

· 研究报告 ·

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

林轶男¹, 金慧子¹, 苏娟² (1. 上海交通大学药学院, 上海 200240; 2. 第二军医大学药学院天然药物化学教研室, 上海 200433)

[摘要] 目的 建立高效液相色谱法(HPLC)测定山楂精降脂片中齐墩果酸和熊果酸的含量, 有效地控制产品质量。方法 采用 Agilent Zorbax SB C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 以甲醇-0.06 mol/L 乙酸铵(85:15)为流动相, 流速为 0.8 ml/min; 检测波长为 210 nm; 柱温为 25 ℃。结果 齐墩果酸和熊果酸分别在 0.124~2.48 μg ($r=0.9997$) 和 0.498~9.96 μg ($r=0.9998$) 范围内与其峰面积呈良好线性关系。测得齐墩果酸平均回收率为 96.9%, RSD 为 1.26%; 熊果酸平均回收率为 100.4%, RSD 为 2.6%。结论 山楂精降脂片质量稳定, 质控方法简便、准确, 结果可靠、重现性好。

[关键词] 山楂精降脂片; 齐墩果酸; 熊果酸; 高效液相色谱法

[中图分类号] R927

[文献标志码] A

[文章编号] 1006-0111(2015)05-0448-04

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2015.05.018

Determination of oleanolic acid and ursolic acid in Shanzhaji Jiangzhi tablet by HPLC

LIN Yinan¹, JIN Huizi¹, SU Juan² (1. School of Pharmacy, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200240, China; 2. Department of Phytochemistry, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[Abstract] **Objective** To establish the quality standard for Shanzhaji Jiangzhi tablet by HPLC. **Methods** Samples were analyzed on a Agilent Zorbax SB C₁₈ column(250 mm×4.6 mm, 5 μm) with methanol and 0.06 mol/L ammonium acetate (85:15) as mobile phase at the flow rate of 0.8 ml/min. The wavelength and column temperature were set at 210 nm and 25 ℃, respectively. **Results** The calibration curve showed a good linear relationship within the range of 0.124-2.48 μg for oleanolic acid ($r=0.9997$) and 0.498-9.96 μg for ursolic acid ($r=0.9998$). The average recovery ratio of the oleanolic acid and ursolic acid were 96.9% (RSD=1.26%) and 100.4% (RSD=2.6%), respectively. **Conclusion** The method was proved to be good at evaluation effectiveness and practicality.

[Key words] Shanzhaji Jiangzhi tablet; oleanolic acid; ursolic acid; HPLC

山楂精降脂片(Shanzhaji Jiangzhi tablet)是福建汇天生物药业有限公司生产的以山楂提取物为单一原料制成的纯中药制剂, 是降血脂的良药。原标准收载于 1994 年版《中华人民共和国卫生部药品标准·中药成方制剂》第九册(标准号为 WS₃-B-1687-94)。原标准中含量测定采用紫外分光光度法测定无水鞣皮素的含量, 该方法专属性差, 对山楂精降脂片的质量控制意义不大。事实上三萜类成分为山楂精降脂片中降血脂的主要活性成分^[1-3], 而齐墩果酸和熊果酸都被广泛证实具有降脂、降压、抗肿瘤、抗肝炎等作用。为了更好地控制山楂精降脂片

的内在质量, 笔者制定了同时测定山楂精降脂片中齐墩果酸和熊果酸含量的 HPLC 方法, 提高完善了山楂精降脂片的检测标准, 对产品的质量控制和保证用药安全具有积极意义。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 Agilent HP-1100 系列高效液相色谱仪, 包括在线脱气机、四元泵、自动进样器、柱温箱、可变波长检测器、二极管阵列检测器。Sartorius BP211D 型电子天平(德国赛多利斯公司)。

1.2 试剂 齐墩果酸对照品、熊果酸对照品(中国药品生物制品检定所, 批号: 110709-200505, 110742-200516, 纯度≥98%)。山楂精降脂片(福建汇天生物药业有限公司, 批号: 120403、130201、130202、130203、130204、130103、130302、130602、130901)。甲醇(J. T Baker, 质谱纯), 乙酸铵

