

doi:10.3969/j.issn.0253-2417.2015.05.022

刺玫果提取物中总三萜酸的定性定量分析研究



ZHONG Fang-li

钟方丽¹, 王晓林^{1*}, 杨 扬^{1,2}

(1. 吉林化工学院 化学与制药工程学院, 吉林 吉林 132022;

2. 吉林大学 化学学院, 吉林 长春 130012)

摘 要: 建立刺玫果提取物中总三萜酸的定性定量分析方法。采用 TLC 法对刺玫果提取物总三萜酸中的熊果酸进行定性分析;采用 UV 法对刺玫果提取物中的总三萜酸进行了定量分析;采用 HPLC 法对刺玫果提取物总三萜酸中的齐墩果酸、熊果酸进行了定量分析。结果表明,UV 法中齐墩果酸在 1.75 ~ 15.75 mg/L 范围内与吸光度有良好的线性关系 ($r = 0.999\ 1$),平均加样回收率为 101.60% (RSD 1.23%);HPLC 法中齐墩果酸、熊果酸在 0.1 ~ 1.1 μg ($r = 0.999\ 7$)、0.024 ~ 0.768 μg ($r = 0.999\ 9$) 线性关系良好,平均加样回收率分别为 100.24% (RSD 1.44%)、100.54% (RSD 0.45%)。3 批刺玫果提取物中总三萜酸平均为 8.62%,齐墩果酸平均为 0.273%,熊果酸平均为 0.534%。结果表明,所建立的刺玫果提取物中总三萜酸的定性分析和定量分析方法可用于该提取物的质量控制。

关键词: 刺玫果;总三萜酸;齐墩果酸;熊果酸

中图分类号: TQ35

文献标识码: A

文章编号: 0253-2417(2015)05-0135-08

引文格式: 钟方丽,王晓林,杨扬. 刺玫果提取物中总三萜酸的定性定量分析研究[J]. 林产化学与工业,2015,35(5):135-142.

Qualitative and Quantitative Analysis of Total Triterpenoid Acids in Fruit Extracts of *Rosa davurica* Pall.

ZHONG Fang-li¹, WANG Xiao-lin¹, YANG Yang^{1,2}

(1. School of Chemistry and Pharmaceutical Engineering, Jilin Institute of Chemical Technology, Jilin 132022, China;

2. School of Chemistry, Jilin University, Changchun, 130012, China)

Abstract: The qualitative and quantitative analysis methods of total triterpenoid acids (TTA) in fruit extracts of *Rosa davurica* Pall. were established. Both UV and HPLC methods were applied to determine the content of TTA, oleanolic acid and ursolic acid. TLC method was used to accomplish the qualitative identification of ursolic acid in fruit extracts. The concentration of oleanolic acid showed good linear relationship with absorbance at the range of 1.75 – 15.75 mg/L ($r = 0.999\ 1$) and the average recovery was 101.60% (RSD 1.23%) in quantitative analysis of TTA with UV method. On the other hand, oleanolic acid and ursolic acid showed good linear relationship at the range of 0.1 – 1.1 μg ($r = 0.999\ 7$) and 0.024 – 0.768 μg ($r = 0.999\ 9$) respectively and the average recoveries of them were 100.24% (RSD 1.44%) and 100.54% (RSD 0.45%) by HPLC method. The average contents of TTA, oleanolic acid, and ursolic acid of three batches of fruit extracts were 8.62%, 0.273%, and 0.534%, respectively. The experimental results showed that the content determination and TLC qualitative identification methods established could be applied to control of the qualitative and quantitative analysis of fruit extracts of *R. davurica*.

Key words: fruit of *Rosa davurica* Pall.; total triterpenoid acids; oleanolic acid; ursolic acid

山刺玫为蔷薇科小灌木,喜光,属阳性树种,耐瘠薄、耐干旱,主要生长在林源开阔地,河流两岸,山

收稿日期:2014-09-16

基金项目:吉林省教育厅资助项目(吉教科合字[2013]第318号)

作者简介:钟方丽(1970—),女,山东安丘人,教授,博士,硕士生导师,主要从事天然产物化学成分分离与生物活性研究;E-mail: fanglizhong@sina.com

* 通讯作者:王晓林(1969—),男,山东五莲人,副教授,硕士,主要从事天然产物有效成分的提取、纯化及药物的研究与开发;E-mail: wangxiaolin69@eyou.com.

