

· 论著 ·

HPLC法同时测定山楂提取物中齐墩果酸和熊果酸的含量

毛玲^{1,2}, 韦国兵¹, 叶霁², 周柏伦^{2,3}, 林轶男⁴ (1.江西中医药大学药学院, 江西南昌 330004; 2.第二军医大学药学院, 上海 200433; 3.广东药科大学中药学院, 广东广州 510006; 4.上海交通大学药学院, 上海 200240)

[摘要] 目的 采用 HPLC 法建立山楂提取物中齐墩果酸和熊果酸的含量测定方法, 为山楂提取物的质量控制提供依据。方法 Agilent Zorbax SB C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流速 0.8 ml/min, 柱温 25 °C, 以甲醇(A)-0.06 mol/L 乙酸钠溶液(B)(85:15, V/V)为流动相, 等度洗脱 30 min, 检测波长 210 nm。结果 齐墩果酸和熊果酸分别在 0.496~2.480 μg、0.498~9.960 μg 范围内与峰面积呈良好线性关系($r > 0.999 5$), 经重复性、精密度、加样回收率、稳定性试验, 结果均符合《中华人民共和国药典》(2015年版)方法验证的要求。结论 该方法可为山楂提取物及其制剂的质量控制提供依据。

[关键词] 山楂提取物; 齐墩果酸; 熊果酸; 质量控制; 高效液相色谱法

[中图分类号] R284.1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2016)06-0537-04

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2016.06.014

Simultaneous determination of oleanolic acid and ursolic acid in Hawthorn extract by HPLC

MAO Ling^{1,2}, WEI Guobing¹, YE Ji², ZHOU Bailun^{2,3}, LIN Yinan⁴ (1.School of Pharmacy, Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330004, China; 2.School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 3.School of Traditional Chinese Materia Medica, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China; 4.School of Pharmacy, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200240, China)

[Abstract] **Objective** To establish a HPLC method for simultaneous determination of oleanolic acid and ursolic acid and provide the basis for quality control of Hawthorn extract. **Methods** Chromatographic separation was performed on Agilent Zorbax SB C₁₈ column(250 mm×4.6 mm, 5 μm) with mobile phase of methanol (A)-0.06 mol/L ammonium acetate solution (B) (85:15, V/V) under isocratic elution for 30 min. The flow rate was set at 0.8 ml/min and the detection was set at the wavelength of 210 nm. **Results** Oleanolic acid and ursolic acid showed good linearity ($r > 0.999 5$) in the ranges of 0.496-2.480 g and 0.498-9.960 g, respectively. Repeatability, precision, recovery and stability were conform to the method validation requirements of China Pharmacopoeia. **Conclusion** The method could provide the basis for the quality control of Hawthorn extract and its preparation.

[Key words] Hawthorn extract; oleanolic acid; ursolic acid; quality control; HPLC

中药山楂的原植物为蔷薇科植物山里红(*Crataegus pinnatifid* Bge. var. *major* N.E.Br.)或山楂(*Crataegus pinnatifida* Bge.)的干燥成熟果实^[1]。动物实验研究表明, 从山楂不同部位提取到的成分均具有显著的降血脂、降血压的药理作用^[2-4]。临床上, 由山楂经一系列提取工艺制成的中成药山楂精降脂片已广泛用于高脂血症、冠心病、心绞痛等多种疾病的治疗^[5-7], 其主要原料即为山楂提

取物。目前对山楂的活性成分分析的报道主要是针对有机酸类和黄酮类成分^[8,9], 而对山楂中三萜类成分的研究较少, 且尚未见对山楂提取物质量控制的研究报道。同时, 《中华人民共和国药典》(2015年版, 简称《药典》)仅收录了山楂的质量标准^[1], 缺乏山楂提取物的质量标准。因此, 建立完善的山楂提取物质量标准十分必要。

山楂的化学成分复杂多样, 其有机酸类、黄酮类、三萜类成分已被证明是主要的药理活性成分^[10], 而三萜类化合物(如熊果酸和齐墩果酸)则是降血脂、降血压的主要活性成分。为了更有效地控制山楂提取物的质量, 本研究从色谱柱、流速、柱温、流动相、洗脱条件、检测波长等方面对山楂提取物中

[基金项目] 国家自然科学基金(81502957)

