

# HPLC-ELSD 同时测定枇杷叶中 6 种三萜酸成分的含量

蔡雪萍<sup>1,2</sup>, 李松林<sup>2</sup>, 华俊磊<sup>1,2</sup>, 吕寒<sup>3</sup>, 李维林<sup>3</sup>, 鞠建明<sup>2\*</sup>

(1. 南京中医药大学药学院, 南京 210046; 2. 江苏省中医药研究院, 南京 210028;  
3. 江苏省中科院植物研究所, 南京 210014)

**[摘要]** 目的: 建立 HPLC-ELSD 同时测定枇杷叶中 6 种三萜酸成分含量的方法。方法: 采用 Ultimate XB C<sub>18</sub> 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈-甲醇-0.5% 醋酸铵溶液, 梯度洗脱, 流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 柱温 35 °C, 蒸发光散射检测器漂移管温度 95 °C, 氮气流速 2.5 L·min<sup>-1</sup>。结果: 蔷薇酸、委陵菜酸、马斯里酸、科罗索酸、齐墩果酸、熊果酸分别在 0.436 ~ 2.180, 0.392 ~ 1.960, 0.39 ~ 1.960, 0.856 ~ 4.280, 0.424 ~ 2.120, 1.592 ~ 7.960 μg, 进样质量对数值与峰面积对数值呈良好线性关系; 平均回收率分别为 98.9% (RSD 3.8%), 96.3% (RSD 2.7%), 97.7% (RSD 2.6%), 97.6% (RSD 3.2%), 96.6% (RSD 1.9%), 102.5% (RSD 2.5%)。结论: 建立的含量测定方法简便、准确、分离效果好、重复性好, 为更好地控制枇杷叶药材质量提供试验依据。

**[关键词]** 枇杷叶; 蔷薇酸; 委陵菜酸; 马斯里酸; 科罗索酸; 齐墩果酸; 熊果酸

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)01-0084-04

## Simultaneous Determination of Content of Six Triterpene Acids in *Eriobotrya japonica* by HPLC-ELSD

CAI Xue-ping<sup>1,2</sup>, LI Song-lin<sup>2</sup>, HUA Jun-lei<sup>1,2</sup>, LV Han<sup>3</sup>, LI Wei-lin<sup>3</sup>, JU Jian-ming<sup>2\*</sup>

(1. School of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China;

2. Jiangsu Province Academy of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210028, China;

3. Institute of Botany, Jiangsu Province and Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210014, China)

**[Abstract]** **Objective:** To establish an HPLC-ELSD method for simultaneous quantitation of six triterpene

**[收稿日期]** 20120824(002)

**[基金项目]** 江苏省产学研前瞻性联合研究项目(BY2009144)

**[第一作者]** 蔡雪萍, 在读硕士, 从事中药新剂型新工艺研究, Tel: 15850500785, E-mail: caixueping880315@163.com

**[通讯作者]** \* 鞠建明, 硕士, 副研究员, 硕士生导师, 从事中药新剂型与新工艺及中药材质量控制研究, Tel: 025-85639640, E-mail: jjm405@sina.com

[5] Xagorari A, Papapetropoulos A, Mauromatis A, et al. Luteolin inhibits an endotoxin-stimulated phosphorylation cascade and proinflammatory cytokine production in macrophage [J]. *J Pharm Exp Ther*, 2001, 296(1): 181.

[6] 张洁, 李宝泉, 冯峰, 等. 裸花紫珠的化学成分及其止血活性研究 [J]. *中国中药杂志*, 2010, 35(24): 3297.

[7] 巩珺, 麦锦富, 彭素萍, 等. Doehlert 设计法优化紫珠中苯乙醇苷的提取工艺 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2011, 17(17): 7.

[8] 胡蓉, 姚闯, 李玉云. HPLC 法测定裸花紫珠药材中木

犀草素的含量 [J]. *中药新药与临床药理*, 2009, 20(3): 271.

