

高效液相色谱法测定枇杷叶及其制剂中三萜类成分*

朱诗塔¹, 张凤岭¹, 金革², 肖瑶²

(1. 福建省厦门市第五医院药剂科, 厦门 361101; 2. 湖南医药学院, 怀化 410008)

摘要 目的 采用高效液相色谱(HPLC)法测定枇杷叶及其制剂中三萜类成分含量,初步探索熊果酸和齐墩果酸作为枇杷叶制剂定量检测标志化合物的可能。方法 比较枇杷叶膏样品两种脱糖方式。用 HPLC 分析枇杷叶药材及其制剂中熊果酸和齐墩果酸的含量。色谱柱为迪马 Diamonsil C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 以乙腈-0.1% 磷酸水(95:5)为流动相, 流速 0.5 mL·min⁻¹, 柱温 30 ℃, 进样量 10 μL, 检测波长 210 nm。结果 枇杷叶药材及其制品中均含有熊果酸和齐墩果酸, 且含量均比较稳定。结论 熊果酸和齐墩果酸可作为枇杷叶制剂定量控制的标志化合物。

关键词 枇杷叶制剂; 熊果酸; 齐墩果酸; 色谱法, 高效液相

中图分类号 R284.1

文献标识码 B

文章编号 1004-0781(2017)06-0673-04

DOI 10.3870/j.issn.1004-0781.2017.06.018

Analysis of Triterpenoids Component in *Loquat* Leaf Herbs and Its Preparations by HPLC

ZHU Shita¹, ZHANG Fengling¹, JIN Ping², XIAO Yao² (1. Department of Pharmacy, the Fifth Hospital of Xiamen City, Fujian Province, Xiamen 361101, China; 2. Hunan University of Medicine, Huaihua 410008, China)

ABSTRACT Objective To determine the triterpenoid content in *Loquat* leaf by using HPLC method and to explore the feasibility of ursolic acid and oleanolic acid as the quantitative markers for determination of *Loquat* leaf and its preparations.

Methods Two desugaring methods of *Loquat* leaf extracts were compared. The contents of ursolic acid and oleanolic acid in *Loquat* leaf as well as preparations were measured based on a system of HPLC, with a Dumas Diamonsil C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) was used as analytical column. The mobile phase was consisted of acetonitrile-0.1% phosphoric acid (95:5) with the flow rate of 0.5 mL·min⁻¹. The column temperature was 30 ℃, the injection volume was 10 μL, the detective wavelength was 210 nm.

Results Ursolic acid and oleanolic acid were measured in both *Loquat* leaf and its preparations, and their contents were fairly stable and comparable. **Conclusion** Ursolic acid and oleanolic acid can be served as quantitative markers for the determination of *Loquat* leaf and its preparations.

KEY WORDS Preparations of *Loquat* leaf; Ursolic acid; Oleanolic acid; Chromatogram, high performance liquid

枇杷叶为蔷薇科植物枇杷 [*Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl.] 的干燥叶, 为常用的中药材, 具有清肺止咳、降逆止呕等功效, 常用于肺热咳嗽、气逆喘急、烦热口渴、胃热呕逆等^[1]。大量研究发现, 枇杷叶主要含有三萜类、黄酮类、皂苷类、多糖类等化学成分, 具有止咳、抗炎、祛痰作用, 临床上主要用于治疗呼吸道炎症、风湿性关节炎、过敏性紫癜、肾小球肾炎、荨麻疹、湿疹及高血糖等疾病^[2]。目前已有文献报道采用高效液相色谱(HPLC)法测定枇杷叶药材中熊果酸、齐墩果酸^[3-5]等成分的含量, 但以枇杷叶成分作为其制剂定量检测指标的研究鲜少报道。2015年版《中华人民共和国药典》有关枇杷叶单方和复方制剂的质量标准中均没

有采用枇杷叶的化学成分作为定量检测指标, 而复方制剂枇杷止咳颗粒则采用罂粟壳标志物吗啡或磷酸可待因作为标志物进行定性分析^[1]。为研究和规范枇杷叶药材及其制剂的质量标准, 笔者在本研究采用 HPLC 法对 7 个产地 8 个枇杷叶样品的熊果酸和齐墩果酸的含量进行分析, 并对复方制剂枇杷止咳颗粒和单方制剂枇杷叶膏中熊果酸和齐墩果酸进行分析测定, 以探索熊果酸和齐墩果酸作为枇杷叶制剂定量检测指标的可能性, 为枇杷叶及其相关制剂质量标准研究提供科学依据。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 Agilent 1260 高效液相色谱仪, G1311B 四元泵, G4212B DAD 阵列二极管检测器; 超声波中药处理机(山东济宁鲁超超声设备有限公司, 型号: LC-350); 电子分析天平(日本岛津, 型号: AUW120D, 感量: 0.1/0.01 mg)。

