

HPLC 法测定山茱萸中科罗索酸的含量

刘博^{1,2}, 杨艳芳², 吴和珍^{2*}

(1. 湖北丽益医药科技有限公司, 武汉 430205, 2. 湖北中医药大学药学院, 武汉 430065)

摘要 目的: 建立高效液相色谱法测定山茱萸中科罗索酸的含量。方法: 采用 Inertsil ODS-3 (150 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 流动相为甲醇-水-磷酸 (82:18:0.2), 流速 1.0 mL · min⁻¹, 检测波长 205 nm, 柱温 30 °C。结果: 科罗索酸进样浓度在 59.86 ~ 598.6 μg · mL⁻¹ 范围内与峰面积呈良好的线性关系, 平均回收率 (n=6) 为 98.7% (RSD=1.0%)。结论: 该方法分离度好, 专属性强, 重复性好, 简便易行, 可用于山茱萸中科罗索酸的含量测定。

关键词: 山茱萸; 三萜酸类; 科罗索酸; 高效液相色谱法; 含量测定

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793(2011)12-2217-03

HPLC determination of corosolic acid in Corni Fructus

LIU Bo^{1,2}, YANG Yan-fang², WU He-zhen^{2*}

(1. Hubei Livscien Pharm Sci & Tech CO., LTD., Wuhan 430205, China;

2. Pharmacy Faculty, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China)

Abstract Objective: To establish an HPLC method for determination of corosolic acid in Corni Fructus. **Methods:** A Inertsil ODS-3 (150 mm × 4.6 mm, 5 μm) column was adopted; The mobile phase consisted of methanol-dis-tilled water-phosphoric acid (82:18:0.2) at a flow rate of 1.0 mL · min⁻¹; The detection wavelength was 205 nm, and the column temperature was 30 °C. **Results:** The standard curves of corosolic acid shows a good linearity in the concentration range of 59.86 - 598.6 μg · mL⁻¹, and the average recovery (n=6) was 98.7% with RSD of 1.0%. **Conclusion:** This method is simple, repeatable, and has good resolution and high selectivity. It can be used for the determination of corosolic acid in Corni Fructus.

Key words: Corni Fructus; Terpene acids; corosolic acid; HPLC; assay

山茱萸为山茱萸科植物山茱萸 (*Cornus officina-lis* Sieb. et Zucc.) 的干燥成熟果肉, 收载于中国药典 2010 年版一部, 具有补益肝肾、收涩固脱的功能, 用于眩晕耳鸣、腰膝酸痛、阳痿遗精、遗尿尿频、崩漏带下、大汗虚脱、内热消渴等病症。山茱萸作为治疗消渴症的要药^[1], 经常出现在中医降糖的组方中, 如肾气丸、六味地黄丸、鹿茸丸等。有文献研究表明, 山茱萸降血糖活性成分是以熊果酸为主的三萜酸类化合物^[2], 故近代的植物化学与含量测定方面的研究也多集中在齐墩果酸、熊果酸上^[3]。科罗索酸 (corosolic acid) 为三萜酸类物质, 是熊果酸的衍生物。现代研究表明, 科罗索酸具有显著降血糖作用, 活性远高于熊果酸^[4]。其降糖机理主要是通过诱导肌肉、骨骼和脂肪细胞中的 GLUT4 受体从胞内

移动到细胞膜表面, 并与体液中葡萄糖结合再转入细胞内, 从而降低机体血糖水平^[5]。

科罗索酸作为 II 型糖尿病植物药和功能性天然保健食品医药原料, 现在已成为国际市场的热门产品。但目前仅见从枇杷叶^[6]和大叶紫薇叶^[7]中提取科罗索酸的报道, 未见从山茱萸中提取纯化科罗索酸及检测科罗索酸含量的研究。本试验研究建立了高效液相色谱法测定山茱萸中科罗索酸的含量, 将为山茱萸的进一步开发提供重要的科学依据。

1 仪器与材料

高效液相色谱仪: 美国光谱物理公司 SP1000 泵, 岛津 SPD-10A 紫外检测器, N2000 色谱工作站; 紫外-可见分光光度计: 岛津 UV2100; 超声波清洗仪: AutoScience AS5150A; 旋转蒸发仪: Heidolph

LABOROTA 4000; 天平: 岛津 Libror AEL - 40SM、METTLER TOLEDO PB303 - N; 科罗素酸对照品(纯度 98.53%) 购自 Sigma 公司; 山茱萸药材购自湖北金药堂武汉胭脂路店, 经湖北丽益医药科技有限公司中药室杨向东主任鉴定为山茱萸科植物山茱萸 *Cornus officinalis* Sieb. et Zucc. 的干燥成熟果肉; 所用试剂均为分析纯, 水为重蒸馏水。

2 溶液制备

2.1 对照品溶液 精密称取干燥至恒重的科罗素酸对照品 10 mg, 置 25 mL 量瓶中, 加甲醇适量, 超声(功率 150 W, 频率 40 kHz) 处理 10 min 使溶解, 放冷, 稀释至刻度, 摇匀, 即得每 1 mL 含科罗素酸 400 μg 的溶液。

