

TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y DƯỢC HUẾ
HUE UNIVERSITY OF MEDICINE AND PHARMACY

**TẠP CHÍ
Y DƯỢC HỌC**
JOURNAL OF MEDICINE AND PHARMACY

Số 06
2011

Huế, 12 - 2011

9	Nghiên cứu sự liên quan giữa nồng độ NT-proBNP huyết tương với biến đổi hình thái và chức năng thất trái ở bệnh nhân đái tháo đường type 2 <i>Study on the correlation between plasma NT-proBNP concentration and structural change and dysfunction of left ventricle in diabetic type 2 patients</i> Nguyễn Hải Thủy, Lê Thanh Tùng	74
10	Định lượng acid betulinic trong dược liệu Chắc chịu bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao <i>Quantitative analysis of betulinic acid in the plant Tetracera scandens using high performance liquid chromatography</i> Nguyễn Thị Hoài	83
11	Nghiên cứu rối loạn nhịp tim bằng Holter điện tim 24 giờ ở bệnh nhân hẹp van hai lá <i>Study on the heart dysrhythm by 24 hours ECG Holter in patients with mitral stenosis</i> Nguyễn Tấn Thịnh, Lê Thị Bích Thuận	89
12	Nghiên cứu đặc điểm lâm sàng và nội soi của viêm VA và kết quả phẫu thuật nạo VA tại Bệnh viện Đa khoa Thành phố Buôn Ma Thuột năm 2010 <i>Study on clinical and endoscopic features of adenoiditis and result of adenoidectomy at Buon Ma Thuot Hospital</i> Võ Nguyễn Hoàng Khôi, Nguyễn Thanh Nam, Đặng Thanh	97
13	Tỷ lệ các loại bệnh lý tiết niệu và thái độ xử trí tại Khoa Ngoại Tổng hợp Bệnh viện Trường Đại học Y Dược Huế <i>Percentage and management of urinary diseases at the surgical department of Hue University Hospital</i> Nguyễn Trường An, Nguyễn Đình Quang Minh	104
14	Bước đầu đánh giá kết quả phẫu thuật cắt ruột thừa viêm cấp qua ngã nội soi một công tại Bệnh viện trung ương Huế <i>Assessment of results of single-port laparoscopic appendectomy at Hue Central Hospital</i> Phạm Như Hiệp, Hồ Hữu Thiện, Phạm Anh Vũ, Trần Văn Nghĩa	114
15	Khảo sát khối cơ thất trái trên đối tượng tiền tăng huyết áp bằng điện tâm đồ và siêu âm tim <i>Evaluation of left ventricular mass in the prehypertensives on by electrocardiography and echocardiography</i> Nguyễn Thị Thúy Hằng	119
16	Phẫu thuật nội soi một lỗ điều trị ung thư đại tràng tại Bệnh viện Trung ương Huế <i>Single-incision laparoscopic colectomy in treatment colon cancer at Hue Central Hospital</i> Phạm Như Hiệp, Hồ Hữu Thiện, Phạm Anh Vũ, Phan Hải Thanh, Nguyễn Thanh Xuân, Trần Nghiêm Trung, Văn Tiến Nhân, Phạm Trung Vỹ, Phạm Xuân Đông	126
17	Cập nhật về các kiểu gen của HBV và ý nghĩa lâm sàng <i>Updates on HBV genotypes and their clinical significance</i> Trần Xuân Chương	133
18	Thông tin Y Dược học <i>News</i> Nguyễn Hoài Phong	140

ĐỊNH LƯỢNG ACID BETULINIC TRONG DƯỢC LIỆU CHẠC CHÌU BẰNG PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ LỎNG HIỆU NĂNG CAO

Nguyễn Thị Hoài

Khoa Dược, Trường Đại học Y Dược Huế

Tóm tắt

Đặt vấn đề: Acid betulinic là hợp chất có nhiều hoạt tính sinh học quý giá, việc xác định hàm lượng acid betulinic trong Chạc chịu sẽ định hướng cho việc khai thác sử dụng dược liệu này trong tương lai. **Đối tượng và phương pháp nghiên cứu:** Chạc chịu được thu hái tại huyện Hương Thủy – Tỉnh Thừa Thiên Huế. Định lượng hoạt chất bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao, cột sắc ký pha đảo C18. **Kết quả:** Từ phần trên mặt đất của Chạc chịu *Tetracera scandens* (Dilleniaceae) bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao, detector UV-VIS đã xác định hàm lượng acid betulinic là 1,069%, tính theo khối lượng dược liệu khô tuyệt đối.