[作者简介] 林轶男, 硕士研究生。Tel: 18616634566, E-mail: linyinan1989@gmail.com

[通讯作者] 金慧子, 副教授, 硕士生导师, 研究方向: 天然药物化学。Tel: (021)34205989; E-mail: kimhz@sytu.edu.cn

(Anaque Chemicals Supply, 质谱纯), 水为 Milli-Q 超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱 Agilent Zorbax SB C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 以甲醇-0.06 mol/L 乙酸铵(85:15)为流动相; 流速为 0.8 ml/min; 检测波长为 210 nm; 柱温为 25 °C; 进样量 5 μl。

2.2 溶液的制备 ①对照品溶液: 取齐墩果酸对照品和熊果酸对照品适量, 精密称定, 加甲醇制成每 1 ml 含齐墩果酸 0.1 mg 和熊果酸 0.5 mg 的混合溶液, 即得。②供试品溶液: 取本品 10 片, 剥去糖衣,

研细, 取约 0.5 g, 精密称定, 精密加入甲醇 30 ml, 超声提取 30 min 后, 放冷, 再称定重量, 用甲醇补足减失重量, 摇匀, 用微孔滤膜过滤, 取续滤液, 即得。③空白对照溶液: 因山楂精降脂片是以山楂提取物为单一原料制成的纯中药制剂, 所以使用甲醇溶液作为空白对照。

2.3 系统适用性试验 分别取供试品溶液、对照品溶液、空白对照溶液, 按“2.1”项色谱条件, 进样 5 μl。齐墩果酸、熊果酸的保留时间分别为 24.239、25.742 min。理论塔板数均>4 000, 两色谱峰分离度为 1.54, 达到基线分离, 且空白对照无干扰, 结果见图 1。

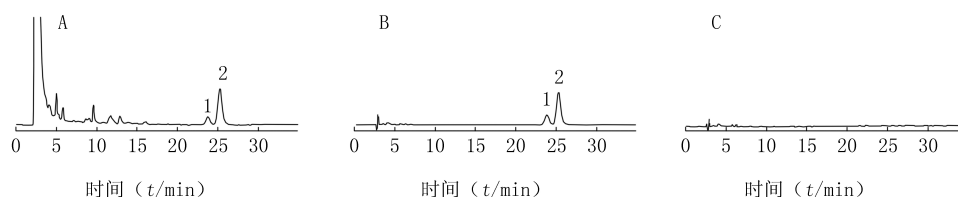


图 1 山楂精降脂片 HPLC 色谱图

A. 供试品; B. 对照品; C. 空白对照; 1. 齐墩果酸; 2. 熊果酸

2.4 线性关系考察 精密称取齐墩果酸对照品 3.10 mg, 熊果酸对照品 12.45 mg, 置 25 ml 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 精密吸取上述对照品溶液各 1、2、4、6、8、10、12、14、20 μl, 按“2.1”项色谱条件进样, 测定峰面积, 以峰面积积分为纵坐标, 齐墩果酸和熊果酸的质量 (mg) 为横坐标, 绘制标准曲线, 计算回归方程。齐墩果酸标准曲线为 $Y = 455.813 X + 12.367$, $r = 0.9997$; 熊果酸标准曲线为 $Y = 433.59 X + 25.099$, $r = 0.9998$ 。结果表明齐墩果酸在 0.124~2.48 μg 范围内、熊果酸在 0.498~9.96 μg 范围内呈良好线性关系。

2.5 精密度试验 精密称取齐墩果酸对照品 3.10 mg, 熊果酸对照品 12.45 mg, 置 25 ml 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 按“2.1”项色谱条件进样 5 μl, 连续进样 6 次。测得齐墩果酸、熊果酸峰面积积分值的 RSD 分别为 1.43% 和 0.34%。结果表明精密度良好。

2.6 重复性试验 取同一批号的样品 (山楂精降脂片批号: 130901) 40 片, 去糖衣, 精密称重, 每片片芯重 106.62 mg。研细, 分别精密称重 0.5 g, 共称取 6 份, 按“2.2”项下方法配成供试品溶液, 按“2.1”项下的色谱条件进样, 测得齐墩果酸的平均含量为 0.633 mg/片, RSD 为 1.63%; 熊果酸的平均含量