坡灌木及杂木林中。刺玫果又名野玫瑰果,系蔷薇科蔷薇属植物山刺玫(*Rosa davurica* Pall.)的成熟果实,《中药大辞典》谓其有健脾理气、养血调经的作用^[1]。刺玫果富含皂苷^[2]、黄酮^[3]、多糖^[4]、鞣质、脂肪油、挥发油^[5]、维生素等多种生物活性物质。研究表明,刺玫果提取物具有降血压、增加冠脉流量、抑制血小板聚集、抑制血栓形成等众多药理活性,这些药理作用与刺玫果皂苷类成分有关^[6]。刺玫果中皂苷成分主要以五环三萜类的齐墩果酸和熊果酸为主,齐墩果酸和熊果酸具有抗菌消炎、抗癌、利尿抗水肿、降酶、保肝、降血脂和降血糖等功效^[7]。因此,有必要对刺玫果提取物中的总三萜酸进行定性、定量研究,三萜酸类化合物的测定方法主要有 UV 法和 HPLC 法等^[8]。本研究确立了刺玫果提取物的薄层鉴别方法;建立了总三萜酸的 UV 含量测定方法;建立了齐墩果酸和熊果酸的 HPLC 含量测定方法,以为刺玫果提取物的质量控制和进一步综合利用提供依据。

1 实 验

1.1 材料、试剂与仪器

刺玫果提取物为吉林化工学院化学与制药工程学院药学系自制^[2];齐墩果酸、熊果酸对照品购于中国食品药品检定研究院;薄层色谱用硅胶,青岛海洋化工有限公司;水为双蒸水;甲醇、乙腈为色谱纯试剂;其他试剂为分析纯试剂。ZF-20D 暗箱式紫外分析仪,上海宝山顾村电光仪器厂;TU-1810 紫外分光光度计,北京普析通用仪器有限公司;LC2000 高效液相色谱仪,上海天美科学仪器有限公司;KQ-250B 超声波清洗器,昆山市超声仪器有限公司;微量点样器,上海医用激光仪器厂。

1.2 薄层色谱(TLC)法定性鉴别

1.2.1 对照品溶液的制备 精密称取在 105 ℃干燥至质量恒定的熊果酸对照品 4.8 mg,置 25 mL 容量瓶中,加无水甲醇适量使溶解,定容,配制成质量浓度为 0.192 g/L 的熊果酸对照品溶液。

1.2.2 供试品溶液的制备 精密称取干燥至质量恒定的刺玫果提取物 0.16 g,加蒸馏水 50 mL 溶解。用蒸馏水饱和的正丁醇萃取 3 次,每次 30 mL,合并萃取液,用 20 mL 正丁醇饱和水洗涤,挥去正丁醇后用甲醇溶解并定容至 25 mL 容量瓶中,摇匀,即得供试品溶液。

1.2.3 阴性对照液的制备 精密称取干燥至质量恒定的刺玫果提取物 0.16 g,用 50 mL 蒸馏水溶解,溶液上树脂柱,流出液重复上柱,至流出液无三萜酸反应,收集流出液,在水浴上挥干,用适量蒸馏水溶解。后续操作同 1.2.2 节,即得除去总三萜酸后的阴性对照溶液。

1.2.4 鉴定方法 按《中国药典》2010 年版一部附录 VI B 薄层色谱法试验^[9],吸取上述熊果酸对照品溶液、3 批供试品溶液及阴性对照溶液各 5 μ L,分别点于同一层析硅胶 G 薄层板上,以环己烷-三氯甲烷-乙酸乙酯-甲酸(体积比 20:5:8:0.1)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以 10% 硫酸乙醇溶液,晾干,置于紫外分析仪(365 nm)下检视。

1.3 刺玫果提取物中总三萜酸的定量测定

采用香草醛-冰醋酸-高氯酸显色法^[10]测定刺玫果提取物中总三萜酸的含量,并对具体的显色条件和含量测定的方法学进行了相关研究。

1.3.1 对照品溶液的制备 精密称取干燥至质量恒定的齐墩果酸对照品适量,加无水甲醇适量使溶解,定容,配制成质量浓度为 0.105 g/L 的齐墩果酸对照品溶液。

1.3.2 供试品溶液的制备及显色体系的确定

1.3.2.1 供试品溶液 A 的制备 精密称取干燥至质量恒定的刺玫果提取物 0.16 g,按 1.2.2 节操作,制备供试品溶液 A。

1.3.2.2 供试品溶液 B 的制备 精密称取干燥至质量恒定的刺玫果提取物 0.16 g,置于 50 mL 容量瓶中,加 60% 乙醇使溶解,定容,摇匀,即得供试品溶液 B。

1.3.2.3 供试品溶液 C 的制备 称取干燥至质量恒定的刺玫果提取物 0.16 g,加 60% 乙醇 50 mL 溶

解,加入 2 mol/L HCl 溶液 50 mL 于 100 ℃ 水解 5 h,挥去乙醇,用蒸馏水饱和的正丁醇萃取 3 次,每次 30 mL,合并萃取液,用 20 mL 正丁醇饱和水洗涤,挥去正丁醇后用甲醇溶解并定容至 25 mL 容量瓶中,摇匀,即得供试品溶液 C。