Abstract

QUANTITATIVE ANALYSIS OF BETULINIC ACID IN THE PLANT TETRACERA SCANDENS USING HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

Nguyen Thi Hoai

Background: Betulinic acid is a compound that has many valuable biological activity, the determination of betulinic acid in *Tetracera scandens* (Dilleniaceae) makes accommodate the exploitation of medicinal will be used in the future. **Materials and method:** *Tetracera scandens* was collected in Huong Thuy District - Thua Thien Hue Province. The quantification were made by a HPLC system using a C18 column. **Results:** From species *Tetracera scandens* collected at Huong Thuy - Thua Thien Hue, by a HPLC system, UV-VIS detector, the result showed that accumulation of the principle compound in the aerial parts of the plant is 1.069%.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Acid betulinic là một triterpenoid thuộc nhóm lupan tự nhiên, được tổng hợp bởi nhiều loài thực vật khác nhau [1]. Các nghiên cứu về tác dụng sinh học gần đây cho thấy acid betulinic có tác dụng chống ung thư [2-4], kháng HIV [4-6] và rất nhiều tác dụng khác như chống viêm, chống loét dạ dày, bảo vệ gan, tăng cường miễn dịch, chống sốt rét... [7]. Do đó, hoạt chất này đã được nhiều nhà khoa học quan tâm, phát triển các dẫn xuất của nó để định hướng đến ứng dụng

trong lâm sàng [4], [8].

Acid betulinic được tìm thấy nhiều trong các loài thực vật thuộc các chi *Betula* (Betulaceae), *Syzygium* (Myrtaceae), *Zyzyphus* (Rhamnaceae) và trong nhiều họ thực vật khác [7]. Các nghiên cứu trước đây cũng chỉ ra rằng acid betulinic có mặt trong nhiều loài thuộc họ *Dilleniaceae* [9], và trong các loài thuộc chi *Tetracera* [10-13]. Trong nghiên cứu của chúng tôi, acid betulinic đã được phân lập từ loài *Tetracera scandens*

mọc tại Việt Nam, được gọi tên là Chặc chiu hay Dây chiều. Tuy nhiên, hàm lượng thành phần này trong các loài *Tetracera* nói chung và trong Chặc chiu chưa được khảo sát. Để định hướng cho việc khai thác sử dụng dược liệu này với mục đích phân lập acid betulinic làm nguyên liệu cho nghiên cứu hay sản xuất thuốc, chúng tôi tiến hành xây dựng quy trình định lượng acid betulinic trong mẫu dược liệu Chặc chiu thu hái tại Việt Nam.

2. NGUYÊN LIỆU, THIẾT BỊ VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên liệu

Nguyên liệu nghiên cứu là phần trên mặt đất của cây Chặc chiu được thu hái tại xã Thủy Bằng, huyện Hương Thủy, tỉnh Thừa Thiên Huế vào tháng 10 năm 2009. Mẫu nghiên cứu đã được TS. Dương Đức Huyền, Phòng Thực vật, Viện Sinh thái Tài nguyên sinh vật, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam xác định tên khoa học là *Tetracera scandens* (L.) Merr., họ Sô (Dilleniaceae). Mẫu dược liệu (VDL-10/2009-01) hiện đang được lưu tại Khoa Hóa Phân tích – Tiêu chuẩn, Viện Dược liệu, Hà Nội, Việt Nam.

Nguyên liệu sau khi thu hái được rửa sạch, thái nhỏ, phơi, sấy khô, sau đó nghiền thành bột thô và bảo quản ở nhiệt độ phòng, nơi khô, thoáng.

