

杜蕾蕾, 陈维, 冉良骥. 快速溶剂萃取-电雾式检测器同时测定山楂及其炮制品中5种三萜酸类成分的含量[J]. 环境化学, 2023, 42(6): 2132-2135.

DU Leilei, CHEN Chu, RAN Liangji. Simultaneous determination of five triterpenic acids in *Crataegi Fructus* by accelerated solvent extraction-charged aerosol detector [J]. Environmental Chemistry, 2023, 42 (6): 2132-2135.

快速溶剂萃取-电雾式检测器同时测定山楂及其炮制品中5种三萜酸类成分的含量

杜蕾蕾¹ 陈维² 冉良骥^{3*}

(1. 成都中医药大学 民族医药学院, 成都, 611137; 2. 四川省中医药科学院 中药材品质及创新中药研究四川省重点实验室, 成都, 610041; 3. 赛默飞世尔科技(中国)有限公司, 上海, 201206)

摘要 建立一种快速溶剂萃取-电雾式检测器(ASE-CAD)同时测定山楂及其炮制品中5种三萜酸类成分含量的方法. 试验确定 ASE 萃取山楂的最优条件: 以甲醇作溶剂, 提取温度 100 °C, 静态提取时间 5 min, 循环次数 2 次, 提取池冲洗体积 60%. HPLC 方法: 采用 Thermo Acclaim C30 (4.6 mm×250 mm, 5 μm) 色谱柱, 乙腈-1% 乙酸铵为流动相, 梯度洗脱, 体积流量 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 25 °C, CAD 雾化温度 70 °C, 采集频率 5 Hz, 分别测定齐墩果酸、熊果酸、白桦脂酸、科罗索酸、山楂酸的含量. 结果表明, 齐墩果酸、白桦脂酸、科罗索酸、山楂酸的线性范围为 5 — 75 μg·mL⁻¹, 熊果酸的线性范围为 5 — 250 μg·mL⁻¹; 相关系数均不小于 0.9970; 平均回收率在 88% — 101% 之间, RSD 均小于 5%. 该方法准确、简便、重复性好, 适用于山楂及其炮制品中齐墩果酸、熊果酸、白桦脂酸、科罗索酸、山楂酸的含量测定.

关键词 山楂, 三萜酸, 快速溶剂萃取, 电雾式检测器, 炮制品.

Simultaneous determination of five triterpenic acids in *Crataegi Fructus* by accelerated solvent extraction-charged aerosol detector

DU Leilei¹ CHEN Chu² RAN Liangji^{3*}

(1. College of Ethnic Medicine, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu, 611137, China; 2. Sichuan Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Quality and Innovation, Sichuan Academy of Traditional Chinese Medicine, Chengdu, 610041, China; 3. Thermo Fisher Scientific (China) Co., Ltd., Shanghai, 201206, China)

Abstract The objective of this paper is to establish a method for the simultaneous determination of five triterpenic acids in *Crataegi Fructus* and its processed products by accelerated solvent extraction (ASE)- charged aerosol detector (CAD). The optimal extraction conditions were determined by the ASE test: methanol was used as solvent, ASE extraction temperature was 100 °C, extraction time was 5 min and cycle time was 2. For the HPLC analysis, Thermo Acclaim C30 (4.6 mm×250 mm, 5 μm) was employed, the mobile phase for the analysis pump was composed of acetonitrile-1% ammonium acetate in program of gradient elution, and the flow rate was 1.0 mL·min with oven temperature 25 °C. The parameters applied for CAD are nebulizer temperature at 70 °C and data rate at 5 Hz. The results showed that the calibration curves were linear over a concentration range of 5 — 75 μg·mL⁻¹ for oleanolic acid, betulinic acid, corosolic acid and maslinic acid, and 5 — 250 μg·mL⁻¹ for ursolic acid. The correlation coefficients were greater than 0.9970. The average recoveries were between 88% and 101%, with RSDs less than 5%. This method is accurate, simple and reproducible.

* 通信联系人 Corresponding author, E-mail: liangji.ran@thermofisher.com

It can be used for the determination of oleanolic acid, betulinic acid, corosolic acid, maslinic acid and ursolic acid in *Crataegi Fructus*.

