

山楂中齐墩果酸和熊果酸的测定

陈宝龙^{1*}, 冯坤¹, 郑朝华², 陈玉英²

(1. 河南省正骨研究院, 河南 洛阳 471002; 2. 中国药科大学分析化学教研室, 南京 210009)

[摘要] 目的: 建立测定山楂果中齐墩果酸和熊果酸含量的高效液相色谱法。方法: 采用 C₁₈ 色谱柱, 甲醇-水-磷酸-三乙胺(87 13 0.2 0.04) 为流动相, 流速 0.9 mL·min⁻¹, 35℃, 检测波长 210 nm。结果: 齐墩果酸和熊果酸的分离度 > 1.4; 方法学考察符合液相色谱法的要求; 山楂药材中齐墩果酸含量 > 0.5 mg·g⁻¹; 熊果酸含量 > 1.9 mg·g⁻¹。结论: 该法简便、灵敏、分离度高、专属性好, 适用于山楂中齐墩果酸和熊果酸的含量测定。

[关键词] 山楂果; 齐墩果酸; 熊果酸; 含量测定; 高效液相色谱

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)05-0073-03

Determination of Oleanic Acid and Ursonic Acid in Crude Hawthorn Berry by HPLC

CHEN Bao-long^{1*}, FENG Kun¹, ZHENG Zhao-hua², CHEN Yu-ying²

(1. Institute of Traditional Chinese Orthopedics and Traumatology of Henan Province, Luoyang 471002, China;
2. Department of Analytical Chemistry, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

[Abstract] Objective: To establish an HPLC method for determination the content of Oleanic acid and Ursonic acid in crude hawthorn berry. **Method:** The HPLC analysis was carried out through C₁₈ column with detection wavelength set at 210 nm and the temperature set at 35℃. The mobile phase was composed of MeOH-H₂O-H₃PO₄-TEA (87 13 0.2 0.04) at a flow rate of 0.9 mL·min⁻¹. **Result:** The separation of Oleanic acid and Ursonic acid was 1.4; the methodologic validation conformed to requirement of liquid chromatography. The content of Oleanic acid and Ursonic acid in crude hawthorn berry was more than 0.5 mg·g⁻¹ and 1.9 mg·g⁻¹, respectively. **Conclusion:** The HPLC method can be used in the routine analysis of Oleanic acid and Ursonic acid in crude hawthorn berry.

[Key words] Crude hawthorn berry; Oleanic acid; Ursonic acid; Determination; HPLC

齐墩果酸和熊果酸是已确知的山楂三萜酸类代表性化学成分, 二者结构相近且含量差别较大, 故需进行分离测定以便更好地控制山楂药材及其制剂的质量。

由于齐墩果酸和熊果酸为同分异构体, 用 HPLC 同时进行含量测定具有一定的难度。本研究在参考文献资料基础上^[1-3], 经区域搜索优化后确定了齐

墩果酸和熊果酸 RP-HPLC 分析方法。方法学研究表明本分析方法基本稳定、可靠。

1 材料

LC-10AT 型高效液相色谱仪(日本岛津公司), SPD-10A 型 UV-Vis(日本岛津公司), N2000 色谱工作站(浙江大学智能信息工程研究所), 甲醇(色谱纯)、磷酸(分析纯)、三乙胺(分析纯)、重蒸水(自制), 对照品: 齐墩果酸、熊果酸(中国药品生物制品检定所)。

山楂果药材: 产自山东济南, 经本单位药物室李军研究员鉴定为蔷薇科植物山里红 *Crataegus pinnatifida* Bge. var. *major* N. E. Br 的干燥成熟果实。

[收稿日期] 2009-10-26

[通讯作者] * 陈宝龙, Tel: (0379) 63546653; E-mail: CBL0002@126.com

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Lichrospher ODS C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 200 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-水-磷酸-三乙胺 (87:13:0.2:0.04), 流速为 0.9 mL·min⁻¹, 检测波长为 210 nm, 柱温 35℃, 进样量 20 μL, 采用峰面积外标法定量。

2.2 对照品溶液的制备 精密称取齐墩果酸和熊果酸对照品各 10.0 mg, 分别置于 100 mL 量瓶中, 用甲醇水溶液溶解, 稀释至刻度, 摇匀, 作为对照品溶液备用 (100.0 μg·mL⁻¹)。

2.3 供试品溶液的制备 称取干燥的山东济南山楂果粉各 4.0 g, 以 95% 乙醇溶液为提取溶剂, 分别采取索氏提取、热回流提取和超声提取 3 种方式 (提取液定容至 100 mL) 制备供试品溶液; 以三氯甲烷为提取溶剂, 分别采取索氏提取和超声提取方式 (提取液定容至 100 mL) 制备供试品溶液。

