

## HPLC 同时测定沙棘果实中的 6 种三萜酸

周浩楠<sup>1,2</sup> 胡娜<sup>1</sup> 董琦<sup>1</sup> 王洪伦<sup>1\*</sup>

(1. 中国科学院西北高原生物研究所 中国科学院藏药研究重点实验室 青海省藏药研究重点实验室 青海 西宁 810008;  
2. 中国科学院大学 北京 100049)

**摘要:** 目的 采用 RP-HPLC 法同时测定沙棘果实中山楂酸、科罗索酸、白桦脂酸、齐墩果酸、熊果酸、obtusol 的含量。方法 采用 C<sub>18</sub> 色谱柱(250 mm × 4.6 mm 5 μm) 流动相为甲醇-0.5% 甲酸溶液(85:15) 流速 0.8 mL·min<sup>-1</sup> 检测波长 210 nm 柱温 30 °C 进样量 10 μL。结果 山楂酸、科罗索酸、白桦脂酸、齐墩果酸、熊果酸、obtusol 等的线性范围分别为 0.088~3.012、0.192~5.988、0.098~2.982、0.213~6.031、0.435~11.978、0.113~3.634 μg (r<sup>2</sup> ≥ 0.9990) ,平均加样回收率分别为 93.29%、95.96%、94.07%、96.48%、98.43%、97.78% (n=6) RSD 均小于 1.7% (n=6) 。结论 所用方法操作简便 分离效果、重复性及稳定性均较好 结果准确 可用于沙棘样品中 6 种三萜酸类成分的测定。

**关键词:** 反相高效液相色谱法; 同时测定; 三萜酸; 含量测定; 不同产地; 沙棘属; 沙棘; 果实

中图分类号: R917

文献标志码: A

文章编号: 1006-0103(2021)03-0319-04

DOI: 10.13375/j.cnki.wjps.2021.03.018

## Simultaneous determination of six triterpenic acids in *Hippophae rhamnoides* fruit by HPLC

ZHOU Haonan<sup>1,2</sup> ,HU Na<sup>1</sup> ,DONG Qi<sup>1</sup> ,WANG Honglun<sup>1\*</sup>

(1. Qinghai Provincial Key Laboratory of Tibetan Medicine Research Key Laboratory of Tibetan Medicine Research Northwest Institute of Plateau Biology Chinese Academy of Sciences Xining Qinghai 810008 P. R. China; 2. University of Chinese Academy of Sciences Beijing 100049 P. R. China)

**Abstract:** **OBJECTIVE** To simultaneously determine content of maslinic acid ,corosolic acid ,betulinic acid ,oleanolic acid , ursolic acid and 3β,27-dihydroxy-urs-12-ene in *Hippophae rhamnoides* L. fruits by RP-HPLC. **METHODS** The separation was achieved on a C<sub>18</sub> column (250 mm × 4.6 mm 5 μm) at 30 °C using methanol-0.5% formic acid aqueous solution (85:15) as the mobile phase at a flow rate of 0.8 mL·min<sup>-1</sup>. The wavelength was set at 210 nm. **RESULTS** The linear ranges of maslinic acid ,corosolic acid ,betulinic acid ,oleanolic acid ,ursolic acid ,and 3β,27-dihydroxy-urs-12-ene were 0.088-3.012 0.192-5.988 0.098-2.982 0.213-6.031 0.435-11.978 and 0.113-3.634 μg (r<sup>2</sup> ≥ 0.9990) , and the average sample recovery (n=6) were 93.29% 95.96% 94.07% 96.48% 98.43% and 97.78% with RSD (n=6) all less than 1.7%. **CONCLUSION** The method is simple to operate and has good separation effect ,repeatability and stability , and accurate results. It can be used for the determination of six triterpenic acids of *H. rhamnoides* samples.

