

HPLC 测定藤梨根中熊果酸、齐墩果酸的含量

邸学¹, 王海波^{1,2}, 翟延君^{1*}, 潘蕾¹

(1. 辽宁中医药大学药学院, 辽宁 大连 116600; 2. 沈阳药科大学中药学院, 沈阳 110016)

[摘要] 目的: 建立藤梨根药材中熊果酸、齐墩果酸的含量测定方法, 对不同品种、产地药材进行测定。方法: 采用反向高效液相色谱法, 色谱柱为 ZORBA × 300SB-C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相甲醇-0.5% 醋酸铵 (76:24), 流速为 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 25 °C, 检测波长 210 nm。结果: 熊果酸在 0.492 ~ 2.460 μg 线性关系良好 ($r = 0.9997$), 平均回收率为 97.6%, RSD 1.8%; 齐墩果酸在 0.448 ~ 2.240 μg 线性关系良好 ($r = 0.9999$), 平均回收率为 98.7%, RSD 0.6%。结论: 该方法简单、准确并且专属性强, 可作为藤梨根药材质量控制方法。

[关键词] 藤梨根; 熊果酸; 齐墩果酸; 高效液相色谱

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)01-0066-03

Determination of Oleanolic Acid and Ursolic Acid in Radix Actinidiae by RP-HPLC

DI Xue¹, WANG Hai-bo^{1,2}, ZHAI Yan-jun^{1*}, PAN Lei¹

(1. School of Pharmaceutical Sciences, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China; 2. School of Traditional Chinese Medicines, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

[Abstract] **Objective:** HPLC method was established for determination of ursolic acid and oleanolic acid in Radix Actinidiae. **Method:** HPLC was carried out on ZORBA × 300SB-C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) at 25 °C using methanol-0.5% ammonium acetate (76:24) as mobile phase with a flow rate of 1.0 mL·min⁻¹ and detection wavelength was at 210 nm. **Result:** Linear correlation ($r = 0.9997$) of the peak area and the concentration of ursolic acid over the concentration range 0.492-2.460 mg·L⁻¹ was obtained. Linear correlation ($r = 0.9999$) of the peak area and the concentration of oleanolic acid over the concentration range 0.448-2.240 mg·L⁻¹ was obtained. The average recovery was 97.6%, 98.7% and RSD was 1.8%, 0.6%. **Conclusion:** The method is simple, rapid and accurate. It can be used for the quality control of Radix Actinidiae.

[Key words] Radix Actinidiae; ursolic acid; oleanolic acid; RP-HPLC

藤梨根为猕猴桃科猕猴桃属植物中华猕猴桃或软枣猕猴桃的根。分布在长江流域以南各地, 具清热解毒、活血散结、祛风功效, 用于风湿性关节炎、淋巴结核、跌打损伤、痈疔等^[1]。我国民间常用藤梨

根治疗癌症, 有一定的疗效^[2]。文献记载藤梨根为临床常用抗癌中药, 目前尚缺少相应的质量评价方法。熊果酸、齐墩果酸为本品的主要有效成分, 它们的含量直接影响藤梨根药材的质量。本研究对自采的来源于软枣猕猴桃的藤梨根及商品药材藤梨根中的熊果酸和齐墩果酸进行含量测定, 为藤梨根药材的质量控制提供科学依据。

1 仪器与试剂

1100 Series 高效液相色谱仪 (美国 Agilent 公司), ACCULAB ALC-110.4 1/万天平 (SARTORIUS), CP225D 1/10 万天平 (SARTORIUS), KQ5200DB 型数

[收稿日期] 20110721(001)

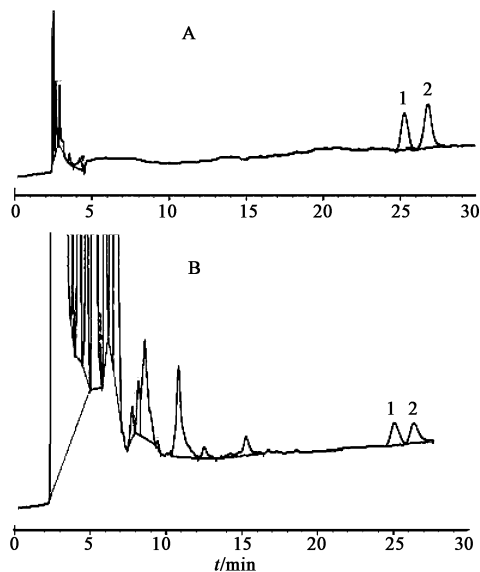
[第一作者] 邸学, 在读硕士, 实验师, 从事中药品种鉴定评价研究, Tel: 15942491966, E-mail: dix_email@163.com