1.2 试剂 熊果酸对照品(中国食品药品检定研究院, 批号: 110742-201421, 含量: 93.8%), 齐墩果酸对

收稿日期 2016-03-17 修回日期 2016-09-05

基金项目 * 厦门市科技惠民项目(3502Z20144069)

作者简介 朱诗塔(1975-), 女, 湖南邵阳人, 主管药师, 硕士, 主要研究方向: 医院药学。电话: 0592-7212713, E-mail: amoystar@163.com。

照品(中国食品药品检定研究院,批号:110709-200304,含量 $\geq 98\%$);枇杷叶分别采自福建、云南、浙江、安徽、湖南邵阳、湖南怀化、江苏南京等7个地区(经湖南医药学院梅树模副教授鉴定);枇杷叶膏(北京同仁堂科技发展股份有限公司制药厂,批号:14130719,规格:每瓶150 g),枇杷止咳颗粒(贵州神奇药业有限公司,批号:140864,规格:每袋3 g);磷酸、乙腈、甲醇为色谱纯,水为超纯水,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱为迪马 Diamonsil C_{18} (250 mm \times 4.6 mm, 5 μm),流动相为乙腈-0.1%磷酸(95:5),流速0.5 mL $\cdot\text{min}^{-1}$,柱温30 $^{\circ}\text{C}$,进样量10 μL ,检测波长210 nm。

2.2 对照品溶液的制备 取熊果酸、齐墩果酸6.21, 2.01 mg,精密称定,置10 mL棕色量瓶中,用甲醇定容,分别配制成含有熊果酸621 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,齐墩果酸201 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液,经孔径0.45 μm 滤膜滤过,即得。

2.3 供试品溶液的制备

2.3.1 药材供试品溶液的制备 取上述8个枇杷叶药材样品粉末各4.0 g,精密称定,加入95%乙醇200 mL,超声提取30 min,补重,经孔径0.45 μm 滤膜滤过,按“2.1”项色谱条件进样,即得。

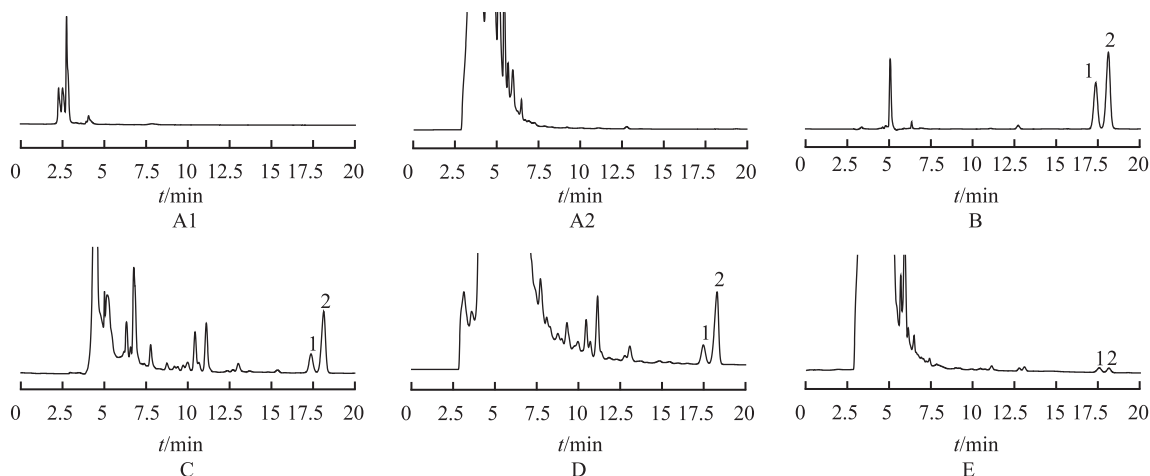
2.3.2 制剂供试品溶液的制备 取贵州神奇枇杷止咳颗粒3.11 g,精密称定,加入水15 mL,浓氨水0.5 mL,乙酸乙酯20 mL,连续萃取3次,取上层液,水