2.2. Máy móc thiết bị, dung môi, hóa chất

2.2.1. Máy móc, thiết bị

- Hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao Shimadzu (Series 20A, Nhật)
- Máy đo pH Mettler HM-25R Toa
- Cân phân tích Shimadzu (chính xác đến 0,1 mg)
- Máy lắc ống nghiệm IKA
- Máy khuấy từ Stuart
- Máy xác định độ ẩm

Các thiết bị đều được hiệu chuẩn theo tiêu chuẩn ISO/IEC 17025:2000.

2.2.2. Dung môi, hóa chất

Dung môi, hóa chất gồm có nước cất 2 lần, acid phosphoric, methanol, acetonitril. Các hóa chất đều được mua của hãng Merck, đạt tiêu chuẩn phân tích dùng cho sắc ký HPLC.

2.2.3. Chất đối chiếu

Acid betulinic đã được nhóm nghiên cứu phân lập và xác định cấu trúc bằng phương pháp phân tích các phổ (IR, MS, NMR). Mẫu chất phân lập tinh khiết được dùng làm chất đối chiếu trong quá trình định lượng.

2.3. Phương pháp nghiên cứu:

Định lượng acid betulinic trong Chặc chiu bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) tại Trung tâm Kiểm nghiệm dược phẩm Thừa Thiên Huế, sử dụng cột sắc ký pha đảo Inertsil® ODS-3 (RP₁₈, 250 × 4,6 mm, 5 μm), detector UV-VIS.

2.3.1. Chuẩn bị mẫu chạy sắc ký

- Dung dịch mẫu đối chiếu: cân chính xác 0,0105g acid betulinic đối chiếu, cho vào bình định mức 10 ml, thêm 5 ml methanol, siêu âm cho tan hết chất. Thêm methanol vừa đủ đến vạch, lắc đều, lọc qua màng lọc millipore 0,45 μm được dung dịch có nồng độ khoảng 1000 μg/ml.

- Dung dịch mẫu thử: cân chính xác 1,308g bột dược liệu khô, chiết bằng shoxlet với methanol trong 24 giờ. Gộp dịch chiết, lọc qua giấy lọc rồi cô cạn ở áp suất giảm thu được 0,0505g cặn khô (cao methanol). Hòa tan cặn trong methanol, siêu âm cho tan hết cặn rồi cho vào bình định mức 10 ml, thêm methanol vừa đủ đến vạch. Lắc đều, lọc qua màng lọc millipore 0,45 μm thu được dung dịch mẫu thử dùng cho định lượng.

Các dung dịch được chuẩn bị ngay trước thí nghiệm ở cùng điều kiện và được bảo quản ở nhiệt độ 4°C trong vòng 1 tuần.

2.3.2. Khảo sát quy trình định lượng

Thăm dò một số điều kiện sắc ký khác nhau về tỷ lệ hệ dung môi pha động, bước sóng phát hiện, pH dung dịch đệm cũng như thời gian phân tích. Điều kiện sắc ký tìm được phải tách

hoàn toàn peak hoạt chất trong dung dịch mẫu thử từ cao toàn phần Chặt chịu với hệ số đối xứng của peak đạt yêu cầu, nằm trong khoảng 0,8-1,5 [15]. Các tiêu chí khảo sát gồm có thời gian lưu của chất cần định lượng, khoảng tuyến tính của nồng độ, tính đặc hiệu và độ đúng của phương pháp.

2.3.3. Điều kiện sắc ký

- Cột sắc ký Inertsil ODS-3 (RP₁₈, kích thước 250 x 4,6 mm, cỡ hạt 5 μm)
- Pha động: acetonitril – dung dịch acid phosphoric 0,3%, (pH 3,0), tỷ lệ 90:10, đẳng dòng.

- Tốc độ dòng: 1 ml/phút

- Detector UV-VIS, bước sóng phát hiện 210 nm

- Thể tích tiêm: 20μl (tiêm mẫu tự động).