[9] 李才堂, 文萍, 虞金宝, 等. 高效液相色谱法测定裸花紫珠药材中游离子型和结合型木犀草素的含量 [J]. *中国新药杂志*, 2010, 19(21): 2008.

[10] 张艳秋, 洪金波, 刘文林. HPLC 法测定裸花紫珠中齐墩果酸与熊果酸的含量 [J]. *海南医学院学报*, 2009, 15(1): 5.

[11] 李才堂, 文萍, 郭琦丽, 等. HPLC 测定裸花紫珠药材中毛蕊花糖苷的含量 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2012, 18(1): 84.

[责任编辑 顾雪竹]

acids from *Eriobotrya japonica*. **Method:** Samples were analyzed with Ultimate XB C<sub>18</sub> column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) and eluted with acetonitrile-methanol-0.5% ammonium acetate solution as mobile phases in gradient mode, flow rate was 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, column temperature of 35 °C, drift tube temperature of ELSD was set at 95 °C, and flow rate of nitrogen was 2.5 L·min<sup>-1</sup>. **Result:** There were good linear relationship between natural logarithm of peak areas and injection quality at the range of 0.436-2.180, 0.392-1.960, 0.39-1.960, 0.856-4.280, 0.424-2.120, 1.592-7.960 μg for rosolic acid, tormentic acid, maslinic acid, corosolic acid, oleanolic acid, ursolic acid, respectively. The average recoveries of these six triterpene acids were 98.9% (RSD 3.8%), 96.3% (RSD 2.7%), 97.7% (RSD 2.6%), 97.6% (RSD 3.2%), 96.6% (RSD 1.9%), 102.5% (RSD 2.5%), respectively. **Conclusion:** This established method was simple, accurate and repeatable with good separation, it could provide experimental basis for a better quality control of *E. japonica*.

[**Key words**] *Eriobotrya japonica*; rosolic acid; tormentic acid; maslinic acid; corosolic acid; oleanolic acid; ursolic acid

枇杷叶具有清肺止咳、降逆止呕的作用,临床用于治疗肺热咳嗽、气逆喘急、胃热呕逆、烦热口渴等症<sup>[1]</sup>。其化学成分有三萜酸、黄酮类、多酚、倍半萜及糖苷类等,但药理学作用主要集中在三萜酸的抗炎止咳、降血糖、抗病毒和抗氧化等<sup>[2]</sup>。枇杷叶中的三萜酸类成分主要有蔷薇酸、委陵菜酸、马斯里酸、科罗索酸、齐墩果酸和熊果酸6种。目前关于枇杷叶中三萜酸的含量测定已有一些报道<sup>[3-5]</sup>,但均采用紫外检测器,三萜酸为紫外末端吸收,采用紫外检测器测定含量干扰较大。本课题组对文献报道的HPLC-UV测定方法进行了重复试验,结果发现重复性较差,基线漂移、噪音大且有的成分分离度<1.5。故本试验探索采用HPLC-ELSD测定不同产地枇杷叶中6种三萜酸类成分的含量,建立了稳定可靠且重复性好的测定方法,为更好地控制中药材枇杷叶的质量提供科学依据。

## 1 材料

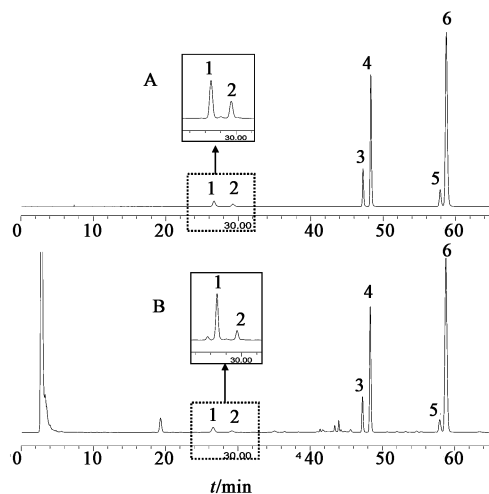
2695型高效液相色谱仪(美国Waters),AB204-5型1/万及AT201型1/10万电子天平(瑞士METTLER),Coulter Microfuge 16型台式微量离心机(美国Beckman公司),Milli-Q型纯水器(美国Millipore公司)。