**Key words:** RP-HPLC; Simultaneous determination; Triterpenic acid; Content determination; Different areas; *Hippophae* L.; *Hippophae rhamnoides* L.; Fruit

CLC number: R917

Document code: A

Article ID: 1006-0103(2021)03-0319-04

胡颓子科沙棘属沙棘 *Hippophae rhamnoides* L. 为灌木或小乔木 ,具有健脾养胃、破瘀止血、祛痰、利肺、化湿、壮阴、升阳等作用<sup>[1]</sup>。沙棘果实和叶中含有三萜及其苷、黄酮、生物碱、有机酸、挥发油等多种化学成分<sup>[2]</sup>。沙棘果渣作为一种沙棘加工副产物 ,也含有三萜、黄酮、维生素、粗

脂肪、粗纤维及甾体等丰富的有效成分<sup>[3]</sup>。三萜酸类化合物大多具有抗炎、镇痛、抗菌等作用<sup>[4]</sup>。在前期研究中 ,课题组首次从沙棘中分离制备得到一种三萜酸化合物 obtusol (3β,27-dihydroxy-urs-12-ene) ,该化合物具有一定的新颖性<sup>[5]</sup>。由于存在同分异构体 ,加大了三萜酸分析方法建

基金项目: 青海省科技厅项目(2017-SF-A8; 2017-ZJ-Y11; 2019-ZJ-7023)

作者简介: 周浩楠 正攻读中药学-天然药物化学专业的硕士学位。Email: hnzhou@nwipb.cas.cn

\* 通信作者( Correspondent author) ,Email: hlwang@nwipb.cas.cn

立的难度。研究者采用柱前衍生 HPLC 法,来克服同分异构体共洗脱所致分离难度增加的问题,也有研究者采用分析种类比较少的三萜酸来降低分析难度<sup>[6]</sup>。现选取 6 种三萜酸对照品,其中,有两对互为同分异构体(即山楂酸和科罗素酸、齐墩果酸和熊果酸),为更加全面地分析沙棘中三萜酸的种类和含量,还加入了化合物 obtusol 作为一个检测指标。将方法用于沙棘样品中三萜类化合物的分析,可为分析、评价沙棘植物与其相关制品以及质量控制研究提供参考。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与试剂

1260 系列高效液相色谱仪(美国 Agilent); 中草药粉碎机(天津市泰斯特仪器有限公司)。山楂酸、科罗素酸、白桦脂酸、熊果酸等对照品

(成都德思特生物科技有限公司);齐墩果酸对照品(成都曼思特生物科技有限公司);obtusol 对照品(3 $\beta$ -27-dihydroxy-urs-12-ene,自制,色谱纯度 $\geq 96\%$ );沙棘果实样品(采自青海省的西宁市、湟中县、湟源县、互助县、大通县等 5 个市县,经高庆波研究员鉴定为胡颓子科植物中国沙棘 *Hippophae rhamnoides* L. subsp. *sinensis* 的果实);甲醇为色谱纯;水为纯净水;其余试剂为分析纯。

### 1.2 方法与结果

**1.2.1 色谱条件** 采用 XAqua C<sub>18</sub> 色谱柱(250 mm $\times$ 4.6 mm 5  $\mu$ m) 流动相为甲醇-0.5% 甲酸水溶液(85:15),流速 0.8 mL $\cdot$ min<sup>-1</sup>,检测波长 210 nm,柱温 30  $^{\circ}$ C。取混合对照品及供试溶液在此色谱条件下进样,目标色谱峰的分离较好,基本达到基线分离,对称因子 0.96~1.08,分离度均大于 1.5(图 1)。

