

伞房花耳草中乌索酸的分离提纯及 HPLC 分析

朱智勇, 邹盛勤, 陈武*, 李开泉

(1. 宜春学院化学与生物工程学院, 江西宜春 336000; 2. 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 采用“醇提凝析法”从伞房花耳草中分离提纯乌索酸, 并用光谱等技术对乌索酸结构进行了表征, 建立了伞房花耳草中乌索酸的分离提纯及含量测定的方法。结果表明, 此方法具有快速简便、精密度高、重现性好、线性范围宽的特点, 可用于乌索酸的质量控制。

关键词 伞房花耳草; 乌索酸; 结构表征; HPLC 分析

中图分类号 Q503 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2007)33-10567-02

Separation and HPLC Analysis of Ursolic Acid in *Hedyotis Corymbosae* Lam

ZHU Zhi-yong et al (Chemistry & Bioengineering College of Yichun University, Yichun, Jiangxi 336000)

Abstract To develop a method for extracting and analysis of ursolic acid in *Hedyotis Corymbosae* Lam, the method of ethanol extracting and agglutination separating were used to extract ursolic acid from *Hedyotis Corymbosae* Lam and the structure of ursolic acid was identified by IR, MS, NMR. HPLC was carried out on the chromatographic column of SymmetryShield RP18 (3.9 mm × 150 mm, 5 μm) at 25 °C, using methanol-water (88:12, V/V) as mobile phase with a flow of 1.0 ml/min, and detection wavelength was set at 210 nm. There was a good relationship between the peak area and the sample content injected at the range of 3.9 ~ 19.6 μg ($r = 0.9999$). The content was 99.58% by HPLC and the gain rate was 3.04%. The method was simple, accurate and had good repeatability and wider linear range, and can be used to evaluate the quality of ursolic acid.

Key words *Hedyotis Corymbosae* Lam; Ursolic acid; Structural characteristics; HPLC

伞房花耳草, 又名蛇舌草、水线草, 为茜草科耳草属植物伞房花耳草 (*Hedyotis corymbosa* Lam.) 的干燥全草^[1], 含有多三萜类化合物, 其中乌索酸 (Ursolic acid) 含量较高, 为主要活性成分。近来药理研究发现, 乌索酸具有抗肝炎、抗肿瘤、抗病毒、抗炎抑菌及增强免疫等多种药理活性, 具有重要的药用开发价值^[2]。为此, 笔者以伞房花耳草为原料, 采用“醇提凝析法”分离提纯乌索酸^[3], 并建立了 HPLC 测定分析乌索酸含量的方法。

1 材料与实验方法

1.1 实验材料 茜草科耳草属植物伞房花耳草 (*Hedyotis corymbosa* Lam.) 全草采自赣西地区宜春市奉新县, 经江西省天然药物活性成分研究重点实验室鉴定; 乙醇 (浓度 95%, 南昌利康药械实业有限公司生产); “YCX-1 号”除杂剂, 自制; 复合酶制剂 (哈尔滨神农有限公司生产); 活性炭 (分析纯, 上海豪申化学试剂有限公司生产); 乌索酸对照品 (中国药品生物制品检定所提供)。熔点用 Boettius 显微熔点测定仪测定, 温度计未经校正; 旋光度用 WZZ-1S 数字式自动旋光仪测定; 红外光谱用 PE 公司 Spectrum One 傅立叶变换红外光谱仪测定; 质谱用 Autospec-Ultima ETOF EL 型质谱仪测定; 核磁共振用 INOVA-600 型、Brucker ACF-400 型核磁共振仪测定, TMS 为内标, DMSO-d₆、CDCl₃ 为溶剂; 含量用 Waters 高效液相色谱仪测定, 515 型双泵, 2996 光电二极管矩阵检测器。

1.2 实验方法

1.2.1 乌索酸的分离提纯。 采用“醇提凝析法”分离提纯。将干燥后的伞房花耳草 10 kg 粉碎成粗粉 (20 目), 用温水湿润后, 加入原料干重 0.6% 的复合酶制剂, 于 37 °C 左右酶解处理后, 用 8 倍量 90% 的乙醇于 80 °C 回流提取 2 次, 每次 1 h, 合并提取液, 过滤, 减压回收乙醇得浸膏, 以纯水沉降洗涤后, 加“YCX-1 号”除杂剂除杂处理 2 次, 过滤, 用 95% 乙醇