Keywords *Crataegi Fructus*, triterpenic acid, accelerate solvent extraction, charged aerosol detector, processed products.

山楂 *Crataegi Fructus* 为蔷薇科植物山里红 *Crataegus pinnatifida* Bge. var. Major N. E. Br.或山楂 *Crataegus pinnatifida* Bge.的干燥成熟果实。山楂为药食两用品种,在临床应用广泛,具有消食健胃,行气散瘀,化浊降脂之功效,常用于肉食积滞,胃脘胀满,瘀血经闭等症^[1]。研究表明,山楂富含黄酮、有机酸、三萜酸等化学成分,其中的三萜酸类成分主要为山楂酸、科罗素酸、齐墩果酸、熊果酸等,大多具有保肝、抗炎、抗肿瘤、降血糖、调血脂等作用^[2]。因此,三萜酸类成分的组成和含量对山楂的质量控制具有重要意义。

加速溶剂萃取法(ASE)是一种利用有机溶剂在高温高压下快速高效提取化合物的自动化萃取技术,有简便、省时、回收率高、溶剂用量少等优点^[3]。文献报道采用 ASE 萃取中药中的齐墩果酸和熊果酸的提取效率优于超声提取^[4]。目前尚未见山楂中5种三萜酸类成分 ASE 提取的报道。

三萜酸类的检测主要为高效液相色谱法,采用紫外/二极管阵列检测器^[5]。但由于三萜酸类紫外吸收弱,只能在200 nm附近检测,易受干扰,对低含量成分的灵敏度受限。有报道建立了基于蒸发光散射检测器(ELSD)、串联质谱检测器(MS/MS)的检测方法^[6,7]。电雾式检测器(charged aerosol detector, CAD)是一种通用型检测器,其响应值不依赖于被测物质的光学性质和离子化效率,具有较高的检测灵敏度和均匀一致的响应因子,适合缺少紫外发色基团的药物成分的检测。迄今尚未见采用 CAD 同时测定山楂中多种三萜酸的报道。本研究拟建立 ASE-CAD 方法用以检测山楂及其炮制品中山楂酸、科罗素酸、白桦脂酸、齐墩果酸和熊果酸等5种三萜酸类成分的含量。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

ASE350 快速溶剂萃取仪(赛默飞世尔科技有限公司)、Vanquish Core 高效液相色谱仪(赛默飞世尔科技有限公司,配双元泵、Corona Veo RS 电雾式检测器、变色龙色谱管理软件 Chromeleon CDS 7.2.10);MS205DU 电子天平($d=0.01\text{mg}$,梅特勒-托利多有限公司);SB-3200DT 超声波清洗器(180 W, 40 kHz, 宁波新芝生物科技公司)。

1.2 试剂

山楂酸(批号 PS011005)、科罗素酸(批号 PS000533)、白桦脂酸(批号 PS010392)、齐墩果酸(批号 PS012022)、熊果酸(批号 PS012671)对照品均购自成都普思生物科技公司;色谱级乙腈、乙酸铵均购自赛默飞世尔公司;超纯水由纯水机(Milli-Q Integral-3)新鲜制备;其余试剂均为分析纯。

1.3 样品制备

山楂饮片 S1—S9 购自河北、山东、四川、广东等地。自制炮制品 S10—S12 以 S1 为原料按照《中国药典》2020 年版四部通则 0213 制备。

取山楂及其炮制品,50℃烘干4h,粉碎过30目筛。精密称取样品粉末3.0g,加入硅藻土适量,混合均匀,转至底层垫有纤维素膜的34mL萃取池中,加盖后置于 ASE 350 快速溶剂萃取仪中,于100℃下加速溶剂萃取5min,冲洗体积60%,循环两次,待萃取液冷却至室温后定容至50mL,过0.45μm滤膜,即得。