2.2.4. Tính kết quả:

Hàm lượng Acid betulinic trong phần trên mặt đất của Chặt chịu theo dược liệu khô tuyệt đối được tính công thức:

$$F\% = \frac{m \times C_t \times V \times 100}{m' \times a \times (100\% - h) \times 10^6}$$

Trong đó:

F: hàm lượng acid betulinic tính theo dược liệu khô tuyệt đối (đơn vị: %)

a: khối lượng dược liệu khô (đơn vị: g)

m: khối lượng cao chiết ra từ a (g) dược liệu khô (đơn vị: g)

m': khối lượng cao dùng để chuẩn bị mẫu thử (đơn vị: g)

h: độ ẩm của mẫu dược liệu (đơn vị: %)

C_t: nồng độ acid betulinic trong mẫu thử đem định lượng (đơn vị: μg/ml)

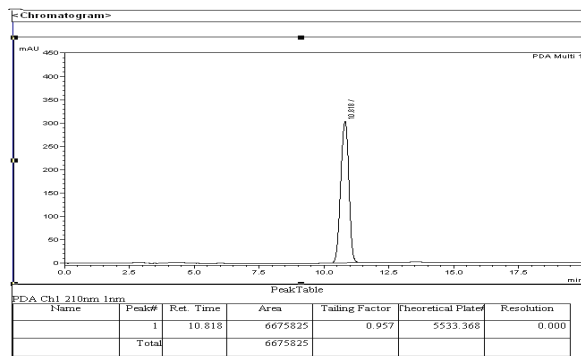
V: thể tích dung dịch mẫu thử (đơn vị: ml).

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Qui trình định lượng

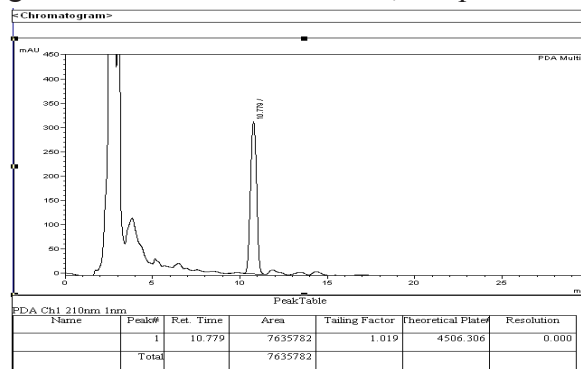
3.1.1. Sắc ký đồ của mẫu đối chiếu và dịch methanol từ dược liệu

Với điều kiện sắc ký đã lựa chọn, pic mẫu acid betulinic đối chiếu có thời gian lưu ở 10,818 phút (Hình 1).



Hình 1. Thời gian lưu và diện tích dưới đường cong của mẫu chuẩn.

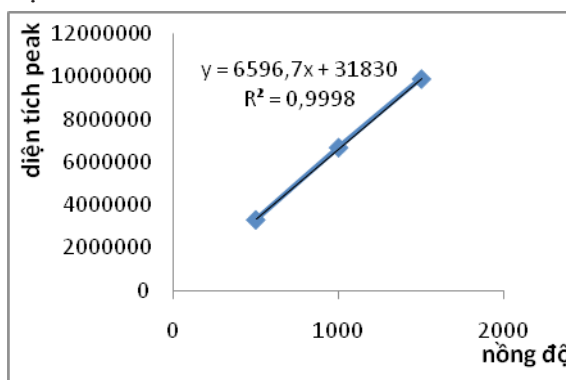
Trong sắc ký đồ của mẫu thử (Hình 2), xuất hiện pic có thời gian lưu trùng với thời gian lưu của mẫu chuẩn ở 10,779 phút.



Hình 2: Thời gian lưu và diện tích dưới đường cong của mẫu thử.

3.1.2. Khoảng tuyến tính

Dung dịch chuẩn được pha với 3 nồng độ lần lượt là 500 μg/ml, 1000 μg/ml và 1500 μg/ml, mỗi mẫu tiêm 2 lần, kết quả được thể hiện ở hình 3.