1.3.2.4 显色体系的确定 对 3 种供试品溶液 A、B、C,分别进行香草醛-冰醋酸-高氯酸体系^[10]、香草醛-冰醋酸-浓硫酸体系^[11]、香草醛-乙醇-硫酸体系^[12]进行显色,以确定最佳显色体系。

1.3.3 检测波长的选择 精密量取齐墩果酸对照品溶液、供试品 A 溶液及阴性对照溶液各 0.4 mL 于 10 mL 的具塞试管中,80 ℃ 水浴挥干溶剂,加入一定浓度的香草醛-冰醋酸 0.2 mL 和一定体积的高氯酸溶液,摇匀,一定温度下水浴加热一定时间,取出后冰浴一定时间,加 5 mL 冰醋酸稀释,室温静置一定时间后,对照品溶液以不显色的齐墩果酸对照品溶液为空白对照,供试品以不显色的供试品溶液为空白对照。在 200 ~ 700 nm 进行光谱扫描。

1.3.4 香草醛-冰醋酸-高氯酸法最佳显色条件的确定 分别吸取若干份供试品溶液,按 1.3.3 节操作,分别考察反应温度、香草醛-冰醋酸浓度、反应时间、高氯酸用量、冰水浴时间、室温放置时间对吸光度的影响。

1.3.5 方法学研究

1.3.5.1 线性关系考察 精密量取质量浓度为 0.105 g/L 的齐墩果酸对照品溶液 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9 mL,分别置于已贴好标签的 9 个具塞试管中,按 1.3.4 节最佳条件操作,在 548 nm 处测定其吸光度。

1.3.5.2 仪器精密度试验 吸取质量浓度为 0.105 g/L 齐墩果酸对照品溶液及供试品溶液各 0.5 mL 于具塞试管中,按 1.3.5.1 节方法显色,连续测定 6 次吸光度。

1.3.5.3 稳定性试验 吸取 0.5 mL 供试品溶液于具塞试管中,按 1.3.5.1 节方法分别于配制后 0、0.5、1、2、3、4、5、6 h 进行显色,测定吸光度。按 1.3.5.1 节方法分别在显色后于 0、15、30、40、50、60 min 测定吸光度。

1.3.5.4 重复性试验 取同一批号刺玫果提取物 6 份,精密称定,按 1.3.2 节方法制成供试品溶液,吸取供试品溶液 0.5 mL 于具塞试管中,按 1.3.5.1 节方法显色,在 548 nm 处测定吸光度值。

1.3.5.5 加样回收率试验 精密称定 9 批已知含量的刺玫果总三萜酸提取物(75.69 mg/g),按 1.3.2 节操作,制成供试品溶液,从上述供试品溶液中吸取 10 mL 于 25 mL 容量瓶中,加甲醇定容至刻度,得稀释后的供试品溶液。各精密吸取稀释的供试品溶液 0.2 mL,每 3 份中分别加入质量浓度为 0.105 g/L 的齐墩果酸对照品溶液 0.29、0.37、0.44 mL,按 1.3.5.1 节方法显色,于 548 nm 处测定吸光度。

1.3.6 样品中总三萜酸的含量测定 称取 3 批供试品,精密称定,按 1.3.2 节操作,制备供试品溶液,按 1.3.5.1 节方法显色,在 548 nm 处测定吸光度值,计算供试品总三萜酸的含量。

1.4 HPLC 法测定齐墩果酸和熊果酸的含量

1.4.1 对照品溶液的制备 精密称取在 105 ℃ 干燥至质量恒定的熊果酸和齐墩果酸对照品适量,置于 25 mL 容量瓶中,加无水甲醇适量使溶解,定容至刻度,配制成混合对照品溶液^[13-14]。

1.4.2 供试品溶液的制备 精密称取干燥至质量恒定的刺玫果提取物 0.1 g,置于具塞锥形瓶中,加入一定体积的甲醇-5% 盐酸(体积比 5:1)溶液,密塞,称质量,置于一定温度水浴中加热回流一定时间,放冷,称质量,用甲醇补充损失的质量,摇匀,过滤,将滤液转移至 50 mL 容量瓶中,甲醇定容,0.45 μm 微孔滤膜过滤,取滤液作为供试品溶液。

1.4.3 色谱条件及适应性试验 色谱柱为依利特 Hypersil ODS2 C₁₈(4.6 mm × 150 mm, 5 μm);选择一定的流动相;流速为 0.6 mL/min;进样量 20 μL;检测波长 205 nm;柱温 20 ℃^[15]。

