11

mg·mL<sup>-1</sup>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<sup>-1</sup>;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。

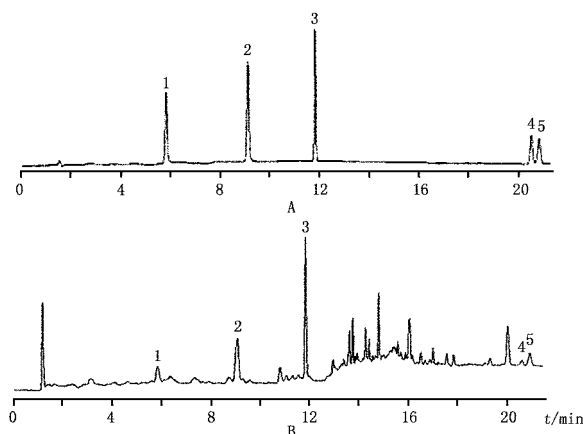


图 1 对照品(A)及样品(B)的色谱图

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<br>(components)     | 回归方程<br>(regression equation)               | $r$    | 线性范围<br>(linear range) / $\mu\text{g}$ | LOD<br>/ng | LOQ<br>/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<br>(sources) | 部位<br>(parts)     | 冬凌草甲素<br>( oridonin) | 冬凌草乙素<br>( ponacidin) | 迷迭香酸<br>( rosmarinic acid) | 齐墩果酸<br>( oleanolic acid) | 熊果酸<br>( 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<sup>-1</sup>、0.2 mL · min<sup>-1</sup>、0.3 mL · min<sup>-1</sup>、0.4 mL · min<sup>-1</sup> 进行试验:当流速在 0.2 mL · min<sup>-1</sup> 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<sup>-1</sup>。

**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)