

不同产地山楂中熊果酸和齐墩果酸量的差异分析

丁银花^{1,3}, 孙永成^{2,3}, 王振中^{2,3}, 毕宇安^{2,3}, 张广仁^{3,4}, 杨瑶珺¹, 萧伟^{2,3*}

1. 北京中医药大学, 北京 100020
2. 江苏康缘药业股份有限公司, 江苏 连云港 222001
3. 中药制药过程新技术国家重点实验室, 江苏 连云港 222001
4. 南京中医药大学, 江苏 南京 210000

摘要: 目的 采用 HPLC 测定山楂中熊果酸、齐墩果酸的量, 比较不同产地山楂中熊果酸和齐墩果酸量的差异。方法 利用 Waters Symmetry C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 在流动相为乙腈-甲醇-0.5% 乙酸铵 (69:12:19), 体积流量为 1 mL/min, 检测波长为 210 nm、柱温为 30 °C 的色谱条件下对 10 个不同产地的山楂进行测定, 并对测定结果进行方差分析和聚类分析。结果 熊果酸、齐墩果酸分别在 0.078~0.780 mg/mL, $r=0.999\ 8$; 0.016 9~0.169 mg/mL, $r=0.999\ 6$, 呈良好的线性关系, 加样回收率分别为 102.6%、100.2%, 均符合《中国药典》2010 年版的要求。结论 该测定方法简便快速、重复性好, 能够准确测定山楂中熊果酸和齐墩果酸的量; 江苏、河北的山楂质量较佳, 可以作为欣脉胶囊处方中山楂药材的固定来源。

关键词: 山楂; 熊果酸; 齐墩果酸; 定量测定; HPLC 法

中图分类号: R286.022 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2014)14-2084-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.14.024

Variation analysis on triterpene compounds in hawthorn from different regions

DING Yin-hua^{1,3}, SUN Yong-cheng^{2,3}, WANG Zhen-zhong^{2,3}, BI Yu-an^{2,3}, ZHANG Guang-ren^{3,4}, YANG Yao-jun¹, XIAO Wei^{2,3}

1. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100020, China
2. Jiangsu Kanion Pharmaceutical Co., Ltd., Lianyungang 222001, China
3. State Key Laboratory of New-tech for Chinese Medicine Pharmaceutical Process, Lianyungang 222001, China
4. Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210000, China

Abstract: Objective To establish an HPLC method for the content determination of ursolic acid and oleanolic acid in hawthorn (*Crataegi Fructus*) from different regions, whose differences were compared. **Methods** Waters Symmetry C₁₈ column (4.6 mm×250 mm, 5 μm) was used with the mobile phase of acetonitrile-methanol-0.5% ammonium acetate (69:12:19) at a flow rate of 1 mL/min. The detection wavelength was set at 210 nm and the column temperature was 30 °C. To determine the content of hawthorn from 10 different regions, variance analysis and cluster analysis were carried out for the results. **Results** The linear ranges of ursolic acid and oleanolic acid were 0.078—0.780 mg/mL ($r = 0.999\ 8, n = 6$) and 0.016 9—0.169 mg/mL ($r = 0.999\ 6, n = 6$), respectively. The average recoveries of the two components were 102.6% and 100.2%, in accordance with the determination requirement in *Chinese Pharmacopoeia 2010*. **Conclusion** This method is simple, quick, accurate, and has better reproducibility for the determination of triterpene compounds in hawthorn. And hawthorn from Chengde and Jiangsu provinces is better. It could be used as the origin of hawthorn in the prescription of Xin mai Capsule.

