

文章编号: 1006-2858(2007)03-0164-03

RP-HPLC法同时测定不同采收期连翘中 乌索酸和齐墩果酸的含量

邹盛勤

(宜春学院生物工程研究所,江西省天然药物活性成分研究重点实验室,江西 宜春,336000)

摘要: 目的 建立同时测定连翘中乌索酸和齐墩果酸含量的测定方法。方法 采用 HPLC 法测定其含量。色谱柱为 Nucleodur C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250.0 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-水(体积比为 88/12), 流速为 0.8 mL · min⁻¹, 检测波长为 210 nm, 柱温为 25 °C。结果 乌索酸、齐墩果酸进样量分别在 0.426 5 ~ 4.265 0 μg ($r = 0.999\ 7$) 和 0.462 4 ~ 4.624 0 μg ($r = 0.999\ 9$) 内峰面积与进样量呈良好的线性关系; 乌索酸和齐墩果酸的平均回收率分别为 99.6 % (RSD 为 0.7 %) 和 98.7 % (RSD 为 0.8 %)。结论 该方法可用于中药连翘的质量评价和控制。

关键词: 连翘; 乌索酸; 齐墩果酸; 高效液相色谱法; 含量测定

中图分类号: R 917

文献标志码: A

连翘(*Fructus Forsythiae*)为木犀科连翘属植物连翘[*Forsythia suspensa* (Thunb.) Vahl.]的干燥果实,别名旱连子、大翘子、空壳、连召、落翘,始载于《神农本草经》,性平气微香味微苦,具有清热解毒、疏散风热、消痈散结、强心利尿和降血压之功效,主产于我国东北、华北、长江流域至云南等地,是常用的大宗药材,主要含有连翘酚(forsythol)、连翘苷(phillyrin)、乌索酸(ursolic acid, UA)和齐墩果酸(oleanolic acid, OLA)等化学成分^[1-3]。现代药理研究表明,连翘具有广谱抗菌、抗病毒等作用,对丹毒、颈淋巴结结核、尿路感染、扁桃体炎、肾炎双球菌等均有抑制作用,常用于急性胃炎、呼吸道感染等病症^[4]。目前,连翘及其制剂中连翘苷、连翘酯苷的 HPLC 分析^[5-6]文献报道较多,但三萜酸类成分的定量方法未见报道。作者采用乙醇超声提取,建立 RP-HPLC 法同时测定了连翘中乌索酸和齐墩果酸(结构式见图 1)的含量,为控制连翘的内在质量提供了科学依据。

1 仪器与材料

Waters515 双泵型高效液相色谱仪、2996 光电二极管矩阵检测器、7725I 进样阀、Empower 中文色谱工作站(美国 Waters 公司), Nucleodur

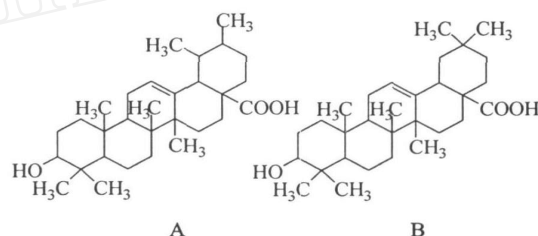


Fig. 1 The structures of ursolic acid (A) and oleanolic acid (B)

C₁₈ 色谱柱(德国 Macherey-Nagel 公司), RO-MB-10D 高纯水机(杭州永洁达膜分离设备厂), CP225D 分析天平(德国 Sartorius 公司), FW100 型高速万能粉碎机(天津市泰斯特仪器有限公司), 202-26A 型数显电热恒温干燥箱(上海阳光实验仪器有限公司), KS-1500 超声提取仪器(宁波科盛仪器厂)。

甲醇(色谱纯,上海陆忠试剂厂),水为高纯水,体积分数为 95 % 的乙醇溶液(分析纯,江西同盟试剂化工厂),乌索酸和齐墩果酸对照品(中国药品生物制品检定所提供,批号 110742-200314、110709-200304,供含量测定用),连翘[(市售,购自宜春市开心大药房,经宜春学院陈武研究员鉴定为木犀科植物连翘[*Forsythia suspensa* (Thunb.) Vahl.]的干燥果实。