[作者简介] 毛玲, 硕士研究生. Tel: 13127590386; E-mail: 13127590386@163.com

[通讯作者] 叶霁, 讲师, 研究方向: 中药质量控制. Tel: (021) 81871248; E-mail: catheline620@163.com

三萜类成分齐墩果酸($C_{30}H_{48}O_3$)和熊果酸($C_{30}H_{48}O_3$)进行了优化,在中药制剂含量测定 HPLC 方法学研究的基础上,采用 HPLC 法建立山楂提取物齐墩果酸和熊果酸含量测定的新方法。该法简便,准确度和重现性均较好,适用于山楂提取物的质量控制研究。

1 仪器和材料

1.1 仪器 BP 211D 十万分之一电子天平(德国 Sartorius)、Agilent HP-1100 高效液相色谱仪(美国 Agilent)、KUDOS 超声波清洗器(上海科导超声仪器有限公司)、超纯水仪(美国 Milipore)。

1.2 药品与试剂 熊果酸对照品、齐墩果酸对照品(中国药品生物制品检定所,批号:110742-200505、110742-200516)。山楂提取物 12 批(福建汇天生物药业,批号:120402、121206、121207、121208、121211、121213、121215、130102、130105、130204、130301、130305)。水(Milli-Q 超纯水),甲醇(色谱级,美国 J.T Baker),乙酸铵(分析纯,美国 Anaqua Chemicals Supply)。

2 实验方法

2.1 供试品溶液的制备 精密称定山楂提取物粉末 0.5 g,置磨口锥形瓶中,加入甲醇 50 ml,密塞,精密称重,超声处理 30 min,冷却至室温,再精密称定重量,甲醇补足失重,充分摇匀,用 0.25 μm 微孔滤膜过滤,滤液即山楂提取物供试品溶液。

2.2 对照品溶液的制备 取齐墩果酸对照品 1 mg 和熊果酸对照品 5 mg,置 10 ml 容量瓶中,精密称定,加甲醇至刻度,配制成含齐墩果酸 0.1 mg/ml、熊果酸 0.5 mg/ml 的混合溶液。

2.3 色谱条件 色谱柱:Agilent Zorbax SB C₁₈ 柱(250 mm \times 4.6 mm, 5 μm),检测波长:210 nm,流速:0.8 ml/min,柱温:25 $^{\circ}\text{C}$,流动相:甲醇-0.06 mol/L 乙酸铵(85:15, V/V),等度洗脱 30 min。

3 方法学验证

3.1 系统适用性试验 取山楂提取物供试品溶液、齐墩果酸和熊果酸混合对照品溶液,按“2.3”项下色谱条件,进样 5 μl 。齐墩果酸、熊果酸对照品溶液的保留时间分别为 23.816 和 25.248 min,山楂提取物中齐墩果酸、熊果酸的保留时间分别为 23.512 和 24.919 min。齐墩果酸和熊果酸的理论塔板数均 $>$ 10 000,色谱峰分离度分别为 10.23 和 1.55。结果

见图 1。

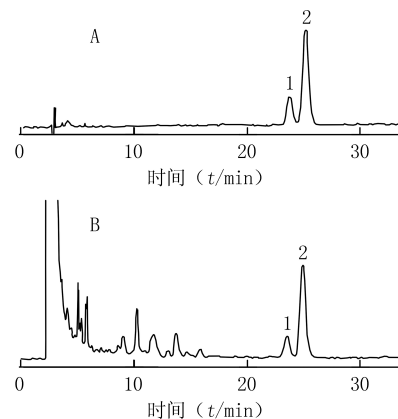


图 1 对照品溶液与山楂提取物 HPLC 图

A. 齐墩果酸、熊果酸对照品溶液; B. 山楂提取物;
1. 齐墩果酸; 2. 熊果酸

3.2 专属性试验 取供试品溶液和空白对照溶液,按上述色谱条件,进样 5 μl 。采用 DAD 全波长扫描,分别查看保留时间为 23.816 和 25.248 min 处峰上 5 个点的紫外吸收图,重合度好,表明专属性好。

3.3 线性关系考察 分别取齐墩果酸、熊果酸对照品 3.06、12.41 mg,置 25 ml 容量瓶中,加入甲醇溶解后稀释至刻度,分别精密吸取上述对照品溶液 1、2、4、6、8、10、12、14、20 μl ,按上述色谱条件,以峰面积(Y)为纵坐标,以齐墩果酸和熊果酸的含量(X , mg)为横坐标,绘制齐墩果酸和熊果酸标准曲线。其回归方程分别为: $Y=433.59 X+25.099$ 、 $Y=455.81 X+12.367$,齐墩果酸和熊果酸分别在 0.496~2.480 μg 和 0.498~9.960 μg 范围与峰面积线性关系良好($r>0.9995$)。

