

吴亚林,李小平,傅求平. HPLC-ELSD 法同时测定鹅绒委陵菜中齐墩果酸和熊果酸的含量[J]. 江苏农业科学,2013,41(9):303-304.

HPLC-ELSD 法同时测定鹅绒委陵菜中齐墩果酸和熊果酸的含量

吴亚林,李小平,傅求平

(江苏农牧科技职业学院,江苏泰州 225300)

摘要:建立了鹅绒委陵菜中齐墩果酸和熊果酸含量的测定方法。主要的参数设置为:色谱柱 Betasil C₁₈ (150 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相为乙腈-0.5% 三氟乙酸(体积比 85:15);流速 1.0 mL/min;柱温 30 ℃;蒸发光散射检测器,漂移管温度 80 ℃;氮气流速 2.0 L/min。试验结果表明,齐墩果酸、熊果酸分别在 0.009 0~0.090 mg/mL 和 0.0120~0.120 mg/mL 范围内线性关系良好($n=6$),平均回收率分别为 97.2%、99.1%,研究得出的方法简便、快速、准确,为鹅绒委陵菜的质量评价提供了相关依据。

关键词:鹅绒委陵菜;齐墩果酸;熊果酸;HPLC-ELSD

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)09-0303-02

鹅绒委陵菜(*Potentilla anserine* L.)为蔷薇科(Rosaceae)委陵菜属(*Potentilla*)植物鹅绒委陵菜的干燥全草,分布于我国北方各省及西南的四川、云南、西藏等地,是我国的传统中药,具有清热解毒、凉血止痢等功效,可用于赤痢腹痛、久痢不止、痔疮出血、痈肿疮毒、脾虚腹泻等症^[1-2]。鹅绒委陵菜中的主要药用化学成分有黄酮类、三萜类、甾醇类及有机酸类等^[3-5],其中的齐墩果酸具有保肝、消炎、降糖、抗 HIV 和抗肿瘤的药理作用,熊果酸具有抑制血管生成、抗肿瘤、抗炎、抗 HIV 的药理作用,是鹅绒委陵菜的活性成分。目前已有很多关于其他中药和中药制剂中齐墩果酸和熊果酸含量的报道^[6-8],但是尚未见鹅绒委陵菜中齐墩果酸和熊果酸含量测定的相关报道。为了全面评价药材质量,本研究以 ELSD 为检测器,建立了鹅绒委陵菜中熊果酸和齐墩果酸的 HPLC 测定方法。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

试验材料购自青海普兰特中药材有限公司,经中国科学院西北生物研究所孙洪发研究员鉴定为鹅绒委陵菜。齐墩果酸对照品(批号 110709-200304)和熊果酸对照品(批号 110742-200516)均购自中国药品生物制品鉴定所。

乙腈为色谱纯,甲醇为分析纯,水为超纯水。

试验仪器主要有:HPLC 色谱仪[Waters 600 泵,AF 在线脱气机, Waters 717 自动进样器, 2996 Photodiode Array Detector(PDA), Alltech ELSD 2000 蒸发光检测器(ELSD), Empower 色谱工作站]。

收稿日期:2013-02-15

基金项目:江苏农牧科技职业学院院级项目(编号:YB201001)。

作者简介:吴亚林(1981—),男,江苏连云港人,助教,主要研究方向为药物制剂。E-mail: wylguzhu@126.com。

通信作者:李小平,女,青海海东人,博士,讲师,主要研究方向为天然产物的开发与利用。E-mail: lixiaoping1995@hotmail.com。

1.2 试验方法

1.2.1 色谱条件 色谱柱:Betasil C₁₈ (150 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈-0.5% 三氟乙酸(体积比 85:15);流速:1.0 mL/min;柱温:30 ℃。蒸发光散射检测器,漂移管温度 80 ℃;氮气流速:2.0 mL/min。