2.2 供试品溶液 取山茱萸药材适量, 粉碎(过 3

号筛), 取约 20 g, 精密称定, 加入 80% 乙醇 400 mL, 加热回流 2 h, 滤过, 滤渣重复回流提取 1 次, 滤过。合并滤液, 60 $^{\circ}\text{C}$ 减压回收溶剂至干, 加 50 mL 水使混悬, 用乙酸乙酯振摇提取 5 次, 每次 50 mL, 合并乙酸乙酯液, 蒸干, 残渣加甲醇移至 10 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 用 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

3 色谱条件

色谱柱: Inertsil ODS - 3 (150 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇 - 水 - 磷酸(82:18:0.2); 流速: 1.0 mL $\cdot$ min $^{-1}$; 检测波长: 205 nm; 柱温: 30 $^{\circ}\text{C}$; 进样量: 20 μL 。理论塔板数按科罗素酸峰计应不低于 3000, 分离度应大于 1.5。对照品及样品色谱图见图 1。

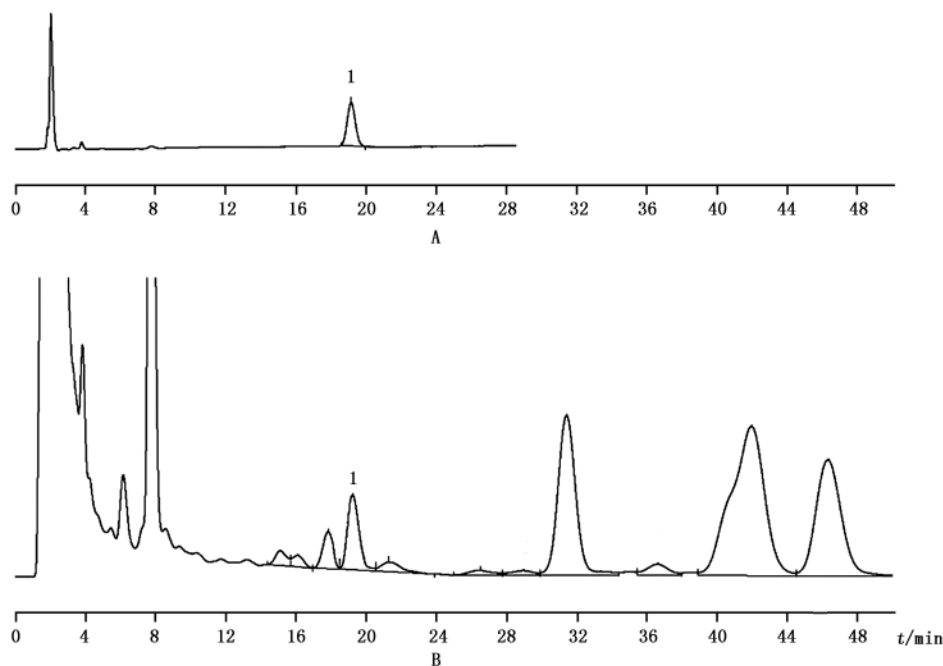


图 1 对照品(A)、样品(B) HPLC 图

Fig 1 HPLC chromatograms of reference substance(A) and sample(B)

1. 科罗素酸(corosolic acid)

4 线性关系考察及检测限的测定

精密称取科罗素酸对照品 59.86 mg, 置 50 mL 量瓶中, 加甲醇适量, 超声(功率 150 W, 频率 40 kHz) 处理 10 min 使溶解, 放冷, 稀释至刻度, 摇匀, 再精密量取 0.5, 1, 2, 3, 4, 5 mL, 分别置 10 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 即得系列对照品溶液。分别精密吸取 20 μL 注入液相色谱仪中测定, 记录色谱图和峰面积。以科罗素酸峰面积(Y) 为纵坐标, 质量浓度(X , $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 为横坐标, 得线性方程

为:

$$Y = 150.7X + 26.81 \quad r = 0.9999$$

表明科罗素酸进样浓度在 59.86 ~ 598.6 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内, 与峰面积呈良好的线性关系。

取“2.1”项的对照品溶液, 用甲醇逐级稀释, 进样, 按 3 倍信噪比计算检测限, 结果显示科罗素酸最小检出限为 $6.108 \times 10^{-8} \text{ g}$, 表明以本法测定科罗素酸含量的灵敏度高。

5 精密度试验

取 $478.8 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 对照品溶液 $20 \mu\text{L}$, 连续进样 6 次, 测定科罗索酸峰面积, 计算 $\text{RSD} (n=6)$ 为 0.41% , 表明仪器精密度良好。

6 重复性试验

取山茱萸药材适量, 粉碎, 取约 20 g , 共 6 份, 按“2.2”项下方法制备 6 份供试品溶液, 分别进样测定。结果科罗索酸平均含量 ($n=6$) 为 0.025% , RSD 为 1.6% , 表明本方法重复性好。