浴挥干溶剂,精密加入甲醇60 mL,过孔径0.45 μm 滤膜,即得。取枇杷叶膏4.71 g,精密称定,加入水15 mL,浓氨水0.5 mL,乙酸乙酯20 mL,连续萃取3次,得上层液,水浴挥干溶剂,精密加入甲醇60 mL,过0.45 μm 滤膜,按“2.1”项下色谱条件进样,即得。

2.3.3 阴性对照溶液 分别按照枇杷止咳颗粒和枇杷叶膏制备工艺,并按照“2.3.1”和“2.3.2”项方法,制备缺枇杷叶的阴性对照溶液。

2.4 系统适应性实验 取“2.2”和“2.3”项对照品溶液,供试品溶液和阴性对照溶液,按照“2.1”项色谱条件进样,记录色谱图。分别得到对照品、浙江药材和枇杷叶膏、枇杷止咳颗粒色谱图,结果见图1。

2.5 线性关系考察 精密移取“2.2”项对照品溶液各5.0 mL置10 mL量瓶中,定容,配制成含熊果酸和齐墩果酸分别为310.50和100.50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的混合对照品原溶液,并将此溶液分别稀释至2,5,10,20,40倍,得熊果酸质量浓度系列为310.50,155.25,62.10,31.05,15.53,7.76 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$;齐墩果酸质量浓度系列为100.50,50.25,20.10,10.05,5.03,2.51 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,按“2.1”项下色谱条件按进样,以峰面积(Y)为纵坐标,浓度(X)为横坐标,分别绘制熊果酸和齐墩果酸的标准曲线。结果熊果酸线性方程为 $Y = 6.3665X - 5.1642$ ($r = 0.9999$),表明在7.76~310.50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 范围内线性关系良好,齐墩果酸线性方程为 $Y = 6.5721X + 4.3479$ ($r = 0.9991$),表明在2.51~100.50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 范围内线性关系良好。



A1. 枇杷叶膏阴性对照溶液; A2. 枇杷止咳颗粒阴性对照溶液; B. 对照品溶液; C. 浙江枇杷叶; D. 枇杷叶膏; E. 枇杷止咳颗粒; 1. 齐墩果酸; 2. 熊果酸

图1 6种溶液的HPLC色谱图

A1. negative control of *Loquat* leaf cream; A2. negative control of *Loquat* granule; B. reference solution; C. Zhejiang *Loquat* leaf; D. the tested solution of *Loquat* leaf cream; E. the tested solution of *Loquat* granule; 1. oleanolic acid; 2. ursolic acid

Fig.1 HPLC chromatogram of six kinds of solution

2.6 精密度实验 精密吸取“2.5”项混合对照品原溶液10 μL,重复进样6次,测得熊果酸峰面积积分值 RSD 为 0.31%,齐墩果酸峰面积积分值 RSD 为 1.21%。

2.7 稳定性实验 取新配制的混合对照品溶液及新制备的福建产枇杷叶供试品提取溶液,分别于 0,2,4,8,12 h 进样,记录色谱峰面积的变化,结果对照品溶液熊果酸峰面积 RSD = 3.25%,齐墩果酸峰面积 RSD = 3.68%;供试品熊果酸峰面积 RSD = 4.17%,齐墩果酸峰面积 RSD = 4.36%。表明混合对照品溶液和供试品溶液在 12 h 内稳定。

2.8 重复性实验 精密称取福建产枇杷叶药材 5 份,按照“2.3.1”项方法制备供试液,按照“2.1”项色谱条件进样,测得齐墩果酸平均含量为 0.57%,RSD 为 1.57%,熊果酸平均含量为 1.06%,RSD 为 0.43%。

2.9 加样回收率实验 取枇杷止咳颗粒 3.11,3.08,3.15,3.12,3.10 g,精密称定,分别加入适量齐墩果酸、熊果酸对照品,加入水 15 mL,浓氨水 0.5 mL,乙酸乙酯 20 mL,连续萃取 3 次,得上层液,挥干,用甲醇定容 50 mL。过孔径 0.45 μm 滤膜,按“2.1”项色谱条件进样,结果见表 1。齐墩果酸平均加样回收率 91.93%,RSD = 8.76%,熊果酸平均加样回收率 70.36%,RSD = 11.43%。