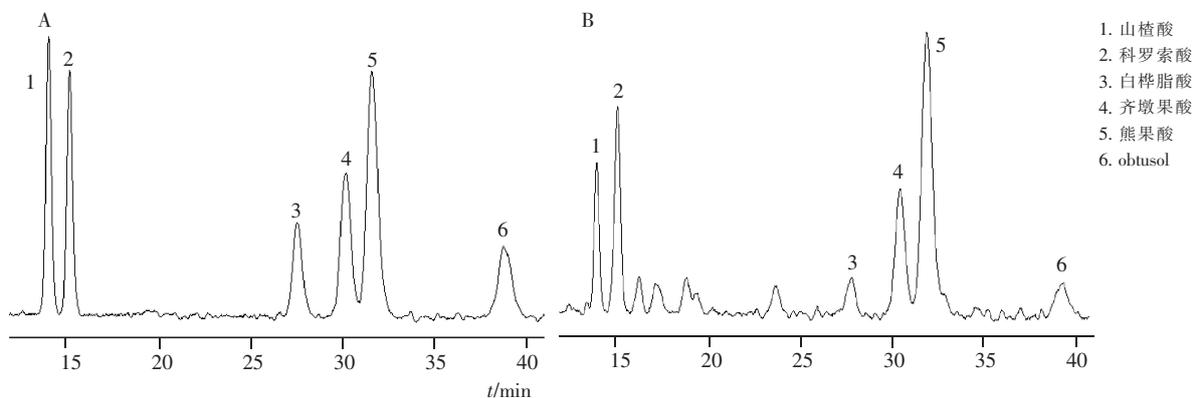


图 1 混合对照品(A)和沙棘样品(B)溶液的 HPLC 色谱图

Figure 1 HPLC chromatograms of the mixed reference solution(A) and samples of *Hippophae rhamnoides* pomace(B)

**1.2.2 溶液的制备** 分别精密称取适量山楂酸、科罗素酸、白桦脂酸、齐墩果酸、熊果酸、obtusol 等对照品,分别置 10 mL 量瓶中,加甲醇溶解并定容,得单一组分对照品贮备液。分别精密吸取 1 mL 上述贮备液转移至 10 mL 量瓶中,加甲醇定容,制成山楂酸、科罗素酸、白桦脂酸、齐墩果酸、熊果酸及 obtusol 浓度分别为 0.1、0.2、0.1、0.2、0.4、0.12 mg $\cdot$ mL<sup>-1</sup> 的混合对照品贮备液。将沙棘各样品置冷冻干燥机中,于 -70  $^{\circ}$ C 下干燥 48 h 精密称取 3.0 g 沙棘样品,研碎后置具塞锥形瓶中,精密加入 20 mL 95% 乙醇,称定重量,超声(200 W、40 kHz)提取 1 h,冷却至室温后再称定重量,用 95% 乙醇补足减失的重量,摇匀,静置 30 min 后取上清液,过 0.45  $\mu$ m 滤膜,即得供试品溶液。

**1.2.3 线性关系的考察** 分别吸取混合对照品溶液,用甲醇依次稀释,得混合对照品系列溶液,分别吸取 10  $\mu$ L 混合对照品系列溶液,按“1.2.1”项色谱条件进样,分析测定,记录峰面积,以峰面积值为纵坐标、对照品进样量( $\mu$ g)为横坐标进行线性回归,得各成分的回归方程及线性参数见表 1。

**1.2.4 精密性、重复性与稳定性的试验** 分别精密吸取 10  $\mu$ L 混合对照品溶液,于 1 d 内,按“1.2.1”项色谱条件连续重复进样 6 次,计算得山楂酸、科罗素酸、白桦脂酸、齐墩果酸、熊果酸、obtusol 等化合物峰面积的 RSD 分别为 1.71%、1.34%、1.52%、2.09%、1.67%、1.22% ( $n=6$ ),表明仪器精密性良好。取同一沙棘样品 6 份,每份各约 3.0 g,按“1.2.2”项方法制备供试品溶

表1 各化合物的线性回归方程、线性范围和相关系数( $n=6$ )Table 1 Regression equations, linear ranges and correlation coefficient( $r$ ) of each compound( $n=6$ )

化合物	回归方程	$r^2$	线性范围/ $\mu\text{g}$
山楂酸	$Y = 1.0085 \times 10^3 X + 23.7900$	0.9991	0.088 - 3.012
科罗索酸	$Y = 0.5054 \times 10^3 X + 2.9372$	0.9998	0.192 - 5.988
白桦脂酸	$Y = 0.4083 \times 10^3 X + 1.3674$	0.9990	0.098 - 2.982
齐墩果酸	$Y = 0.5030 \times 10^3 X + 58.0970$	0.9991	0.213 - 6.031
熊果酸	$Y = 0.4965 \times 10^3 X - 50.4120$	0.9999	0.435 - 11.978
Obtusol	$Y = 0.3503 \times 10^3 X + 5.3830$	0.9991	0.113 - 3.634