1.4.4 流动相的选择 考察了不同种类流动相对刺玫果提取物中齐墩果酸、熊果酸保留时间和分离度的影响。

1.4.5 供试品溶液制备方法的确定 在齐墩果酸、熊果酸含量测定中,对供试品溶液制备方法进行了研究,分别对水解液的用量、水解时间和水解温度进行了探索。

1.4.6 样品中齐墩果酸与熊果酸的含量测定 称取 3 批刺玫果提取物,精密称定,按 1.4.2 节已定方法确定的条件制备供试品溶液,分别进样 20 μL ,计算含量。

2 结果与分析

2.1 TLC 法定性鉴别试验结果

刺玫果提取物的薄层色谱如图 1 所示。由图 1 可知,供试品色谱中,在与对照品色谱相应的位置上,显有相同颜色的荧光斑点,且斑点清晰,阴性对照液在对照品色谱相应的位置上没有荧光斑点,说明此薄层色谱法专属性较好,阴性无干扰。

2.2 UV 法测定含量试验结果

2.2.1 供试品溶液的制备及显色体系的确定 试验结果表明,在 3 个显色体系中供试品溶液 A 与齐墩果酸对照品溶液显色的峰形和最大吸收峰均对应,香草醛-冰醋酸-高氯酸体系是皂苷普遍适用的显色剂,且该显色方法显色灵敏,稳定性较好,所以选择供试品溶液 A,以香草醛-冰醋酸-高氯酸体系显色作为总三萜酸含量的测定方法。

2.2.2 检测波长的选择 试验结果表明,齐墩果酸对照品溶液、供试品 A 溶液的最大吸收波长均为 548 nm,峰型相似,而且同样方法显色的阴性对照溶液及未显色的阴性对照溶液、齐墩果酸对照品溶液、供试品溶液和显色剂在 548 nm 处均未有吸收,所以选择以齐墩果酸为对照品,以 548 nm 作为检测波长。

2.2.3 香草醛-冰醋酸-高氯酸法最佳显色条件的确定

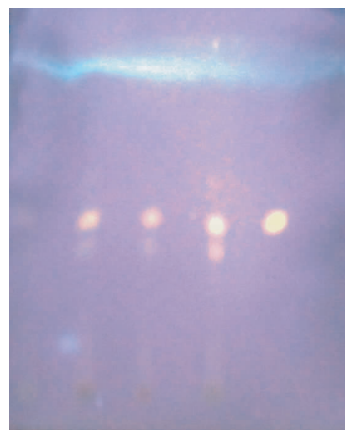
2.2.3.1 反应温度 在香草醛-冰醋酸质量浓度 50 g/L、高氯酸用量 0.8 mL、水浴 15 min、冰浴 15 min 和室温放置 15 min 条件下,水浴温度分别为 50、60、70、80 和 90 $^{\circ}\text{C}$ 时,吸光度值分别为 0.497、0.728、0.849、0.918 和 0.969。由结果可知随着反应温度的升高,吸光度值逐渐增大,但 70 $^{\circ}\text{C}$ 后随着温度的升高,空白和未显色的供试品溶液的吸光度增加明显,由于温度越高,其他如糖、蛋白等的干扰越严重,空白颜色加深,所以选择反应温度为 70 $^{\circ}\text{C}$ 。

2.2.3.2 香草醛-冰醋酸质量浓度 选择水浴温度 70 $^{\circ}\text{C}$ 、其他条件同 2.2.3.1 节,香草醛-冰醋酸溶液质量浓度分别为 10、30、50、70 和 90 g/L 时,吸光度值分别为 0.593、0.652、0.742、0.860 和 0.824。试验结果表明,随着香草醛-冰醋酸溶液质量浓度的增加,供试品溶液的吸光度先增大后减小,使用 70 g/L 香草醛-冰醋酸吸光度值最大,确定香草醛-冰醋酸加入质量浓度为 70 g/L。

2.2.3.3 反应时间 选择水浴温度 70 $^{\circ}\text{C}$ 、香草醛-冰醋酸质量浓度 70 g/L,其他条件同 2.2.3.1 节,水浴加热时间分别为 5、10、15、20、25 和 30 min 时,吸光度值分别为 0.225、0.446、0.487、0.512、0.567 和 0.570。试验结果表明,随着水浴时间的增加,供试品溶液吸光度均逐渐升高,水浴时间过短则反应不完全,过长则空白颜色加深,误差加大,而且反应 25 min 和 30 min 的吸光度值差别很小,因此,选取水浴加热时间为 25 min。

2.2.3.4 高氯酸用量 在 2.2.3.3 节优化条件下,高氯酸用量分别为 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 和 1.2 mL 时,吸光度值分别为 0.550、0.746、0.793、0.849、0.748 和 0.742。试验结果表明,加入 0.8 mL 高氯酸,供试品溶液吸光度值最大,所以选取高氯酸用量为 0.8 mL。

2.2.3.5 冰水浴时间 在 2.2.3.4 节优化条件下,冰浴时间分别为 5、10、15、20、25 和 30 min 时,吸光



1. 阴性对照液 negative control solution;
2, 3, 4. 供试品溶液 test samples solution;
5. 熊果酸对照品溶液 ursolic acid reference solution

图 1 刺玫果提取物薄层鉴别色谱图

Fig.1 TLC chromatograms of fruit extracts of *Rosa davurica* Pall.