1.2.2 溶液的制备 对照品溶液的制备:分别精确称取齐墩果酸对照品、熊果酸对照品 25、30 mg,置于同一 50 mL 容量瓶中,用甲醇溶解并定容、摇匀;再精确量取 1 mL 于同一 10 mL 容量瓶中,定容,摇匀即得齐墩果酸 0.050 mg/mL、熊果酸 0.060 mg/mL 的混合对照品溶液。

供试品溶液的制备:精确称取 1.0 g 左右的鹅绒委陵菜药材粉末,过四号筛,置于 100 mL 锥形瓶中,再精确量取 25 mL 甲醇加入锥形瓶中,称定整个锥形瓶的重量;加热回流 1 h,冷却后再次称重,用甲醇将减少的重量补足;摇匀、过滤,弃初滤液,剩余溶液用 0.45 μm 滤膜过滤,即得供试品溶液。

1.2.3 线性关系的考察 精确取适量齐墩果酸和熊果酸对照品,用适量甲醇溶解,制得齐墩果酸对照品、熊果酸对照品浓度分别为 0.090、0.120 mg/mL 的混合对照品溶液。

分别精确量取 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 mL 对照品溶液于 10 mL 容量瓶中,用甲醇定容,按照“1.2.1”节中的色谱条件分别进样 20 μL。以对照品浓度(μg/mL)为横坐标、峰面积为纵坐标进行回归分析。

1.2.4 精密度试验 精确吸取 10 μL“1.2.2”节中的混合对照品溶液,按照“1.2.1”节中的色谱条件,重复进样 6 次。

1.2.5 溶液的稳定性试验 分别在制备完成后 0、2、4、8、12、24 h 用同一供试品溶液进样,测试溶液的稳定性。

1.2.6 重复性试验 取 6 份同样的鹅绒委陵菜样品,按照“1.2.2”节中的步骤制得供试品溶液,按照“1.2.1”节中的色谱条件测定齐墩果酸和熊果酸含量。

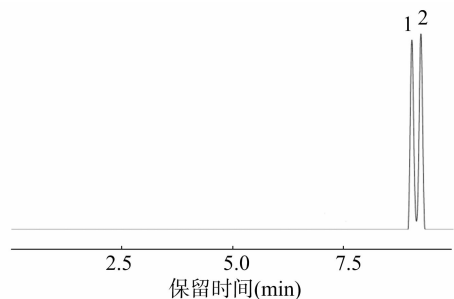
1.2.7 方法的回收率试验 精确称取 6 份经干燥粉碎的鹅绒委陵菜药材粉末,每份 0.5 g,在其中 3 份中加入精确称定的 0.06 mg 齐墩果酸、0.10 mg 熊果酸,按照“1.2.2”节中的相关步骤制备供试品溶液,测定并计算回收率。

1.2.8 样品含量的测定 取“1.2.2”节中制备的供试品溶液,参照“1.2.1”节中的色谱条件进行测定。

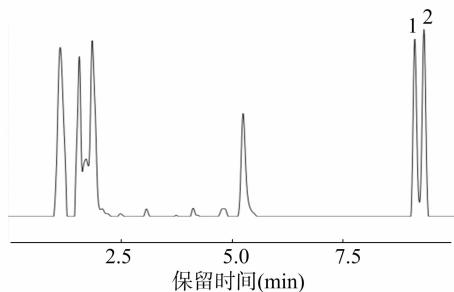
2 结果与分析

2.1 色谱图

齐墩果酸和熊果酸混合对照品及样品的色谱图见图 1。



A. 齐墩果酸和熊果酸混合对照品的色谱图



B. 齐墩果酸和熊果酸混合样品的色谱图

1. 齐墩果酸 ($t_{R_1}=9.04$ min); 2. 熊果酸 ($t_{R_2}=9.24$ min)