分别取山楂酸、科罗素酸、白桦脂酸、齐墩果酸、熊果酸对照品适量,精密称定,以甲醇溶解定容为2.5mg·mL⁻¹的溶液,作为对照品贮备液。

2 结果与讨论

2.1 色谱条件

采用 Thermo Acclaim C30 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱;1% 乙酸铵溶液(A)-乙腈(B)为流动相,梯度洗脱,0—2 min, 70% B, 2—20 min, 70% B—80% B;体积流量 1.0 mL·min⁻¹,柱温 25℃,电雾式检测器气化温度 70℃,进样体积 5 μL。上述条件下,5个成分的分离度均大于2.0,理论塔板数均大于6000,对称因子0.98—1.02。色谱图见图1。

ELSD、CAD 均为通用型检测器,适用于检测弱紫外吸收化合物。本研究对比了两种检测器的检测性能。取浓度为 25 μg·mL⁻¹ 的混合对照品溶液,在相同色谱条件下连续进样6次,ELSD 测定山楂酸、科罗素酸、白桦脂酸、齐墩果酸、熊果酸的 RSD 分别为 4.15%、3.55%、3.24%、3.15% 和 3.07%,均大于3%;而 CAD 测定的 RSD 均小于1%,且同等浓度下 ELSD 无法检出山楂酸。CAD 具有更高的精密度和灵敏度,适用检测山楂中5种三萜酸类成分。

白桦脂酸、齐墩果酸、熊果酸互为同分异构体(C₃₀H₄₈O₃),山楂酸(2α-羟基齐墩果酸)与科罗素酸(2α-羟基熊果酸)互为同分异构体(C₃₀H₄₈O₄)。上述成分在常规 C18 柱上难以有效分离,而改用 C30 柱后可获得理想分离效果。推测原因是后者通过在超球形多孔硅胶表面键合 C30 烷基链,为结构相近的疏水性异构体提供了更好的空间结构选择性。

考察了柱温(25℃、30℃、35℃)对分离度的影响,熊果酸和齐墩果酸保留特性相似,柱温越高分离度越差,而柱温降低会导致压力增高。试验确定柱温 25℃ 时,两者良好分离,且系统压力小于 20 MPa。

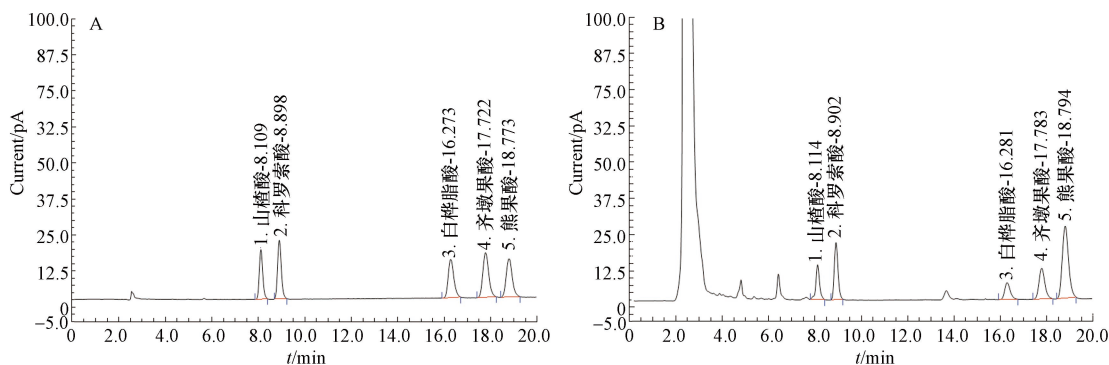


图1 混合对照品(A)及供试品(B)的HPLC-CAD色谱图

Fig.1 Chromatograms of (A) mixed standard solution and (B) sample solution of five triterpenic acids

2.2 ASE 提取条件优化

对影响 ASE 提取效率的提取温度(80、100、120℃)、静态提取时间(3、5、7、10 min)进行了单因素考察,循环次数均为 2 次,提取池冲洗体积为 60%。结果发现,温度由 80℃ 提高到 100℃ 时,提取率增加较明显,但继续升高到 120℃ 时,提取效率增加很少甚至下降;静态提取时间为 5 min 时,主要成分的提取率最高;ASE 不同提取条件下,各成分的提取率普遍高于超声提取 30 min,表明 ASE 提取效果优于超声提取。综上,优选的提取方法为 ASE 甲醇提取,提取温度 100℃,静态提取时间 5 min。