度值分别为 0.819、0.824、0.852、0.821、0.820 和 0.812。试验结果表明,冰水浴时间 15 min 时吸光度值最大,所以确定最佳冰水浴时间为 15 min。

2.2.3.6 室温放置时间 在 2.2.3.5 节优化条件下,室温放置时间分别为 5、10、15、20、25 和 30 min 时,吸光度值分别为 0.845、0.834、0.829、0.823、0.814 和 0.802。结果表明,随着放置时间增加,供试品溶液吸光度降低,在 10~20 min 吸光度值的变化较小,所以最佳室温放置时间为 15 min。

综上所述,该显色方法以 70 g/L 香草醛-冰醋酸和 0.8 mL 高氯酸为显色剂,在 70 ℃ 水浴反应 25 min,取出后冰水浴 15 min,室温静置 15 min 后测定吸光度。

2.2.4 线性关系考察 以吸收度为纵坐标,齐墩果酸对照品质量浓度 (mg/L) 为横坐标,制作标准曲线,回归方程: $A = 59.238C - 0.011$, $r = 0.999\ 1$ 。结果表明:齐墩果酸在 1.75~15.75 mg/L 范围内与吸光度呈良好线性关系。

2.2.5 仪器精密度试验 齐墩果酸对照品溶液 RSD 0.14%、供试品溶液 RSD 0.21%,结果表明精密度较好。

2.2.6 稳定性试验 显色前 RSD 为 1.86%,显色后 RSD 为 2.30%,结果表明,供试品溶液室温条件下显色前 6 h 内、显色后 60 min 内基本稳定,满足测定要求。

2.2.7 重复性试验 供试品溶液 RSD 2.21%,结果表明,重复性良好。

2.2.8 加样回收率试验 回收率试验结果见表 1。结果表明,齐墩果酸平均加样回收率为 101.60%,RSD 1.23%,回收率良好,方法准确性较高,具有可行性。

表 1 齐墩果酸加样回收率试验
Table 1 Recovery tests of oleanolic acid

序号 No.	取样量/mg amount of sample	样品/ μg content of sample	加入量/ μg addition of reference	测得总量/ μg total amount	回收率/% recovery	平均值/% average recovery	RSD/%
1	0.514	38.90	30.45	69.18	99.44	101.60	1.23
2	0.513	38.83	30.45	69.73	101.49		
3	0.515	38.98	30.45	70.13	102.27		
4	0.513	38.83	38.85	78.40	101.85		
5	0.514	38.90	38.85	78.09	100.88		
6	0.514	38.90	38.85	79.21	103.76		
7	0.513	38.83	46.20	85.99	101.95		
8	0.514	38.90	46.20	86.19	102.36		
9	0.514	39.90	46.20	85.28	100.39		

2.2.9 样品中总三萜酸的含量测定 结果表明,3 批刺玫果提取物中总三萜酸分别为 8.44%、8.57%、8.84%,平均为 8.62%。

2.3 HPLC 法测定含量试验结果

2.3.1 流动相的选择 流动相为甲醇-0.2% 磷酸溶液、甲醇-0.4% 醋酸溶液、甲醇-1% 乙酸铵溶液、乙腈-水、甲醇-0.1% 磷酸水溶液未能将齐墩果酸与熊果酸完全分离;乙腈-0.1% 磷酸水溶液,出现拖尾;流动相甲醇-乙腈-10 mmol/L 乙酸铵溶液(体积比 55:27:18)能将供试品中齐墩果酸与熊果酸完全分离,保留时间分别为 24.33、26.19 min,齐墩果与熊果酸分离度为 1.653,理论塔板数为 7 300,峰形较好,故选择甲醇-乙腈-10 mmol/L 乙酸铵溶液(55:27:18)为流动相,HPLC 图见图 2。

2.3.2 供试品溶液制备方法的确定

2.3.2.1 水解温度 水解温度分别为 50、60、70、80 和 90 ℃ 时,齐墩果酸、熊果酸的色谱峰面积总和分别为 197 436、207 894、187 493、109 550 和 101 298,60 ℃ 时 2 种物质色谱峰面积最大。

2.3.2.2 水解液用量 甲醇-5% 盐酸(5:1)溶液用量分别为 24、30、36、42 和 48 mL 时,齐墩果酸、熊果

酸的色谱峰面积总和分别为 199 990、203 649、208 039、207 834 和 207 931。结果表明,水解液用量为 36、42、48 mL 时,2 种物质的色谱峰面积差别较小,故水解液用量宜采用 36 mL。

