

• 质量标准 •

山楂饮片的质量评价研究

陈承瑜, 杨 滨*, 周 洁

(中国中医科学院中药研究所, 北京 100700)

[摘要] 目的: 建立以高效液相色谱指纹图谱与多指标成分定量相结合的山楂质量评价方法。方法: 采用高效液相色谱-紫外检测法, 以磷酸盐缓冲液(pH 3.0)-乙腈梯度洗脱。结果: 建立了山楂饮片高效液相色谱指纹图谱, 指认了 5 个色谱峰: 绿原酸, 表儿茶素, 原花青素 B₂, 异槲皮素, 及芦丁与金丝桃苷的共洗脱峰; 测定了绿原酸与表儿茶素的含量, 其中绿原酸含量为 0.03% ~ 0.06%; 表儿茶素含量为 0.09% ~ 0.43%。结论: 该方法可为山楂的质量评价研究提供实验数据。

[关键词] 山楂饮片; 高效液相色谱; 绿原酸; 表儿茶素; 多成分定量; 指纹图谱

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2009)12-0001-04

Study on Quality Evaluation of Hawthorn

CHEN Cheng-yu, YANG Bin*, ZHOU Jie

(Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a quality evaluation method of hawthorn using HPLC fingerprint and multi-ingredient quantification. **Method:** High-performance liquid chromatography coupled with a ultraviolet detector was used and the samples were performed with a mobile phase composed of phosphoric buffer (adjust pH to 3.0) and acetonitrile. **Result:** The HPLC fingerprint was established, and five chromatographic peaks, such as chlorogenic acid, epicatechin, procyanidin B₂, isoquercetin, were found in all samples; the contents of chlorogenic acid and epicatechin were in the range of 0.03% to 0.06% and 0.09% to 0.43%, respectively. **Conclusion:** The method can provide some useful experimental data for quality evaluation of hawthorn.

[Key words] Hawthorn; HPLC; chlorogenic acid; epicatechin; multi-ingredient quantification; fingerprint

山楂为蔷薇科植物山里红 *Crataegus pinnatifida* Bge. var. *major* N. E. Br 或山楂 *C. pinnatifida* Bge. 的干燥成熟果实。山楂的化学成分主要为有机酸类、酚酸类, 三萜酸类, 及黄酮类; 其中有机酸是山楂消食作用的主要成分^[1], 三萜酸与黄酮类则是山楂降血脂的主要成分^[2]。目前已建立了山楂中熊果酸、枸橼酸、槲皮素、金丝桃苷^[3-6]等成分的含量测定方法和黄酮化物的色谱指纹图谱^[7-8]。本实验在建

立山楂高效液相色谱指纹图谱的同时对山楂中绿原酸和表儿茶素含量进行测定, 将高效液相色谱指纹图谱与多指标成分定量相结合来建立山楂质量评价方法。

1 仪器与试剂

Waters Alliance 高效液相色谱仪(包括: 2695 Separations Module 四元泵、在线真空脱气机、自动进样器、柱温箱、Waters2996 二极管阵列检测器), Empower 色谱工作站(Waters 公司, 美国)。

乙腈色谱纯(美国 Fisher 公司), 甲醇色谱纯(天津四友精细化学品有限公司), 其它试剂均为分析纯。高纯水为本所自制。

对照品: 绿原酸(批号 25700, 纯度 ≥98%)、牡荆素(批号 49513, 纯度 ≥98%)、牡荆素-2''-O-鼠李糖苷

[收稿日期] 2009-07-03

[基金项目] 科研院所社会公益研究专项(2004DIB2J062); 国际合作项目(2006DFB31720)

[通讯作者] * 杨 滨, Tel: (010) 64014411-2848, E-mail: Ybinmm@hotmail.com

(批号 55608) 均购于 Fluka 公司, 表儿茶素(批号 110878-200102)、芦丁(批号 0080-9705)、金丝桃苷(批号 111521-200303) 均购于中国药品生物制品检定所, 原花青素 B₂(批号 N210, Asahi Breweries LTD 公司), 异槲皮素(批号 20311-96, 关东化学株式会社)。