[通讯作者] * 翟延君, 博士, 教授, 从事中药品种鉴定与质量标准研究, Tel: 13019499386, E-mail: lnzyzyj@sohu.com

控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。熊果酸(成都曼思特生物科技有限公司),齐墩果酸(成都曼思特生物科技有限公司),经检验纯度均超过98.0%;试验中所用甲醇为色谱纯,水为娃哈哈纯净水,其他试剂均为分析纯。所有溶液使用前均由0.45 μm孔径的滤膜过滤。自采药材经辽宁中医药大学药学院翟延君教授鉴定为来源于软枣猕猴桃 *Actinidia arguta* (Sieb. & Zucc.) Planch. ex Miq. 的根,商品药材为来源于中华猕猴桃 *A. chinensis* Planch. 的根。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱为 ZORBA × 300SB-C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相甲醇-0.5% 乙酸铵(76:24), 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 25 °C, 检测波长 210 nm, 见图 1。



1. 齐墩果酸; 2. 熊果酸; A. 对照品; B. 供试品

图 1 藤梨根 HPLC

2.2 对照品溶液的制备 精密称取熊果酸、齐墩果酸适量,加甲醇制成含熊果酸 0.090 4 g·L⁻¹, 齐墩果酸 0.112 g·L⁻¹ 的溶液, 摇匀即得。

2.3 供试品溶液的制备 分别称取样品粉末各 3 g, 精密称定, 置于 100 mL 具塞锥形瓶中, 加入 80% 乙醇 25 mL 超声 40 min (2 次) 取续滤液, 合并滤液, 水浴蒸干, 残渣加甲醇溶解, 定容至 5 mL 棕色量瓶中, 摇匀, 用微孔滤膜 (0.45 μm) 过滤, 取续滤液备用。进样量为 20 μL。

2.4 标准曲线的绘制 分别精密吸取 0.123 g·L⁻¹ 的熊果酸和 0.112 g·L⁻¹ 的齐墩果酸 (4, 8, 12, 16, 20 μL) 对照品溶液注入高效液相色谱仪, 在上述色谱

条件下测定峰面积。以峰面积为纵坐标, 以对照品的量为横坐标, 分别绘制标准曲线。得回归方程分别为熊果酸 $Y = 27.899X - 76.707$, $r = 0.9997$; 齐墩果酸 $Y = 17.645 - 37.39$, $r = 0.9999$ 。熊果酸、齐墩果酸分别在 0.492 ~ 2.46, 0.448 ~ 2.24 μg 呈良好线性关系。

2.5 精密度试验 分别精密吸取同一熊果酸、齐墩果酸对照品溶液各 10 μL, 分别重复进样 6 次, 测定峰面积, RSD 分别为 1.5%, 1.4%, 表明仪器精密度良好。

2.6 重复性试验 分别取同一样品, 按 2.3 项下制备方法, 分别制备 5 份供试品溶液, 按 2.2 项下测定条件分别测定熊果酸、齐墩果酸的含量, RSD 分别为 1.1%, 1.5%。表明方法重复性较好。

2.7 稳定性试验 分别精密吸取同一熊果酸、齐墩果酸测定供试品溶液 10 μL, 分别于 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 h 注入高效液相色谱仪, 分别测定熊果酸、齐墩果酸峰面积, 其 RSD 分别为 1.3%, 1.3%, 表明样品中熊果酸、齐墩果酸均在 12 h 内稳定。

2.8 加样回收率试验 分别取已知含量的样品 6 份, 精密称定, 分别加入一定量的熊果酸和齐墩果酸, 测定熊果酸、齐墩果酸的含量, 计算加样回收率, 结果见表 1, RSD 均 < 2%, 表明方法具有良好的准确度。

2.9 样品含量测定 分别取不同产地 8 批样品, 按 2.3 项下方法制备供试品溶液和 2.2 项下色谱条件下进行测定, 用外标法计算样品中熊果酸和齐墩果酸含量, 结果见表 2。

