

HPLC 法快速测定 8 种中药中齐墩果酸和熊果酸

刘慧妍¹, 黄馨慧², 张艳海³

1. 广西壮族自治区梧州食品药品检验所, 广西 梧州 543002

2. 广西梧州市人民医院 药剂科, 广西 梧州 543002

3. 赛默飞世尔科技中国有限公司, 上海 201206

摘要: **目的** 建立一种快速分析方法, 同时测定中药材马鞭草 *Verbena officinalis*、女贞子 *Ligustrum lucidum*、夏枯草 *Prunella vulgaris*、白花蛇舌草 *Hedyotis diffusa*、败酱草 *Patrinia scabiosaeifolia*、枇杷叶 *Eriobotrya japonica*、山楂 *Crataegus pinnatifida*、木瓜 *Chaenomeles Fructus papaya* 中齐墩果酸和熊果酸的量。 **方法** 使用快速溶剂萃取法, 采用甲醇作为提取溶剂, 静态萃取时间 6 min, 制备样品溶液, 液相色谱分析采用 Acclaim C₃₀ 色谱柱, 以乙腈-0.2%醋酸 (85:15) 为流动相, 体积流量为 0.3 mL/min, 紫外检测波长为 205 nm。 **结果** 样品提取时间为 10 min, 待测物齐墩果酸和熊果酸达到基线分离, 且无样品基质干扰, *r* 大于 0.999, 平均回收率在 95.8%~102.7%, 本法测定结果与《中国药典》2015 年版方法的平均质量分数差异不显著。 **结论** 本方法简便、快速, 且一法多用, 可用于 8 种中药中齐墩果酸和熊果酸的测定。

关键词: 快速溶剂萃取; 齐墩果酸; 熊果酸; 马鞭草; 女贞子; 夏枯草; 白花蛇舌草; 败酱草; 枇杷叶; 山楂; 木瓜; HPLC
中图分类号: R286.022 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2017)10-1998-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.10.011

Rapid determination of oleanolic acid and ursolic acid in eight kinds of Chinese materia medica by HPLC

LIU Hui-yan¹, HUANG Xin-hui², ZHANG Yan-hai³

1. Wu Zhou Institutes for Food and Drug Control, Wuzhou 543002, China

2. Department of Pharmacy, the People's Hospital of Wuzhou, Wuzhou 543002, China

3. Thermo Fisher Scientific Corporation, Shanghai 201206, China

Abstract: Objective To establish a method of rapid analysis for simultaneous determination of oleanolic acid and ursolic acid in Chinese materia medica (CMM) of *Verbena officinalis*, *Ligustrum lucidum*, *Prunella vulgaris*, *Hedyotis diffusa*, *Patrinia scabiosaeifolia*, *Eriobotrya japonica*, *Crataegus pinnatifida*, *Chaenomeles Fructus papaya*. **Methods** The analyses of preparation were conducted by accelerated solvent extraction (ASE), methanol was used as solvent extraction, and the static extraction time was 6 min. Separation was carried out on Acclaim C30 Thermo column with acetonitrile and 0.2% acetic acid (85:15) as mobile phase, flow rate was 0.3 mL/min, and UV detection wavelength was set at 205 nm. **Results** After 10 min sample extraction time, oleanolic acid and ursolic acid reached baseline separation, and no sample matrix was interfered, the linear correlation coefficient was over 0.999, the average recovery between 95.8% and 102.7%; Compared to *Chinese Pharmacopoeia* 2015, the determination of average mass fraction difference was 3.7% and 5.8%. **Conclusion** This method is simple, fast, and suitable for the analysis of these drugs, and it can be used for content determination of oleanolic acid and ursolic acid for eight kinds of CMM.

Key words: accelerated solvent extraction; oleanolic acid; ursolic acid; *Verbena officinalis*; *Ligustrum lucidum*; *Prunella vulgaris*; *Hedyotis diffusa*; *Patrinia scabiosaeifolia*; *Eriobotrya japonica*; *Crataegus pinnatifida*; *Chaenomeles Fructus papaya*; HPLC

齐墩果酸 (oleanolic acid) 和熊果酸 (ursolic acid) 都是五环三萜类化合物, 是多种中药材均含有的活性成分, 具有保肝、消炎、抗肿瘤、调血脂、免疫双向调解等药理作用^[1]。其检测的方法有分光光度法^[2]、薄层扫描^[3]和高效液相色谱法^[4], 齐墩果酸