本实验用山楂主要采自山东, 部分为药店市售品, 经本室杨滨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。取上述样品, 去核, 粉碎过 20 目筛。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液制备 分别精密称取适量绿原酸、表儿茶素、原花青素 B₂、异槲皮素、芦丁、金丝桃苷、牡荆素、牡荆素-2''-O-鼠李糖苷对照品, 用甲醇分别配制成 0.05, 0.28, 0.13, 0.14, 0.14, 0.22, 0.08, 0.20 mg·mL⁻¹ 的对照品溶液。

2.2 供试品溶液制备 取山楂粉末约 1 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 25 mL, 称定重量, 加热回流 2 h, 放冷, 再称定重量, 用甲醇补足缺失的重量, 摇匀, 滤过, 取续, 即得。

2.3 指纹图谱的建立

2.3.1 色谱条件 Diamonsil C₁₈ 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流速为 0.8 mL·min⁻¹; 检测波长: 325 nm 280 nm; 柱温为 35 °C; 流动相: A: 50 mM 磷酸盐缓冲液(pH 值为 3.0), B: A-甲醇-乙腈(3:2:5); 梯度洗脱: B: 18% (0~40 min), 18%~40% (40~90 min); 进样量 10 μL; 理论塔板数按绿原酸峰计为 8953, 按表儿茶素峰计为 12447。

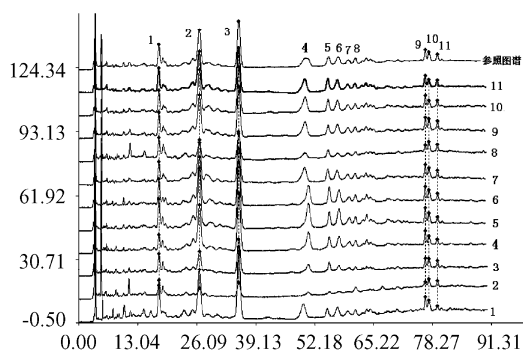


图 1 山楂样品 HPLC 指纹图谱(280 nm)

1 绿原酸; 2 原花青素 B₂; 3 表儿茶素; 10 芦丁/金丝桃苷;
11 异槲皮素; R 对照指纹图谱

2.3.2 色谱峰的归属和参照峰的选择 通过比较对照品与山楂样品色谱峰的保留时间和 UV 光谱图, 从山楂样品指纹图谱中辨认出 5 个色谱峰, 为绿原酸, 原花青素 B₂, 表儿茶素, 异槲皮素的色谱峰及

芦丁, 金丝桃苷的共洗脱峰。比较了不同的检测波长, 以 280 nm 下样品出峰的数目多, 基线平稳, 同时选取表儿茶素为参照峰, 以其为基准计算其他特征峰的相对保留时间(图 1)。

2.3.3 精密度试验 取山楂粉末样品按 2.1 方法制备供试品溶液, 供试品溶液按 2.3.1 条件连续进样 5 次, 各特征峰相对保留时间的 RSD 均小于 3.0%。

2.3.4 稳定性试验 取同一批山楂溶液按 2.3.1 项分别于 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 20 h 进样分析, 各特征峰相对保留时间的 RSD 均小于 3.0%, 结果表明供试品溶液在 20 h 内稳定。

2.3.5 重复性试验 取同一批山楂粉末, 按 2.1 方法操作, 平行制备 5 份供试品溶液, 在 2.3.1 项下分别进样, 各特征峰相对保留时间的 RSD 均小于 3.0%。

2.3.6 样品测定 取收集的 11 份山楂粉末, 按 2.1 方法操作, 分别制成供试品溶液, 按 2.3.1 项进样分析, 以药典委员会推荐的“中药色谱指纹图谱相似性评价系统(A 版)”对样品的相似度进行评价, 建立对照指纹图谱, 见图 1。