齐墩果酸、熊果酸对照品(中国药品生物制品检定所,批号分别为110709-200505,110742-200518),蔷薇酸、委陵菜酸、科罗索酸及山楂酸对照品(由江苏省中国科学院植物研究所从枇杷叶中提取分离,经核磁共振光谱鉴定,高效液相,蒸发光散射检测检查,归一化纯度均>98%),甲醇、乙腈为色谱纯,水为超纯水,其余试剂均为分析纯。枇杷叶购自江苏省药材公司,由江苏省中医药研究院中药资源研究室钱士辉研究员鉴定为蔷薇科枇杷属植

物枇杷 *Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl. 的干燥叶。

## 2 方法与结果

**2.1 色谱条件** AlltimaC<sub>18</sub>色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈(A)-甲醇(B)-0.5%醋酸铵(C)梯度洗脱(0~30 min,5%~10% A,55% B;30~40 min,10%~28% A,55% B;40~60 min,28%~32% A,55% B;60~65 min,28%~32% A,55% B),流速1.0 mL·min<sup>-1</sup>,柱温35 °C,ELSD漂移管温度95 °C,氮气流速2.5 L·min<sup>-1</sup>,放大系数1,撞击器关,进样量10 μL,以外标两点对数方程计算样品的含量。在此条件下,6个三萜酸成分与其相邻峰均能达到基线分离,且分离度>1.5。见图1。



A. 对照品; B. 样品; 1. 蔷薇酸; 2. 委陵菜酸;  
3. 马斯里酸; 4. 科罗索酸; 5. 齐墩果酸; 6. 熊果酸

图1 枇杷叶中6种三萜酸类HPLC

**2.2 对照品溶液的制备** 分别精密称取蔷薇酸、委陵菜酸、马斯里酸、科罗索酸、齐墩果酸及熊果酸对照品适量,用甲醇配制成含蔷薇酸、委陵菜酸、马斯

里酸、科罗素酸、齐墩果酸、熊果酸 0.218, 0.196, 0.196, 0.428, 0.212, 0.796  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  的对照品混合溶液。

**2.3 供试品溶液的制备** 称取枇杷叶粉末 1 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 20 mL, 密塞, 称定质量, 超声处理 (500 W, 40 kHz) 60 min, 放冷, 甲醇补足减失质量, 摇匀, 用 0.45  $\mu\text{m}$  微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

**2.4 线性关系考察** 精密吸取混合对照品溶液 2, 4, 6, 8, 10  $\mu\text{L}$  注入液相色谱仪, 按上述色谱条件测定。以 6 种三萜酸进样质量 ( $M$ ) 的对数值为横坐标, 峰面积 ( $A$ ) 的对数值为纵坐标, 得回归方程蔷薇酸  $\lg A = 1.55 \lg M + 5.15$  ( $r = 0.999 0$ ), 委陵菜酸  $\lg A = 1.46 \lg M + 4.91$  ( $r = 0.999 7$ ), 马斯里酸  $\lg A = 1.76 \lg M + 5.70$  ( $r = 0.999 9$ ), 科罗素酸  $\lg A = 1.76 \lg M + 5.68$  ( $r = 0.999 8$ ), 齐墩果酸  $\lg A = 1.71 \lg M + 5.52$  ( $r = 0.999 8$ ), 熊果酸  $\lg A = 1.71 \lg M + 5.56$  ( $r = 0.999 8$ )。线性范围分别为 0.436 ~ 2.180, 0.392 ~ 1.960, 0.392 ~ 1.960, 0.856 ~ 4.280, 0.424 ~ 2.120, 1.592 ~ 7.960  $\mu\text{g}$ 。

