

# 反相 HPLC 测定藏药唐古特青兰植物中的齐墩果酸含量

## DETERMINATION OF OLEANOLIC ACID IN

## DRACOCEPHALUM TANGUTICUM MAXIM BY HPLC

张晓峰

(中国科学院西北高原生物研究所, 西宁, 810001)

Zhang Xiaofeng

(Northwest Plateau Institute of Biology, The Chinese Academy of Sciences,

Xining, 810001)

唐古特青兰 (*Dracocephalum tanguticum* Maxim.) 系唇形科 (Labiatae) 多年生草本植物, 产于西藏、青海、四川西部和甘肃西南部, 海拔 1900—4600 米的山地阳坡、干燥谷地、以及田边林缘均有生长, 是青藏高原特有的药用植物。在藏药中用处甚广, 有清热、止血、燥黄水之功, 主治胃炎、头晕、关节炎及疔疮。有关唐古特青兰的化学成分研究, 仅见微量元素的报道。为开发利用这一藏药资源, 从全草的甲醇提取物中分离到 8 种化学成分, 再通过光谱分析及化学方法鉴定, 获得齐墩果酸 (oleanolic acid, I)、熊果酸 (ursolic acid, II)、胡萝卜甙 (daucosterol, III)、茵芋甙 (skimmin, IV)、大波斯菊甙 (cosmosiin, V)、胡麻素 (pedalitin, VI)、胡麻甙 (pedaliin, VII)、胡麻甙-6"- 乙酸酯 (pedaliin-6"-acetate, VIII)。其中, 化合物 VI 和 VII 首次从青兰属植物中得到, 化合物 VIII 为一新的天然产物。齐墩果酸具有护肝降酶、消炎、镇静、强心、利尿、增强免疫等作用, 是降低谷丙转氨酶 (glutaminic pyruvate aminotransferase) GPT 的主要有效成分, 治疗急性黄疸性肝炎总有效率达 94.4%。

近年来国内外对各种药用植物中的齐墩果酸的分离测定方法多采用光密度计法、比色法、薄层一比色法和薄层扫描法等, 但灵敏度和准确度均较差, 为了改进测定方法, 本文采用反相高压液相色谱法, 就无需进行繁杂的样品前处理, 仅将待测样品用溶剂提取后一次即可完成, 定性定量简便, 而且具有较高的灵敏度和准确度。本方法不仅适用于测定唐古特青兰中的齐墩果酸含量, 而且同样适用于其他药用植物中的齐墩果酸的测定。

## 实验部分

### 1. 仪器和试剂

仪器 高压液相色谱仪 Waters 600E 配有 486 紫外检测器 746 电脑数据处理机

试剂 甲醇 (北京化学试剂厂 A. R), 氯仿 (西安化学试剂厂 A. R), 齐墩果酸 (中国药品生物制品检定所) 二次去离子水。

## 2. 色谱条件

色谱柱 Waters C18 (150mm×150mm) 5μm

流动相 甲醇:水 (85:15)

流速 1.0ml/min

紫外检测 215nm

灵敏度 0.010AUFS

纸速 0.25cm/min

## 3. 齐墩果酸含量与色谱峰面积的线性关系

齐墩果酸标准液配成浓度为 0.001mg/ml; 0.005mg/ml; 0.01mg/ml; 0.05mg/ml; 0.1mg/ml 的标准溶液, 分别进样 3 次, 每次 10μl, 计算峰面积的平均值, 以标准浓度与峰面积计算回归方程,  $y=14.02x-0.093$ ,  $r=0.9998$ 。结果表明含量为 0.001~0.1mg/ml, 有良好的线性关系。

## 4. 样品的制备

实验用唐古特青兰植物样品采自青海省化隆县, 物候期: 花期和果期。取其样品中的根部、茎部、叶子、花瓣和果实经磨碎, 经过筛后并准确称取各细粉样品 1.0000g 置索氏提取器中加甲醇 30ml 再加热回流 4 小时, 全部转移到 50ml 的容量瓶中, 用甲醇定容至刻度, 用 0.5μm 的有机过滤膜过滤备用。测定结果如表 1。

表 1 唐古特青兰 5 种器官部位中的齐墩果酸含量 (%)

Table 1 The content of oleanolic acid in five organ of *Dracocephalum tanguticum* Maxim. (%)

样品 Samples	根部 Root	茎 Stem	叶子 Leaf	花瓣 Petal	果实 Fruit
含量 Content	0	0.20	0.44	0.41	0.10