图1 齐墩果酸和熊果酸混合对照品和样品的色谱图

2.2 方法学的考察结果

2.2.1 线性关系的考察结果 通过回归统计得到齐墩果酸和熊果酸的回归方程分别为:

$$y = 450.216x - 1.274, r = 0.9999 (n = 6);$$

$$y = 602.346x - 2.341, r = 0.9997 (n = 6).$$

线性范围分别为:0.009 0 ~ 0.090 mg/mL、0.012 0 ~ 0.120 mg/mL。

2.2.2 精密度试验结果 试验测得齐墩果酸峰面积的 RSD 为 0.38%, 熊果酸峰面积的 RSD 为 0.32%, 两者的 RSD 都小于 0.5%, 表明仪器具有良好的精密度。

2.2.3 溶液的稳定性试验结果 在制备完成后 0、2、4、8、12、24 h 进样, 测得齐墩果酸峰面积的 RSD 为 0.33%, 熊果酸峰面积的 RSD 为 0.27%, 表明在 24 h 内供试品溶液稳定。

2.2.4 重复性试验结果 试验测得齐墩果酸、熊果酸的平均含量分别为 0.263、0.471 mg/g, RSD 分别为 0.71%、0.42%。

2.2.5 方法的回收率 试验测得齐墩果酸的平均回收率为 97.2%, RSD 为 1.9% ($n = 6$); 熊果酸的平均回收率为 99.1%, RSD 为 2.0% ($n = 6$)。

2.3 样品含量的测定结果

试验测得鹅绒委陵菜中齐墩果酸、熊果酸含量分别为 0.263、0.471 mg/g。

3 结果与讨论

齐墩果酸和熊果酸均为三萜类化合物, 结构极为相似, 极性非常相近, 紫外吸收都在近紫外区, 如果采用紫外检测器则会给测定结果带来较大的误差; 蒸发光散射检测器为质量型通用检测器, 在检测过程中溶剂和流动相会全部蒸发, 因此对检测结果无干扰, 灵敏度高, 含量结果可靠。

齐墩果酸和熊果酸的分离度受柱温影响较大。试验结果表明: 柱温越高其分离度越差; 但柱温太低时, 仪器的压力增高。经过多次试验发现, 在 30 ℃ 时齐墩果酸和熊果酸都具有理想的分离效果。

齐墩果酸和熊果酸不具有挥发性, 而流动相较易挥发, 因此为了保证理想的灵敏度和重复性, 检测器采用不分流模式。

本试验中, 回归曲线和含量测定均采用常用对数值计算, 是因为蒸发光散射器的峰面积和样品质量的对数呈线性关系。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 2010 年版 一部[M]. 北京: 化学工业出版社, 2010: 420.
- [2] 李利英, 邓瑞雪, 刘 普, 等. 委陵菜属植物的化学成分及药理作用研究进展[J]. 中国现代中药, 2008, 10(9): 3-6, 29.
- [3] 沈 阳, 王庆贺, 林厚文, 等. 委陵菜化学成分的研究[J]. 中药材, 2006, 29(3): 237-239.
- [4] 王庆贺, 李志勇, 沈 阳, 等. 委陵菜三萜类化学成分研究[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(17): 1434-1436.
- [5] 刘 普, 段宏泉, 潘 勤, 等. 委陵菜三萜成分研究[J]. 中国中药杂志, 2006(22): 1875-1879.
- [6] 沈晓丹, 袁 杰, 徐乃玉, 等. HPLC 测定蓝萼香茶菜中齐墩果酸和熊果酸的含量[J]. 中成药, 2010, 32(12): 2182-2183.
- [7] 赵韶华, 刘敏彦, 王玉峰, 等. HPLC-ELSD 法同时测定连翘叶中齐墩果酸和熊果酸[J]. 食品科学, 2012, 2(2): 224-226.
- [8] 徐 君, 吴连花, 徐文芬, 等. HPLC 法测定对坐叶药材中齐墩果酸和熊果酸[J]. 中成药, 2012, 34(4): 765-767.