收稿日期: 2006-04-04

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(汉族),江西奉新人,副教授,主要从事天然药物成分提取与分析研究, Tel. 0795-3201280, E-mail zsqycxy@sohu.com。

2 方法与结果

2.1 检测波长的确定

取乌索酸和齐墩果酸对照品混合溶液进样,在190~500 nm波长内进行光谱扫描,其最大吸收波长均为202.2 nm(图2),但由于流动相在短波长处有末端吸收,为了减少干扰,提高信噪比,提取不同波长的色谱图进行比较,选择210 nm为检测波长信噪比高,峰形好、干扰小。

2.2 色谱条件

色谱柱为Nucleodur C₁₈柱(4.6 mm × 250.0 mm, 5 μm),流动相为甲醇-水(体积比为88:12),流速为0.8 mL·min⁻¹,检测波长为210 nm,柱温为25℃,进样量20 μL。乌索酸和

果酸理论塔板数均大于10 000,分离度大于1.5,对照品混合溶液及连翘样品溶液的HPLC色谱见图3。

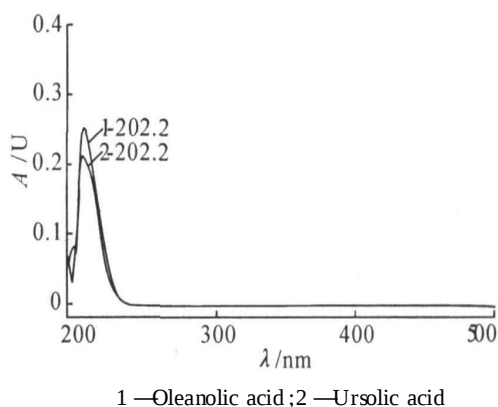


Fig. 2 UV spectrum of ursolic acid and oleanolic acid standards

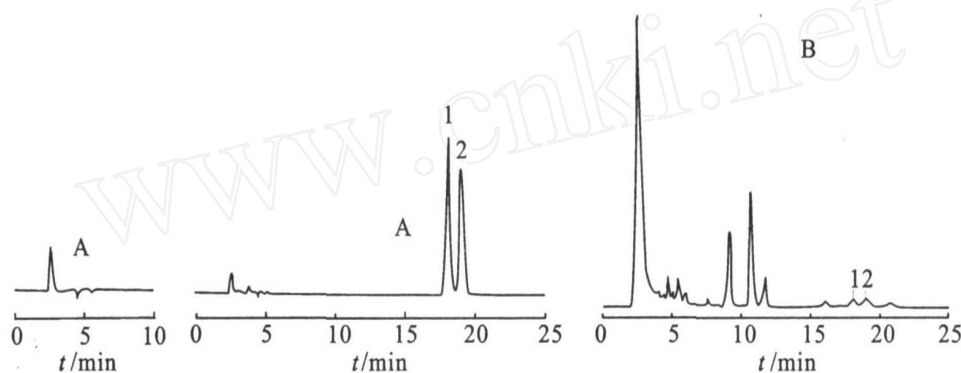


Fig. 3 HPLC chromatogram of mixed standards and sample

2.3 溶液的制备

2.3.1 对照品混合溶液的配制

精密称取干燥至恒质量的乌索酸和齐墩果酸对照品21.28 mg和23.12 mg,置100 mL容量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,配制成对照品储备溶液。精密量取上述储备溶液1.0、2.0、4.0、6.0、8.0 mL,分别置于10 mL容量瓶中,加甲稀释至刻度,摇匀,配制成对照品溶液。

2.3.2 样品溶液的配制

取连翘样品于80℃恒温干燥10 h,粉碎,精密称取约1 g,加入体积分数为95%的乙醇溶液30 mL,超声提取120 min,冷却至室温,滤过,滤渣用乙醇超声洗涤2次,合并过滤液于50 mL容量瓶,乙醇定容,摇匀,经0.45 μm微孔滤膜过滤,得样品溶液。