Key words: hawthorn (*Crataegi Fructus*); ursolic acid; oleanolic acid; quantitative determination; HPLC method

山楂 *Crataegi Fructus* 药材为蔷薇科植物山里 山楂 *Crataegus pinnatifida* Bge. 的干燥成熟果实。红 *Crataegus pinnatifida* Bge. var. *major* N. E. Br. 或 具有消食健胃、行气散瘀、化浊降脂的功效^[1]。山

收稿日期: 2014-02-25

基金项目: 江苏省科技成果转化项目 (BA2012020)

作者简介: 丁银花 (1988—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药生药学。Tel: 15150991528 E-mail: dingyinhuo0113@163.com

*通信作者 萧伟, 男, 研究员级高级工程师, 博士, 研究方向为中药新药的研究与开发。

Tel: (0518)81152337/13905136437 E-mail: wzhzh-nj@163.net

楂中的主要化学成分^[2-6]为熊果酸、齐墩果酸、槲皮素、芦丁、金丝桃苷、枸橼酸等化合物,其中熊果酸、齐墩果酸为三萜类化合物,在山楂中的量较高^[7-8]。现代药理研究表明^[6-7],熊果酸、齐墩果酸在调血脂和抗动脉粥样硬化等心脑血管疾病方面的疗效显著,受到了广泛关注。故可选择熊果酸和齐墩果酸作为山楂质量评价指标。

欣脉胶囊是江苏康缘药业股份有限公司正在研发的中药6类新药,处方源于国医大师周仲瑛教授治疗高脂血症的临床经验方,由山楂、银杏叶等5味中药组成。山楂作为欣脉胶囊处方中的君药,其药材的来源产地对于产品的质量尤为重要。本实验利用高效液相色谱法建立了山楂中熊果酸、齐墩果酸测定的方法,对来自10个不同产地山楂中熊果酸和齐墩果酸进行测定,并通过统计学方法的分析,固定了欣脉胶囊处方中山楂药材的来源产地,同时也为山楂质量的全面评价提供依据。

1 仪器与材料

Agilent 1200型高效液相色谱仪(紫外检测器,自动进样器,四元低压梯度泵,柱温箱,美国安捷伦公司),AE240型电子分析天平,BP211D型电子分析天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司],直立粉碎机(北京环亚天元机械技术有限公司)。

熊果酸对照品(批号110749-200518、110742-200519,中国食品药品检定研究院),齐墩果酸对照品(批号110709-201206,中国食品药品检定研究院),乙腈(色谱纯,上海星可生化有限公司),甲醇(色谱纯,美国天地有限公司),乙酸铵(色谱纯,陕西奥联科技有限公司),甲醇、石油醚(30~60℃)、氨水(分析纯,南京化学试剂有限公司),超纯水。

药材来自10个产地,除山东产地收集了9批外,其余产地各收集了3批,共36批,经北京中医药大学杨瑶珺教授鉴定为山楂 *Crataegus pinnatifida* Bge. 的干燥成熟果实。各药材样品具体来源见表1。

2 方法

2.1 色谱条件

采用 Waters Symmetry C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱;流动相为乙腈-甲醇-0.5%乙酸铵(69:12:19);体积流量为1 mL/min;柱温为30℃;检测波长210 nm,进样量20 μL。根据上述色谱条件,分别取对照品和供试品溶液进样分析,记

录色谱图。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 取齐墩果酸、熊果酸对照品适量,精密称定,加甲醇制成含齐墩果酸25 μg/mL、熊果酸115 μg/mL的混合对照品溶液,即得。

2.2.2 供试品溶液的制备 取山楂药材粉末(过80目筛)约1 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇25 mL,称定质量,加热回流4 h,放冷,再称定质量,用甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过。精密量取续滤液10 mL,加1%氨水3 mL,混匀,石油醚(30~60℃)振摇提取3次,每次15 mL,弃去石油醚,取甲醇液蒸干,残渣加甲醇溶解,转移至10 mL量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,离心,即得。

2.3 系统适用性试验

在“2.1”项色谱条件下,测定样品中熊果酸和齐墩果酸的质量分数,以熊果酸峰计算理论板数大于10 000,分离度大于1.5,已达到基线分离,拖尾因子符合要求。

2.4 线性关系考察

精密称定熊果酸对照品39.00 mg、齐墩果酸对照品8.45 mg,置50 mL量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,精密量取1、3、5、7、9、10 mL,分别置于10 mL量瓶中,用甲醇稀释至刻度,摇匀,得到系列对照溶液。精密吸取溶液20 μL注入色谱仪中,按上述色谱条件测定峰面积,以峰面积为纵坐标(Y),质量浓度为横坐标(X)进行线性回归。结果表明,熊果酸在0.078~0.780 mg/mL具有良好的线性关系,回归方程为 $Y=7.9348X-5.5205$, $r=0.9998$;齐墩果酸在0.0169~0.1690 mg/mL具有良好的线性关系,回归方程为 $Y=9.0407X+1.5396$, $r=0.9996$ 。