和熊果酸互为同分异构体, 仅 29、30 位的甲基位置不同, 分离存在一定困难, 要将两者分开, 色谱条件的选择非常重要, 近年来采用 HPLC 测定的方法大多流动相组成复杂, 出峰时间长, 峰形和分离度不太理想^[5-8]。

收稿日期: 2016-12-25

作者简介: 刘慧妍 (1982—), 女, 本科, 研究方向为食品、药品质量控制与监管。E-mail: 67943284@qq.com

快速溶剂萃取 (ASE) 是指在密闭容器内于高温 (50~200 °C) 和高压 (3 448~20 685 kPa) 条件下, 在短时间内, 用有机溶剂提取固体或半固体样品的一种新型样品前处理方法^[9]。与超声、微波、回流、超临界萃取等成熟方法相比, ASE 有萃取溶剂用量少、提取时间短、萃取效率高、操作简单方便、安全和自动化程度高等优点^[10-14]。国外已有学者将这项技术应用于植物药定量和定性分析中样品的前处理, 但在中药材有效成分的定量和定性分析中作为样品的前处理方法应用较少^[15], 本实验采用 ASE 方法对含有齐墩果酸和熊果酸的常用 8 种中药材马鞭草、女贞子、夏枯草、白花蛇舌草、败酱草、枇杷叶、山楂、木瓜进行快速提取, 对色谱快速分离条件进行优化, 建立了统一的提取和色谱分析方法, 为 8 种中药材的质量分析与控制提供一种快速的检测方式和科学依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器

ThermoFisher SCITIFIC ULTIMATE 3000 高效液相色谱仪 (赛默飞世尔科技公司); ASE350 快速溶剂萃取仪 (赛默飞世尔科技公司); XA205DU 电子分析天平 (梅特勒仪器有限公司); 超纯水机 (默克密理博公司)。分析柱 Thermo Acclaim C₃₀ (150 mm×2.1 mm, 3 μm) 购自赛默飞世尔科技公司。

1.2 供试药品

对照品齐墩果酸 (批号 110709-201206, 质量分数 100%), 熊果酸 (批号 110742-201421, 质量分数 93.8%), 均由中国食品药品检定研究院提供; 实验所用药材均购于玉林药材市场, 马鞭草 (批号 15062801, 产地广西; 批号 1507103、20150801, 产地浙江)、枇杷叶 (批号 20160401、20160606、151201, 产地广西)、木瓜 (批号 151202、160501, 产地广西; 批号 20160701, 产地广东)、夏枯草 (批号 HX16N01, 产地福建; 批号 151210、20160408, 产地广西)、山楂 (批号 1605006、151201、150806, 产地江苏)、女贞子 (批号 20160210, 产地广西; 批号 20160804、20160710, 产地广东)、白花蛇舌草 (批号 1602005, 产地海南; 批号 151208、20160509, 产地广西)、败酱草 (批号 151210, 产地浙江; 批号 150811、20160409, 产地湖北) 经广西梧州食品药品检验所黄薇副主任中药师鉴定为马鞭草科植物马鞭草 *Verbena officinalis* L. 的干燥地上部分、木犀科植物女贞 *Ligustrum lucidum* Ait. 的

干燥成熟果实、唇形科植物夏枯草 *Prunella vulgaris* L. 的干燥果穗、茜草科植物白花蛇舌草 *Hedyotis diffusa* Willd. 的干燥全草、败酱科植物黄花败酱 *Patrinia scabiosaefolia* Fisch. 的干燥全草、蔷薇科植物枇杷 *Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl. 的干燥叶、蔷薇科植物山楂 *Crataegus pinnatifida* Bge. 的干燥成熟果实、薇科植物贴梗海棠 *Chaenomeles speciosa* (Sweet) Nakai 的干燥近成熟果实; 甲醇、乙腈, 色谱纯, 默克公司; 超纯水自制; 其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 Thermo Acclaim C₃₀ (150 mm×2.1 mm, 3 μm), 以乙腈-0.2%醋酸 (85:15) 溶液为流动相, 检测波长为 205 nm, 柱温 18 °C, 体积流量 0.3 mL/min, 按照上述色谱条件, 齐墩果酸和熊果酸的分离度为 2.2。