2.4 绿原酸与表儿茶素的含量测定

2.4.1 线性关系考察 分别精密称取绿原酸与表儿茶素对照品适量, 以甲醇配制成 0.066 mg·mL⁻¹ 和 0.271 mg·mL⁻¹ 的对照品溶液。在 2.3.1 项下, 分别以 1, 3, 5, 7, 9, 10 μL 进样分析, 以峰面积为纵坐标, 进样量为横坐标, 绘制回归曲线。绿原酸检测波长为 325 nm, 表儿茶素检测波长为 280 nm。绿原酸回归方程为: $Y = 3.00 \times 10^6 X + 2.11 \times 10^6$, $r = 0.999 4$, 在 0.066~0.66 μg 内进样量与峰面积具有良好线性关系; 表儿茶素回归方程为: $Y = 1.00 \times 10^6 X - 3.17 \times 10^3$, $r = 0.999 6$, 在 0.271~2.71 μg 内进样量与峰面积具有良好线性关系。

2.4.2 定量限与最小检测限 在 2.3.1 项下, 测定绿原酸与表儿茶素的定量限(信噪比 S/N=10)与最小检测限(信噪比 S/N=3), 绿原酸定量限为 0.040 μg, 最小检测限为 0.016 μg; 表儿茶素定量限为 0.400 μg, 最小检测限为 0.080 μg。

2.4.3 精密度试验 对照品溶液在 2.3.1 项下连续进样 5 次, 绿原酸峰面积 RSD 为 1.03%, 表儿茶素峰面积 RSD 为 0.85%。供试品溶液按 2.3.1 条件连续进样 5 次, 绿原酸峰面积 RSD 为 1.0%, 表儿茶素峰

面积 RSD 为 1.2%。

2.4.4 稳定性试验 取同一批对照品溶液和供试品溶液, 在 2.3.1 项下, 分别于 0, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 36, 48, 72 h 及 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 20 h 进样分析, 对照品溶液中绿原酸与表儿茶素峰面积在 0~ 72 h 的 RSD 分别为 2.0%, 2.5%, 表明对照品溶液在 72 h 内稳定。供试品中绿原酸与表儿茶素峰面积在 0~ 20 h 的 RSD 分别为 1.3%, 2.0%, 表明供试品溶液在 20 h 内稳定。

2.4.5 重复性试验 取同一批山楂粉末, 按 2.1 方法操作, 平行制备 5 份样品, 按 2.3.1 项分别进样, 绿原酸的平均含量为 0.06%, RSD 为 2.1%, 表儿茶素的平均含量为 0.43%, RSD 为 1.4%。

2.4.6 加样回收率 取已知含量的山楂粉末(0.5 g × 5 份), 精密称定, 分别精密加入绿原酸与表儿茶素对照品溶液适量, 按 2.1 方法制得供试品溶液, 在 2.3.1 项下测定, 按测定结果计算回收率, 结果见表 1~ 2。

表 1 绿原酸加样回收率试验结果

编号	称样量 (g)	样品含量 (mg)	加入量 (mg)	测得量 (mg)	加样回收 率(%)	平均回收 率(%)	RSD (%)
1	0.503 96	0.31		0.64	100.0		
2	0.503 38	0.31		0.64	100.0		
3	0.507 40	0.31	0.33	0.65	103.0	99.98	2.16
4	0.508 22	0.31		0.63	96.9		
5	0.508 32	0.31		0.64	100.0		

表 2 表儿茶素加样回收率试验结果

编号	称样量 (g)	样品含量 (mg)	加入量 (mg)	测得量 (mg)	加样回收 率(%)	平均回收 率(%)	RSD (%)
1	0.503 96	2.16		4.40	101.4		
2	0.503 38	2.16		4.46	104.1		
3	0.507 40	2.18	2.21	4.43	101.8	99.54	3.70
4	0.508 22	2.18		4.28	95.0		
5	0.508 32	2.18		4.39	100.0		

2.4.7 样品测定 取收集的 11 份样品, 按供试品溶液的制备方法操作, 分别制成样品溶液, 按上述色谱条件下测定, 11 批样品中绿原酸与表儿茶素含量见表 3。

3 讨论

3.1 色谱条件的选择 比较了磷酸盐缓冲液-乙腈系统与冰醋酸-乙腈系统, 结果表明前者主要峰分离度较好, 在此条件下比较 13 个不同梯度对 HPLC 图谱的影响, 结果以现行色谱条件最佳。本试验在山