2.5 精密度试验

按“2.2.1”项下方法制备对照品溶液,精密吸取20 μL,“2.1”项色谱条件测定,连续进样6次,计算熊果酸和齐墩果酸的峰面积,RSD分别为0.56%、1.83%,结果表明仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验

精密吸取上述对照品溶液和“2.2.2”项方法制备的供试品溶液,分别于0、2、4、8、10、12 h各自进样20 μL,测定峰面积。计算对照品中熊果酸和齐墩果酸的峰面积,RSD分别为0.86%、1.21%,供试液中熊果酸和齐墩果酸的峰面积,RSD分别为1.67%、1.85%,结果表明对照品和供试品溶液在12

h 内基本稳定。

2.7 重复性试验

按“2.2.2”项下供试品溶液的制备方法，平行制备供试品溶液 6 份，按上述色谱条件测定。计算得熊果酸的平均质量分数为 2.393 0 mg/g，RSD 为 1.45%；齐墩果酸的平均质量分数为 0.449 3 mg/g，RSD 为 1.98%，结果表明本方法的重复性良好。

2.8 加样回收率试验

取山楂粉末 6 份，每份约 0.5 g，精密称定，置具塞锥形瓶中，分别加入含熊果酸 0.255 mg/mL、齐墩果酸 1.176 mg/mL 的混合对照品溶液 1 mL，再加

入 24 mL 甲醇，按“2.2.2”项方法制备。按“2.1”项色谱条件测定并计算熊果酸、齐墩果酸的加样回收率。计算得熊果酸、齐墩果酸的平均加样回收率分别为 102.6%、100.2%，RSD 分别为 1.31%、1.97%，结果表明本方法回收率良好。

3 结果与分析

3.1 样品的测定

按“2.2.2”项下供试品溶液的制备方法，制备已收集到的 10 个产地（共 36 批）山楂药材的供试液，按上述色谱条件进行测定，记录色谱图，计算熊果酸、齐墩果酸的质量分数，结果见表 1，色谱图见图 1。

表 1 10 个产地山楂中熊果酸和齐墩果酸的测定结果

Table 1 Determination of ursolic acid and oleanolic acid contents in hawthorn from 10 regions

编号	产地	质量分数 / %		总质量分数 / %	编号	产地	质量分数 / %		总质量分数 / %
		熊果酸	齐墩果酸				熊果酸	齐墩果酸	
1	湖南	0.21	0.034	0.24	19	甘肃	0.14	0.022	0.16
2	湖南	0.19	0.023	0.21	20	甘肃	0.15	0.028	0.18
3	湖南	0.17	0.020	0.19	21	甘肃	0.18	0.029	0.21
4	河南	0.16	0.023	0.18	22	江苏	0.31	0.049	0.36
5	河南	0.23	0.031	0.26	23	江苏	0.30	0.042	0.34
6	河南	0.23	0.046	0.28	24	江苏	0.33	0.052	0.38
7	山西	0.20	0.026	0.23	25	浙江	0.22	0.029	0.25
8	山西	0.23	0.041	0.27	26	浙江	0.21	0.023	0.23
9	山西	0.25	0.049	0.30	27	浙江	0.14	0.025	0.17
10	河北	0.29	0.043	0.33	28	山东	0.28	0.029	0.31
11	河北	0.33	0.051	0.38	29	山东	0.25	0.053	0.30
12	河北	0.31	0.039	0.35	30	山东	0.21	0.038	0.25
13	广西	0.11	0.020	0.13	31	山东	0.24	0.026	0.27
14	广西	0.18	0.024	0.20	32	山东	0.34	0.054	0.39
15	广西	0.14	0.019	0.16	33	山东	0.20	0.036	0.24
16	湖北	0.29	0.049	0.34	34	山东	0.22	0.039	0.26
17	湖北	0.26	0.041	0.30	35	山东	0.21	0.031	0.24
18	湖北	0.23	0.027	0.26	36	山东	0.26	0.026	0.29