液按“1.2.1”项色谱条件,进样测定,记录色谱图的峰面积,计算得山楂酸、科罗索酸、白桦脂酸、齐墩果酸、熊果酸、obtusol等化合物峰面积的RSD分别为2.14%、2.62%、2.27%、3.12%、2.39%、3.31%( $n=6$ )。取同一沙棘果实供试品溶液,分别于0、2、4、6、8、12 h时,按“1.2.1”项色谱条件,进样测定,记录色谱图峰面积,计算得山楂酸、科罗索酸、白桦脂酸、齐墩果酸、熊果酸、obtusol等化合物峰面积的RSD分别为2.10%、1.87%、1.21%、2.09%、1.39%、3.13%( $n=6$ )。

**1.2.5 加样回收率的试验** 精密称取3.0 g已知含量的沙棘样品,共6份,分别精密加入与样品中6个三萜酸含量相当的对照品贮备液,按“1.2.2”项方法制备供试品溶液,按“1.2.1”项色谱条件,依次进样测定,计算得山楂酸、科罗索酸、白桦脂酸、齐墩果酸、熊果酸、obtusol等化合物的平均加样回收率分别为97.29%、95.96%、

94.07%、96.48%、98.43%、97.78% RSD分别为1.42%、1.33%、1.51%、1.69%、1.46%、1.19%( $n=6$ )。

**1.2.6 样品的含量测定** 精密吸取5个产地的沙棘果实供试品溶液各10  $\mu\text{L}$ ,按“1.2.1”项色谱条件,依次进样,测定样品中6个分析物的峰面积,重复进样3次,计算三萜酸成分的含量(表2)。通过分析比较,发现不同产地沙棘果的三萜酸含量差别较大,沙棘果实中三萜酸的含量依次为:大通>西宁>互助>湟源>湟中,总三萜酸的含量分别为0.74、0.785、0.947、0.746、0.813  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ,这可能与生长地区气候、土壤环境等有一定的关系。此外,化合物obtusol为首次从沙棘中分离出来的一种三萜酸类化合物,通过试验测定其含量后,能够补充该化合物在沙棘植物中研究的空白,为今后鉴定和大量制备该化合物奠定了一定的基础。

表2 不同产地沙棘样品中三萜酸的含量测定结果( $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ,  $n=3$ )Table 2 Triterpenic acid content of *H. rhamnoides* samples from different habitats ( $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ,  $n=3$ )

产地	山楂酸	科罗索酸	白桦脂酸	齐墩果酸	熊果酸	Obtusol	总三萜酸
湟中	0.014	0.184	0.095	0.041	0.382	0.024	0.74
湟源	0.017	0.158	0.172	0.101	0.239	0.098	0.785
大通	0.065	0.306	0.121	0.054	0.284	0.117	0.947
互助	0.021	0.095	0.176	0.093	0.286	0.075	0.746
西宁	0.023	0.124	0.158	0.171	0.126	0.211	0.813

## 2 讨论

曾分别考察了乙腈-0.1%甲酸水溶液(80:20)、乙腈-0.1%甲酸水溶液(90:10)、甲醇-0.1%甲酸水溶液(80:20)、甲醇-0.5%甲酸水溶液(85:15)等4种流动相及基于以上4种流动相下流速的变化影响。结果发现:采用乙腈-0.1%甲酸水溶液(80:20)、乙腈-0.1%甲酸水溶液(90:10)、甲醇-0.1%甲酸水溶液

(80:20)作为流动相,在0.8、1.0  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 的流速下时,齐墩果酸和熊果酸均未达到完全分离,分离度<1.0。采用甲醇-0.5%甲酸水溶液(85:15)为流动相,流速为0.8  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 时,各色谱峰分离度良好,分离度>1.5,且保留时间适中,齐墩果酸和熊果酸能完全分离。还考察了不同色谱柱对三萜酸分离的效果,发现当流动相条件一致时,XAqua  $\text{C}_{18}$ 柱对目标峰的分离效果远优于Kromasil  $\text{C}_{18}$ 柱,故文中选用了XAqua  $\text{C}_{18}$ 柱用