**2.5 精密度试验** 取 2.2 项下混合对照品溶液, 按上述色谱条件连续进样 6 次, 计算蔷薇酸、委陵菜酸、马斯里酸、科罗素酸、齐墩果酸、熊果酸的峰面积 RSD 分别为 2.3%, 3.1%, 2.9%, 2.5%, 2.5%, 2.4%, 表明仪器精密度良好。

**2.6 稳定性试验** 精密吸取同一份供试品溶液, 分别于 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 进样测定, 结果蔷薇酸、委陵菜酸、马斯里酸、科罗素酸、齐墩果酸、熊果酸含量的 RSD 分别为 2.4%, 2.2%, 3.1%, 2.9%, 2.6%, 2.7%。表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

**2.7 重复性试验** 精密称取同一批枇杷叶样品粉末 6 份, 按 2.3 项下方法制备供试品溶液, 测定并计算含量。测得药材中蔷薇酸、委陵菜酸、马斯里酸、科罗素酸、齐墩果酸、熊果酸的平均含量分别为 2.49, 1.64, 2.17, 4.80, 1.96, 8.92  $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ , RSD 分别为 3.0%, 3.7%, 3.4%, 3.2%, 2.3%, 2.2%, 表明该方法重复性良好。

**2.8 加样回收率试验** 取已知含量的枇杷叶粉末 0.5 g, 共 6 份, 精密称定, 分别精密加入蔷薇酸、委陵菜酸、马斯里酸、科罗素酸、齐墩果酸、熊果酸对照品 1.37, 0.89, 1.25, 2.63, 1.14, 4.68 mg, 按 2.3 项下方法制备供试液, 进样 10  $\mu\text{L}$ , 计算平均回收率, 结果 6 种三萜酸的平均回收率分别为 98.9%, 96.3%, 97.7%, 97.6%, 96.6%, 102.5%; RSD 分别

为 3.8%, 2.7%, 2.6%, 3.2%, 1.9%, 2.5%。结果见表 1。

表 1 枇杷叶中 6 种三萜酸的加样回收率

对照品	样品 中质量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均 回收率 /%	RSD /%
蔷薇酸	2.63	1.37	4.02	101.5	98.9	3.8
	2.87	1.37	4.23	99.3		
	2.41	1.37	3.67	92.0		
	2.49	1.37	3.84	98.5		
	2.78	1.37	4.19	102.9		
	2.67	1.37	4.03	99.3		
委陵菜酸	1.71	0.89	2.59	98.9	96.3	2.7
	1.75	0.89	2.62	97.8		
	1.78	0.89	2.64	96.6		
	1.84	0.89	2.66	92.1		
	1.63	0.89	2.47	94.4		
	1.84	0.89	2.71	97.8		
马斯里酸	2.28	1.25	3.56	102.4	97.7	2.6
	2.35	1.25	3.55	96.0		
	2.39	1.25	3.61	97.6		
	2.16	1.25	3.39	98.4		
	2.24	1.25	3.43	95.2		
	2.45	1.25	3.66	96.8		
科罗素酸	5.08	2.63	7.60	95.8	97.6	3.2
	5.03	2.63	7.52	94.7		
	5.26	2.63	7.92	101.1		
	5.17	2.63	7.85	101.9		
	5.19	2.63	7.73	96.6		
	5.33	2.63	7.84	95.4		
齐墩果酸	2.05	1.14	3.14	95.6	96.6	1.9
	2.16	1.14	3.27	97.4		
	2.22	1.14	3.35	99.1		
	2.31	1.14	3.41	96.5		
	2.37	1.14	3.48	97.4		
	2.35	1.14	3.42	93.9		
熊果酸	9.25	4.68	14.12	104.1	102.5	2.5
	9.16	4.68	13.78	98.7		
	9.29	4.68	14.15	103.8		
	9.21	4.68	13.97	101.7		
	9.38	4.68	14.33	105.8		
	9.18	4.68	13.91	101.1		