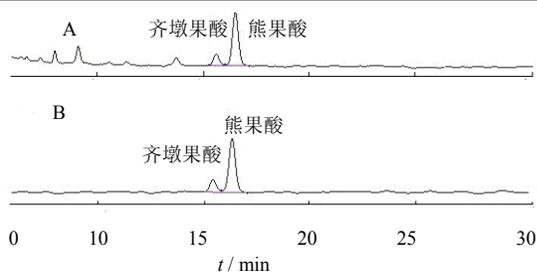


图 1 供试品 (A) 和混合对照品 (B) 的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC of tested sample (A) and mixed reference substances (B)

3.2 统计学分析

3.2.1 方差分析 利用 SPSS16.0 版本软件对以上 10 个产地山楂药材中的熊果酸、齐墩果酸的质量分数进行方差分析。结果见表 2。

根据表 2 方差分析结果可知，不同产地山楂中

三萜类成分的量 $P < 0.01$ ，说明不同产地山楂中三萜类成分量具有显著差异。通过 LSD 法进行多重比较，给出了各个总体均数两两比较的结果，初步分析表 1 结果可知，河北产地山楂中三萜类成分量较高。

3.2.2 聚类分析 利用 SPSS16.0 版本软件对以上 10 个产地山楂药材进行聚类分析，以熊果酸、齐墩果酸的质量分数为变量。结果见图 2。

由图 2 可见，当分类距离为 15 时，可将 10 个产地的山楂药材分为 2 类，河北、江苏产地的山楂药材可聚为一类；其余 8 个产地聚为一类。此结果与方差分析的结果基本一致。再比较各产地山楂药材中三萜类成分的平均质量分数，可以得出，河北、江苏产地的山楂为量较高的一类，其余各产地的山楂为量较低的一类。

表2 基于方差齐性的方差分析结果

Table 2 Results of ANOVA based on homogeneity of variance

变异来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
组间	0.127	9	0.014	9.746	0
组内	0.038	26	0.001		
总计	0.165	35			

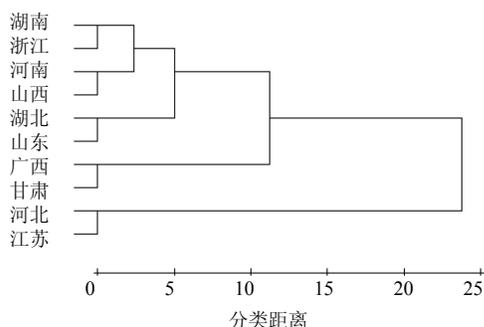


图2 10个产地山楂药材聚类分析树状图

Fig. 2 Dendrogram of cluster analysis on hawthorn from 10 regions

3.3 结论

山楂药材中的三萜类成分平均质量分数为0.26%，不同产地或同一产地之间山楂中熊果酸的量差异明显，而齐墩果酸的量相对较低，差异不明显，在0.02%~0.05%，两者的质量分数均达到了万分之一以上，故可以用熊果酸、齐墩果酸这2种三萜类成分的总量来客观评价山楂药材质量，为完善山楂药材的质量控制标准提供参考。

此外，通过方差分析和聚类分析的结果，可以得出结论，不同产地之间山楂中三萜类成分的质量分数有差异，其中河北和江苏的山楂药材三萜类成分质量分数较高，质量佳。因此可以考虑选择河北、江苏作为欣脉胶囊处方中君药山楂药材的固定来源产地。

4 讨论

4.1 供试品溶液制备方法的选择

参考《中国药典》2010年版一部中马鞭草、木瓜测定项下供试液的制备方法^[1]，对提取溶剂和提取方式进行了考察，对比了甲醇、无水乙醇2种提取溶剂以及回流、超声2种提取方式，结果显示，甲醇回流提取的样品供试液中熊果酸、齐墩果酸提取的更完全，峰形更好。