为 3.574 mg/片, RSD 为 0.8%。结果证明此方法重现性良好。

2.7 稳定性试验 取同一供试样品 (山楂精降脂片批号: 130901) 10 片, 去糖衣, 精密称重, 研细, 精密称重 0.5 g, 按“2.2”项下方法配成供试品溶液, 按“2.1”项下的色谱条件, 分别于提取后 0、1、2、4、6、8、10、12、24 h, 进样 5 μl, 测得齐墩果酸和熊果酸的峰面积的 RSD 分别为 2.57% 和 1.37%。结果表明, 供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.8 加样回收率试验 取已知含量的山楂精降脂片样品 (批号: 130901) 40 片, 去糖衣, 精密称重, 每片片芯重 106.62 mg。研细, 各精密称定样品约 0.25 g, 共称取 6 份, 分别置于 30 ml 量瓶中。分别精密加入浓度为 1.5 mg/ml 的齐墩果酸对照品溶液 1 ml 和浓度为 8.47 mg/ml 的熊果酸对照品溶液 1 ml, 加入甲醇适量。按“2.2”项下方法配成供试品溶液, 按“2.1”项下的色谱条件, 进样 5 μl, 测得其含量, 分别计算回收率, 结果表明齐墩果酸平均回收率为 96.9%, RSD 为 1.26%; 熊果酸平均回收率为 100.4%, RSD 为 2.6%, 见表 1。

2.9 样品含量测定 取山楂精降脂片样品 9 批, 按“2.2”项下方法配成供试品溶液, 测定其含量, 按外标一点法计算齐墩果酸和熊果酸含量, 结果见表 2。

表1 加样回收率试验结果(n=6)

成分	取样量 (m/g)	样品量 (m/mg)	加入量 (m/mg)	测得总量 (m/mg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
齐墩果酸	0.2527	1.5003	1.50	2.947	96.5	96.9	1.26
	0.2529	1.5015	1.50	2.933	95.5		
	0.2528	1.5009	1.50	2.942	96.1		
	0.2527	1.5003	1.50	2.980	98.6		
	0.2526	1.4997	1.50	2.952	96.8		
	0.2528	1.5009	1.50	2.973	98.1		
熊果酸	0.2527	8.4730	8.47	16.572	95.6	100.4	2.60
	0.2529	8.4797	8.47	17.138	102.2		
	0.2528	8.4764	8.47	16.953	100.1		
	0.2527	8.4730	8.47	17.121	102.1		
	0.2526	8.4697	8.47	17.150	102.5		
	0.2528	8.4764	8.47	16.922	99.7		

表2 样品中齐墩果酸、熊果酸的含量(n=2)

批号	平均含量(mg/片)		
	齐墩果酸	熊果酸	合计
120403	0.622	3.099	3.721
130103	0.728	3.472	4.200
130201	0.635	3.560	4.195
130202	0.704	3.416	4.120
130203	0.725	3.146	3.871
130204	0.731	3.430	4.161
130302	0.629	3.467	4.096
130602	0.665	3.902	4.567
130901	0.633	3.574	4.207

3 讨论

3.1 指标性成分的选择 山楂中主要含有黄酮类、有机酸类和三萜类成分。而原标准采用的含量测定方法是以无水鞣皮素作为指标^[4],采用紫外分光光度法检测样品中的总黄酮含量。所以我们首先采用液质联用、对照品比对等方法研究了山楂精降脂片中含有的黄酮类成分,结果发现山楂提取物中并不含有鞣皮素,且文献报道的金丝桃苷^[5]、牡荆素等常见的黄酮类化合物在山楂精降脂片中也检测不到。故黄酮类物质不适合作为山楂精降酯片含量测定的指标性成分。而三萜类成分作为山楂中另一类主要成分,有广泛的生物活性。其中,齐墩果酸和熊果酸是降血脂、降血压的活性成分^[2-4],且两者是已确知的山楂三萜类代表性化学成分。2010版《中国药典》^[6]山楂药材的鉴别项采用的就是以熊果酸为对照品的薄层色谱法,詹学雄等^[7]选取了熊果酸作为山楂精降脂片含量测定的指标性成分。齐墩果酸和熊果酸作为同分异构体,结构相近,药理活性相似,在山楂精降脂片中同时存在,且含量较高,所以我们认为,将两者一起作为含量测定的指标性成分更合