2.4 线性关系实验

分别将5份对照品溶液及储备溶液精密吸取20 μL进样,按“2.2”条色谱条件进样并测定峰面积。以峰面积Y/(μV·s)对进样量m(μg)进行线

性回归,乌索酸和齐墩果酸的回归方程分别为:

$$Y_{UA} = 6.252 \times 10^5 m + 1.536 \times 10^3, r = 0.9997,$$

$$Y_{OLA} = 5.314 \times 10^5 m - 2.569 \times 10^3, r = 0.9999.$$

表明乌索酸进样量在0.4265~4.2650 μg,齐墩果酸进样量在0.4624~4.6240 μg时,线性关系良好。

2.5 仪器精密度试验

精密吸取乌索酸和齐墩果酸对照品混合溶液20 μL进样,重复5次,测得乌索酸峰面积的相对标准偏差(RSD)为0.6%(n=5),齐墩果酸的峰面积RSD为0.4%(n=5),表明仪器精密度良好。

2.6 方法重复性试验

精密称取连翘样品5份,按“2.3.2”条配制样品溶液,精密吸取20 μL进样分析,测得乌索酸含量的RSD为1.2%(n=5),齐墩果酸含量的RSD为1.4%(n=5),方法重现性好。

2.7 加样回收率试验

精密称取已知乌索酸和齐墩果酸含量的连翘(青翘)药材6份,每组2份,按高、中、低3种体积

浓度分别加入 5、10、15 mL 乌索酸和齐墩果酸对照品储备溶液,制备样品溶液,进样分析,计算乌索酸和齐墩果酸平均加样回收率。回收率结果见表 1。

Table 1 Recovery experiment results of ursolic acid and oleanolic acid

Sample	$m_{\text{contained}}/\text{mg}$	$m_{\text{added}}/\text{mg}$	$m_{\text{found}}/\text{mg}$	Recovery/ %	Average/ %	RSD/ %
Ursolic acid	3.790	1.064	4.856	100.2	99.6	0.7
	3.737	1.064	4.807	100.6		
	3.663	2.128	5.789	99.9		
	3.818	2.128	5.925	99.0		
	3.615	3.192	6.769	98.8		
	3.789	3.192	6.955	99.2		
Oleanolic acid	3.228	1.156	4.379	99.6	98.7	0.8
	3.183	1.156	4.331	99.3		
	3.120	2.312	5.393	98.3		
	3.252	2.312	5.546	99.2		
	3.080	3.468	6.472	97.8		
	3.228	3.468	6.630	98.1		

2.8 样品中乌索酸和齐墩果酸含量测定

精密称取不同采收期连翘样品约 1 g,制备样品溶液。精密吸取样品溶液 20 μL ,分别进样,平行

试验 5 次,测定乌索酸和齐墩果酸峰面积,外标法计算含量质量分数,结果见表 2。

Table 2 The determined results of ursolic acid and oleanolic acid in samples

No.	Collecting period	$w(\text{ursolic acid})/\%$	RSD/ %	$w(\text{oleanolic acid})/\%$	RSD/ %
1	Qingqiao	0.385	0.7	0.330	1.1
2	Qingqiao	0.376	0.8	0.325	0.6
3	Shuqiao	0.417	1.1	0.346	1.3
4	Laoqiao	0.549	1.5	0.406	0.9

3 讨论

a. 样品提取方法的选择 原药中乌索酸和齐墩果酸的提取多采用乙醇回流法、索氏提取法,提取时间长,原料和试剂的使用量大、成本高,且溶剂易挥发污染环境。作者尝试采用超声提取法,结果表明该法对样品处理过程简单,提取率高。

b. 色谱柱选择 考察了不同型号色谱柱对乌索酸和齐墩果酸的分离效果,在甲醇-水体系为流动相时,Nucleodur C₁₈色谱柱的分离能力优于Nova-Pak C₁₈色谱柱,2 组分保留时间适中,达基线分离。

c. 不同采收期连翘中 UA 和 OLA 的含量 对不同采收期连翘中乌索酸和齐墩果酸的含量检测分析表明,老翘中 2 组分的含量明显高于青翘和熟翘,采收期对中药连翘中的乌索酸和齐墩果酸的含量影响较大。连翘中乌索酸和齐墩果酸的含量均较高,是连翘的主要活性成分,为保证药材的质量,