3 讨论与结论

3.1 提取溶剂的选择 考察了甲醇、乙醇 (100%, 95%, 80%)、乙醚、氯仿各溶剂超声、回流、索氏提取 3 种提取方法。确定其最佳提取工艺参数为 80% 乙醇超声提取 40 min, 有利于藤梨根中熊果酸和齐墩果酸的含量测定, 可有效减少干扰物质。

3.2 检测波长的选择 由于熊果酸、齐墩果酸两者是同分异构体, 给分离带来一定难度, 且两者无共轭体系, 紫外吸收波长较短, 而在 210 nm 处两者灵敏度较高, 其他色谱峰干扰较少, 分离最为理想, 因此本试验选 210 nm 测熊果酸、齐墩果酸的含量。

3.3 流动相的选择 参考有关文献^[3-4], 对甲醇-1% 醋酸体系、乙腈-0.1% 磷酸体系、甲醇-磷酸三乙胺体系、甲醇-乙酸铵体系作为流动相, 按不同比例进行研究, 经过优化、筛选而确定的。采用甲醇-

表 1 熊果酸、齐墩果酸加样回收率试验

成分	样品量 /g	样品含量 /mg	加入量 /mg	测得总量 /mg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
熊果酸	1.503 1	0.067 0	0.06 6	0.133 5	100.7	97.6	1.8
	1.502 3	0.067 1	0.06 8	0.132 5	96.1		
	1.503 6	0.067 2	0.06 5	0.132 0	99.7		
	1.501 6	0.066 9	0.06 7	0.131 5	96.4		
	1.502 1	0.067 2	0.06 5	0.132 0	99.7		
	1.503 2	0.066 9	0.06 6	0.131 4	97.7		
齐墩果酸	1.501 2	0.078 1	0.07 7	0.155 3	100.2	98.7	0.6
	1.502 5	0.078 0	0.07 6	0.155 0	101.2		
	1.501 4	0.077 9	0.07 8	0.154 4	98.1		
	1.501 7	0.078 2	0.07 7	0.154 6	99.2		
	1.502 6	0.078 1	0.07 8	0.155 2	98.8		
	1.502 2	0.078 3	0.07 7	0.155 6	100.4		

表 2 藤梨根中熊果酸、齐墩果酸的含量 ($n=3$) $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$

No.	样品产地/收集地	品种	熊果酸	齐墩果酸
1	千山中沟	藤梨根(软枣猕猴桃)	0.287	0.645
2	千山南沟	藤梨根(软枣猕猴桃)	0.122	0.456
3	牡丹江林场	藤梨根(软枣猕猴桃)	0.279	0.618
4	牡丹江二林场	藤梨根(软枣猕猴桃)	0.450	0.510
5	陕西西安	藤梨根(软枣猕猴桃)	0.317	0.236
6	安徽亳州	藤梨根(中华猕猴桃)	0.235	0.378
7	河北安国	藤梨根(中华猕猴桃)	0.286	0.504
8	湖北宜昌	藤梨根(中华猕猴桃)	0.247	0.527

0.5% 乙酸胺 (76:24), 基线平稳, 峰形、分离度效果较佳, 可以对熊果酸、齐墩果酸准确定量。

齐墩果酸具有消炎, 增强免疫力, 抑制血小板聚集, 降血糖等多方面的临床药理作用, 是治疗急性黄疸型肝炎和慢性病毒性肝炎较理想的药物, 且毒性低, 不良反应少, 而熊果酸具有多种生物活性, 尤其在抗肿瘤、抗氧化、抗炎保肝、降血脂方面的作用显

著。采用 HPLC 对藤梨根中熊果酸、齐墩果酸的含量进行了测定, 结果显示自采药材的含量普遍高于商品药材的含量, 提示应关注市售的藤梨根饮片的质量。各种样品的含量差异可能与藤梨根品种、产地、采收季节等因素有关, 可为藤梨根的品种鉴定、采收时间及质量评价研究提供参考。

[参考文献]

- [1] 中国药典. 一部[S]. 1978;552.
- [2] 王铁僧, 朱玉芳, 王铁明, 等. 江、浙地区民间及临床常用抗癌中草药的原植物整理和应用介绍[J]. 中药材, 1992, 15(1):16.
- [3] 李喜凤, 郝哲, 邱天宝, 等. 反相高效液相色谱法测定蒲公英中齐墩果酸的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(5):52.
- [4] 陈宝龙, 冯坤, 郑朝华, 等. 山楂中齐墩果酸和熊果酸的测定[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(5):73.

[责任编辑 蔡仲德]