**2.9 样品测定** 精密称取不同产地枇杷叶样品粉末,按2.3项下方法制备供试品溶液,按上述色谱条件进样测定,外标法计算枇杷叶中各三萜酸含量。结果见表2。

表2 不同产地枇杷叶中6种三萜酸含量( $n=3$ )  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$

产地	蔷薇酸	委陵菜酸	马斯里酸	科罗索酸	齐墩果酸	熊果酸	总三萜酸
安徽	2.59	1.88	2.24	4.97	2.03	9.16	22.87
广西	7.36	3.48	4.40	7.09	3.29	12.58	38.20
福建	5.56	2.95	3.82	6.45	2.77	11.16	32.71
广东	7.04	5.12	3.51	6.30	2.80	10.44	35.21
浙江	2.56	1.84	1.83	4.01	1.78	7.18	19.20
江苏南京(新鲜叶经60℃干燥)	1.75	0.60	1.73	3.79	2.84	13.08	23.79

### 3 讨论

枇杷叶中的6种三萜酸成分为乌苏烷型及齐墩果烷型三萜酸,其结构式中无共轭体系,紫外吸收不明显,只在末端210 nm左右出现双键的吸收峰,用常见的紫外检测器测定时干扰较大,色谱峰分离较差且梯度洗脱时基线易漂移。ELSD为质量型检测器,适用于紫外吸收弱的成分的含量测定,且可使用梯度洗脱的分离条件,解决使用紫外检测器时基线漂移且噪音大的问题<sup>[6-7]</sup>。

本试验曾分别采用乙腈-0.5%醋酸铵溶液和甲醇-0.5%醋酸铵溶液<sup>[8]</sup>作为流动相,结果发现,前者无法使蔷薇酸和委陵菜酸这对非对映异构体分开,而后者无法使齐墩果酸和熊果酸的分离度达到要求,于是采用乙腈-甲醇-0.5%醋酸铵溶液为流动相,并采用梯度洗脱使6种三萜酸类成分达到较好的分离,分离度均>1.5。

综合来看,不同产地枇杷叶质量差异较大,其中广西、广东产枇杷叶药材中总三萜酸的含量较高,而浙江、江苏和安徽产枇杷叶药材中总三萜酸的含量较低。各产地气候、土壤等环境条件可能是影响三萜酸含量的重要因素。

### [参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:190.
- [2] 李婷,林文津,徐榕青,等. 枇杷叶的化学成分和药理作用研究进展[J]. 中国野生植物资源, 2010, 29(5):11.
- [3] 陈龙胜,忻畅,许舒雯,等. RP-HPLC同时测定枇杷叶中4种三萜酸[J]. 中草药,2008,39(9):1411.
- [4] 吕寒,习超鹏,陈剑,等. 不同生长季节枇杷叶中三萜酸成分的含量变化[J]. 中国中药杂志,2009,34(18):2353.
- [5] Li E N, Luo J G, Kong L Y. Qualitative and quantitative determination of seven triterpene acids in *Eriobotrya japonica* Lindl. by High-performance Liquid Chromatography with photodiode array detection and mass spectrometry[J]. Phytochem Anal, 2009, 20(4):338.
- [6] 陈千良,孙小明,王文全,等. HPLC-ELSD法同时测定知母药材中2种皂苷含量[J]. 中国中药杂志,2011,36(4):474.
- [7] 叶雪兰,高英,李卫民,等. HPLC-UV-ELSD同时测定知母黄柏药对提取物中盐酸小檗碱、黄柏碱、知母皂苷B II[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(8):122.
- [8] 毛红梅,平欲晖,宗星星,等. HPLC同时测定败酱草中常春藤皂苷元、齐墩果酸和熊果酸的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(15):89.

[责任编辑 全燕]