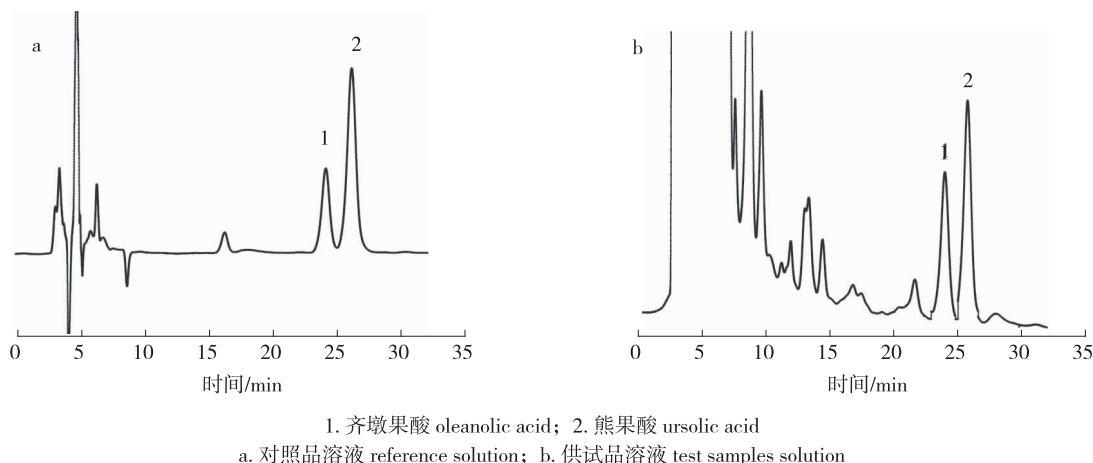


图 2 刺玫果提取物总三萜酸的 HPLC 色谱图

Fig. 2 HPLC chromatograms of total triterpenoid acids in fruit extracts of *Rosa davurica* Pall.

2.3.2.3 水解时间 在水解温度 60 ℃、水解液用量 36 mL 条件下,水解时间分别为 1、2、3、4 和 5 h 时,齐墩果酸、熊果酸的色谱峰面积总和分别为 202 242、206 557、182 530、156 686 和 143 445。结果表明,2 h 已达到最大提取效果。

2.3.3 线性关系考察 吸取齐墩果酸与熊果酸的混合对照品溶液,配成质量浓度分别为 1.2、2.4、4.8、9.6、19.2、38.4 mg/L 的熊果酸系列对照品溶液和质量浓度分别 5、15、25、35、45、55 mg/L 的齐墩果酸系列对照品溶液,分别进样 20 μL,测定齐墩果酸与熊果酸峰面积。以齐墩果酸与熊果酸峰面积积分值(Y)为纵坐标,进样量($X, \mu\text{g}$)为横坐标,绘制标准曲线,回归方程为:熊果酸: $Y = 6 \times 10^5 X + 3 \times 10^3$, $r = 0.9999$;齐墩果酸: $Y = 5.7 \times 10^5 X + 4.7 \times 10^3$, $r = 0.9997$ 。结果表明,熊果酸和齐墩果酸对照品分别在 0.024 ~ 0.768 μg、0.10 ~ 1.10 μg,进样量与峰面积之间呈良好的线性关系。

2.3.4 重复性试验 取同一批号刺玫果提取物 6 份,按 1.4.2 节方法确定的条件制备供试品溶液,各进样 20 μL,进行测定。供试品中齐墩果酸、熊果酸峰面积 RSD 分别为 1.70%、1.35%,结果表明该方法具有良好的重复性。

2.3.5 仪器精密度试验 吸取浓度已知的齐墩果酸和熊果酸混合对照品溶液,连续进样 6 次,每次进样 20 μL,进行测定。对照品齐墩果酸、熊果酸峰面积 RSD 分别为 0.95%、0.85%,表明仪器精密度良好。

2.3.6 稳定性试验 吸取供试品溶液,在 1.4.3 节色谱条件下,分别于 0、1、2、3、4、5、6、7、8 h 进样 20 μL,进行测定。供试品中齐墩果酸、熊果酸峰面积 RSD 分别为 1.38%、1.14%,表明供试品溶液在室温下 8 h 内稳定。

2.3.7 加样回收率试验 称取 9 份齐墩果酸、熊果酸含量已知的刺玫果提取物,每 3 份中分别加入质量浓度为 0.088 g/L 的齐墩果酸和质量浓度为 0.192 g/L 的熊果酸对照品溶液适量,按 1.4.2 节方法制备供试品溶液,在 1.4.3 节色谱条件下,进行含量测定。试验结果见表 2。由表 2 可知,齐墩果酸的平均加样回收率为 100.24%,RSD 为 1.44%;熊果酸的平均加样回收率为 100.54%,RSD 为 0.45%,回收率良好。

