



HPLC同时测定山楂提取物中绿原酸 和牡荆素鼠李糖苷的含量

何雅君¹, 苏娟², 杨茜², 刘慧², 张卫东^{1,2*}

(1. 上海交通大学药学院, 上海 200240; 2. 第二军医大学药学院, 上海 200433)

[摘要] 目的:采用 HPLC 建立山楂提取物中绿原酸和牡荆素鼠李糖苷的含量测定方法。方法:SHISEIDO CAPCELL PAK C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相甲醇(A)、四氢呋喃-乙酸-水(10:2:76, B), 梯度洗脱, 检测波长 330 nm, 流速 1.0 mL · min⁻¹, 柱温 25 °C。结果:绿原酸和牡荆素鼠李糖苷分别在 1.34 ~ 164.8, 1.18 ~ 148.7 mg · L⁻¹ 线性关系良好; 平均加样回收率分别为 100.4%, 98.83%, RSD 1.5%, 1.3%。结论:该方法简单、准确、重复性好, 可用于测定山楂提取物中绿原酸和牡荆素鼠李糖苷的含量, 为山楂提取物及其制剂的质量控制有效的方法。

[关键词] 山楂提取物; 绿原酸; 牡荆素鼠李糖苷; 质量控制; HPLC

山楂提取物为蔷薇科植物山里红 *Crataegus pinnatifida* Bge. var. *major* N. E. Br. 的干燥果实经加工制成^[1], 为山楂精降脂片所附提取物, 具有抗氧化、清除自由基的作用, 临床主要用于治疗高脂血症, 亦可用于冠心病和高血压的辅助治疗^[2]。其主要活性成分为有机酸类和黄酮类。山楂中所含黄酮类成分包括牡荆素、牡荆素鼠李糖苷、金丝桃苷、槲皮素、芦丁等, 有机酸类成分包括绿原酸、枸橼酸、熊果酸等。药理活性研究表明山楂黄酮类成分具有降压、降血脂的作用^[3], 被认为是山楂提取物的主要药效成分, 其中牡荆素鼠李糖苷的含量较高。而山楂中有机酸类成分绿原酸能够清除自由基, 具有抗氧化和降脂的作用^[4]。

为了有效地控制山楂提取物的质量, 本文采用 HPLC 建立了山楂提取物中绿原酸和牡荆素鼠李糖苷 2 个活性成分的含量测定方法。该法测定快速、简便, 准确度和重现性均较好, 适用于山楂提取物及其制剂的质量控制。

1 材料

Agilent-1100 型高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司); Sartorius BP211D 型电子天平(德国 Sartori-

us); 甲醇(J T Baker 色谱纯), 乙腈(J T Baker 色谱纯), 四氢呋喃(TEDIA 色谱纯), Milli-Q 超纯水(美国 Millipore 公司), 其余试剂均为分析纯。

牡荆素鼠李糖苷, 绿原酸均购自中国药品生物制品检定所, 供含量测定用, 批号分别为 111668-200401, 110753-200413。实验所用 8 批样品均来源于山西晋城中晋药业有限公司, 山楂提取物为干燥的山楂成熟果实经乙醇提取, 盐酸水解后的提取物。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 对照品溶液的制备 精密称取绿原酸对照品 3.30 mg, 牡荆素鼠李糖苷对照品 2.97 mg, 置 10 mL 量瓶中, 用 60% 乙醇溶解并定容至刻度, 摇匀, 作为对照品溶液。质量浓度分别为 0.330, 0.297 g · L⁻¹。4 °C 冷藏保存备用。

2.1.2 供试品溶液的制备 取山楂提取物粉末 40 mg, 精密称定, 置 10 mL 量瓶中, 加入 60% 乙醇溶解并定容至刻度, 摇匀, 滤过, 取滤液, 即得。

2.2 色谱条件与系统适用性试验

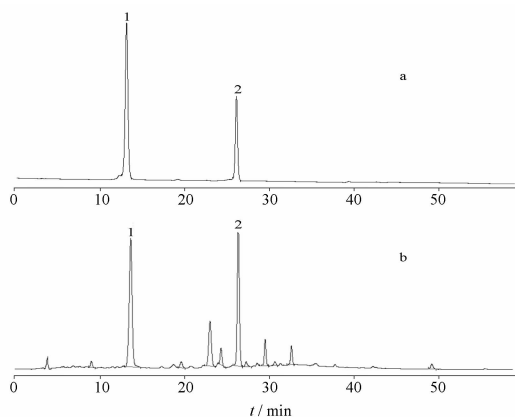
SHISEIDO CAPCELL PAK C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相甲醇(A), 四氢呋喃-乙酸-水(10:2:76, B), 梯度洗脱, 0 ~ 13 min, 2% A, 13 ~ 30 min, 2% ~ 35% A, 30 ~ 60 min, 35% ~ 60% A; 流速 1.0 mL · min⁻¹; 柱温 25 °C; 检测波长 330 nm。绿原酸、牡荆素鼠李糖苷对照品溶液及山楂提取物供试品溶液 HPLC 图见图 1。

