

中图分类号: R932; R284.1; R286.0

文献标志码: A

文章编号: 1006-4931(2024)13-0093-03

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2024.13.022



手性流动相高效液相色谱法测定木瓜中齐墩果酸和熊果酸含量

耿仲乐, 王 静, 张 峰

(河南省漯河市药品检测检验中心, 河南 漯河 462000)

摘要:目的 建立同时测定木瓜中齐墩果酸和熊果酸含量的手性流动相高效液相色谱法。方法 色谱柱为 Shimpack GIST C₁₈ 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-甲醇-含 12 mmol/L 羟丙基-β-环糊精的 0.5% 醋酸铵溶液 (64:12:21, V/V/V), 流速为 1.0 mL/min, 检测波长为 210 nm, 柱温为 18 °C, 进样量为 20 μL。结果 齐墩果酸和熊果酸的分离度大于 1.5; 质量浓度分别在 0.009~0.182 μg/mL、0.016~0.325 μg/mL 范围内与峰面积积分值线性关系良好 ($r = 0.999\ 8, 0.999\ 9, n = 6$); 检测限分别为 0.86, 0.58 μg/mL, 定量限分别为 2.75, 1.86 μg/mL; 精密度、稳定性、重复性试验结果的 RSD 均小于 2.0% ($n = 6$); 加样回收率分别为 99.74%, 99.22%, RSD 分别为 1.00%, 0.93% ($n = 6$)。3 批样品中齐墩果酸和熊果酸的总含量为 2.305%~2.357%。结论 该改进方法操作简便、结果准确、重复性好, 可有效分离并测定木瓜中齐墩果酸和熊果酸的含量, 可用于木瓜药材的质量控制。

关键词: 木瓜; 高效液相色谱法; 手性流动相; 齐墩果酸; 熊果酸; 含量测定

Content Determination of Oleanolic Acid and Ursolic Acid in Chaenomeles Fructus by HPLC with Chiral Mobile Phase

GENG Zhongle, WANG Jing, ZHANG Feng

(Luohe Drug Testing and Inspection Center, Luohe, Henan, China 462000)

Abstract: Objective To establish a high-performance liquid chromatography (HPLC) method with chiral mobile phase for simultaneous determination of oleanolic acid and ursolic acid in Chaenomeles Fructus. **Methods** The chromatographic column was Shimpack GIST C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), and the mobile phase was acetonitrile-methanol-0.5% cyclodextrin ammonium acetate solution containing 12 mmol/L hydroxypropyl group-β-cyclodextrin (64:12:21, V/V/V), the flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelength was 210 nm, the column temperature was 18 °C, and the injection volume was 20 μL. **Results** The separation degree of oleanolic acid and ursolic acid was higher than 1.5, the linear ranges of oleanolic acid and ursolic acid were 0.009-0.182 μg/mL and 0.016-0.325 μg/mL ($r = 0.999\ 8, 0.999\ 9, n = 6$), respectively. The limits of detection were 0.86 and 0.58 μg/mL, respectively. The limits of quantification were 2.75 and 1.86 μg/mL, respectively. The RSDs of precision, stability, and repeatability test results were all lower than 2.0% ($n = 6$). The recoveries of oleanolic acid and ursolic acid were 99.74% and 99.22%, with RSDs of 1.00% and 0.93% ($n = 6$), respectively. The total content of oleanolic acid and ursolic acid in three batches of samples was in the range of 2.305%-2.357%. **Conclusion** The improved method is simple, accurate, and has good repeatability, it can effectively separate and determine the content of oleanolic acid and ursolic acid in Chaenomeles Fructus, which can be used for the quality control of Chaenomeles Fructus.

Key words: Chaenomeles Fructus; HPLC; chiral mobile phase; oleanolic acid; ursolic acid; content determination

木瓜为蔷薇科植物贴梗海棠 *Chaenomeles speciosa* (Sweet) Nakai 的干燥近成熟果实, 味酸, 气微清香, 具有镇痛、抗炎、增强免疫、保肝、抗胃溃疡与肠损伤、抗肿瘤等药理学活性, 临床常用于治疗湿痹拘挛、腰膝关节酸重疼痛、暑湿吐泻、转筋挛痛、脚气水肿等症^[1-2]。木瓜中含三萜类、黄酮类、苯丙素类、有机酸类、油脂类、氨基酸、甾类等化学成分, 其中三萜类化合物齐墩果酸与熊果酸具有抗肿瘤、保肝、抗氧化、抗炎、抗病毒、降血糖作用^[3-6]。齐墩果酸和熊果酸互为同分异构体, 仅 29 位、30 位的甲基位置不同, 结构与性质极相似。故采用高效液相色谱法检测时难以有效分离齐墩果酸和熊果酸, 且通过改变二元或三元流动相比比例、酸碱度