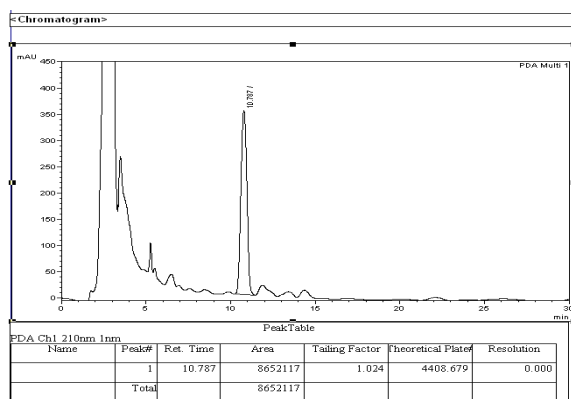


Hình 3. Đồ thị và phương trình tuyến tính của acid betulinic đối chiếu.

Phương trình hồi quy tuyến tính xây dựng được là $y = 6596,7x + 31830$, hệ số tương quan $R^2 = 0,9998$. Từ đồ thị trên cho thấy có mối liên hệ tuyến tính giữa nồng độ acid betulinic với diện tích pic thu được trong khoảng nồng độ 500-1500 $\mu\text{g/ml}$.

3.1.3. Tính đặc hiệu của phương pháp

Bằng cách thêm acid betulinic đối chiếu vào dung dịch thử nhận thấy pic hoạt chất trong dung dịch thử có thời gian lưu tương ứng với pic dung dịch chuẩn và có sự tăng lên về diện tích cũng như chiều cao pic so với trước khi thêm chuẩn (Hình 4). Như vậy phương pháp có tính đặc hiệu.



Hình 4. Thời gian lưu và diện tích dưới đường cong của mẫu thử thêm chuẩn.

3.1.4. Độ đúng của phương pháp

Độ đúng của phương pháp xây dựng được xác định bằng phương pháp thêm chuẩn. Thêm chính xác betulinic đối chiếu vào mẫu thử đã xác định hàm lượng. Xác định độ đúng theo công thức

$$\text{Rev} (\%) = \frac{c_2 - c_1}{c_0} \times 100$$

$$= \frac{c_2 - c_1}{c_0} \times 100$$

Với C_2 : nồng độ acid betulinic trong mẫu thử thêm chuẩn

C_1 : nồng độ acid betulinic trong mẫu thử

C_0 : nồng độ acid betulinic chuẩn được thêm vào.

Bảng 1. Khảo sát độ đúng của phương pháp định lượng

Nồng độ acid betulinic ($\mu\text{g/ml}$)			Độ đúng (Rev, %)
C_1	C_2	C_0	
1152,7	1283,9	131,7	99,6
1153,6	1293,9	138,6	101,2
1162,7	1306,8	141,0	102,2
Trung bình			101,0 \pm 1,31

Kết quả $\text{Rev} = 101,0\%$ (trung bình của 3 lần xác định, độ lệch chuẩn $\text{SD} = 1,31$) cho thấy phương pháp có độ đúng cao, có thể sử dụng để định lượng acid betulinic trong mẫu được liệu.

3.2. Xác định hàm lượng acid betulinic trong dược liệu

Nồng độ acid betulinic trong mẫu thử được xác định theo phương trình hồi quy $y = 6596,7x + 31830$ với x là nồng độ acid betulinic trong dung dịch, y là diện tích pic tương ứng. Hàm lượng acid betulinic (F,%) trong dược liệu chắc chắn được tính theo công thức ở mục 2.2.5. Kết quả được trình bày ở Bảng 2.