表 3 山楂饮片样品测定(n=2, %)

序号	样品来源	绿原酸	表儿茶素
1	山东平邑	0.06	0.43
2	寿光	0.03	0.09
3	青州(烘干)	0.04	0.22
4	青州(晾干)	0.03	0.37
5	烟台	0.06	0.42
6	临沂	0.05	0.35
7	济南	0.05	0.32
8	淄博	0.04	0.17
9	北京同仁堂参茸有限责任公司	0.05	0.32
10	北京永安堂药店	0.05	0.29
11	国医堂中医医院	0.05	0.29

楂样品中未检出牡荆素、牡荆素-2''-O-鼠李糖苷, 这与文献报道它们主要集中在叶子上是一致的^[9]。由于芦丁与金丝桃苷的化学结构相似, 仅在糖基的结构上有差异, 在本实验的色谱条件下它们的色谱峰为共洗脱峰。枸橼酸极性较大, 槲皮素极性较小, 两者在该色谱条件下均为未被洗脱出峰。

3.2 检测波长的选择 采用二极管阵列检测器在 200~ 400 nm 检测, 绿原酸在 325 nm, 表儿茶素在 280 nm 下存在最大吸收峰, 故在含量测定时, 选择 280 nm 与 325 nm 分别作为绿原酸、表儿茶素的测定波长。

3.3 供试品溶液制备方法的选择 比较了药材的粒度, 提取溶剂, 提取方法及提取时间, 结果表明药材去核粉碎过 20 目筛, 甲醇回流 2 h, 提取完全。

3.4 指纹图谱研究 在 280 nm 下, 供试品共有峰面积占总峰面积 85%; 除 2、7、8 号样品外, 其余样品色谱图与对照指纹图谱的相似度大于 0.9。不同批次山里红均含有表儿茶素、绿原酸、原花青素 B₂、异槲皮素等成分, 但是其含量存在差异。

3.5 样品测定 山东各产地山楂中绿原酸与表儿茶素的含量存在差异, 其中绿原酸含量为: 0.03%~ 0.06%; 表儿茶素含量为: 0.09%~ 0.43%。就产地上看两类成分均以山东寿光地区最低, 山东平邑地区最高; 另外, 从表 3 中也可看出, 不同的干燥方式会影响表儿茶素的含量: 3 号与 4 号样品来自同一产地, 前者为烘干品后者为晾干品, 前者表儿茶素含量明显低于后者。

[参考文献]

[1] 高光跃, 冯毓秀, 秦秀琴. 山楂类果实的化学成分分析及其质量评价[J]. 药学学报, 1995, 30(2): 138-143.

- [2] 李贵海, 孙敬勇, 张希林, 等. 山楂降血脂有效成分的实验研究[J]. 中草药, 2002, 33(1): 50-52.
- [3] 谢颖, 吴春红, 谢宝金. HPLC-ELSD 法测定山楂中熊果酸和齐墩果酸含量的研究[J]. 中草药, 2004, 35(12): 1417-1418.
- [4] 杨滨, 李化, 汤树良, 等. 高效液相色谱法测定山楂中枸橼酸的含量[J]. 中国中药杂志, 2004, 29(11): 697-699.
- [5] 张永超, 哈云利, 唐大力, 等. 高效液相色谱法测定山楂中芦丁和槲皮素的含量[J]. 化学工程师, 2006, 126(3): 53-54.
- [6] 张忠会, 秦婷, 王惠达, 等. RP-HPLC 法测定山楂提取物中金丝桃苷的含量[J]. 中草药, 2004, 35(8): 884-885.
- [7] 陈宝龙, 郑朝华, 陈玉英. 山楂药材黄酮类成分 HPLC 指纹图谱的研究[J]. 中国新药杂志, 2005, 14(1): 80-82.
- [8] 汤树良, 杨滨, 黄璐琦, 等. 山楂高效液相指纹图谱研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2004, 10(4): 9-13.
- [9] 陈佳, 宋少江, 宋宁. 山楂叶及其提取物中 2''-O-2 鼠李糖牡荆素和牡荆素的含量测定[J]. 中国药学(英文版), 2006, 15(1): 51-54.