3.4 检测限和定量限 取齐墩果酸和熊果酸混合对照品储备液逐级稀释,按上述色谱条件不同体积进样。按信噪比 3:1 计算,齐墩果酸和熊果酸最低检测限分别为 0.238 和 0.186 μg ;按信噪比 10:1 计算,齐墩果酸和熊果酸定量限分别为 0.470 和 0.434 μg 。

3.5 精密度试验 分别取齐墩果酸和熊果酸对照品 3.06、12.41 mg,置 25 ml 容量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,按上述色谱条件,进样 5 μl ,连续进样 6 次。齐墩果酸、熊果酸峰面积平均值分别为 589.5、2 165.5, RSD 分别为 1.43%、0.34%,表明精密度良好。

3.6 稳定性试验 取山楂提取物同一批次样品(批号:120402),按“2.1”项配制供试品溶液,按“2.3”项下的色谱条件,于 0、1、2、4、6、8、10、12、24 h,进样 5 μl 。齐墩果酸、熊果酸的峰面积平均值分别为

239.9、1 220.4, RSD 分别为 1.54%、0.97%, 表明山楂提取物供试品溶液在 24 h 内稳定。

3.7 重复性试验 取山楂提取物同一批次样品 6 份(批号:120402), 按“2.1”项配制供试品溶液, 按“2.3”项下色谱条件, 进样 5 μ l。结果显示, 齐墩果酸、熊果酸的平均含量分别为 1.04%、5.98%, RSD 分别为 1.22%、1.23%, 说明本方法的重复性较好。

3.8 加样回收率试验 取山楂提取物同一批次样

品 6 份(批号:120402), 每份约 0.25 g, 精密称定, 分别置于 10 ml 容量瓶中。精密加入浓度为 2.51、14.97 mg/ml 的齐墩果酸和熊果酸对照品溶液各 1 ml, 以甲醇稀释, 按“2.1”项下方法配制供试品溶液, 按“2.3”项下色谱条件, 进样 5 μ l, 计算平均回收率, 结果见表 1。齐墩果酸、熊果酸的平均回收率分别为 100.26%、103.12%, RSD 分别为 0.91%、1.65%, 表明该法的回收率良好。

表 1 山楂提取物的加样回收率试验结果

成分	取样量 (m/g)	样品中的含量 (m/mg)	对照品加入量 (m/mg)	测定量 (m/mg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
齐墩果酸	0.250 8	2.608	2.51	5.113	99.81	100.26	0.91
	0.251 1	2.611	2.51	5.110	99.58		
	0.250 6	2.606	2.51	5.153	101.42		
	0.250 7	2.607	2.51	5.147	101.15		
	0.250 8	2.608	2.51	5.127	100.40		
	0.251 0	2.610	2.51	5.100	99.20		
熊果酸	0.250 8	14.968	14.97	30.484	103.65	103.12	1.65
	0.251 1	14.986	14.97	30.312	102.38		
	0.250 6	14.956	14.97	30.393	103.12		
	0.250 7	14.962	14.97	30.231	102.00		
	0.250 8	14.968	14.97	30.864	106.19		
	0.251 0	14.980	14.97	30.156	101.38		

4 样品含量测定

取“1.2”项下楂提取物 12 批次样品, 按“2.1”项下方法平行制备 2 份供试品溶液, 按“2.3”项下色谱条件实验, 进样 5 μ l。齐墩果酸和熊果酸含量(按干燥品计)之和的最高值和最低值分别为 7.93%、6.37%, 平均值为 7.30%。按平均含量的 80% 拟定限度的规定, 将含量限度拟定为按干燥品计, 含齐墩果酸(C₃₀H₄₈O₃)和熊果酸(C₃₀H₄₈O₃)之和不得少于 5.80%。

5 讨论

5.1 提取条件的选择 从提取方法(超声、回流、冷浸), 提取溶剂(水、乙酸乙酯、乙醇和甲醇), 溶剂体积(30、40、50、60 ml), 提取时间(15、30、45、60、90 min), 检测波长等方面对含量测定的前处理方法进行了研究。最终确定了最优提取条件是 50 ml 甲醇超声提取 30 min。