理、可靠。

3.2 提取溶剂与提取方法考察 在样品的前提取处理中,对水、乙醇、乙酸乙酯、甲醇等提取溶剂进行了考察,结果表明,甲醇作为提取溶剂提取率最高。对冷浸法、热回流提取法、以及超声处理法进行了考察,结果表明,超声处理法效果较理想,而且操作简单易行。此外,对超声时间进行了考察,证明超声处理30 min,即可将有效成分提取完全。

3.3 色谱条件选择 齐墩果酸和熊果酸是互为同分异构体,结构非常相似,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。根据文献报道,我们试验了不同的流动相系统:甲醇-水-冰醋酸-三乙胺^[8]、甲醇-水-磷酸^[9]、甲醇-四丁基溴化铵-三乙胺^[10]和乙腈-甲醇-水-乙酸胺^[11]系统等。结果表明,乙腈-甲醇-水-乙酸胺系统分离效果较好,在此基础上最终确定甲醇-0.06 mol/L 乙酸铵(85:15)为流动相。考察了4种不同型号的色谱柱对供试品分离效果的影响,包括 AGT Venusil XBP C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm); Intersil ODS-3 C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm); Agilent extend C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm)和 Agilent Zorbax SB C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm)。结果表明,用 Agilent Zorbax SB C₁₈ 柱能更好地分离山楂精降脂片中的成分,而且指标性成分齐墩果酸峰和熊果酸峰峰形较好,理论板数较高,所以选用 Agilent Zorbax SB C₁₈ 柱进行含量测定。之后又进一步考察了流动相流速和温度的变化对分离效果的影响,结果表明柱温为25℃时,甲醇-0.06 mol/L 乙酸铵(85:15)的流动相在流速为0.8 ml/min的情况下,齐墩果酸和熊果酸的分离效果最好。

3.4 检验波长选择 在实验中,对齐墩果酸和熊果酸对照品溶液进行 DAD 全波长扫描,测得齐墩果酸和熊果酸的最大吸收波长为210 nm。

【参考文献】

- [1] 李贵海,杨振宁,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.
- [2] 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.
- [3] 林科,张太平,张鹤云.山楂中熊果酸的提取及其对小鼠的降血脂作用[J].天然产物研究与开发,2007,19(6):1052-1054.
- [4] 宋学玲,王美芝.山楂的化学成分与临床应用[J].甘肃中医,2007,20(10):47-48.
- [5] 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.

是治疗原发性肝癌的首选措施,但由于手术创伤、出血,以及肝血流阻断等因素,可使机体产生严重的应激反应。严重的应激反应会加重肝功能的损害,影响患者的康复^[6]。手术中的出血量是影响手术后病死率及肝脏功能的一个重要因素。肝切除术中的出血可能导致血液携氧能力降低进而导致肝脏组织的低氧损伤。Fan等^[7]研究发现,当肝脏切除术中的出血量 $>4\ 000\ \text{ml}$ 时,术后死于肝脏功能衰竭的发生率将明显增加。而Johnson等^[8]研究发现,肝切除术中出血量过多而接受输血治疗的患者,术后生存率明显低于未接受输血者。肝切除术中肝门阻断时间在30 min之内(少数亦有阻断长达60 min以上的报道)一般不会造成肝功能的不可逆性损伤。然而合并肝硬化患者则对缺血再灌注损伤敏感得多,有学者研究发现,合并肝硬化患者阻断时间 $>20\ \text{min}$ 就会对术后肝功能产生明显影响^[9]。

对我院150份病例统计分析的结果显示,临床应用人血白蛋白的日剂量与患者手术的肝门阻断时间、术中出血量相关性较小($P>0.05$),与患者用药前肝功能的Child-Pugh评分存在正相关关系($P<0.05$),可见临床医生主要以患者肝功能为人血白蛋白日剂量的参考对象。而人血白蛋白应用的日剂量与用药后血清白蛋白浓度的变化程度相关关系较小($P>0.05$),说明人血白蛋白的补充效果并非由每日用量决定,其使用应根据患者的实际情况,并非补充速度快、补充量大即可达到良好的效果。