值、离子强度等的分离效果均不理想。参考文献[7-11], 对 2020 年版《中国药典(一部)》木瓜中的含量测定方法进行优化, 建立了同时测定木瓜中齐墩果酸和熊果酸含量的手性流动相高效液相色谱法。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Waters 2695/2996 型高效液相色谱仪(美国 Waters 公司); KQ-250DB 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司, 功率为 250 W, 频率为 40 kHz); AB135-S 型电子天平(瑞士 Mettler 公司, 精度为 0.01 mg)。

1.2 试剂

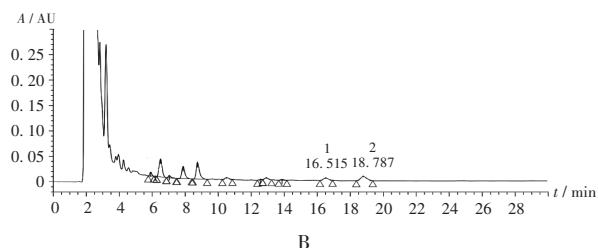
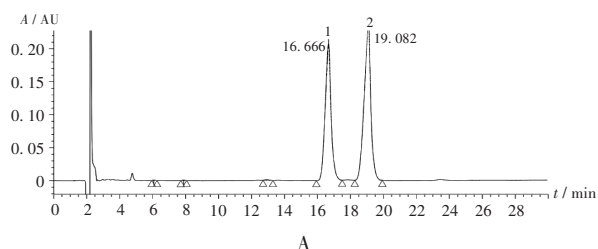
木瓜(产自安徽宣城, 批号分别为 20220905, D0020810,

20221005),经河南省漯河市药品检测检验中心耿仲乐主管中药师鉴定为正品;齐墩果酸对照品(批号为110709-201808,含量为91.1%),熊果酸对照品(批号为110742-201823,含量为99.9%),均购自中国食品药品检定研究院;羟丙基- β -环糊精(国药集团化学试剂有限公司,批号为20201102);甲醇、乙腈(色谱纯,美国Tedia公司);水为超纯水,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱:Shimpack GIST C₁₈柱(250 mm×4.6 mm, 5 μ m);流动相:乙腈-甲醇-含12 mmol/L羟丙基- β -环糊精的0.5%醋酸铵溶液(64:12:21, V/V/V);流速:1.0 mL/min;检测波长:210 nm;柱温:18 $^{\circ}$ C;进样量:20 μ L。在此色谱条件下,齐墩果酸峰和熊果酸峰的分离度大于1.5,理论板数均大于6 000,对称因子在0.92~1.07之间。色谱图见图1。



1. 齐墩果酸 2. 熊果酸
A. 混合对照品溶液 B. 供试品溶液

图1 高效液相色谱图

1. Oleanolic acid 2. Ursolic acid
A. Mixed reference solution B. Test solution

Fig. 1 HPLC chromatograms

2.2 溶液制备

混合对照品溶液:取齐墩果酸对照品、熊果酸对照品各适量,精密称定,加甲醇制成每1 mL含齐墩果酸0.455 mg、熊果酸0.812 mg的混合对照品贮备液;精密量取1 mL,置10 mL容量瓶中,加甲醇定容,摇匀,经0.45 μ m微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

供试品溶液:取样品细粉2 g,精密称定,置100 mL具塞锥形瓶中,精密加入甲醇100 mL,密塞,称定质量,超声处理(功率为250 W,频率为40 kHz)1 h,放冷,再称定质量,用甲醇补足减失的质量,摇匀,经0.45 μ m微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.3 方法学考察

线性关系考察:精密吸取2.2项下混合对照品贮备液0.5,1,2,5,8,10 mL,分别置25 mL容量瓶中,加甲醇定容,配制一系列质量浓度的混合对照品溶液,按2.1项下色谱条件进样测定,以对照品溶液的质量浓度(X , μ g/mL)为横坐标、峰面积积分值(Y)为纵坐标进行线性回归。结果见表1。

