

## • 药物分析 •

## 高效液相色谱法测定石见穿中齐墩果酸及熊果酸的含量

施 红(上海市闵行区吴泾医院药剂科,上海 200241)

**[摘要]** 目的 建立高效液相色谱法对中药石见穿中的熊果酸及齐墩果酸进行含量测定。方法 采用高效液相色谱法,色谱柱 Agilent HC<sub>18</sub>(4.6 mm×250 mm 5 μm),流动相 A 相为 0.1% 甲酸水溶液, B 相为甲醇, A: B = 14: 86,流速为 1.0 ml/min,柱温 20 °C,紫外检测波长 205 nm,进样量 50 μl,运行时间为 35 min。结果 熊果酸和齐墩果酸能够达到基线分离,二者分别在 11.55 ~ 462.0、5.265 ~ 210.6 μg/ml,呈良好的线性关系,日内、日间精密度的均小于 5% (n = 3),平均回收率分别为 100.47% (RSD = 1.95% n = 6)、101.88% (RSD = 2.98% n = 6)。结论 该法简便、快捷,结果准确、重复性好,可用于石见穿中熊果酸和齐墩果酸的质量控制。

**[关键词]** 石见穿;熊果酸;齐墩果酸;含量测定;高效液相色谱法

**[中图分类号]** R284 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2013)02-0134-03

**[DOI]** 10.3969/j.issn.1006-0111.2013.02.015

## Determination of ursolic acid and oleanolic acid in *Salvia chinensis* Benth by HPLC

SHI Hong( Department of Pharmacy, Shanghai Minhang Wujing Hospital, Shanghai 200401, China)

**[Abstract]** **Objective** To establish a method for determination of ursolic acid and oleanolic acid contents in *Salvia chinensis* Benth. **Methods** HPLC-DAD was used; the column was Agilent HC<sub>18</sub>(4.6 mm×250 mm 5 μm); mobile phase was A: 0.1% (v/v) formic acid solution, B: methanol, A: B = 14: 86. The flow rate was 1.0 ml/min; the temperature of column was 20 °C; the detection wavelength was set at 205 nm; the injection volume was 50 μl; the running time was 35 min. **Results** Ursolic acid and oleanolic acid were separated in baseline, the linear range was 11.55 ~ 462.0 μg/ml for ursolic acid and 5.265 ~ 210.6 μg/ml for oleanolic acid. The result of intra-day and inter-day precisions were both within 5% (n = 3), and the average recovery was 100.47% (RSD = 1.95%, n = 6) and 101.88% (RSD = 2.98%, n = 6). **Conclusion** The method was rapid, convenient, accurate, and suitable for quality control of ursolic and oleanolic acid in *Salvia chinensis* Benth.

**[Key words]** *Salvia chinensis* Benth; ursolic acid; oleanolic acid; determination; HPLC

石见穿系唇形科植物华鼠尾草(*Salvia chinensis* Benth)的干燥地上部分,亦名紫参、小丹参、月下红、石打穿、紫丹花、红参根等,广泛分布于江苏、安徽、江西、湖北、湖南、广东、广西、四川、云南等地。其味苦、辛,性平。归肝、脾经,具有清热解毒、活血理气止痛、散结消肿等功能<sup>[1-2]</sup>。文献报道石见穿中含有的化学成分为酚酸、多糖及萜类等<sup>[3-6]</sup>。其中萜类主要有齐墩果酸(oleanolic acid, OA)及熊果酸(ursolic acid, UA)。研究表明二者均具有抗癌作用<sup>[7-8]</sup>。已有文献对石见穿中的酚酸类成分进行了定量研究<sup>[9,10]</sup>。本研究针对石见穿中所含的齐墩果酸及熊果酸进行定量分析,建立该药材的质量控制方法。

### 1 仪器与试剂

**1.1 仪器** Agilent 1100 系列高效液相色谱仪(美国安捷伦),包括真空脱气机、四元泵、自动进样器、温箱和检测器;DJ-04 药材粉碎机(上海淀久,中国);METTLER AE240 型十万分之一电子天平(瑞士梅特勒);SB3200-T 超声波清洗器(上海市必能信超声有限公司)。