5.2 流动相与色谱条件的选择 根据文献[11, 12], 考察了甲醇-水-磷酸、甲醇-四丁基溴化铵-三乙胺和乙腈-甲醇-水-乙酸铵等不同的流动相系统。同时考察了 AGT Venusil XBP C₁₈ (250 mm \times

4.6 mm, 5 μ m); Inertsil ODS-3 C₁₈ (250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m); TSKgel 100V ODS C₁₈ (250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m); Agilent Zorbax SB C₁₈ (250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m) 4 种型号的 C₁₈ 色谱柱。最终确定色谱条件为: 以 Agilent Zorbax SB C₁₈ 柱(250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m) 为色谱柱; 甲醇-0.06 mol/L 乙酸铵(85:15, V/V) 为流动相; 流速 0.8 ml/min; 柱温 25 $^{\circ}$ C, 检测波长 210 nm; 等度洗脱 30 min。

【参考文献】

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 2015 年版一部[S]. 北京: 化学工业出版社, 2015: 29-30.
- [2] Ma LY, Liu RH, Xu XD, et al. The pharmacokinetics of C-glycosyl flavones of Hawthorn leaf flavonoids in rat after single dose oral administration [J]. Phytomedicine, 2010, 17(8-9): 640-645.
- [3] Wang YL, Wang ZJ, Shen HL, et al. Effects of artesunate and ursolic acid on hyperlipidemia and its complications in rabbit[J]. Eur J Pharm Sci, 2013, 50(3-4): 366-371.
- [4] 王云彩, 袁秉祥, 李生正, 等. 沙棘总黄酮和山楂总黄酮及其混合液对大鼠高血脂的影响[J]. 中国药理学通报, 1992, 8(2): 85-87.

(下转第 555 页)

治疗方案,而对药物治疗的关注度有限。临床药师的优势在于更关注用药、更懂药。随着临床药学工作越发受到关注与重视,临床药师应当不断提高自身综合技能,在实践中认真履行促进临床合理用药的神圣职责,同时不断提升自身价值。

【参考文献】

[1] 中华医学会计划生育学分会. 剖宫产瘢痕妊娠诊断与治疗共识[J]. 中华医学杂志, 2012, 92(25):1731-1733.

[2] 施腾飞, 童晓文. 剖宫产瘢痕妊娠的诊断与治疗进展[J]. 国际妇产科学杂志, 2014, 41(1): 10-13

[3] 李瑾瑾, 刘欣燕. 剖宫产瘢痕妊娠的治疗选择[J]. 中国医学科学院学报, 2014, 36(2):209-213.

[4] 陈国强, 谢春明. 子宫动脉栓塞/化疗栓塞术在治疗剖宫产后子宫切口妊娠中的应用价值[J]. 当代医学, 2009, 15(17): 325-327.

[5] Zhang B, Jiang ZB, Huang MS, et al. Uterine artery embolization combined with methotrexate in the treatment of cesarean scar pregnancy: results of a case series and review of the literature [J]. J Vasc Interv Radiol, 2012, 23(12):1582-1588.

[6] Gómez García MT, Aguarón Benitez G, Barberá Belda B, et al. Medical therapy (methotrexate and mifepristone) alone or in combination with another type of therapy for the management of cervical or interstitial ectopic pregnancy [J]. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2012, 165(1):77-81.

[7] Kalampokas E, Boutas I, Panoulis K, et al. Novel medical therapy of cesarean scar pregnancy with a viable embryo combining multidose methotrexate and mifepristone: a case report [J]. Medicine (Baltimore), 2015, 94(41):e1697.

[8] Garbin O, de Tayrac R, de Poncheville L, et al. Medical treatment of ectopic pregnancy: a randomized clinical trial comparing metotrexate-mifepristone and methotrexate-placebo[J]. J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris), 2004, 33(5): 391-400.

[9] 罗丹, 钟玲, 赵腾飞. 甲氨蝶呤联合米非司酮与单用甲氨蝶呤治疗异位妊娠的疗效评价[J]. 解放军医学杂志, 2011, 36(2): 184-187.

[10] 裴海英, 张大微, 吴钦兰, 等. 甲氨蝶呤联合宫外孕 II 号方与米非司酮治疗异位妊娠的随机对照试验[J]. 中国循证医学杂志, 2012, 12(2): 168-172.