应在连翘完全成熟后采收老翘为最佳。

d. 含量测定方法的建立 采用 HPLC 法,以外标法同时测定连翘中乌索酸和齐墩果酸的含量,可用于连翘的质量评价和控制。

参考文献:

[1] 江苏新医学院. 中药大辞典[M]. 上海:上海人民出版社,1977:2270.
[2] 李英霞,孟庆梅. 连翘的本草考证[J]. 中药材,2002,25(6):435-437.
[3] 陈玉俊,项进,许美娟,等. 连翘化学成分的研究[J]. 中国中药杂志,1999,24(5):296.
[4] 张海燕. 连翘化学成分及药理活性的研究进展[J]. 中药材,2000,23(10):657-660.
[5] 张果,李发荣,段飞,等. 不同采收期连翘叶中连翘苷、连翘酯苷和芦丁的含量测定[J]. 天然产物研究与开发,2005,17(6):790-793.
[6] 张涛,陈学松. 连翘不同炮制品中连翘苷的 HPLC 测定[J]. 中草药,2005,36(9):1339-1340.

(下转至第 171 页)

Difference in lipid raft between lowly metastatic and highly metastatic FBJ cells

HU Dan , YAMA GATA Sadako , YAMA GATA Tatsuya

(School of Pharmaceutical Engineering, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

Abstract :Objective to investigate the difference in lipid raft between highly metastatic and lowly metastatic FBJ cells and elucidate the regulating mechanism of ganglioside GD1a on tumor metastasis. **Methods** After lipid raft fraction was extracted ,the difference of protein composition in lipid raft between cells with different metastatic ability was analyzed by SDS-PA GE and two dimensional electrophoresis ,and the difference in phosphorylation pattern between cells with different metastatic ability was analyzed by Western blotting. **Conclusions** Using the methods as above described ,we find that there are some difference between highly metastatic cell and lowly metastatic cells both in protein composition and phosphorylation pattern ,these changes maybe relate to the metastatic ability of tumor cells.

Key words :ganglioside GD1a ; FBJ osteocarcinoma ; lipid raft ; two dimensional electrophoresis

(上接第 166 页)

RP- HPLC determination of ursolic acid and oleanolic acid in various collecting period of Forsythia suspensa(Thunb.) Vahl.

ZOU Sheng-qin

(Bioengineering Research Institute of Yichun University, Key Laboratory of Province for Research on Active Ingredients in Natural Medicines, Yichun 336000, China)

Abstract : Objective To develop a method for the quantitative analysis of ursolic acid and oleanolic acid in *Forsythia suspensa* simultaneously. **Method** HPLC was carried out on the Nucleodur C₁₈ column (4.6 mm ×250.0 mm, 5 μm) at 25 °C using MeOH-H₂O (V/V = 88/12) as mobile phase with a flow rate of 0.8 μL ·min⁻¹ and detected at 210 nm. **Results** There was good liner relationship between the peak areas and the sample contents injected at the ranges of 0.426 5 ~ 4.265 0 μg (r = 0.999 7) and 0.462 4 ~ 4.624 0 μg (r = 0.999 9) for ursolic acid and oleanolic acid respectively. The average recovery rates of ursolic acid and oleanolic acid were 99.6 % (RSD 0.7 %) and 98.7 % (RSD 0.8 %), respectively. **Conclusion** The method can be used for the quality evaluation and control of *Forsythia suspensa*.

key words : *Forsythia suspensa* (Thunb.) Vahl. ; ursolic acid ; oleanolic acid ; HPLC ; content determination