[稿件编号] 2011124002

[基金项目] 国家药典委员会标准研究项目(TS-46)

[通信作者] * 张卫东, 博士生导师, Tel/Fax: (021) 81871244, E-mail: wdzhangy@hotmail.com

[作者简介] 何雅君, 硕士研究生, E-mail: heyajun0228@126.com



a. 对照品; b. 样品; 1. 绿原酸; 2. 牡荆素鼠李糖苷。

图1 对照品及山楂提取物样品的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC chromatograms of Crataegi Fructus extract

表1 山楂提取物线性关系

Table 1 Linearities of Crataegi Fructus extract

化合物	回归方程	检测范围/mg · L ⁻¹	r	检测限/ng	定量限/ng
绿原酸	Y = 2 456.4X - 3.109	1.34 ~ 164.8	0.999 9	0.72	2.96
牡荆素鼠李糖苷	Y = 1 400X + 1.397 5	1.18 ~ 148.7	0.999 9	0.83	3.73

密度绿原酸 1.67%、牡荆素鼠李糖苷 3.1%。

2.3.3 重复性考察 精密称定同一批号(080425)的山楂提取物粉末 40 mg, 平行称取 6 份, 按 2.1.2 项操作制备供试液, 按 2.2 项色谱条件进样分析, 测定峰面积, 计算含量, 测得 RSD 分别为 0.30% 和 0.90% (n = 6), 结果证明此方法重复性良好。

2.3.4 专属性考察 采用 DAD 全波长扫描, 查看保留时间为 13.60 min 处的绿原酸峰和保留时间为 26.59 min 处的牡荆素鼠李糖苷峰上 5 点的紫外吸收图, 发现其最大紫外吸收峰相同, 且 5 点重合度好, 说明两峰纯度好, 均为单一峰。

2.3.5 稳定性考察 取新制备的同一份供试溶液, 分别在室温放置 0, 4, 8, 12, 24, 48 h 后进样, 测得绿原酸和牡荆素鼠李糖苷峰面积 RSD 分别为 1.2%, 1.6%, 表明供试溶液在 48 h 内稳定。

2.3.6 加样回收率考察 精密称取 9 份已知含量的山楂提取物(批号 080306), 平均分 3 组, 每组中分别加入质量浓度分别为绿原酸和牡荆素鼠李糖苷的对照品溶液(每种分别相当于供试提取物中原有含量质量分数的 80%, 100%, 120%), 照 2.1.2 项方法制备供试品溶液, 按 2.2 项色谱条件测定, 计算回收率, 结果见表 2。

2.3 方法学考察

2.3.1 线性关系考察 精密吸取混合对照品溶液适量, 用 60% 乙醇稀释, 分别制成 8 个浓度梯度的对照品溶液。按上述色谱条件分别进样 10 μL, 记录峰面积, 以对照品浓度为横坐标(X)、峰面积为纵坐标(Y), 绘制标准曲线, 各对照品的最低检测限 LOD 按信噪比的 3 倍来计算, 最低定量限 LOQ 按信噪比的 10 倍来计算, 结果见表 1。

2.3.2 精密度考察 取同一混标溶液, 按 2.2 项色谱条件测定, 分别在同一天测定 5 次进行日内精密度考察和连续 5 d 测定进行日间精密度考察, 记录各色谱峰的峰面积, 计算各待测物的 RSD。日内精密度绿原酸 0.94%、牡荆素鼠李糖苷 1.1%, 日间精

表2 山楂提取物中绿原酸和牡荆素鼠李糖苷加样回收率 (n = 3)

Table 2 The recovery of chlorogenic acid and vitexin 2''-rhamnoside in Crataegi Fructus extract (n = 3)

化合物	样品中量/mg	加入量/mg	测得值/mg	回收率/%	平均值/%	RSD/%			
绿原酸	0.277 2	0.220 6	0.509 6	105.3	100.4	1.5			
	0.279 8	0.239 0	0.518 8	96.72					
	0.280 5	0.213 9	0.490 2	98.04					
	0.264 0	0.282 3	0.534 9	95.96					
	0.298 7	0.281 6	0.578 1	99.22					
	0.289 2	0.267 5	0.567 7	104.1					
	0.265 4	0.324 4	0.602 2	103.8					
	0.291 8	0.336 8	0.620 3	97.54					
	0.269 1	0.313 7	0.593 5	103.4					
	牡荆素鼠李糖苷	0.380 0	0.304 9	0.679 3			98.16	98.83	1.3
		0.369 2	0.298 8	0.657 8			96.59		
		0.406 1	0.322 2	0.717 1			96.52		
0.374 1		0.365 4	0.7203	94.74					
0.363 0		0.376 5	0.751 7	103.2					
0.382 8		0.355 8	0.726 6	96.63					
0.382 5	0.460 1	0.829 5	97.15						
0.359 9	0.480 1	0.849 6	101.9						
0.364 5	0.482 3	0.868 3	104.4						