2.4 系统适用性试验 分别吸取齐墩果酸和熊果酸对照品溶液各 5.0 mL, 置于 10 mL 量瓶中, 摇匀, 在选定的色谱条件下用 3 只不同 ODS 柱 (Lichrospher C₁₈ ODS 柱 (4.6 mm × 200 mm, 5 μm, 10 nm 孔径, 江苏汉邦生产)、Kromasil C₁₈ ODS 柱 (4.6 mm × 200 mm, 5 μm, 10 nm 孔径, 天津特纳生产)、Hypersil C₁₈ BDS 柱 (4.6 mm × 200 mm, 5 μm, 12 nm 孔径, 大连依利特生产), 在 3 台不同型号的液相色谱仪上于不同时间测定。理论塔板数按齐墩果酸峰计算不低于 3 000; 按熊果酸峰计算不低于 3 000; 齐墩果酸与熊果酸的分离度不小于 1.4。

2.5 线性关系考察 分别吸取齐墩果酸和熊果酸对照品溶液各 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10.0 mL, 置于 10 mL 量瓶中, 甲醇稀释至刻度, 摇匀, 作为系列标液, 在选定的色谱条件下测定, 以峰面积 *Y* 对浓度 *X* 进行线性回归, 得齐墩果酸和熊果酸的回归方程为: $Y = 3.12 \times 10^3 X - 4.82 \times 10^2$, $r = 0.9998$; $Y = 4.05 \times 10^3 X - 1.51 \times 10^2$, $r = 0.9998$; 线性范围均为 5.0 ~ 100.0 μg·mL⁻¹。

2.6 精密度试验 取线性关系的考察项下的 5 号对照品溶液, 照实验方法重复进样 6 次, 测定峰面积, 求得齐墩果酸的 RSD 为 0.40%, 熊果酸的 RSD 为 0.31%, 表明仪器的精密度良好, 对照品色谱图见图 1。

2.7 稳定性试验 取 95% 乙醇溶液超声提取工艺制备的供试液, 照实验方法在 0, 2, 4, 6, 8, 10 h 进

样, 测定峰面积, 求得齐墩果酸的 RSD 为 0.64%, 熊果酸的 RSD 为 0.26%, 表明供试液在 10 h 内稳定。

2.8 重复性试验 取 95% 乙醇溶液超声提取工艺制备的供试液 6 份, 依实验方法测定峰面积, 求得齐墩果酸的 RSD 为 3.59% ($n = 6$), 熊果酸的 RSD 为 0.26%, 表明方法有好的重复性。

2.9 加样回收试验 取 95% 乙醇溶液超声提取工艺制备的供试液, 加入一定量的对照品, 依实验方法测定峰面积, 计算含量, 求得齐墩果酸和熊果酸的平均回收率为 97.2% (RSD = 4.09%) 和 98.5% (RSD = 3.32%) ($n = 9$)。表明方法的准确度良好, 结果见表 1、表 2。

表 1 齐墩果酸加样回收率试验

No.	样品齐墩果酸的量 /mg	加入齐墩果酸的量 /mg	测出齐墩果酸总量 /mg	测出齐墩果酸加入量 /mg	回收率 /%	聊 /%	RSD /%
1	1.10	0.88	1.95	0.868	98.6		
2	1.10	0.88	1.99	0.819	93.1		
3	1.10	0.88	1.95	0.889	101.0		
4	1.10	1.10	2.16	1.060	96.6		
5	1.10	1.10	2.14	1.030	93.5	97.2	4.09
6	1.10	1.10	2.19	1.090	99.5		
7	1.10	1.32	2.45	1.370	104.0		
8	1.10	1.32	2.41	1.210	92.0		
9	1.10	1.32	2.38	1.270	96.4		

表 2 熊果酸加样回收率试验

No.	样品熊果酸的量 /mg	加入熊果酸的量 /mg	测出熊果酸总量 /mg	测出熊果酸加入量 /mg	回收率 /%	聊 /%	RSD /%
1	1.03	0.83	1.85	0.816	98.3		
2	1.03	0.83	1.81	0.780	94.0		
3	1.03	0.83	1.84	0.810	97.6		
4	1.03	1.03	2.08	1.050	102.0		
5	1.03	1.03	2.05	1.020	99.2	98.5	3.32
6	1.03	1.03	2.03	0.997	96.8		
7	1.03	1.24	2.11	1.080	105.0		
8	1.03	1.24	2.02	0.993	96.4		
9	1.03	1.24	2.03	0.999	97.0		

2.10 样品测定 取提取溶剂和提取方式选择项下制备的各供试液, 照实验方法进样, 测定峰面积, 求算齐墩果酸和熊果酸的含量, 结果见表 3、表 4, 样品色谱图见图 2。