作实验分析。同时,还考察了 95% 乙醇、无水乙醇、纯甲醇作为提取溶剂对三萜酸提取的影响。甲醇作提取溶剂时,对三萜酸的提取率较低,且杂质峰较多,无水乙醇和 95% 乙醇作提取溶剂时,对活性成分的提取量最高,但无水乙醇提取后杂质峰较多,故选用 95% 乙醇作提取溶剂。

#### 参考文献:

- [1] 雍正平,陈维,张浩,等. 中国沙棘果实的化学成分及其体外抗氧化活性研究[J]. 华西药学期刊, 2010, 25(6): 633-636.
- [2] 冉贝贝,李卫东. 沙棘果与沙棘叶化学成分及其差异的研究

- 进展[J]. 中国中药杂志 2019, 44(9): 1767-1773.
- [3] 朱丹丹. 沙棘果渣系列产品加工工艺研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学硕士学位论文 2018.
- [4] 孙燕. 沙棘中功效成分液相色谱-高分辨质谱精准检测鉴定技术研究[D]. 北京: 北京中医药大学硕士学位论文, 2019.
- [5] SIDDIQUI BS, FIRDOUS, BEGUM S. Two triterpenoids from the leaves of *Plumeria obtusa* [J]. *Phytochemistry*, 1999, 52(6): 1111-1115.
- [6] 周武,胡娜,王煜伟,等. 柱前衍生高效液相色谱-荧光检测/质谱联用测定青藏高原产沙棘果实中的 5 种三萜酸成分[J]. 华西药学期刊 2018, 33(5): 535-538.

收稿日期: 2020-01-02

## 电感耦合等离子体质谱法测定不同产地小天冬中的重金属及有害元素

张 华 麦雅竹 熊学庆 阳文武\*

(重庆市万州食品药品检验所 重庆 万州 404000)

**摘要:** 目的 测定不同产地小天冬中重金属及有害元素的含量,并评价其品质。方法 采用微波消解-电感耦合等离子体质谱法(ICP-MS)测定小天冬中铅(Pb)、镉(Cd)、汞(Hg)、砷(As)、铜(Cu)的含量。结果 按 2015 年版《中国药典》中部分药材的限量值标准,Cd、As 的超标率分别为 12.5%、12.5%、Pb、Hg、Cu 均符合要求。结论 所用方法快速准确、灵敏度高、重复性好,可用于小天冬中重金属及有害元素的含量测定,为其药材中重金属及有害元素限量标准的制定提供了依据。

**关键词:** 小天冬; 铅; 镉; 汞; 砷; 铜; 电感耦合等离子体质谱; 微波消解; 含量测定

中图分类号: R28

文献标志码: A

文章编号: 1006-0103(2021)03-0322-03

DOI: 10.13375/j.cnki.cejps.2021.03.019

### Determination of the heavy metals and harmful elements in *Asparagus meioladus* from different growing areas by Inductively coupled plasma mass spectrometry method

ZHANG Hua, MAI Yazhu, XIONG Xueqing, YANG Wenwu\*

(Wanzhou Institute for Food and Drug Control, Chongqing 404000 P. R. China)

**Abstract:** **OBJECTIVE** To determine heavy metal and harmful elements content in *Asparagus meioladus* L. from different growing areas and quality evaluation. **METHODS** Microwave digestion method combined with Inductively coupled plasma mass spectrometry method (ICP-MS) was used for the content determination of Pb, Cd, Hg, As and Cu. **RESULTS** Under the limited value standard of 2015 edition of Chinese Pharmacopoeia, the over-standard rate of heavy metal Cd and As were 12.5% and 12.5%, respectively. The contents of Pb, Hg and Cu conformed to relevant requirements. **CONCLUSION** The method is fast, accurate, sensitive and repeatable, and can be used for the determination of heavy metals and harmful elements in *A. meioladus*. It has provided a theoretical basis for the establishment of the limit standard for heavy metal and harmful elements

基金项目: 重庆市中药材标准项目(CQZYC201821)

作者简介: 张华(1972—),男,副主任药师,从事食品药品的质量控制工作。Email: 412460564@qq.com

\* 通信作者( Correspondent author) ,Email: oyww2008@163.com