## 5. 精确度实验

0.05mg/ml 的浓度下进样 6 次, 计算 RSD%。测定结果见表 2。

表 2 准确度实验

Table 2 Experiments of accuracy (n=6)

进样次数	1	2	3	4	5	6
Time of injection						
峰面积						
Peak area	699537	708208	683186	717355	681955	693145
平均值 (x)						
Average			697230			
变异系数 (RSD%)						
Coefficien of variation (%)			2.01			

## 6. 回收率实验

在已知含有齐墩果酸的样品中加入标准的齐墩果酸, 按上述处理方法进行操作, 进样 4 次每次

表 3 回收率测定结果

Table 3 Determination of rate of recovery

进样次数 (NO.) Time of injection	加标量 (mg/ml) Standard added	实验值 (mg) Experiment	回收率 (%) Recovery	平均值 (%) Average
1	0.2566	0.2531	98.64	
2	0.2566	0.2499	97.39	
3	0.2566	0.2598	101.25	
4	0.2566	0.2612	101.79	99.77

7. 流动相中甲醇浓度的影响

流动相中的甲醇浓度比例大小十分重要, 实验表明最佳浓度范围为 75%~80%。因为高于 80% 时, 齐墩果酸保留时间会缩短, 与样品中的其它杂峰难以分开。低于 75% 时, 齐墩果酸保留时间会延长, 峰形变宽, 定量往往不准。

8. 样品前处理方法的比较

齐墩果酸易溶于氯仿、甲醇和乙醇等有机溶剂, 在同等条件下, 用氯仿和甲醇分别回流提取进行比较, 结果甲醇提取效率高, 方法简便易行, 样品前处理简单, 使用范围广, 对植物生药片剂及含有齐墩果酸的中药材均可检测。

关键词: 唐古特青蓝; 气相色谱

Key words: Dracocephalum tanguticum Maxim.; GC=MS

(1) 仪器与试剂 日本岛津 GC-920 气相色谱仪; 安捷动手册 (美国 Drummond T) 试剂; 甲醇; 氯仿; 正己烷; 正庚烷; 正辛烷; 正壬烷; 正癸烷; 正十一烷; 正十二烷; 正十三烷; 正十四烷; 正十五烷; 正十六烷; 正十七烷; 正十八烷; 正十九烷; 正二十烷; 正二十一烷; 正二十二烷; 正二十三烷; 正二十四烷; 正二十五烷; 正二十六烷; 正二十七烷; 正二十八烷; 正二十九烷; 正三十烷; 正三十一烷; 正三十二烷; 正三十三烷; 正三十四烷; 正三十五烷; 正三十六烷; 正三十七烷; 正三十八烷; 正三十九烷; 正四十烷; 正四十一烷; 正四十二烷; 正四十三烷; 正四十四烷; 正四十五烷; 正四十六烷; 正四十七烷; 正四十八烷; 正四十九烷; 正五十烷; 正五十一烷; 正五十二烷; 正五十三烷; 正五十四烷; 正五十五烷; 正五十六烷; 正五十七烷; 正五十八烷; 正五十九烷; 正六十烷; 正六十一烷; 正六十二烷; 正六十三烷; 正六十四烷; 正六十五烷; 正六十六烷; 正六十七烷; 正六十八烷; 正六十九烷; 正七十烷; 正七十一烷; 正七十二烷; 正七十三烷; 正七十四烷; 正七十五烷; 正七十六烷; 正七十七烷; 正七十八烷; 正七十九烷; 正八十烷; 正八十一烷; 正八十二烷; 正八十三烷; 正八十四烷; 正八十五烷; 正八十六烷; 正八十七烷; 正八十八烷; 正八十九烷; 正九十烷; 正九十一烷; 正九十二烷; 正九十三烷; 正九十四烷; 正九十五烷; 正九十六烷; 正九十七烷; 正九十八烷; 正九十九烷; 正一百烷; 正一百零一万, 正一百零二万, 正一百零三万, 正一百零四万, 正一百零五万, 正一百零六万, 正一百零七万, 正一百零八万, 正一百零九万, 正一百一十万, 正一百一十一万, 正一百一十二万, 正一百一十三万, 正一百一十四万, 正一百一十五万, 正一百一十六万, 正一百一十七万, 正一百一十八万, 正一百一十九万, 正一百二十万。