2.3 线性关系考察

精密量取“2.2”项下混合对照品储备液适量,以甲醇稀释制成浓度为 250、100、75、50、25、10、5、2 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的系列混合标准溶液,经 0.45 μm 微孔滤膜滤过后,分别吸取 5 μL 续滤液注入液相色谱仪,按“2.1”项下色谱条件测定。以浓度(C)对数值对峰面积(A)值进行强制过原点的线性回归,结果 5 种三萜酸类成分在 5.00—75.00 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 浓度范围内线性关系良好,相关系数均 >0.998。

2.4 精密度

精密吸取浓度为 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 混合对照品溶液 5 μL ,按“2.1”项下色谱条件连续进样 6 次,记录色谱峰面积。结果显示,RSD 分别为山楂酸 0.35%、科罗素酸 0.24%、白桦脂酸 0.33%、齐墩果酸 0.67%、熊果酸 0.41%,精密度较好。

2.5 重复性和稳定性

精密称取同一批次(S6)供试品 6 份,按“2.4”项下方法制备供试品溶液,测定含量。结果显示,各成分含量 RSD 分别为山楂酸 1.05%、科罗素酸 0.58%、白桦脂酸 1.31%、齐墩果酸 1.40%、熊果酸 1.22%,表明本方法重复性良好。

取同一供试品溶液分别于制备后 0、2、4、8、12、24 h 进样测定,结果各成分峰面积 RSD 分别为山楂酸 1.05%、科罗素酸 0.38%、白桦脂酸 0.97%、齐墩果酸 0.62%、熊果酸 1.06%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.6 加样回收率

精密称取同一批次(S6)供试品 6 份,粉碎过 30 目筛。精密称取粉碎后样品 1.5 g,加入硅藻土适量,混合均匀,转至底层垫有纤维素膜的 34ml 萃取池中,然后依次加入样品中已知含量 100% 的山楂酸、科罗素酸、白桦脂酸、齐墩果酸、熊果酸的对照品,加盖后置于 ASE 350 快速溶剂萃取仪中,按“2.4”项下方法制备供试品溶液,分别测定并计算加样回收率。山楂酸、科罗素酸、白桦脂酸、齐墩果酸、熊果酸的加样回收率分别为 97.31%、88.63%、98.16%、98.83% 和 100.39%,RSD 分别为 0.96%、1.65%、1.38%、0.69% 和 4.39%。

2.7 定量限和检测限

取对照品溶液逐级稀释,测定山楂酸、科罗素酸、白桦脂酸、齐墩果酸、熊果酸的峰高,分别以信噪比(S/N)等于 10 和 3 为标准,测定定量限和检测限分别为 5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和 2 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

2.8 样品测定

取山楂及其炮制品,按照“2.4”项下方法制备供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件进行测定,记录峰面积,计算含量,结果见表 1。

表 1 不同山楂样品中 5 种三萜酸的含量($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, $n=3$)

Table 1 Contents of five triterpenic acids in samples ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, $n=3$)

| 编号 | 饮片类型 | 产地 | 山楂酸 | 科罗素酸 | 白桦脂酸 | 齐墩果酸 | 熊果酸 | 总含量 |
|----|------|----|--------|--------|-------|--------|---------|---------|
| S1 | 生山楂 | 四川 | 25.36 | 104.37 | 97.85 | 666.70 | 3983.37 | 4877.65 |
| S2 | 生山楂 | 四川 | 63.61 | 125.56 | 90.90 | 757.82 | 4594.35 | 5632.24 |
| S3 | 生山楂 | 广东 | 306.18 | 761.31 | 42.14 | 368.50 | 2097.14 | 3575.27 |
| S4 | 生山楂 | 广东 | 208.78 | 528.70 | 34.83 | 251.71 | 1506.44 | 2530.46 |
| S5 | 生山楂 | 山东 | 22.46 | 91.73 | 84.91 | 539.25 | 3280.92 | 4019.27 |