溶解, 调节 pH 值, 加活性炭脱色, 过滤除杂, 再用 95% 乙醇溶解, 调 pH 值, 凝析分离、纯化精制, 于 80 °C 干燥 24 h, 得无色针状结晶乌索酸样品 30.4 g, 收率为 3.04%。

1.2.2 色谱条件。 色谱柱为 SymmetryShield RP18 柱 (3.9 mm × 150 mm, 5 μm), 检测波长 = 210 nm, 流动相为甲醇-水 (88:12), 流速为 1.0 ml/min, 柱温为 25 °C。用外标法定量分析。

1.2.3 标准曲线的测定。 精确称取乌索酸对照品 9.8 ng, 置于 10 ml 容量瓶中, 用甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 制成含乌索酸 0.98 ng/ml 的对照品溶液。分别吸取乌索酸对照品溶液 4.8、12、16 和 20 μl, 按“1.2.2”色谱条件进样, 平行测定 3 次, 求其峰面积的平均值得标准曲线。以峰面积对样品进样量 (μg) 进行线性回归, 得乌索酸回归方程为 $Y = 1.42 \times 10^5 X + 2.19 \times 10^4$, $R = 0.9999$, 表明当乌索酸进样量在 3.9 ~ 19.6 μg 时, 线性关系良好。

1.2.4 样品溶液配制。 精确称取乌索酸样品 9.6 ng, 置于 10 ml 容量瓶中, 用甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 溶液经 0.45 μm 微孔滤膜过滤后作为样品溶液。

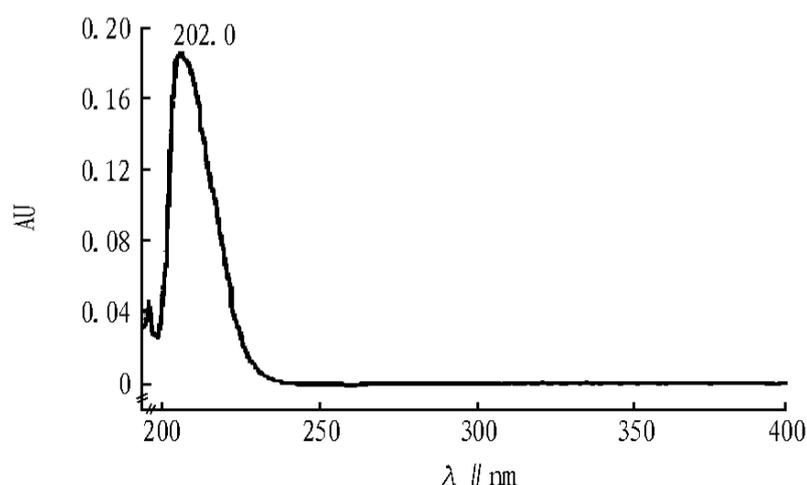


图1 乌索酸紫外光谱

2 结果与分析

2.1 样品结构鉴定 样品为无色针状结晶, 易溶于热乙醇、热甲醇, 可溶于乙醚、醋酸乙酯、乙醇、甲醇、丙酮、氯仿等有机溶剂, 不溶于石油醚和水。熔点为 285 ~ 287 °C, 与乌索酸对照品混合熔点不下降。经质谱仪测定, 波谱数据与文献 [4-5] 值一致, 确证样品为乌索酸^[6]。

