

含齐墩果酸和熊果酸的 10 种果实类中药 HPLC 分析

查孝柱, 谢晓梅*, 吕美红, 周安, 刘先华
(安徽中医学院现代中药安徽省重点实验室, 合肥 230031)

[摘要] 目的: 建立高效液相色谱法测定 10 种果实类中药材: 山茱萸、山楂、女贞子、木瓜、乌梅、连翘、石榴皮、柿蒂、夏枯草以及榧楂中齐墩果酸与熊果酸的含量, 并进行色谱图比较, 探讨其鉴别特征信息。方法: 使用 Shim-pack CLC-ODS 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-水-冰醋酸-三乙胺 (265 35 0.1 0.05), 流速 0.6 mL·min⁻¹, 二极管阵列检测器, 检测波长为 210 nm。结果: 连翘、夏枯草和女贞子齐墩果酸、熊果酸总含量较高; 10 种中药材在所建立方法的检测和分析中表现出一定的鉴别特征。结论: 该法简便、准确、重现性好, 可用于这些含有齐墩果酸与熊果酸的果实类中药材的含量测定, HPLC 的谱图信息分析也为该 10 种中药材鉴定提供了初步的实验资料。

[关键词] 果实类中药材; 齐墩果酸; 熊果酸; 高效液相色谱法

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2010)18-0060-03

Analysis of Fruits from Ten Chinese Medicinal Herbs Containing Oleanolic Acid and Ursolic Acid by HPLC

ZHA Xiao-zhu, XIE Xiao-mei*, LV Mei-hong, ZHOU An, LIU Xian-hua
(Anhui College of Traditional Chinese Medicine, Anhui Key Laboratory of Modernized Chinese Medicine, Hefei 230031, China)

[Abstract] Objective: To establish an HPLC method for simultaneous determination of oleanolic acid and ursolic acid from ten fruits of Chinese medicinal herbs, including Fructus Corni, Fructus Crataegi, Fructus Ligustri, Fructus Chaenomelis, Fructus Mume, Fructus Forsythiae, Pericarpium Granati, Calyx Kaki, Spica Prunellae and Fructus Chaenomelis Sinensis, and their chromatograms were compared. **Method:** Oleanolic acid and ursolic acid were separated on Shim-pack CLC-ODS (M) (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) with mobile phase consisted of methanol-water-glacial acetic acid-triethylamine (265 35 0.1 0.05) at a flow rate of 0.6 mL·min⁻¹. The detective wavelength was set at 210 nm by photodiode array detector (PDAD). **Result:** The total contents of oleanolic acid and ursolic acid from Fructus Forsythiae, Spica Prunellae and Fructus Ligustri were higher than that of others. Some identification characteristics were shown in the analysis of ten kinds of Chinese herbal medicines under the conditions in this paper. **Conclusion:** This method was simple, accurate and reproducible, and suitable for the analysis of these drugs. The chromatogram information may be useful for the identification of the ten fruits from Chinese medicinal herbs.

[Key words] fruits of Chinese medicinal herbs; oleanolic acid; ursolic acid; HPLC

齐墩果酸 (oleanolic acid, OA) 和熊果酸 (ursolic acid, UA) 均为五环三萜类化合物; 是多种中药材含

有的活性成分; 有保肝、消炎、抗肿瘤、降血脂、增强免疫和抑制免疫 (免疫双向调节作用) 等作用^[1-2]。检测方法有分光光度法^[3]、薄层扫描法^[4]和高效液相色谱法^[5-6]。本文采用高效液相色谱法-二极管阵列检测 (HPLC-PDA) 对含有齐墩果酸和熊果酸的常用 10 种果实类中药材: 山茱萸 Fructus Corni、山楂 Fructus Crataegi、女贞子 Fructus Ligustri、木瓜 Fructus

[收稿日期] 20100624(001)

[第一作者] 查孝柱, 生药学专业硕士研究生

[通讯作者] * 谢晓梅, 硕士, 教授, 研究方向: 中药质量分析, Tel: 0551-5169230, E-mail: xiexiaomei9401@sina.com

Chaenomelis、乌梅 Fructus Mume、连翘 Fructus Forsythiae、石榴皮 Pericarpium Granati、柿蒂 Calyx Kaki、夏枯草 Spica Prunellae 以及 榧 楂 Fructus Chaenomelis Sinensis 进行分离检测, 并对谱图和含量测定结果进行比较分析, 旨在为含齐墩果酸和熊果酸的果实类中药材的质量分析与控制提供实验资料和科学依据。

1 材料

1.1 仪器 Agilent1100 高效液相色谱仪 (G1311A 泵、G1322 脱气机、G1313AZ 自动进样器、G1313A 柱温箱、G1315 DAD; ChemStation 色谱工作站); BP221D 电子天平 (德国 Sartorius 公司); KQ-250DB 数控超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); 石英亚沸高纯水提取器 (江苏金城教学仪器厂)。