**1.2 试剂** 石见穿药材饮片购自雷允上大药房(批号:120305,产地:湖北;批号:120503,产地:安徽;批号:120704,产地:河南);所有药材均经第二军医大学药学院生药教研室孙连娜副教授鉴定为唇形科植物华鼠尾草 *Salvia chinensis* Benth 的干燥茎叶。对照品齐墩果酸、熊果酸购自上海斯丹德生物科技有限公司(纯度 > 98.0%)。乙醇为分析纯;甲醇为色谱纯(美国 Merck 公司),甲酸为色谱纯(美国 SIGMA 公司),水为纯化水。

### 2 方法与结果

**[作者简介]** 施 红(1977-)女,本科,药师。Tel: (021) 52216055, E-mail: shihong1977@126.com.

**2.1 液相色谱条件** 色谱柱为 Agilent HC<sub>18</sub> (4.6 mm × 250 mm 5 μm); 流动相为 甲醇:0.1% 甲酸水溶液 = 86:14; 流速为 1.0 ml/min; 柱温 20 °C; 紫外检测波长为 205 nm; 进样量 50 μl; 运行时间为 35 min。

**2.2 供试品溶液的制备** 取石见穿药材饮片, 粉碎后过 60 目筛, 取粉末约 5 g, 精密称定, 置 100 ml 锥形瓶中, 加入 60 ml 甲醇, 称重, 超声 (50 kHz, 120 W) 60 min, 放冷, 用甲醇补足重量, 摇匀, 静置, 取上清液经 0.45 μm 有机微孔滤膜过滤, 取续滤液即得供试品溶液。

**2.3 对照品储备液的制备** 精密称取熊果酸对照品 23.10 mg、齐墩果酸对照品 21.06 mg, 置 10 ml 量瓶中, 加入甲醇溶解并定容, 即得熊果酸浓度 2.310 mg/ml、齐墩果酸浓度为 2.106 mg/ml 的对照品储备液, 置冰箱 4 ~ 10 °C 保存。

**2.4 标准曲线及线性范围** 采用逐级稀释法, 精密量取熊果酸、齐墩果酸对照品溶液适量, 置于 10 ml 量瓶中, 加入甲醇定容, 配制系列浓度对照品溶液。得齐墩果酸为 5.265、26.32、52.65、105.3、210.6 μg/ml, 熊果酸为 11.55、57.75、115.5、231.0、462.0 μg/ml 的系列混合对照品溶液, 按“2.1 项”下色谱条件进样分析。以浓度为横坐标 (X), 待测物色谱峰面积为纵坐标 (Y) 进行线性回归, 得回归方程。齐墩果酸:  $Y = 28.902X + 29.185$   $r = 0.999$  线性范围 5.265 ~ 210.6 μg/ml, 熊果酸:  $Y = 26.704X + 58.861$   $r = 0.9999$  线性范围 11.55 ~ 462.0 μg/ml。

**2.5 定量限及检测限** 将齐墩果酸及熊果酸混合对照品溶液分别进行稀释, 按“2.2 项”下色谱条件进样, 以信噪比为 10:1 时, 确定其最低定量限, 齐墩果酸和熊果酸的最低定量限分别为 5.265 μg/ml 和 5.775 μg/ml; 以信噪比为 3:1 时, 确定其最低检测限, 熊果酸和齐墩果酸的最低检测限分别为 2.633 μg/ml 和 2.310 μg/ml。

**2.6 专属性及系统适应性** 取混合对照品溶液, 按“2.1 项”下色谱条件进样, 得液相色谱图, 见图 1B, 齐墩果酸保留时间为 28.9 min, 熊果酸保留时间为 30.4 min, 二者色谱分离度 > 1.5, 熊果酸的色谱峰对称性为 0.98, 齐墩果酸的色谱峰对称性为 1.0, 二者塔板数 > 10 000。以空白溶剂及石见穿药材提取液进样, 结果见图 1A 及 1C, 在空白溶剂色谱图相应保留时间未见二者色谱峰, 表明系统无干扰。

**2.7 精密度** 取混合对照品溶液, 熊果酸浓度 11.55、57.75、231.0 μg/ml 及齐墩果酸浓度 5.265、26.325、105.3 μg/ml 作为低、中、高 3 个浓度点, 按“2.1 项”下色谱条件, 1 d 内连续进样 3 次, 并连续 3

d 分别进样, 考察日间精密度, 齐墩果酸在 3 个不同浓度的日内精密度分别为 2.41%、2.01%、0.23%; 日间精密度分别为 1.42%、1.39%、0.44%; 熊果酸在 3 个不同浓度的日内精密度分别为 2.37%、3.41%、0.18%; 日间精密度分别为 0.69%、1.49%、0.48%。日内、日间精密度均小于 5%。