表1 线性关系考察、检测限与定量限确定结果

Tab. 2 Results of the linear relation test, limits of detection, and limits of quantification

化合物	回归方程	r	线性范围(mg/mL)	检测限(μ g/mL)	定量限(μ g/mL)
齐墩果酸	$Y = 1.245 \times 10^6 X - 325$	0.999 8	0.009~0.182	0.86	2.75
熊果酸	$Y = 5.315 \times 10^5 X + 158$	0.999 9	0.016~0.325	0.58	1.86

检测限与定量限确定:取2.2项下混合对照品溶液,加甲醇逐级稀释,测定空白溶剂与稀释的混合对照品溶液,以3倍信噪比(S/N)的质量浓度作为齐墩果酸和熊果酸的检测限,以10倍 S/N 的质量浓度作为定量限。结果见表1。

精密度试验:取2.2项下混合对照品溶液适量,按2.1项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果齐墩果酸和熊果酸峰面积的 RSD 分别为0.57%和0.34%($n=6$),表明仪器精密度良好。

重复性试验:取样品(批号为20220905)适量,按2.2项下方法平行制备供试品溶液6份,按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算含量。结果齐墩果酸和熊果酸含量的 RSD 分别为0.67%和0.45%($n=6$),表明方法重复性良好。

稳定性试验:取重复性试验项下供试品溶液,分别于0,2,4,6,8,12 h时按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果齐墩果酸和熊果酸峰面积的 RSD 分别为0.56%和0.79%($n=6$),表明供试品溶液在12 h内稳定性良好。

加样回收试验:取已知含量的样品6份,每份1 g,精密称定,分别置100 mL具塞锥形瓶中,精密量取2.2项下齐墩果酸和熊果酸混合对照品贮备液2 mL,按2.2项下方法制备供试品溶液,按2.1项下色谱条件进样测定,计算回收率。结果见表2。

2.4 样品含量测定

取3批(批号分别为20220905, D0020810, 20221005)样品,按2.2项下方法制备供试品溶液,按2.1项下色谱条件进样测定,记录色谱图,按标准曲线法分别计算齐墩果酸和熊果酸含量。结果齐墩果酸和熊果酸含量为2.305%~2.357%,符合2020年版《中国药典(一部)》规定(木瓜中含齐墩果酸和熊果酸的总量不得少于0.50%)。详见表3。

表 2 加样回收试验结果 ($n = 6$)

Tab. 2 Results of the recovery test ($n = 6$)

样品含量(mg)		加入量(mg)		测得量(mg)		回收率(%)		$\bar{X}$ (%)		RSD(%)	
齐墩果酸	熊果酸	齐墩果酸	熊果酸	齐墩果酸	熊果酸	齐墩果酸	熊果酸	齐墩果酸	熊果酸	齐墩果酸	熊果酸
0.810	1.522	0.910	1.624	1.730	3.114	101.10	98.03				
0.790	1.506	0.910	1.624	1.688	3.110	98.68	98.77				
0.796	1.500	0.910	1.624	1.702	3.136	99.56	100.74				
0.810	1.506	0.910	1.624	1.726	3.114	100.66	99.01	99.74	99.22	1.00	0.93
0.790	1.522	0.910	1.624	1.698	3.142	99.78	99.75				
0.816	1.532	0.910	1.624	1.714	3.140	98.68	99.01				

表 3 样品中齐墩果酸和熊果酸含量测定结果 (% , $n = 3$)

Tab. 3 Results of the content determination of oleanolic acid and ursolic acid in samples (% , $n = 3$)

化合物	20220905	D0020810	20221005	$\bar{X}$
齐墩果酸	0.795	0.802	0.808	0.802
熊果酸	1.562	1.503	1.528	1.531
总含量	2.357	2.305	2.336	2.333

3 讨论

3.1 样品制备方法选择

齐墩果酸和熊果酸均为五环三萜类化合物,游离的化合物易溶于石油醚、苯等有机试剂,不溶于水,与糖类结合成皂苷类成分则可溶于水及含水醇类溶液。以甲醇为溶出介质,以提取方式、提取时间、溶剂量为考察因素,以齐墩果酸和熊果酸峰面积总和为评价指标,采用 $L_9(3^4)$ 正交试验优选木瓜中齐墩果酸和熊果酸的提取条件,根据直观判断和方差分析结果确定最佳提取工艺为木瓜药材加 50 倍量甲醇,超声提取 1 h。