[11] 李景会, 刘聪慧, 夏凤艳. 3 种方案治疗异位妊娠的疗效及成本-效果分析[J]. 现代预防医学, 2013, 40(11): 2044-2048.

[12] 张淑贤. 不同剂量米非司酮治疗异位妊娠的临床观察[J]. 实用妇产科杂志, 2006, 22(4): 210-212.

[13] 龚寅芸. 不同剂量米非司酮联合甲氨蝶呤治疗异位妊娠疗效观察[J]. 中国医药导报, 2010, 7(32): 60-61.

[14] 陈新磊, 张君娜. 甲氨蝶呤、米非司酮及两者联用保守治疗异位妊娠的临床观察[J]. 中国妇幼保健, 2011, 26(2): 297-298.

[15] 刘馨, 张丽. 甲氨蝶呤联合米非司酮不同给药方案治疗异位妊娠疗效观察[J]. 中国妇幼保健, 2007, 22(27): 3909-3910.

[16] Shrestha E, Yang Y, Li X, et al. Successful conservative management with methotrexate and mifepristone of cervical pregnancy[J]. J Biomed Res, 2011, 25(1):71-73.

[17] 任月月, 劳利迪. 甲氨蝶呤联合米非司酮治疗异位妊娠的疗效及不良反应观察[J]. 中国基层医药, 2014, 21(18): 2868-2869.

[18] 陈青文, 吴学明, 陈燕娥. 甲氨蝶呤宫颈注射与肌肉注射治疗异位妊娠疗效分析[J]. 中国妇幼保健, 2009, 24(13): 1865-1866.

[19] 孙海艳, 尹珊珊. 宫颈注射与全身用药应用甲氨蝶呤治疗异位妊娠疗效对比[J]. 微量元素与健康研究, 2015, 32(1): 17-18.

[20] 邓新粮, 何小丽, 肖松舒. 剖宫产术后子宫切口部位妊娠保守治疗 16 例疗效分析[J]. 实用妇产科杂志, 2008, 24(6): 372-373.

[21] 马静, 苑学, 蒋利东, 等. 宫颈注射甲氨蝶呤保守治疗宫外孕临床观察[J]. 河北医药, 2010, 32(23): 3295-3296.

[22] 左文莉. 提高剖宫产瘢痕妊娠的诊治水平, 降低妇女的生殖危害——对《剖宫产瘢痕妊娠诊断与治疗共识》的解读[J]. 中国医学杂志, 2012, 92(25): 1729-1730.

【收稿日期】 2016-05-04 【修回日期】 2016-09-01
【本文编辑】 李睿旻

(上接第 539 页)

[5] 苏齐鉴, 梁飞立, 李益忠, 等. 绞股蓝总苷片联合山楂精降脂片治疗高效抗逆转录病毒治疗后血脂异常的疗效研究[J]. 中国全科医学, 2012, 15(33): 3903-3905.

[6] 许宗凡, 谢后光, 邹双凤. 山楂精降脂片治疗高脂血症 68 例疗效观察[J]. 医学信息(中旬刊), 2010, 5(4): 877-878.

[7] 林铁男, 金慧子, 苏娟. 高效液相色谱法测定山楂精降脂片中齐墩果酸和熊果酸含量[J]. 药学实践杂志, 2015, 33(5): 448-450.

[8] 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, 32(1): 50-52.

[9] Han YY, Xue XW, Shi ZM, et al. Oleanolic acid and ursolic

acid inhibit proliferation in transformed rat hepatic oval cells [J]. World J Gastroenterol, 2014, 20(5): 1348-1356.

[10] 梁睿妹, 张川, 邹豪, 等. HPLC 法测定中药山楂中有效成分绿原酸的含量[J]. 药学实践杂志, 2012, 30(6): 457-477.

[11] 张才华, 郭兴杰, 李芳, 等. HPLC 法同时测定白花蛇舌草中齐墩果酸和熊果酸的含量[J]. 沈阳药科大学学报, 2004, 21(5): 358-360.

[12] 石心红, 郭江宁, 翟静华. HPLC 法测定女贞子中齐墩果酸、熊果酸的含量[J]. 海峡药学, 2005, 17(4): 41-43.

【收稿日期】 2016-04-05 【修回日期】 2016-06-01
【本文编辑】 李睿旻