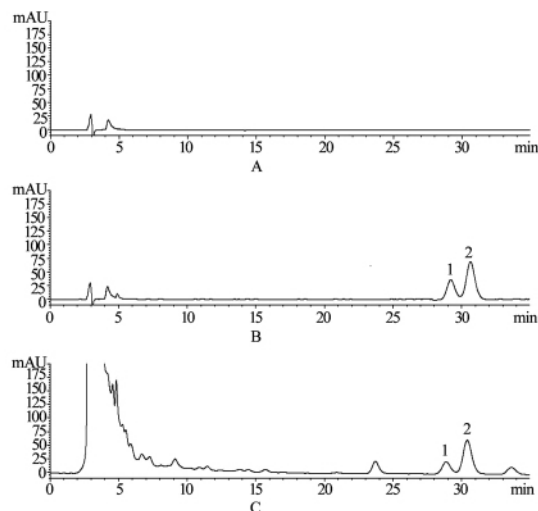


图 1 石见穿高效液相色谱图谱

A-空白溶剂, B-混合对照品, C-石见穿提取物; 1-齐墩果酸; 2-熊果酸

**2.8 重复性** 称取石见穿饮片粉末 (批号: 120503, 产地: 安徽) 约 5 g, 平行操作 6 份, 分别置 100 ml 锥形瓶中, 按“2.2 项”下制备供试品溶液, 按“2.1 项”下色谱条件进样分析, 代入标准曲线方程计算浓度。结果齐墩果酸平均浓度为 0.38 mg/g, RSD 为 1.82%, 熊果酸平均浓度为 1.22 mg/g, RSD 为 3.48%, 重复性结果 RSD 均小于 5%。

**2.9 加样回收率** 称取石见穿饮片粉末 (批号: 120503, 产地: 安徽) 约 2.5 g, 置 100 ml 锥形瓶中, 同时加入齐墩果酸对照品储备液 (2.106 mg/ml) 0.6 ml 及熊果酸对照品储备液 (2.310 mg/ml) 1.2 ml, 平行操作 6 份, 用甲醇补足 60 ml, 按“2.2 项”下提取, 制备加样回收率样品溶液, 按“2.1 项”下色谱条件进样分析, 计算加样回收率。齐墩果酸平均加样回收率为 101.88%, RSD 为 2.98%; 熊果酸加样回收率为 100.47%, RSD 为 1.95%, 回收率在 95% ~ 105% 之间。

**2.10 稳定性** 称取石见穿饮片粉末 (批号: 120503, 产地: 安徽) 约 5 g, 按“2.2 项”下制备供试品溶液, 分别于 0、1、2、4、8、16、24 h 按“2.1 项”下色谱条件进样分析, 记录峰面积。齐墩果酸峰面积 RSD 为 2.8%, 熊果酸的峰面积 RSD 为 0.84%, 结果显示供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

**2.11 样品的测定** 称取不同批号石见穿饮片粉末约5 g,每个批号平行操作3份,置100 ml锥形瓶中,按“2.2项”下制备供试品溶液,按“2.1项”下色谱条件进样分析,记录峰面积,代入标准曲线计算样品中齐墩果酸及熊果酸的浓度,并计算原药材中的含量,结果见表1。

表1 不同批号石见穿药材中齐墩果酸及熊果酸的含量测定结果

批号	产地	齐墩果酸平均含量(mg/g)	RSD (%)	熊果酸平均含量(mg/g)	RSD (%)
120503	安徽	0.40	1.13	1.20	1.61
120305	湖北	0.84	3.34	2.25	1.89
120704	河南	0.90	3.57	2.25	2.84

### 3 讨论

**3.1 检测波长的选择** 采用DAD在190~400 nm全波长扫描,结果发现熊果酸和齐墩果酸均为末端吸收,考虑到流动相中甲醇截止波长的影响,同时排除杂质对待测物的干扰,选择205 nm为检测波长,基线平稳。

**3.2 流动相的考察** 文献报道以甲醇-水系统能够很好地分离熊果酸和齐墩果酸,在流动相中加入一定比例的酸有助于改善峰型,提高分离度<sup>[11,12]</sup>。经过考察,调整有机相的比例,最后确定以0.1%甲酸水溶液:甲醇=14:86,此条件下齐墩果酸和熊果酸在35 min内实现基线分离,分离度大于1.5。