2.2 对照品溶液的制备

分别精密称取齐墩果酸对照品 54.2 mg 至 50 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并定容至刻度, 制成质量浓度为 1.084 mg/mL 对照品储备液; 精密称取熊果酸对照品 81.6 mg 至 100 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并定容至刻度, 制成质量浓度为 0.816 0 mg/mL 对照品储备液。

2.3 供试品溶液的制备

精密称取样品粉末 (过 3 号筛) 0.5 g, 与约 1 g 硅藻土混合均匀后, 置预先铺上纤维滤膜的 5 mL 萃取池中, 加入硅藻土以填满萃取池为宜, 拧紧萃取池上盖, 进行快速溶剂萃取。萃取溶剂为甲醇、萃取温度 100 °C、静态萃取时间 6 min、冲洗体积 100%、静态萃取 1 次、吹扫时间为 100 s, 萃取结束后, 把萃取液转移至 25 mL 量瓶中, 用少量甲醇清洗萃取瓶 3 次并合并至容量瓶中, 加甲醇定容至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.4 线性关系考察

分别精密吸取上述 2 个对照品储备液各 0.1、0.2、0.5、0.8、1.0、1.2 mL, 置 6 个 10 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 即得一系列混合对照品溶液, 按照上述确定的色谱条件进样分析。以质量浓度为横坐标 (X), 峰面积为纵坐标 (Y), 绘制标准曲线, 得回归方程及相关系数, 齐墩果酸 $Y=4\ 783.942\ 8\ X+97.731\ 9$, $R^2=0.999\ 9$; 熊果酸 $Y=7\ 806.077\ 4\ X+1.170\ 9$, $R^2=0.999\ 7$, 齐墩果酸在 10.84~130.08 μg/mL、熊果酸在 7.655~91.85 μg/mL 内呈良好的线性关系。

2.5 精密度试验

取混合对照品溶液,连续进样 6 次,记录峰面积,结果峰面积 RSD 分别为 1.2%、1.6%,表明仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验

取马鞭草(批号 15062801)、枇杷叶(批号 20160401)、木瓜(批号 151202)、夏枯草(批号 HX16N01)、山楂(批号 1605006)、女贞子(批号 20160210)、白花蛇舌草(批号 1602005)、败酱草(批号 151210) 8 个品种供试品,按“2.3”项下方法制备供试品溶液,室温下放置,分别于 0、1、3、6、12 h 测定,记录峰面积。结果马鞭草、枇杷叶、木瓜、夏枯草、山楂、女贞子、白花蛇舌草、败酱草中齐墩果酸峰面积的 RSD 分别为 2.1%、1.8%、2.9%、1.0%、2.3%、1.2%、1.6%、2.0%,熊果酸峰面积的 RSD 分别为 2.5%、2.3%、1.5%、1.4%、2.0%、1.8%、1.6%、1.5%。

2.7 重复性试验

取马鞭草(批号 15062801)、枇杷叶(批号 20160401)、木瓜(批号 151202)、夏枯草(批号 HX16N01)、山楂(批号 1605006)、女贞子(批号 20160210)、白花蛇舌草(批号 1602005)、败酱草(批号 151210) 8 个品种供试品各 6 份,按“2.3”项下方法制备供试品溶液,按上述色谱条件进行测定,测得马鞭草、枇杷叶、木瓜、夏枯草、山楂、女贞子、白花蛇舌草、败酱草中齐墩果酸质量分数的 RSD 分别为 2.4%、2.7%、2.2%、1.8%、2.1%、1.6%、1.2%、2.5%,熊果酸质量分数的 RSD 分别为 1.8%、2.0%、1.6%、2.2%、1.5%、2.0%、1.7%、2.3%。

2.8 加样回收率试验

取已测定的马鞭草(批号 15062801)、木瓜(批号 151202)、枇杷叶(批号 20160401)、夏枯草(批

号 HX16N01)、山楂(批号 1605006)、女贞子(批号 20160210)、白花蛇舌草(批号 1602005)、败酱草(批号 151210) 供试品各 9 份,每份 0.25 g,精密称定,分别精密加入齐墩果酸、熊果酸对照品储备液适量,按“2.3”项下方法制备供试品溶液,按上述色谱条件进行测定,齐墩果酸加样回收率为 96.0%~100.2%,RSD 为 0.5%~1.7%;熊果酸回收率为 96.1%~102.7%,RSD 为 0.4%~1.5%。