Bảng 2. Hàm lượng acid betulinic trong mẫu thử

Lần tiêm	Thời gian lưu (phút)	Diện tích pic	Nồng độ acid betulinic ($\mu\text{g/ml}$)	Hàm lượng betulinic trung bình (%)
1	10,779	7635782	1152,7	1,069%
2	10,786	7641767	1153,6	

4. BÀN LUẬN

Do có nhiều tác dụng sinh học đáng chú ý, đặc biệt là chống ung thư và chống HIV [4], [7], acid betulinic được rất nhiều nhà khoa học quan tâm trong vòng 2 thập kỷ vừa qua.

$$F\% = \frac{m \times C_t \times V \times 100}{m' \times a \times (100\% - h) \times 10^6}$$

Các nghiên cứu chủ yếu là bán tổng hợp các dẫn xuất của nó để định hướng đến ứng dụng trong lâm sàng [5-8]. Cũng đã có nhiều nghiên cứu về phương pháp định lượng hoạt chất này trong các dược liệu khác nhau và đều sử dụng các phương pháp sắc ký [16-21]. Các nghiên cứu có thể sử dụng sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) với các detector khác nhau [16-18], sắc ký lớp mỏng hiệu năng cao HPTLC [19], hay sử dụng gas chromatography với detector là phổ khối (GC-MS) [20], [21]. Dược động học của acid betulinic cũng đã được nghiên cứu trên mô hình in vivo bằng phương pháp LC-MS [22]. Việc sử dụng các phương pháp sắc ký hiện đại sẽ cho kết quả tin cậy hơn do trong các mẫu dược liệu luôn luôn chứa nhiều triterpenoid, khó tách bằng các phương pháp thông thường. Acid betulinic cũng không hấp thụ mạnh ánh sáng UV-VIS, chỉ hấp thụ dải ngắn 190-220 nm do có liên kết đôi C-12/C-13 trong phân tử. Trong công trình này, việc xác định hàm lượng acid betulinic trong Chắc chùi (*T. scandens*) được lựa chọn là sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC, sử dụng detector UV ở bước sóng 205 nm. Qua khảo sát cho

thấy, các thông số được lựa chọn cho phương pháp định lượng hoạt chất này trong dược liệu Chắc chùi cho kết quả đáng tin cậy, có thể dễ dàng thực hiện được ở các cơ sở kiểm nghiệm hay nghiên cứu. Kết quả cho thấy hàm lượng của acid betulinic trong phần trên mặt đất của Chắc chùi là 1,069%, tính theo dược liệu khô tuyệt đối.

Với triển vọng được sử dụng để làm thuốc hoặc được dùng để bán tổng hợp thuốc của betulinic, các nhà khoa học dự đoán có nhiều những ứng dụng mới của nó trong y học trong thời gian sắp tới [4], [8]. Kết quả của nghiên cứu này gợi ý việc khai thác sử dụng dược liệu Chắc chùi, một cây thuốc mọc phổ biến ở Việt Nam, cho nguyên liệu làm thuốc trong tương lai.

5. KẾT LUẬN

Công trình nghiên cứu đã xác định được hàm lượng hoạt chất acid betulinic trong phần trên mặt đất của Chắc chùi *Tetracera scandens* (Dilleniaceae) bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao, detector UV-VIS là 1,069%, tính theo khối lượng dược liệu khô tuyệt đối.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Connolly J. D., Hill. R. A., 2005. Triterpenoids. *Nat. Prod. Rep.* 2005, 22, 487-503.
2. Tan Y., Yu R., Pezzuto J. M., 2001. Betulinic acid-induced programmed cell death in Human melanoma cells involves mitogen-activated protein kinase activation. *Clin. Cancer Res.* 9, 2866-2875.
3. Mullauer F. B., Kessler J. H., Medema J. P., 2010. Betulinic acid, a natural compound with potent anticancer effects. *Anticancer Drugs* 21, 215-227.
4. Cichewicz R. H., Kouzi S. A., 2004. Chemistry, biological activity, and chemotherapeutic potential of betulinic acid for the prevention and treatment of cancer and HIV infection. *Med. Res. Rev.* 24, 90-114.
5. Kashiwada Y., Hashimoto F., Cosentino L. M., Chen C. H., Garrett P. E., Lee K. H., 1996. Betulinic acid and dihydrobetulinic acid derivatives as potent anti-HIV agents. *J. Med. Chem.* 39, 1016-1017.
6. Aiken C., Chen C. H., 2005. Betulinic acid derivatives as HIV-1 antivirals. *Trends Mol. Med.* 11, 31-36.
7. Yogeewari P., Sriram D., 2005. Betulinic acid and its derivatives: a review on their biological properties. *Curr. Med. Chem.* 12, 657-666.
8. Lee K. H., 2010. Discovery and development of natural product-derived chemotherapeutic agents based on a medicinal chemistry approach. *J. Nat. Prod.* 73, 500-516.