从统计病例显示,有57.33%的患者术后血清白蛋白值低于 $35\ \text{g/L}$,有使用人血白蛋白的指征。而对于用药前血清白蛋白水平 $\geq 35\ \text{g/L}$ 的患者,是否有必要使用人血白蛋白预防术后低蛋白血症仍有待商榷。另外,人血白蛋白的补充效果并非由每日用量决定,其使用应根据患者的实际情况,避免单日

给药剂量过大,可能导致患者血容量骤然增加,加重心、肺负担^[10,11]。临床药师可与临床医生进一步沟通和讨论,严格控制人血白蛋白的使用指征,节省医疗资源。

【参考文献】

- [1] 中国抗癌协会肝癌专业委员会,中国抗癌协会临床肿瘤学协作专业委员会,中华医学会肝病学会分会肝癌组.原发性肝癌规范化诊治的专家共识[J].肿瘤,2009,29(4):295-304.
- [2] Vermeulen LC Jr, Ratko TA, Erstad BL, et al. A paradigm for consensus—the University Hospital Consortium Guidelines for the use of albumin, nonprotein colloid, and crystalloid solutions[J]. Arch Intern Med, 1995, 155(4):373-379.
- [3] 许戈良, 龚卫东. 肝切除术中肝脏功能的影响因素及其评估[J]. 世界华人消化杂志, 2010, 18(35):3721-3723.
- [4] 毛一雷, 桑新亭, 杨志英, 等. 肝脏手术后病人白蛋白临床应用研究[J]. 中国实用外科杂志, 2007, 27(8):616-618.
- [5] 邓侠兴, 沈柏用, 吕文杰, 等. 百特5%及25%人血白蛋白在肝脏、胰腺手术围手术期应用的疗效和安全性[J]. 中华肝胆外科杂志, 2009, 15(3):192-195.
- [6] 吴军, 仇毓东, 朱新华, 等. 原发性肝癌精准肝切除术后应用羟乙基淀粉的临床研究[J]. 中国普通外科杂志, 2011, 20(1):27-31.
- [7] Fan ST, Lo CM, Liu CL, et al. Hepatectomy for hepatocellular carcinoma: toward zero hospital deaths[J]. Ann Surg, 1999, 229:322-330.
- [8] Johnson M, Mannar R, Wu AV. Correlation between blood loss and inferior vena caval pressure during liver resection[J]. Br J Surg, 1998, 85:188-190.
- [9] 许戈良, 龚卫东. 肝切除术中肝脏功能的影响因素及其评估[J]. 世界华人消化杂志, 2010, 18(35):3721-3723.
- [10] 张坚, 韩启明, 玉素甫. 重视人血白蛋白的临床应用及管理[J]. 新疆医学, 2008, 36:249-253.
- [11] 梁兵, 田兆嵩. 白蛋白的临床应用[J]. 中国输血杂志, 2008, 21(1):68-70.

[收稿日期] 2015-02-03 [修回日期] 2015-07-27

[本文编辑] 顾文华

(上接第450页)

- [6] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典2010年版一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010:29.
- [7] 詹学雄, 欧秀莉. 山楂精降脂片及其原料熊果酸的含量研究[J]. 海峡药学, 2009, 21(1):43-46.
- [8] 吕美红, 谢晓梅, 查孝柱, 等. 反相高效液相色谱法测定木瓜药材及饮片中齐墩果酸和熊果酸含量[J]. 安徽中医学院学报, 2010, 29(3):72-74.
- [9] 刘小兰, 周剑波, 陶燕铎, 等. 高效液相色谱法测定翼首草中齐

墩果酸和熊果酸的含量[J]. 中国医院药学杂志, 2008, 28(7):546-548.

- [10] 张才华, 郭兴杰. HPLC法同时测定白花蛇舌草中齐墩果酸和熊果酸得含量[J]. 沈阳大学药科学报, 2004, 21(5):358-360.
- [11] 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] 2014-07-09 [修回日期] 2014-11-07

[本文编辑] 顾文华