7 稳定性试验

精密吸取供试品溶液 $20 \mu\text{L}$, 分别在 0, 1, 2, 3, 4, 6, 8 h 进样测定, 计算峰面积的 $\text{RSD} (n=7)$ 为 1.2% , 表明供试品溶液在 8 h 内检测稳定性良好, 完全能够满足分析工作需要。

8 加样回收试验

精密称取 6 份已知含量的样品粉末 10 g (每 1 g 山茱萸药材中含科罗索酸为 0.25 mg), 分别准确加入科罗索酸对照品溶液 2 mL ($1.0136 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$), 按“2.2”项下方法制备供试溶液, 进样 $20 \mu\text{L}$, 测定科罗索酸的量, 计算平均回收率 ($n=6$) 为 98.7% , RSD 为 1.0% 。

9 样品含量测定

取按“2”项下方法制备的对照品溶液和供试品溶液, 在“3”项色谱条件下进样测定。测得 3 批山茱萸药材中科罗索酸含量 (以质量分数计) 分别为 0.025% , 0.025% , 0.024% 。

10 讨论

试验中曾进行了提取溶剂的选择研究, 分别使用甲醇、乙醇、丙酮 3 种溶剂对山茱萸进行比较试验, 发现均能完全提取出药材中的三萜类成分, 考虑到环保及安全性, 故选用乙醇作为提取溶剂。同时还对乙醇浓度、乙醇用量、提取时间、提取次数进行了正交优选试验, 结果表明: 用 80% 乙醇溶液、20 倍 ($\text{g} : \text{mL}$) 乙醇用量、提取 2 次、每次 2 h 为优选提取条件。尽管如此, 作为含量测定的方法, 其药材和溶剂的用量还有待进一步优化。

实验研究中曾对萃取溶剂进行过单因素考察, 结果发现用乙酸乙酯能将药材中科罗索酸提取完全, 且分层迅速, 水浴蒸干速度快, 毒性相对较低, 故

选用乙酸乙酯作萃取溶剂。

取 $59.3 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 科罗索酸溶液, 在岛津 UV2100 紫外-可见分光光度仪上于 $200 \sim 400 \text{ nm}$ 范围内进行紫外扫描, 结果显示在 205 nm 波长处出现最大吸收峰, 故 HPLC 检测波长为 205 nm 。

流动相的选择, 曾经考察过乙腈-水系统, 使用不同比例的流动相等度洗脱及梯度洗脱 2 种方式进行试验, 未达基线分离, 而采用甲醇-水-磷酸系统进行试验, 当其比例为甲醇-水-磷酸 ($82:18:0.2$) 时, 科罗索酸与其他杂质峰达到基线分离, 且分离度大于 1.5% , 基本能达到分离要求, 故确定其为山茱萸中科罗索酸测定流动相。多成分同时测定的更佳分离条件有待进一步深入研究。

参考文献

- JIANG Guo-yan(蒋国彦). Ancient Chinese records and importance drugs of diabetes(中国古代对糖尿病的记载及治疗糖尿病的重要药品). *Natl Med J China*(中华医学杂志), 1953, 39(3): 898
- HAN Jing-chao(韩璟超), JI Hui(季晖), XUE Cheng-feng(薛城锋). Hypoglycemic effect of terpenes from Fructus Corni(山茱萸总萜的降血糖作用). *Chin J Nat Med*(中国天然药物), 2006, 4(2): 125
- YAN Hua(严华), SU Jian(苏健), WANG Bao-qin(王宝琴). Discussion on oleanolic acid and ursolic acid as indicator of quality control of Chinese medica material(药材中齐墩果酸与熊果酸质控指标的探究). *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志), 2009, 29(8): 1400
- De Tommasi N, De Simone F, Cirino G. Hypoglycemic effect of sesquiterpene glycosides and polyhydroxylated triterpenoids of *Eriobotrya japonica*. *Planta Med*, 1991(57): 414
- Miura T, Itoh Y, Kaneko T. Corosolic acid induces GLUT4 translocation in genetically type 2 diabetic mice. *Biol Pharm Bull*, 2004, 27(7): 1103
- CHEN Long-sheng(陈龙胜), CAI Qun-xing(蔡群兴), XIN Yang(忻旸). Study on optimum process for extracting corosolic acid from *Eriobotrya japonica* leaves by orthogonal test(正交试验法优选枇杷叶中科罗索酸提取工艺的研究). *Chem Ind Forest Prod*(林产化学与工业), 2006, 26(3): 110
- ZONG Wei(纵伟), XIA Wen-shui(夏文水). Isolation and determination of corosolic acid in Lagerstroemia speciosa leaves(大叶紫薇叶中 corosolic acid 的分离和测定). *Chin J Trop Crops*(热带作物学报), 2006, 27(2): 103

(本文于 2011 年 1 月 19 日收到)