2.4 样品含量测定

取 8 个不同批次样品各 40 mg, 精密称定, 按照



2.1.2 方法制备供试品溶液,分别精密吸取对照品和供试品溶液各 10 μL,注入液相色谱仪,测定。结果见表 3。

表 3 山楂提取物中绿原酸和牡荆素鼠李糖苷质量分数 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 3 The determination results of chlorogenic acid and vitexin 2''-rhamnoside in different samples ($\bar{x} \pm s, n=3$) μg · g⁻¹

批号	绿原酸	牡荆素鼠李糖苷
080306	256.8 ± 5.6	147.3 ± 2.1
080307	249.2 ± 4.9	20.8 ± 1.3
080425	572.4 ± 3.7	78.5 ± 3.4
080426	438.3 ± 4.3	16.0 ± 3.8
080427	522.1 ± 2.1	3.3 ± 0.2
080314	346.9 ± 3.2	88.6 ± 2.8
080315	417.6 ± 4.8	58.4 ± 3.0
080316	315.7 ± 3.9	39.6 ± 1.6

3 讨论

考察流动相系统(甲醇-水、甲酸-水-磷酸等系统)以及流速的变化对分离效果的影响。结果表明以甲醇为流动相 A,四氢呋喃-乙酸-水(10:2:76)为流动相 B 进行梯度洗脱,在流速 1.0 mL · min⁻¹的情况下,绿原酸出峰时间在 13 ~ 14 min,牡荆素鼠李糖苷出峰时间在 26 ~ 27 min,并与相邻峰分离完全。

用 DAD 全波长扫描,测得绿原酸的紫外吸收峰为 330 nm,牡荆素鼠李糖苷的紫外吸收峰为 230, 268, 335 nm,综合考虑,选择两者均有较强吸收的

330 nm 作为检测波长。

试用了 3 种型号的 C₁₈ 柱,包括 SHISEIDO CAPCELL Pak C₁₈ AQ 柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), TSK-GEL ODS-100Z 柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm), Agilent ZORBAX SB C₁₈ 柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm)。结果表明用 SHISEIDO CAPCELL Pak C₁₈ AQ 柱能更好的分离山楂提取物。

4 结论

山楂提取物主要含有机酸和黄酮及其苷类成分。本文选择主要活性成分绿原酸和牡荆素鼠李糖苷为指标,采用 HPLC 建立了山楂提取物中绿原酸和牡荆素鼠李糖苷含量测定方法,精密度、准确度及重复性均良好,为其绿原酸和牡荆素鼠李糖苷质量控制提供了一个有效方法,也为山楂、山楂提取物及其相关制剂的质量控制提供参考。

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. WS3-B-1687-94 卫生部药品标准中药成方制剂. 第 18 册[S]. 北京:人民卫生出版社,1993.
- [2] 许宗凡,谢后光,邹双凤. 山楂精降脂片治疗高脂血症 68 例疗效观察[J]. 医学信息,2010,5(4):877.
- [3] 谢伟华,孙超,刘淑敏,等. 山楂黄酮对高脂血症小鼠血脂及生脂基因转录表达的影响[J]. 中国中药杂志,2009,34(2):224.
- [5] Li S Y, Chang C Q, Ma F Y, et al. Modulating effects of chlorogenic acid on lipids and glucose metabolism and expression of hepatic peroxisome proliferator-activated receptor-α in golden hamsters fed on high fat diet [J]. Biomed Environ Sci, 2009, 22 (2):122.

Simultaneous determination of chlorogenic acid and vitexin 2''-rhamnoside in Crataegi Fructus extracts by HPLC

HE Yajun¹, SU Juan², YANG Qian², LIU Hui², ZHANG Weidong^{1,2*}

(1. School of Pharmacy, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200240, China;

2. School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a determination method for contents of chlorogenic acid and vitexin 2''-rhamnoside in Crataegi Fructus extracts by HPLC. **Method:** The chromatographic column was SHISEIDO CAPCELL PAK C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); mobile phase was methanol(A) and THF-acetic acid-water (10:2:76, B), with gradient elution, flow speed was 1.0 mL · min⁻¹; detection wavelength was 330 nm; temperature of column was 25 °C. **Result:** Chlorogenic acid and vitexin 2''-rhamnoside showed good linear relationships within the ranges of 1.34-164.8 and 1.18-148.7 mg · L⁻¹, with the recovery rates being 100.4% and 98.8%, and RSD being 1.5% and 1.3% respectively. **Conclusion:** The present method is so simply, accurate and highly repeatable that it can be used to effectively determine the contents of chlorogenic acid and vitexin 2''-rhamnoside in Crataegi Fructus extracts.

[Key words] Crataegi Fructus extracts; chlorogenic acid; vitexin 2''-rhamnoside; determination; HPLC