表 1 齐墩果酸和熊果酸的加样回收率

Tab.1 Recoveries of oleanolic acid and ursolic acid μg				
标准品	原有量	加入量	测得量	回收率/%
齐墩果酸	0.435 4	0.304 0	0.731 6	97.43
	0.431 2	0.310 0	0.740 0	99.61
	0.441 0	0.296 0	0.723 1	95.30
	0.436 8	0.312 0	0.708 1	86.96
	0.434 0	0.374 0	0.734 5	80.35
熊果酸	0.373 2	0.382 0	0.623 5	65.52
	0.369 6	0.390 0	0.629 5	66.64
	0.378 0	0.372 0	0.614 9	63.68
	0.374 4	0.358 0	0.633 9	72.49
	0.372 0	0.384 0	0.692 6	83.49

2.10 样品测定 精密移取“2.3”项供试品溶液,按照“2.1”项色谱条件进样,测得各个药材和制剂中 2 种活性成分的百分含量见表 2。

3 讨论

笔者在本实验中考察枇杷叶膏的两种去糖方法:方法一,取枇杷叶膏 5 g,先用纯化水 15 mL 溶解,再用 100% 乙醇 45 mL 沉淀,滤过,取滤液挥干,用甲醇 2 mL 溶解制备供试品,但没有测到相应的物质。方法

二,称取枇杷叶膏 5 g,加入水 15 mL,乙酸乙酯 20 mL,浓氨水 0.5 mL,连续萃取 3 次,取上层液,过孔径 0.45 μm 滤膜,按“2.1”项色谱条件进样,效果较佳。故本实验采用方法二进行供试品的制备。

表 2 药材和制剂中齐墩果酸和熊果酸的百分含量

Tab.2 Percentage contents of oleanolic acid and ursolic acid in medicinal material and the preparation %, n = 3

来源	齐墩果酸	熊果酸
药材产地		
福建	0.57	1.06
云南	0.44	0.76
浙江	0.80	1.32
安徽	0.47	0.80
安徽(炙)	0.65	1.19
湖南邵阳	0.66	1.27
湖南怀化	0.48	1.24
江苏南京	0.53	1.11
制剂		
枇杷止咳颗粒	0.07	0.06
枇杷叶膏	0.08	0.34

对不同的流动相(甲醇-水、甲醇-0.1% 磷酸溶液、乙腈-水、乙腈-0.1% 磷酸溶液)和洗脱程序进行考察分析,最后确定本实验的色谱分析方法;齐墩果酸和熊果酸的最大吸收峰出现在 210 nm,故选择 210 nm 做为本实验的测定波长。

实验发现,相对于齐墩果酸,熊果酸在复方中的相对含量明显降低,在单方制剂中含量却明显增加,说明复方成分对熊果酸的含量可能有较大影响,在加样回收率实验中同样观察到熊果酸的加样回收率有明显低于齐墩果酸,可能与复方成分的相互作用有关,其相关性有待下一步深入研究。

笔者在已有研究基础上,应用 HPLC 法对产自福建、云南、江、安徽、湖南邵阳、湖南怀化、江苏南京 7 个产地的 8 个枇杷叶药材样品以及枇杷止咳颗粒和枇杷叶膏中三萜类成分进行比较研究,发现上述样品中均含有熊果酸和齐墩果酸,且在药材和制剂中含量均比较稳定,故认为熊果酸和齐墩果酸可作为枇杷叶制剂定量检测指标。

参考文献

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 204-205.
[2] 林玉霖, 林文津, 林力强. 枇杷叶研究现状与开发前景[J]. 中药材, 2006, 29(10): 1111-1114.
[3] 罗晓清, 郭小仪, 俞学炜. RP-HPLC 法测定枇杷叶中熊果

- 酸和齐墩果酸的含量[J]. 中国野生植物资源, 2004, 23 (5): 50 - 51.
- [4] 唐丽琴, 刘圣, 李鑫, 等. 高效液相色谱法测定枇杷叶提取物中齐墩果酸与熊果酸的含量[J]. 中国医院药学杂志, 2004, 24 (12): 725 - 726.

- [5] 鞠建华, 周亮, 郑瑞霞, 等. 高效液相色谱法测定中药枇杷叶中熊果酸的含量[J]. 中国药理学杂志, 2003, 38 (9): 657 - 659.