2.9 定量测定及与药典测定方法结果的比较

取女贞子、夏枯草、白花蛇舌草、败酱草、山楂、马鞭草、枇杷叶、木瓜 8 种中药材各 3 批,按“2.3”项下方法制备供试品溶液,按上述色谱条件进行测定。色谱图见图 1,测定结果见表 1。取 8 种中药材

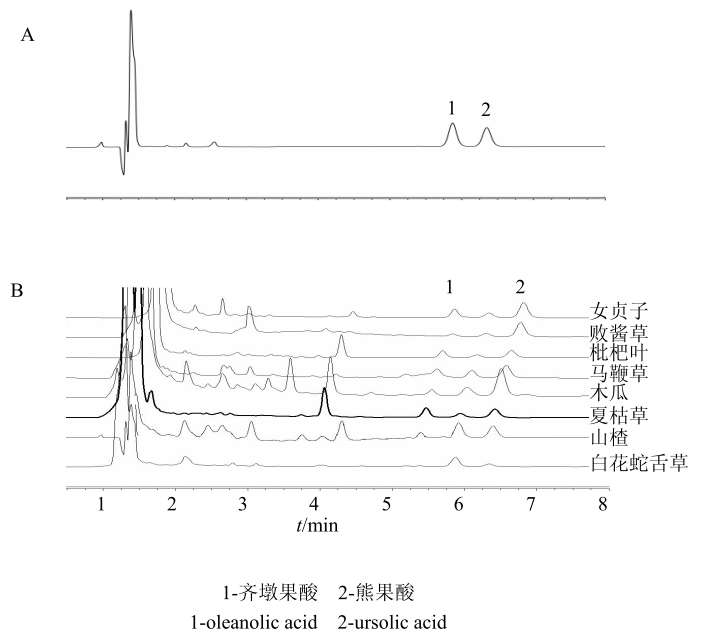


图 1 混合对照品 (A) 和样品 (B) 色谱图

Fig. 1 Chromatogram of reference substances (A) and sample (B)

表 1 8 种中药材中齐墩果酸及熊果酸测定结果

Table 1 Contents of oleanolic acid and ursolic acid in eight kinds of CMM

品种	批号	齐墩果酸/%	熊果酸/%	品种	批号	齐墩果酸/%	熊果酸/%
马鞭草	15062801	0.092 6	0.247 0	山楂	1605006	0.077 2	0.458 2
	1507103	0.102 2	0.254 3		151201	0.073 1	0.442 7
	20150801	0.113 1	0.268 5		150806	0.067 9	0.401 3
枇杷叶	20160401	0.248 2	0.789 5	女贞子	20160210	1.896 5	0.644 2
	20160606	0.217 7	0.718 8		20160804	1.454 7	0.573 2
	151201	0.187 8	0.608 9		20160710	1.624 8	0.612 8
木瓜	151202	0.186 7	0.390 3	白花蛇舌草	1602005	0.117 7	0.461 6
	160501	0.205 5	0.405 5		151208	0.112 4	0.421 5
	20160701	0.189 2	0.357 2		20160509	0.106 7	0.384 9
夏枯草	HX16N01	0.071 8	0.223 3	败酱草	151210	0.201 8	0.351 6
	151210	0.070 2	0.215 5		150811	0.184 9	0.300 9
	20160408	0.068 7	0.202 8		20160409	0.153 5	0.337 6

各 3 批, 分别照“2.3”项下方法及《中国药典》2015 年版一部品种项下方法制备供试液, 按上述色谱条件进行测定, 取 2 种方法得到的结果进行 t 检验, 根据 t 值表, 所得 t 值 $< t(df) 0.05 = 1.86$, 即 2 种方法差异不显著。

3 讨论

3.1 ASE 提取条件的选择

根据检测成分溶解度并参照文献报道^[5, 7]选择甲醇、70%乙醇和无水乙醇进行提取溶剂选择, 结果显示甲醇、70%乙醇和无水乙醇提取时, 齐墩果酸和熊果酸的萃取率基本一致, 且色谱图中杂峰也并无明显差别, 考虑到与提取介质的兼容性以及便捷性, 采用甲醇作为提取溶剂, 并确定甲醇在萃取温度为 100 °C、萃取时间为 6 min 时提取效果较为理想。确定甲醇作为提取溶剂后, 考察萃取循环次数对齐墩果酸和熊果酸量的影响, 取样品分别进行萃取 1、2、3 次循环次数考察, 结果表明萃取次数对结果无影响, 故确定萃取循环次数为 1 次即可。