9. Pavanasasivam G., Sultakrawa M. U. S., 1974. Betulinic acid in the *Dilleniaceae* and review of its natural distribution. *Phytochemistry*, 13, 2002-2006.
10. Na Z., Li C.M., Zheng H.L., Sun H.D., 2001. The chemical constituents from *Tetracera asiatica*. *Acta Botanica Yunnanica* 23, 400-402.
11. Ma J., Starck S.R., Hecht S.M., 1999. DNA polymerase beta inhibitors from *Tetracera boiviniana*. *J. Nat. Prod.* 62, 1660-3.
12. Harrison L.J., Sia G.L., Sim K.Y., 1994. 5,7-Dihydroxy-8-methoxyflavone from *Tetracera indica*. *Planta Med.* 60, 493-494.
13. Võ Thị Bạch Yến, Phạm Thái Sơn, Nguyễn Thị Như Vân, Nguyễn Trung Nhân, 2008. Nghiên cứu thành phần hóa học của thân cây dây chiềù (*Tetracera scandens*), họ SỔ (*Dilleniaceae*). Tóm tắt báo cáo Hội nghị Khoa học lần VI, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Tp Hồ Chí Minh.
14. Nguyễn Trang Thúy, Nguyễn Thị Hoài, Ngô Thị Quỳnh Mai, Trịnh Thị Điệp, Ngô Quốc Luật, Nguyễn Minh Khởi, Phương Thiện Thương, 2010. Các flavonoid phân lập được từ cây Chặt chịu, Tạp chí Dược liệu, tập 15, số 5, 290-294.
15. Bộ Y tế, 2009. *Dược điển Việt Nam IV*. NXB Y học, Hà Nội, phụ lục 122.
16. De Oliveira B. H., Santos C. A. M., Espíndola A. P. D. M., 2002. Determination of the triterpenoid, betulinic acid, in *Doliocarpus schottianus* by HPLC. *Phytochem. Anal.* 13, 95-98.
17. Zhang M., Zhang Y., Xie J., 2008. Simultaneous determination of jujuboside A, B and betulinic acid in semen *Ziziphi spinosae* by high performance liquid chromatography-evaporative light scattering detection. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 48, 1467-1470.
18. Kumar D., Mallick S., Vedasiromoni J. R., Pal B. C., 2010. Anti-leukemic activity of *Dillenia indica* L. fruit extract and quantification of betulinic acid by HPLC. *Phytomedicine* 17, 431-435.
19. Pandey R., Verma R. K., Gupta M. M. 2007. High-performance thin-layer chromatographic method for quantitative determination of 4 α -methyl-24 β -ethyl-5 α -cholesta-14,25-dien-3 β -ol, 24 β -ethylcholesta-5,9(11),22 E -trien-3 β -ol, and betulinic acid in *Clerodendrum inerme*. *J. Separ. Sci.* 30, 2086-2091.
20. Pérez-Camino M. C., Cert A., 1999. Quantitative determination of hydroxy pentacyclic triterpene acids in vegetable oils. *J. Agric. Food Chem.* 47, 1558-1562.
21. Razborssek M. I., Voncina D. B., Dolecek V., Voncina E., 2008. Determination of oleanolic, betulinic and ursolic acid in *Lamiaceae* and mass spectral fragmentation of their trimethylsilylated derivatives. *Chromatographia* 67, 433-440.
22. Cheng X., Shin Y. G., Levine B. S., Smith A. C., Tomaszewski J. E., van Breemen R. B. 2003. Quantitative analysis of betulinic acid in mouse, rat and dog plasma using electrospray liquid chromatography/mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 17, 2089-2092.