2.3.8 样品中齐墩果酸和熊果酸的含量测定 3 批样品中齐墩果酸和熊果酸分别为:0.294%, 0.511%; 0.275%, 0.527%; 0.250%, 0.563%, 样品中平均含齐墩果酸、熊果酸分别为 0.273%、0.534%。

表 2 齐墩果酸和熊果酸的回收率试验

Table 2 Recovery tests of oleanolic acid and ursolic acid

成分 ingredient	序号 No.	取样量/g amount of sample	样品/ μg content of sample	加入量/ μg addition of reference	测定总量/ μg total amount	回收率% recovery	平均值/% average recovery	RSD/%
齐墩果酸 oleanolic acid	1	0.1014	253.50	203.00	458.53	101.00	100.24	1.44
	2	0.1008	252.00	203.00	461.09	103.00		
	3	0.1010	252.50	203.00	457.53	101.00		
	4	0.1010	252.50	253.00	507.50	100.79		
	5	0.1011	252.75	253.00	506.74	100.39		
	6	0.1012	253.00	253.00	504.99	99.60		
	7	0.1004	251.00	301.00	550.01	99.34		
	8	0.1010	252.50	301.00	550.49	99.00		
	9	0.1005	251.25	301.00	546.44	98.07		
熊果酸 ursolic acid	1	0.1014	570.88	456.96	1028.74	100.20	100.54	0.45
	2	0.1008	567.50	456.96	1025.55	100.24		
	3	0.1010	568.63	456.96	1026.18	100.13		
	4	0.1010	568.63	568.32	1138.26	100.23		
	5	0.1011	569.19	568.32	1139.50	100.35		
	6	0.1012	569.76	568.32	1142.17	100.72		
	7	0.1004	565.25	677.76	1250.01	101.03		
	8	0.1010	568.63	677.76	1254.01	100.53		
	9	0.1005	565.82	677.76	1253.46	101.46		

3 结 论

- 3.1 建立了刺玫果提取物中熊果酸的薄层鉴别方法,该鉴别方法斑点清晰、简便、可靠,可作为刺玫果提取物中总三萜酸的定性分析方法。
- 3.2 建立了测定刺玫果提取物中总三萜酸含量的 UV 法。结果表明,齐墩果酸在 1.75 ~ 15.75 mg/L 范围内与吸光度有良好的线性关系($r=0.999\ 1$),平均加样回收率为 101.60%。
- 3.3 建立了测定刺玫果提取物中齐墩果酸和熊果酸含量的 HPLC 法。色谱柱为依利特 Hypersil ODS2 C₁₈(4.6 mm×150 mm, 5 μm),以甲醇-乙腈-10 mmol/L 乙酸铵(55:27:18)为流动相,流速为 0.6 mL/min,检测波长 205 nm,柱温 20 $^{\circ}\text{C}$ 。
- 3.4 在 3 批自制的刺玫果提取物中平均含总三萜酸为 8.62%,平均含齐墩果酸为 0.273%,平均含熊果酸为 0.534%。
- 3.5 建立的含量测定方法专属性强、操作方便、线性关系良好,回收率、重现性符合要求,可作为刺玫果提取物中总三萜酸的定量分析方法。

参考文献:

[1]俞作仁,王文莉,吕娟涛. 刺玫果化学成分及药理作用研究进展[J]. 中草药,2002,33(2):188-190.
YU Zuo-ren, WANG Wen-li, LV Juan-tao. Research progress of chemical composition and pharmacological effect of fruit of *Rose davurica* Pall [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2002, 33(2):188-190.

[2]钟方丽,王晓林,付丽娟,等. 大孔树脂法纯化刺玫果总皂苷工艺研究[J]. 河南工业大学学报:自然科学版,2014,35(1):76-81.
ZHONG Fang-li, WANG Xiao-lin, FU Li-juan, et al. Purification process of total saponins of *Rosa davurica* Pall. fruits by macro-porous resin method[J]. Journal of Henan University of Technology: Natural Science Edition, 2014, 35(1):76-81.

[3]庄志军,钟方丽,杨英杰,等. 刺玫果中总黄酮的提取与分析[J]. 中成药,2007,29(9):1394-1395.
ZHUANG Zhi-jun, ZHONG Fang-li, YANG Ying-jie, et al. Study on extraction and analysis of total flavonoids from the fruit of *Rose davurica* Pall [J]. Chinese Traditional Patent Medicine, 2007, 29(9):1394-1395.