**3.3 提取方法的优化** 石见穿药材饮片粉碎后采用超声提取方法,考察提取溶剂种类(甲醇,乙醇,70%乙醇),超声时间(20,40,60 min)及溶剂体积(8,10,12倍量)对熊果酸和齐墩果酸提取结果的影响,故设计三因素三水平正交试验进行提取条件优化,见表2。实验结果表明影响熊果酸和齐墩果酸提取结果的因素主次顺序都是溶剂种类>溶剂倍数>提取时间,选择12倍量甲醇为提取溶剂,超声提取60 min。又考察了提取次数的影响,实验结果表明提取1次和2次的熊果酸、齐墩果酸含量结果近乎相同,故选择超声1次即可。

**3.4 含量测定结果** 从测定结果来看,初步发现不同产地的药材中所含的齐墩果酸及熊果酸差异较大,含量结果几乎相差2倍,对于药物疗效的发挥具有很大的影响,可见对石见穿药材的规范化种植及质量控制尤为重要。

本文建立了高效液相色谱紫外检测法测定石见穿中齐墩果酸及熊果酸含量的方法,并对该方法进

行了全面的方法学考察,通过正交试验对前处理条件进行了优化,该方法简便、快捷、结果准确、重复性好,可用于石见穿药材的质量控制。

表2 石见穿药材中提取齐墩果酸与熊果酸的影响因素正交设计的实验结果

称量(g)	提取溶剂	超声时间(min)	溶剂体积(ml)	齐墩果酸(mg/g)	熊果酸(mg/g)
5.009	甲醇	20	40	0.38	1.19
5.052	甲醇	40	50	0.35	1.14
5.042	甲醇	60	60	0.40	1.29
5.019	乙醇	20	50	0.06	0.16
5.046	乙醇	40	60	0.09	0.26
5.023	乙醇	60	40	0.09	0.25
5.001	70%乙醇	20	60	0.14	0.51
5.098	71%乙醇	40	40	0.14	0.50
5.071	72%乙醇	60	50	0.13	0.48
K <sub>1</sub>	0.37	0.19	0.20		
K <sub>2</sub>	0.08	0.19	0.18		
K <sub>3</sub>	0.14	0.21	0.21		
R	0.30	0.02	0.03		
K <sub>1</sub> '	1.21	0.62	0.65		
K <sub>2</sub> '	0.22	0.64	0.59		
K <sub>3</sub> '	0.50	0.67	0.69		
R'	0.98	0.05	0.09		

### 【参考文献】

- [1] 中国药典1977版.一部[S].1977:138.
- [2] 江苏新医学院.中药大辞典:上册[M].上海:上海科学技术出版社,1997:597.
- [3] 刘翠平,王雪松,方积年.石见穿两个酸性多糖的化学研究[J].中草药,2004,35(1):8.
- [4] 刘翠平,王雪松,方积年.石见穿多糖SC3的化学研究[J].药学学报,2007,37(3):189.
- [5] 雷涛,孟繁钦,王艳芳等.石见穿化学成分及药理研究进展[J].中国医药导报,2010,7(29):9.
- [6] 王业玲,李占林,刘涛等.石见穿化学成分的分离与鉴定[J].沈阳药科大学学报,2009,26(2):110.
- [7] 徐敬宣,薛姣,钱晓萍等.石见穿的化学成分及抗肿瘤作用研究进展[J].现代肿瘤医学,2011,19(3):587.
- [8] 夏国豪.熊果酸抗肿瘤作用研究进展[J].国外医学肿瘤学分期,2002,29(6):420.
- [9] 丁嘉信,孟琳,陈新梅等.RP-HPLC测定石见穿中丹参素的含量[J].中国现代中药,2012,14(6):7.
- [10] 刘环香,苏汉文,向梅先.石见穿药材中原儿茶酸的含量分析研究[J].时珍国医国药,2011,22(1):131.
- [11] 钟辉.不同产地白花蛇舌草中熊果酸和齐墩果酸的含量测定[J].中医药学报,2010,38(2):105.
- [12] 赵亮,王新霞,黎越丹等.高效液相色谱法测定清肝散颗粒中熊果酸及齐墩果酸的含量[J].第二军医大学学报,2012,33(11):1263.

[收稿日期]2012-11-23

[修回日期]2013-02-05