续表1

| 编号 | 饮片类型 | 产地 | 山楂酸 | 科罗素酸 | 白桦酯酸 | 齐墩果酸 | 熊果酸 | 总含量 |
|-----|------|----|-------|-------|--------|--------|---------|---------|
| S6 | 生山楂 | 山东 | 25.82 | 92.45 | 77.10 | 579.53 | 3502.93 | 4277.83 |
| S7 | 生山楂 | 河北 | 30.76 | 95.43 | 107.39 | 609.00 | 3748.19 | 4590.77 |
| S8 | 炒山楂 | 河北 | 25.50 | 80.58 | 76.47 | 576.21 | 3311.61 | 4070.37 |
| S9 | 焦山楂 | 河北 | 7.26 | 84.12 | 60.64 | 510.54 | 3024.49 | 3687.05 |
| S10 | 炒山楂 | 四川 | 21.79 | 96.87 | 96.11 | 747.55 | 4549.72 | 5512.04 |
| S11 | 焦山楂 | 四川 | 25.88 | 95.87 | 79.16 | 534.37 | 3228.27 | 3963.55 |
| S12 | 山楂炭 | 四川 | 17.32 | 82.37 | 79.07 | 546.74 | 3343.75 | 4069.25 |

三萜酸类成分是山楂中主要活性物质之一。本研究选取含量较高且具有代表性的齐墩果烷型(山楂酸、齐墩果酸)、乌苏烷型(科罗素酸、熊果酸)和羽扇豆烷型(白桦脂酸)等3种类型的三萜酸类成分作为测定指标,可有效控制山楂及其炮制品的质量。在检测12批样品中,除S3、S4外,含量排序均为熊果酸>齐墩果酸>科罗素酸≈白桦脂酸>山楂酸,而S3、S4为熊果酸>科罗素酸>齐墩果酸>山楂酸>白桦脂酸。所有样品的熊果酸含量都远高于其他三萜酸,是山楂及其炮制品中最主要的三萜酸类成分,齐墩果酸次之。

从生山楂逐步炮制得到炒山楂、焦山楂和山楂炭的过程中,5种三萜酸类成分普遍存在含量先略微升高,随后降低的趋势,表明适当炒制可能会促进这5种三萜酸类成分的释放,但随着炮制温度升高、时间延长,含量最终下降。总体而言,5种三萜酸类成分在炮制过程中含量变化并不大,说明高温炒制对此类成分影响有限。

3 结论

本研究建立了快速溶剂萃取-电雾式检测器同时测定山楂及其炮制品中5种三萜酸类成分含量的方法,为山楂及其炮制品的质量评价提供了参考。快速溶剂萃取法的应用为中药复杂成分的快速高效提取提供了新的选择;通用型电雾式检测器在山楂中5种三萜酸类成分检测中表现出的高灵敏度、准确度和良好的普适性,为无紫外吸收或弱紫外吸收成分的检测提供了可靠的解决方法。

参考文献 (References)

- [1] 李春峰,赵子璇,刘桂艳.山楂主要成分提取分离及检测分析研究进展[J].*中成药*,2022,44(9):2929-2934.
- [2] 楼陆军,罗洁霞,高云.山楂的化学成分和药理作用研究概述[J].*中国药业*,2014,23(3):92-94.
- [3] 欧小群,马丽艳,潘赛超,等.加速溶剂萃取技术在食品安全检测中的应用[J].*中国食品学报*,2018,18(5):222-231.
- [4] 刘慧妍,黄馨慧,张艳海.HPLC法快速测定8种中药中齐墩果酸和熊果酸[J].*中草药*,2017,48(10):1998-2001.
- [5] 梁成海,刘旺培,谭本仁,等.RP-HPLC法同时测定喉可宁中齐墩果酸和熊果酸的含量[J].*中国临床药学杂志*,2022,31(6):449-453.
- [6] 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.
- [7] 张萍,何婷,王颖,等.加速溶剂萃取-超高效液相色谱-串联质谱法测定大枣中3种五环三萜酸[J].*食品与药品*,2021,23(1):17-22.