1.2 试药 齐墩果酸和熊果酸对照品 (批号 110709-200304, 110742-200516) 购自中国药品生物制品检定所; 实验所用药材样品来自安徽中医学院中药标本中心, 经安徽中医学院周建理教授和刘鹤龄主任鉴定; 水为亚沸水, 甲醇为色谱纯, 其他试剂为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适用性试验^[7] 色谱柱 Shim-pack CLC-ODS (M) 柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相 甲醇-水-冰乙酸-三乙胺 (265 35 0.1 0.05); 检测波长 210 nm; 柱温 20 °C; 进样量 20 μL; 理论塔板数按齐墩果酸峰计应不低于 8 000; 齐墩果酸与熊果酸色谱峰及其相邻峰分离度均大于 1.5。

2.2 对照品溶液的制备 精密称取齐墩果酸对照品和熊果酸对照品适量, 置 10 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 制成各含 0.1 g·L⁻¹ 的混合溶液, 即得。

2.3 供试品溶液的制备 取样品细粉约 0.5 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加甲醇 25 mL, 密塞, 称定质量, 室温浸渍 2 h, 再称定质量, 用甲醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.4 含量测定 取临床常用的含有齐墩果酸和熊果酸的 10 种果实类药材, 按 2.3 项下制备供试品溶液, 按 2.1 项下色谱条件进行测定; 外标法计算含量, 结果见表 1。

表 1 10 种果实类中药材中齐墩果酸和熊果酸含量测定 (n=2)

中药名称	齐墩果酸	熊果酸	总含量	中药名称	齐墩果酸	熊果酸	总含量
连翘	5.87	4.33	10.2	柿蒂	1.25	3.53	4.78
夏枯草	7.65	1.79	9.44	山茱萸	0.850	1.44	2.29
女贞子	6.65	2.38	9.03	乌梅	1.14	0.93	2.07
木瓜	2.31	3.17	5.48	榧楂	0.810	0.91	1.72
山楂	0.900	3.97	4.87	石榴皮	0.650	0.34	0.99

2.5 色谱特征信息提取 在相同坐标系下比较 10 种供试品 HPLC 谱图 (见图 1, 其中 1 为齐墩果酸, 2 为熊果酸), 以各供试品中熊果酸峰为参照物峰, 其相对保留时间和相对峰面积记为 1, 计算色谱图中达到分离度要求的其他各峰与参照物峰间的保留时间比及峰面积的比值 (Ar), 取 Ar 值大于 2.0% 的峰列于表 2。图 2 显示出在保留时间约 10 min 之后, 各供试品存在 4 ~ 8 个色谱峰, 不同品种色谱图中峰

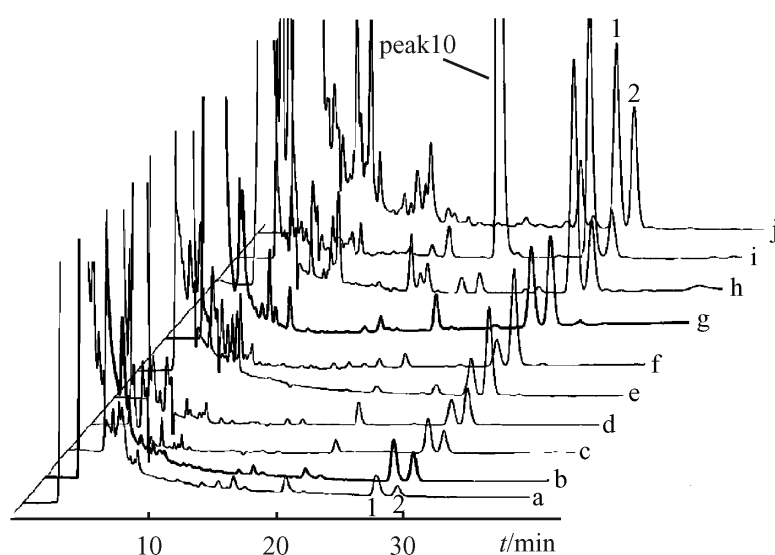


图 2 10 种果实类中药材 HPLC

a. 石榴皮; b. 榧楂; c. 乌梅; d. 山茱萸; e. 柿蒂; f. 山楂; g. 木瓜; h. 女贞子; z. 夏枯草; j. 连翘; 1. 14 号峰; 2. 15 号峰数、峰位和峰强度表现出一定差异性。