广西不同产地玉郎伞根茎叶中水黄皮素的含量测定^{*}

符传武, 黄筱珏, 韦于慢, 覃华亮, 洪薇, 蒋秋香, 覃子龙, 李隽永, 李玲, 刘永逸

(广西壮族自治区柳州食品药品检验所, 柳州 545006)

摘 要 目的 对广西不同产地壮药玉郎伞根、茎、叶中水黄皮素进行测定, 探讨玉郎伞习用药用部位为根的科学性及为其种植基地的选择提供检测数据。方法 采用高效液相色谱法测定广西不同产地壮药玉郎伞药材根、茎、叶中水黄皮素的含量。色谱条件: Symmetry C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 150 mm, 5 μm); 以乙腈-含 0.005 mol·L⁻¹ 庚烷磺酸钠 0.05 mol·L⁻¹ 磷酸二氢钾 (40:60) 为流动相; 柱温: 30 ℃; 流速: 1.0 mL·min⁻¹; 检测波长为 217 nm; 进样量 10 μL。结果 水黄皮素进样量在 12.23 ~ 122.3 μg·mL⁻¹ 间有良好的线性关系。根、茎、叶中水黄皮素的回收率分别为 98.86%, 98.36%, 101.04%; RSD 分别为 0.36%, 0.74%, 0.54%。水黄皮素在玉郎伞的根部含量最高, 茎次之, 在叶中几乎不含, 广西不同产地壮药玉郎伞根、茎中水黄皮素含量也有一定差异。结论 该实验证实玉郎伞习用药用部位为根的科学性, 其检测数据也可用于壮药玉郎伞种植基地的选择。

关键词 玉郎伞; 壮药; 水黄皮素; 色谱法, 高效液相

中图分类号 R284.1

文献标识码 B

文章编号 1004-0781(2017)06-0676-03

DOI 10.3870/j.issn.1004-0781.2017.06.019

玉郎伞 *Milletia pulchra Kurz uar. laxior* (Dunn) Z. Wei, 又名: 龙眼参; 为多年生木本。其分布范围仅局限于中国西南部海拔 1 500 ~ 1 800 m, 北纬 25.5° 附近的狭窄地带, 包括广西的部分市县。玉郎伞是广西特色药材, 现已收载在《广西壮族自治区壮药质量标准 (第一卷)》(2008 年版), 民间用于治疗小儿疳积、血虚头晕、失眠、跌打肿痛、骨折、中风性偏瘫等疾病^[1]。有研究表明^[2-7], 玉郎伞具有抗炎、抗肿瘤、降低血压、抑制心肌收缩力、保肝及清除自由基及对局灶性脑缺血再灌注损伤有保护作用。为了满足国内玉郎伞药材市场的需要和资源的可持续开发和应用, 笔者对不同栽培地区玉郎伞药材根、茎、叶中水黄皮素的含量进行测定, 报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器 美国 Waters2695 高效液相色谱仪, 紫外检测器; GR202 型电子分析天平 (日本 A&D 公司, 感

量: 0.1/0.01 mg); 元素 820a 型摩尔实验室超纯水器 (上海摩勒生物技术有限公司); AS7240BT 型超声清洗器 (天津奥特塞恩斯仪器有限公司)。

1.2 试药 水黄皮素对照品 (批号: 114-00471, 含量: 95%), 购于日本和光纯药工业株式会社; 玉郎伞样品具体信息见表 1, 所有药材均经过广西柳州食品药品检验所李玲主任中药师鉴定; 水为 I 级纯化水; 其余试剂均为分析纯。

表 1 玉郎伞样品信息

样品 编号	采集来源地 或购买地	采集时间 或购买时间	采集 部位
1	鹿寨县铁道口菜园边	2015 年 7 月	根、茎、叶
2	柳州市三棉宿舍	2015 年 7 月	根、茎、叶
3	北流市塘岸镇利民村龙眼园	2015 年 7 月	根、茎、叶
4	玉林市仁厚镇荔枝村种植园	2015 年 7 月	根、茎、叶
5	玉林市药材批发市场	2015 年 7 月	根、茎、叶
6	柳州市花红药业种植基地	2015 年 8 月	根、茎、叶
7	百色市东增路	2015 年 8 月	根、茎、叶
8	柳州市城站路药材市场	2015 年 8 月	根、茎、叶
9	来宾市忻城县遂意乡	2015 年 8 月	根、茎、叶
10	玉林药材市场	2015 年 8 月	根、茎、叶
11	陆川县沙坡镇	2015 年 8 月	根、茎、叶

收稿日期 2016-03-24 修回日期 2016-05-16

基金项目 * 广西柳州市“科技攻关与新产品试剂”课题 (2014CD0201 自)

作者简介 符传武 (1981 -), 男, 海南文昌人, 主管药师, 学士, 主要研究方向: 食品药品检验、质量标准研究。电话: 0772-2819757, E-mail: 38526408@qq.com。