表 3 不同提取溶剂和提取方式齐墩果酸测定 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$

No.	三氯甲烷 索氏	三氯甲烷 超声	乙醇索氏	乙醇超声	乙醇回流
1	0.59	0.53	0.54	0.56	0.59
2	0.53	0.57	0.57	0.51	0.53
3	0.49	0.50	0.50	0.54	0.51
均值 \pm SD	0.54 \pm 0.05	0.53 \pm 0.04	0.54 \pm 0.04	0.54 \pm 0.03	0.54 \pm 0.04
RSD/%	9.3	7.5	7.4	5.6	7.4

经两两间多重比较, 5 种方式间不具有显著性差异。($T=0.0499$, $P=0.05$)。

表 4 不同提取溶剂和提取方式熊果酸测定 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$

No.	三氯甲烷 索氏	三氯甲烷 超声	乙醇索氏	乙醇超声	乙醇回流
1	2.17	1.94	2.06	2.10	2.15
2	2.12	1.98	2.10	2.02	2.05
3	2.00	1.87	2.00	2.05	2.01
均值 \pm SD	2.10 \pm 0.09	1.93 \pm 0.06	2.05 \pm 0.05	2.06 \pm 0.05	2.07 \pm 0.07
RSD/%	4.29	3.11	2.44	2.43	3.38

经两两间多重比较, 5 种方式间不具有显著性差异。($T=0.0499$, $P=0.05$)

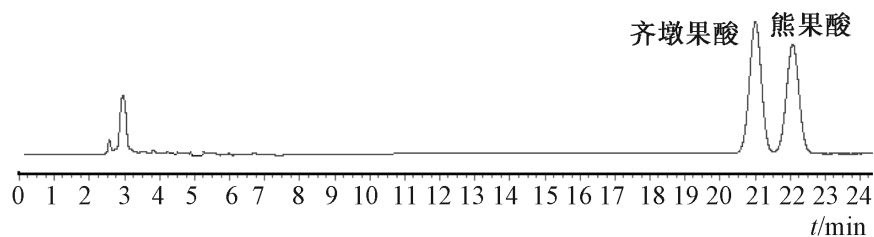


图 1 齐墩果酸和熊果酸对照品的 HPLC 图

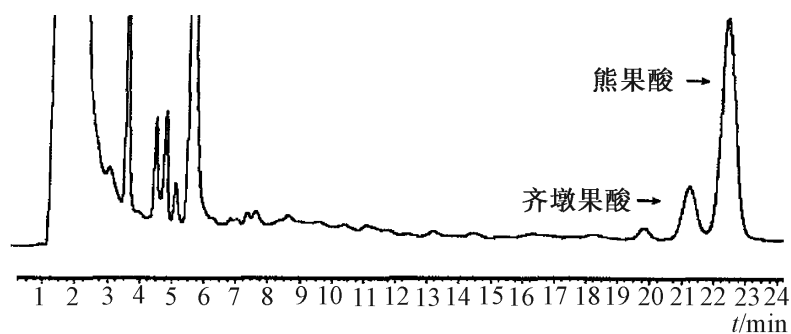


图 2 山楂提取液的 HPLC 图

3 讨论

齐墩果酸和熊果酸是目前已知山楂三萜酸类特征性成分群的代表性化学成分, 故以两者作为定量考察的对象。由于难以重复参考文献的结果, 本试验在参考的基础上, 通过系统研究对基本分析条件进行了确定, 经区域搜索优化, 建立了简便、准确、专属的 RP-HPLC 测定法。

本研究经对照品溶液全波长扫描并考虑作为流动相成分的甲醇截止波长的影响, 确定最大吸收波长 210 nm 作为测定波长。

因三萜酸类化合物带有羧基, 在甲醇—水溶液中可发生水解而成离子, 从而使其保留时间显著缩短, 相邻色谱峰的分离状况不佳。研究表明, 控制流动相的 pH 值在 2 ~3 可以抑制三萜酸类化合物及固定相硅醇基的水解, 明显改善色谱峰形, 提高分离度。同时考虑 pH 值调节试剂对测定的干扰要小, 经试验选定用磷酸及三乙胺调控流动相 pH 值。

DAD 扫描显示, 考察峰与对照品峰吸收谱图相一致, 纯度检测合格, 基本确定考察峰为单一成分。

HPLC 法测定不同提取溶剂及方法齐墩果酸和熊果酸含量的试验结果显示本试验中所采用的 5 种方式在齐墩果酸和熊果酸的提取率上并不存在明显差异。因此, 在考察山楂及其相关制剂中齐墩果酸和熊果酸含量时可选用相对方便、安全的 95% 乙醇提取方式。

[参考文献]

- [1] 谢莹, 杭太俊, 程赞, 等. HPLC 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.
- [2] 邹盛勤, 陈武. 高效液相色谱-光电二极管阵列检测器法测定野山楂中两组分的含量[J]. 食品科学, 2006, 27(11): 438.
- [3] 黄秋妹, 李宗. HPLC 法测定山楂中熊果酸和齐墩果酸的含量[J]. 海峡药学, 2007, 19(3): 43.