4.2 检测波长的选择

采用PDA检测器在190~400 nm对样品及对照品进行扫描，结果表明，205 nm处熊果酸和齐墩果酸吸收最强，但考虑到205 nm处溶剂峰的吸收

也较强，为了减少干扰，提高信噪比，最终采用210 nm作为检测波长。

4.3 色谱条件的选择

参考文献报道^[9-12]，通过对流动相乙腈-甲醇-0.5%乙酸铵、乙腈-水、甲醇-0.5%乙酸铵系统的考察，最终采用乙腈-甲醇-0.5%乙酸铵作为流动相，进行色谱分析，流动相比例优化为69:12:19。结果表明乙腈-甲醇-0.5%乙酸铵(69:12:19)作为流动相可使供试品色谱中熊果酸和齐墩果酸2个峰与其他峰达到很好的分离。所以，最终选择乙腈-甲醇-0.5%乙酸铵(69:12:19)作为流动相。

4.4 柱温的选择

有关文献报道，改变温度可改善离子型化合物的分离^[13]，本实验考察了柱温25、30、35℃这3种温度对齐墩果酸和熊果酸的分离度及保留时间的影响。结果表明，柱温30℃时熊果酸与齐墩果酸分离度及保留时间适宜，故选择柱温为30℃。

4.5 系统耐用性的考察

本实验考察了Agilent1200型高效液相色谱仪和岛津LC-20AT型高效液相色谱仪2种仪器，结果显示，2种仪器记录的色谱图分离度都大于1.5，拖尾因子均符合《中国药典》2010年版要求，表明本方法的系统适用性良好。

参考文献

- [1] 中国药典[S]. 一部. 2010.
- [2] Asher G N, Viera A J, Weaver M A, et al. Effect of hawthorn standardized extract on flow mediated dilation in prehypertensive and mildly hypertensive adults: a randomized, controlled cross-over trial [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2012, 12(26): 1186-1189.
- [3] Hyun S H, Barry E B, Michael M J G. Effects of hawthorn on cardiac remodeling and left ventricular dysfunction after 1 month of pressure overload-induced cardiac hypertrophy in rats [J]. *Cardiovasc Drugs Ther*, 2008, 22(1): 19-22.
- [4] Zick S M, Vautaw B M, Gillespie B, et al. Hawthorn extract randomized blinded chronic heart failure (HERB CHF) trial [J]. *Eur J Heart Fail*, 2009, 11(10): 990-999.

- [5] 詹琤琤, 段时振, 李 杰. 中药山楂的化学成分与药理作用研究概况 [J]. 湖北中医杂志, 2012, 34(12): 77-79.
- [6] 吴士杰, 李秋津, 肖学风, 等. 山楂化学成分及药理作用的研究 [J]. 药物评价研究, 2010, 33(4): 316-319.
- [7] Sun M B, Ho K Y, Lee S M, *et al.* Cytotoxic triterpenes from *Crataegus pinnatifida* [J]. *Arch Pharm Res*, 2000, 23(2): 155-158.
- [8] Lin Y G, Vermeer Ma A, Trautwein E A. Triterpenic acids present in hawthorn lower plasma cholesterol by inhibiting intestinal ACAT activity in hamsters [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2009, 2011(2011), ID801272, 9.
- [9] 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): 43-45.
- [10] 敖茂宏, 宋智琴, 罗晓青, 等. 黔产野生山楂中齐墩果酸的含量测定研究 [J]. 安徽农业科学, 2009, 37(15): 7195-7196.
- [11] 石 静, 聂 晶, 冯钰琦, 等. HPLC 法测定女贞叶乙醇提取物中的齐墩果酸与熊果酸 [J]. 现代药物与临床, 2010, 25(3): 210-213.
- [12] Li E N, Luo J G, Kong L Y. Qualitative and quantitative determination of seven triterpene acids in *Eriobotrya japonica* by HPLC with photodiode array detection and mass spectrometry [J]. *Phytochem Anal*, 2009, 20(4): 338-343.
- [13] Snyder L R, Kirkland J J, Glajch J L, *et al.* *Practical HPLC Method Development* [M]. New York: Wiley-Interscience, 1997.