[4]钟方丽,王慧竹,王芳. 刺玫果多糖的提取工艺研究[J]. 食品与机械,2011,27(1):43-45.
ZHONG Fang-li, WANG Hui-zhu, WANG Fang. Study on extracting process of polysaccharides in fruits of *Rose davurica* pall [J]. Food and

- Machinery, 2011, 27(1): 43–45.
- [5] 王晓林, 王建刚, 钟方丽, 等. 刺玫果挥发性成分的顶空固相微萃取-气质联用分析[J]. 食品科学, 2013, 34(6): 223–226.
WANG Xiao-lin, WANG Jian-gang, ZHONG Fang-li, et al. Analysis of volatile compounds in *Rosa davurica* Pall. fruits by head space solid phase microextraction and gas chromatography mass spectrometry[J]. Food Science, 2013, 34(6): 223–226.
- [6] 张远, 卫兰, 肖菊英. 刺玫果提取物对心血管系统的作用[J]. 中草药, 1985, 16(1): 20–24.
ZHANG Yuan, WEI Lan, XIAO Ju-ying. Study on the effect of fruit extracts of *Rosa davurica* Pall. on cardiovascular system[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 1985, 16(1): 20–24.
- [7] 严华, 苏健, 王宝渠. 药材中齐墩果酸与熊果酸质控指标的探究[J]. 药物分析杂志, 2009, 29(8): 1400–1405.
YAN Hua, SU Jian, WANG Bao-qin. Discussion on oleanolic acid and ursolic acid as indicator of quality control of Chinese medical material[J]. Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis, 2009, 29(8): 1400–1405.
- [8] 相延英, 杨光. 常用中药中齐墩果酸和熊果酸的含量测定[J]. 中国医院药学杂志, 2004, 24(5): 316–317.
XIANG Yan-ying, YANG Guang. Determination of the content of oleanolic acid and ursolic acid in common traditional Chinese medicines[J]. Chinese Journal of Hospital Pharmacy, 2004, 24(5): 316–317.
- [9] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2010 年版, 一部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 附录 34–35.
National Pharmacopoeia Committee. Pharmacopoeia of the People's Republic of China: 1st section[M]. Beijing: China Medical Science Press, 2010: Appendix 34–35.
- [10] 卢圣楼, 刘红, 臧文霞, 等. 响应面法优化神秘果叶总三萜的超声波提取工艺[J]. 林产化学与工业, 2013, 33(6): 95–100.
LU Sheng-lou, LIU Hong, ZANG Wen-xia, et al. Optimization of ultrasound extraction of total triterpenoids from *Synsepalum dulcificum* leaf by response surface methodology[J]. Chemistry and Industry of Forest Products, 2013, 33(6): 95–100.
- [11] 杨荣平, 向春艳, 张小梅, 等. 不同产地翼首草中总皂苷的含量比较[J]. 时珍国医国药, 2010, 21(7): 1797–1798.
YANG Rong-ping, XIANG Chun-yan, ZHANG Xiao-mei, et al. Comparison of the content of total saponins in different areas of *Pterocephalus hookeri*[J]. Lishizhen Medicine and Materia Medica Research, 2010, 21(7): 1797–1798.
- [12] 程莉君, 石雪萍. 苦瓜中总皂苷的比色法测定[J]. 食品与机械, 2008, 24(2): 123–127.
CHENG Li-jun, SHI Xue-ping. Spectrophotometric determination of saponins from *Momordica charantia* L. [J]. Food and Machinery, 2008, 24(2): 123–127.
- [13] 田吉, 李翅翔, 何兵, 等. 高效液相色谱法测定楤木及其提取物中齐墩果酸的含量[J]. 时珍国医国药, 2009, 20(10): 2426–2427.
TIAN Ji, LI Chi-xiang, HE Bing, et al. Determination of oleanolic acid in root bark of *Aralia* and its extracts by HPLC[J]. Lishizhen Medicine and Materia Medica Research, 2009, 20(10): 2426–2427.
- [14] 邹盛勤, 孙伟. 反相高效液相色谱法同时测定柿叶中齐墩果酸和熊果酸[J]. 分析实验室, 2009, 28(4): 18–21.
ZOU Sheng-qin, SUN Wei. Simultaneous determination of oleanolic acid and ursolic acid in persimmon leaves by RP-HPLC[J]. Chinese Journal of Analysis Laboratory, 2009, 28(4): 18–21.
- [15] 石静, 聂晶, 冯钰琦. HPLC 法测定女贞叶乙醇提取物中的齐墩果酸与熊果酸[J]. 现代药物与临床, 2010, 25(3): 210–214.
SHI Jing, NIE Jing, FENG Yu-qi. HPLC determination of oleanolic acid and ursolic acid in ethanol extract of *Ligustrum lucidum* leaves[J]. Drugs & Clinic, 2010, 25(3): 210–214.