3.2 色谱分析条件优化

熊果酸和齐墩果酸结构及理化性质极为相近, 实验曾使用 Synchronis C₁₈、ZORBAX Extend-C₁₈、Kinetex XB-C₁₈、Excel 2 C₁₈ 等十八烷基键合相进行分离, 结果齐墩果酸和熊果酸均未能达到基线分离。C₃₀ 色谱柱键合的碳链更长, 对分子构型的选择性更强, 适于异构体的分离, 使用 Acclaim C₃₀ 色谱柱后两者能实现分离, 且出峰时间与分离度均达到满意效果, 故确定使用 Acclaim C₃₀ 色谱柱进行分析。为确保目标成分处于游离分子态, 流动相中需要加入少量酸, 分别考察加入 0.1%醋酸、0.2%醋酸及 0.5%醋酸对洗脱强度的影响, 结果表明 0.2%醋酸已能满足实验分离需要。考察不同柱温对色谱行为的影响发现, 降低柱温对分离有利, 最终确定 18 °C 为最佳分离温度。

3.3 ASE 法与药典方法效率对比

根据《中国药典》2015 年版马鞭草、枇杷叶、木瓜 3 种药材提取时间分别约为 300、30、20 min, 而使用本实验方法提取时间仅需 10 min, 提取效率大为提高。药典方法使用 C₁₈ 色谱柱, 分析时间为 35~65 min, 本实验分析时间仅为 8 min, 分析效率提高了至少 4 倍。另外使用 0.2%醋酸作为流动相比药典方法使用缓冲盐或三乙胺, 配制过程更简便。

齐墩果酸和熊果酸具有保肝、消炎、抗肿瘤、

调血脂等多种药理活性, 在很多中药材中普遍存在。本实验所测 8 种中药材, 目前或无此项检测规定, 或目标峰分离效果差, 或样品制备方法耗时费力。因此建立统一的分析检测方法对于完善中药材质量评价, 减少检测成本具有重要意义。

参考文献

- [1] 张明发, 沈雅琴. 熊果酸和齐墩果酸抗脑瘤作用的研究进展 [J]. 药物评价研究, 2016, 39(1): 132-135.
- [2] 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): 225-229.
- [3] 严 华, 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): 1107-1110.
- [4] 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): 615-616.
- [5] 申 琳, 运乃茹. HPLC 法同时测定夏枯草中熊果酸和齐墩果酸含量 [J]. 天津药学, 2016, 28(2): 1-3.
- [6] 江铁军. SPE-RP-HPLC 法测定女贞子药材中齐墩果酸、熊果酸的含量 [J]. 广东药学院学报, 2007, 23(5): 513-515.
- [7] 钟 辉. 不同产地白花蛇舌草中熊果酸和齐墩果酸的含量测定 [J]. 中医药学报, 2010, 38(2): 105-108.
- [8] 苏丽娜, 董艳虹, 黄茂波, 等. 枇杷叶膏中齐墩果酸和熊果酸的含量测定 [J]. 大理学院学报, 2011, 10(12): 27-29.
- [9] Richter B E, Jones B A, Ezzell J L, et al. Accelerated solvent extraction: a technique for sample preparation [J]. *Anal Chem*, 1996, 68(6): 1033-1039.
- [10] 牟世芬, 刘勇建. 加速溶剂萃取的原理及应用 [J]. 现代科学仪器, 2001(3): 18-20.
- [11] 黄忠良, 蒋利华, 熊远福, 等. 植物功能成分提取技术研究进展 [J]. 河南化工, 2009(26): 17-20.
- [12] Wong L J, Curtis L W. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants [J]. *Trends Food Sci Technol*, 2006, 17(6): 300.
- [13] Billa N, Hubin-barrows D, Lahren T, et al. Evaluation of microcolorimetric lipid determination method with samples prepared using sonication and accelerated solvent extraction methods [J]. *Talanta*, 2014, 119(119C): 62-70.
- [14] Mantovani C D E C, Lima M B, Oliveira C D. Development and practical application of accelerated solvent extraction for the isolation of cocaine/crack biomarkers in meconium samples [J]. *J Chromatogr*, 2014, 957(957C): 14-19.
- [15] 袁 斌, 车金水, 金 燕, 等. 快速溶剂萃取-液相色谱法测定人参药材中人参皂苷的含量 [J]. 药物分析杂志, 2013, 33(7): 1267-1270.