3 讨论

用所建立 HPLC 测定 10 种果实类中药表明, 这些中药同时存在齐墩果酸和熊果酸; 有文献仅报道

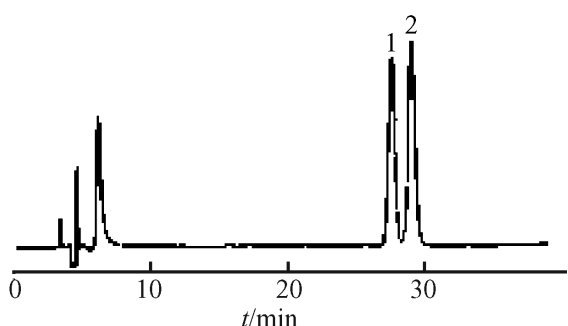


图 1 对照品 HPLC

1. 齐墩果酸; 2. 熊果酸

表 2 含齐墩果酸和熊果酸的 10 种果实类中药材相对保留时间 / 相对峰面积值

药材	Peak1	Peak2	Peak3	Peak4	Peak5	Peak6	Peak7	Peak8
连翘							0.56/0.041	
夏枯草		0.34/0.33			0.47/0.069	0.52/0.15	0.57/0.46	
女贞子	0.26/0.27			0.44/0.043		0.52/0.48		
木瓜	0.27/0.43	0.33/0.23					0.56/0.092	
山楂	0.28/0.37					0.52/0.031	0.56/0.034	0.61/0.023
柿蒂								
山茱萸		0.35/0.064	0.38/0.033			0.52/0.087	0.56/0.080	
乌梅	0.26/0.40							
槲楂						0.53/0.067	0.57/0.16	
石榴皮					0.48/0.28	0.52/0.37	0.56/0.83	

药材	Peak9	Peak10	Peak11	Peak12	Peak13	Peak14	Peak15 (S)	Peak16	number of Peaks
连翘		0.71/0.044	0.82/0.041	0.85/0.51	0.89/0.094	0.95/1.5	1/1		7
夏枯草		0.70/28.5				0.94/5.4	1/1	1.4/0.31	8
女贞子	0.66/0.19	0.70/0.23				0.95/3.4	1/1	1.4/0.28	8
木瓜		0.70/0.30				0.95/0.90	1/1		6
山楂	0.65/0.062	0.71/0.11				0.95/0.29	1/1		8
柿蒂		0.70/0.048		0.86/0.11		0.95/0.43	1/1		4
山茱萸		0.71/0.46				0.96/0.74	1/1		7
乌梅		0.71/0.44				0.96/1.5	1/1		4
槲楂		0.71/0.27				0.95/1.4	1/1		5
石榴皮		0.70/1.4				0.94/2.3	1/1		6

其中 1 种成分含量,是因为没有将这两种成分分离开来。检测发现在 10 种果实中药中,齐墩果酸和熊果酸含量高低存在明显差异,含量比值也不相同;从测定结果可知,连翘、夏枯草和女贞子齐墩果酸、熊果酸总含量较高;夏枯草中齐墩果酸和熊果酸 2 种成分的含量差异较大,前者约是后者的 5 倍。

图 1 和表 2 显示,在所用的提取、分离和检测条件下,10 种中药除了有齐墩果酸和熊果酸峰之外,都有 10 号峰(未知成分),最具特征的是夏枯草,有一个很强的 10 号峰;但是各样品的色谱图中峰数、峰位和峰强度又表现出一定差异性,这些色谱信息特征是否可重复、稳定的表现出各样品的鉴别特征有待增加同种样品批数作进一步研究。

在对多种中药中齐墩果酸与熊果酸的分离检测中发现,采用十八烷基硅烷键合硅胶色谱柱需要兼顾 C₁₈ 色谱柱的个性、流动相的组成及洗脱强度(包括酸和碱的比例)、流速和分离温度等的共同影响。试验中考察了 9 支色谱柱结果显示,对于填料 5 μm 粒径、长度在 250 mm C₁₈ 柱,温度在 25 以下时较易获得稳定的分离结果,其中在 Shim-pack 和依利特色谱柱上容易实现齐墩果酸和熊果酸分离;在 150 mm 长度的 C₁₈ 柱,填料粒径在 5 μm 时较难以达到基线分离,减小填料粒径至 3 μm 时,150 mm 柱长的色谱柱也可达到要求的分离效果。对不同柱温下分离组分的色谱行为考察发现,降低柱温对分离有利。PDAD 显示在 210 nm 有稳定的、较为灵敏的检

测信号和平直的基线。在所建立的色谱条件下,齐墩果酸与熊果酸之间分离度均较好 ($R > 1.68$),与相邻组分色谱峰分离度也达到规定要求。

[参考文献]

[1] Liu J. Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid [J]. J Ethnopharm, 1995, 49: 57.

[2] Lubos C, Lubica G, Eva M, et al. Dual activity of triterpenoids: apoptotic versus antidifferentiation effects [J]. Arch Toxicol, 2006, 80: 429.

[3] 洪艳平,尹忠平,上官新晨,等. 光皮木瓜总三萜化合物提取和含量测定 [J]. 江西农业大学学报, 2007, 29 (2): 225.

[4] 严华,张聿梅,林瑞超. 原位预处理-薄层扫描法同时测定女贞子中齐墩果酸与熊果酸的含量 [J]. 药物分析杂志, 2009, 29(7): 1107.

[5] 谢莹,杭太俊,程赞,等. 高效液相色谱法测定中药中齐墩果酸和熊果酸含量 [J]. 中国中药杂志 2001, 26(9): 615.

[6] 李东,何伶. 高效液相色谱-蒸发光散射检测法同时测定木瓜中齐墩果酸和熊果酸含量 [J]. 中国医院药学杂志, 2005, 25(3): 259.

[7] 吕美红,谢晓梅,查孝柱,等. 反相高效液相色谱法测定木瓜药材及饮片中齐墩果酸和熊果酸含量 [J]. 安徽中医学院学报, 2010, 29(3): 72.

[责任编辑 顾雪竹]