基金项目 国家“863”计划重点资助项目 (2002AA2Z3217)。

作者简介 朱智勇 (1971 -), 男, 江西吉安人, 讲师, 硕士, 从事生物化工与药学研究。* 通讯作者, 教授。

鸣谢 中国海洋大学药物研究所李英霞教授在实验中提供帮助。

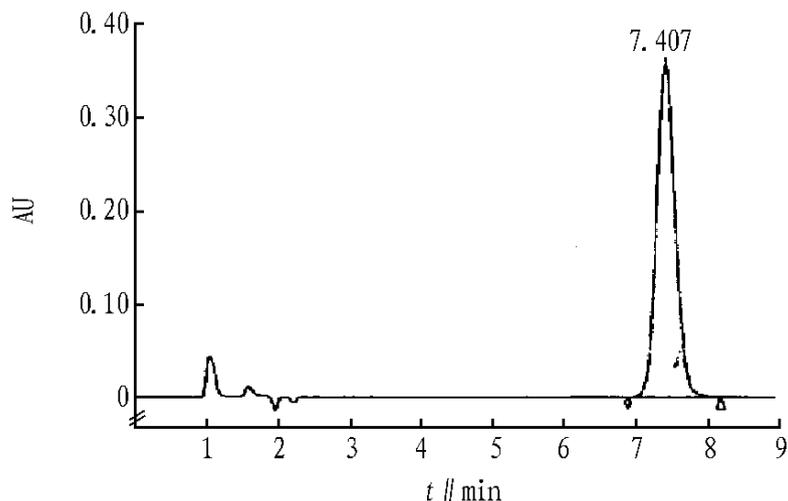
收稿日期 2007-06-26

2.2 HPLC 分析乌索酸含量

2.2.1 色谱条件的确定。采用甲醇-水(88:12)为流动相,出峰时间在7.4 min左右(柱温为25℃),分离度较好,达基线分离,同时流动相的pH值为5.4左右,符合色谱柱的要求。

2.2.2 测定波长的选择。取乌索酸对照品溶液,在190~400 nm进行光谱扫描,流动相中乌索酸最大吸收波长为202.2 nm(图1),但溶剂甲醇在短波长处均有吸收。为了减少干扰,并尽量不降低灵敏度,选择210 nm作为检测波长。

2.2.3 精密度试验。精密吸取乌索酸对照品溶液10 μl进



样,重复进样5次,测得乌索酸峰面积RSD为0.32%(n=5),表明仪器精密度良好。

2.2.4 重现性试验。精密称取同一批乌索酸样品5份,按“1.2.4”方法配制样品溶液,吸取10 μl进样分析,测得乌索酸峰面积RSD为1.12%(n=5)。方法重现性好。

2.2.5 乌索酸含量测定。吸取样品溶液10 μl进样分析,重复进样5次,样品中乌索酸的含量为99.58%。乌索酸对照品及样品HPLC色谱图见图2。

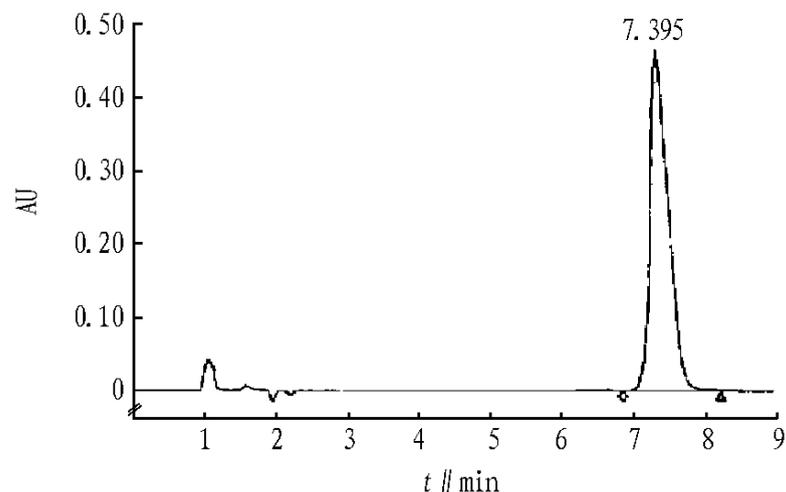


图2 乌索酸对照品及样品HPLC色谱图

3 结论

(1) 采用“醇提凝析法”从伞房花耳草中分离纯化乌索酸,仅以乙醇为溶剂,未加其他有机溶剂,采用自制的“YCX-1号”除杂剂,有效去除脂类、类脂类、酚类及叶绿素等杂质,不仅保证了产品无有害溶剂残留,提高了安全性,而且简化了操作程序,降低了生产成本,有利于乌索酸的富集和纯化,其纯度达99.58%,得率达3.04%。

(2) 该实验建立的反相高效液相色谱定量分析乌索酸含量的方法,具有快速简便、精密度高、重现性好、线性范围宽的优点,可作为控制乌索酸产品质量的方法。

参考文献

- [1] 干国平,段木盛,张义生,等.HPLC测定伞房花耳草中齐墩果酸和熊果酸的含量[J].中国药学杂志,2003,38(3):233-234.
- [2] 陈武,熊筱娟,李开泉,等.乌索酸药理作用研究[J].宜春学院学报,2003,25(4):1-4.
- [3] 李开泉,陈武,叶文峰,等.陆英中乌索酸的分离与鉴定[J].宜春学院学报,2003,25(2):1-2.
- [4] 丛浦珠.质谱学在天然有机化学中的应用[M].北京:科学出版社,1987:684-686.
- [5] 彭师奇.药物的波谱解析[M].北京:北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社,1998.
- [6] 中国海洋大学药物研究所.乌索酸的结构确证[R].分析检测报告,2003:1-3.