3.2 流动相选择

β -环糊精为七元环状低聚糖化合物,其分子中空并呈“V”型的圆桶状构造,作为主体分子能给客体分子提供良好的不对称环境。其手性识别机制主要依赖于对映体分子能否进入 β -环糊精的空腔及其紧密程度,通过两对映体与 β -环糊精不同相互作用形成的非对映体络合物的保留差异和稳定性差异,从而实现对映体的分离。羟丙基- β -环糊精在水中的溶解度好,在 50% 乙醇和 50% 甲醇中也能溶解,是一种理想的注射剂增溶剂和药物赋形剂,可为客体分子提供羟丙基的空间位阻,使客体分子更易被拆分。故流动相系统考虑添加羟丙基- β -环糊精,以增加齐墩果酸和熊果酸的分离度。

为较好地分离齐墩果酸和熊果酸,流动相系统考察了甲醇-水、乙腈-水、甲醇-0.2% 磷酸水溶液、乙腈-0.2% 磷酸水溶液、甲醇-水-冰醋酸-三乙胺溶液、甲醇-含 12 mmol/L 羟丙基- β -环糊精-0.5% 磷酸溶液-三乙胺溶液^[12-14]、乙腈-甲醇-含 12 mmol/L

羟丙基- β -环糊精的 0.5% 醋酸铵溶液(64:12:21, V/V/V),结果在流动相系统中加入羟丙基- β -环糊精后齐墩果酸和熊果酸的分离度较好。且再提高环糊精的浓度分离度增加不显著,为降低试剂对仪器的损耗,选择乙腈-甲醇-含 12 mmol/L 羟丙基- β -环糊精的 0.5% 醋酸铵溶液(64:12:21, V/V/V)作为流动相。

3.3 方法评价

本研究中建立的方法操作简便、结果准确、重复性好,可有效分离并测定木瓜中的齐墩果酸和熊果酸的含量,可用于木瓜药材的质量控制。

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,2015:61.

[2] 邹妍, 鄢海燕. 中药木瓜的化学成分和药理活性研究进展[J]. 国际药学研究杂志,2019,46(7):507-515.

[3] 冯协和, 陈科力, 刘义梅. 木瓜抗氧化活性研究进展[J]. 医药导报,2016,35(5):491-495.

[4] 汤华成, 张东杰, 赵蕾. 功能性食品因子齐墩果酸研究进展[J]. 食品科技,2007,32(9):16-18.

[5] 张明发, 沈雅琴. 齐墩果酸和熊果酸的神经精神药理作用研究进展[J]. 药物评价研究,2015,38(5):570-576.

[6] 闫月乔, 杨宇. 齐墩果酸抗肿瘤作用机制的研究进展[J]. 医学综述,2016,22(5):914-917.

[7] 单莉, 陈莉, 杨洁, 等. 不同产地木瓜中齐墩果酸与熊果酸含量分析[J]. 安徽医药,2020,24(12):2352-2354.

[8] 陈希, 刘绪平, 肖钦钦, 等. 羟丙基- β -环糊精手性流动相添加剂法拆分那氟沙星对映体[J]. 分析试验室,2020,39(12):1426-1429.

[9] 双亚洲. 桥联双 β -环糊精手性液相色谱键合相的制备与评价[D]. 南昌:南昌大学,2020.

[10] 双亚洲, 王惠, 张天赐, 等. 二脲基桥联 β -环糊精手性液相色谱键合相的制备与性能评价[J]. 色谱,2020,38(4):464-475.

[11] 刘尧, 刘莹, 孙睿. 磺丁基醚- β -环糊精流动相添加剂法拆分尼莫地平对映体[J]. 世界最新医学信息文摘,2019,19(70):17-18.

[12] 王玮琦, 吉姆·哈迪, 曾令文, 等. 以羟丙基- β -环糊精为流动相添加剂测定宣木瓜中齐墩果酸与熊果酸[J]. 食品科技,2020,45(4):269-275.

[13] 李维霞, 魏佳, 苏玉红, 等. 高效液相色谱法测定巴旦木青皮提取物中齐墩果酸和熊果酸[J]. 食品科学,2016,37(10):151-157.

[14] 于有强, 李崇阳, 王兴国, 等. HPLC 检测白桦脂酸、齐墩果酸和熊果酸方法的建立[J]. 中国食品添加剂,2018,29(3):176-181.

(收稿日期:2023-03-22;修回日期:2024-01-08)