

· 实验研究 ·

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2018.02.004

高效液相色谱-二极管阵列检测器法测定食用土当归总有机酸中贝壳杉烯酸及海松酸含量*

党凯茹¹, 彭 腾^{1△}, 杨 菁², 禹亚杰³, 匡 宇¹, 韩 笑¹

(1. 成都中医药大学药学院·中药资源系统研究与开发利用省部级共建国家重点实验室培育基地·中药材标准化教育部重点实验室, 四川 成都 611137; 2. 贵阳中医学院, 贵州 贵阳 550002; 3. 四川护理职业学院, 四川 成都 611137)

摘要:目的 建立测定食用土当归总有机酸中贝壳杉烯酸及海松酸含量的高效液相色谱-二极管阵列检测器(HPLC-DAD)法。方法 采用反相高效液相色谱法,使用 YMC-Pack ODS-AQ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm),以乙腈-0.1% 磷酸水溶液(76:24)为流动相,检测波长为 202 nm,流速为 1.0 mL/min,柱温为 30 ℃,进样量为 15 μL。结果 贝壳杉烯酸及海松酸进样量分别在 2.257~4.514 μg($R^2=0.9996$)和 2.839~5.678 μg($R^2=0.9996$)范围内与峰面积线性关系良好,平均回收率分别为 100.30% 和 99.65%, RSD 分别为 1.68% 和 1.46%。10 批食用土当归总有机酸中贝壳杉烯酸和海松酸的平均含量分别为 19.23% 和 27.64%,同时食用土当归总有机酸中贝壳杉烯酸含量均不低于 17.00%,海松酸含量均不低于 24.00%。结论 本研究中采用 HPLC-DAD 法首次测定了食用土当归总有机酸中贝壳杉烯酸及海松酸含量。该方法简便、灵敏、准确、重复性好,为食用土当归总有机酸质量标准的制订奠定了基础。

关键词:食用土当归;总有机酸;贝壳杉烯酸;海松酸;高效液相色谱-二极管阵列检测器法;含量测定

中图分类号:R284.1;R282.71

文献标识码:A

文章编号:1006-4931(2018)02-0016-04

Content Determination of (Ent)-Kaur-16-En-19-Oic Acid and 15-Dien-19-Oic Acid in Total Organic Acids from the Root of *Aralia Cordata* by HPLC-DAD

Dang Kairu¹, Peng Teng¹, Yang Jing², Yu Yajie³, Kuang Yu¹, Han Xiao¹

(1. College of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, State Key Laboratory Breeding Base of Systematic Research, Development and Utilization of Chinese Medicine Resources, Key Laboratory of Standardization of Chinese Herbal Medicine, Ministry of Education, Chengdu, Sichuan, China 611137; 2. Guiyang College of Traditional Chinese Medicine, Guiyang, Guizhou, China 550002; 3. Sichuan Nursing Vocational College, Chengdu, Sichuan, China 611137)

Abstract: Objective To establish an HPLC-DAD method for determination of (ent)-kaur-16-en-19-oic acid and 15-dien-19-oic acid in total organic acids from the root of *Aralia cordata*. Methods RP-HPLC method was carried out, YMC-Pack ODS-AQ column(250 mm×4.6 mm, 5 μm) was adopted, the mobile phase was acetonitrile-0.1% phosphoric acid(76:24), the detection wavelength was 202 nm, the flow rate was 1.0 mL/min, the column temperature was 30 ℃, and the sample size was 15 μL. Results (Ent)-kaur-16-en-19-oic acid and 15-dien-19-oic acid had good linear relationships in the ranges of 2.257~4.514 μg($R^2=0.9996$), 2.839~5.678 μg($R^2=0.9996$), respectively, the average recoveries were 100.30% and 99.65%, and the RSDs were 1.68% and 1.46%. The average contents of (ent)-kaur-16-en-19-oic acid and 15-dien-19-oic acid were 19.23%, 27.64% in 10 batches of total organic acids, the contents of these two components were not less than 17.00% and 24.00%, respectively. Conclusion It is the first time to use HPLC-DAD method for determining (ent)-kaur-16-en-19-oic acid and 15-dien-19-oic acid in total organic acids from the root of *Aralia cordata*, this method is simple, sensitive, accurate and repeatable, which can provide basis for establishing standard of quality control for total organic acids from the root of *Aralia cordata*.

Key words: *Aralia cordata*; total organic acid; (ent)-kaur-16-en-19-oic acid; 15-dien-19-oic acid; HPLC-DAD; content determination

食用土当归 *Aralia cordata* Thunb. 是五加科槲木属植物的根及根茎,是商品九眼独活的主流品种,其作药用最早收载于《本草纲目》^[1],味辛、苦,性微温,具有祛风除湿、止痛利尿消肿的功效^[2]。该药为多年生草本,主产区为四川,阿坝、凉山、甘孜等州产量最大,陕西、湖北等地亦有分布,为药食两用的传统中药^[3]。食用土当

归总有机酸是从食用土当归的根及根茎中提取纯化得到的提取物,课题组前期药理试验研究表明,该总有机酸为食用土当归抗炎镇痛的有效成分^[4]。总有机酸所含主要化学成分是贝壳杉烯酸、海松酸等二萜羧酸类,贝壳杉烯酸及海松酸为抗炎镇痛的有效成分^[5-6]。目前对食用土当归的研究较少,仅限于对其化学成分及药理活

*基金项目:国家科技支撑计划项目[2015BAC05B02];四川省科技支撑计划项目[2011SZ0235]。

第一作者:党凯茹,女,硕士研究生,研究方向为药物分析,(电子信箱)471630205@qq.com。

△通信作者:彭腾,男,博士研究生,教授,硕士研究生导师,研究方向为中药药效物质基础及质量标准,(电话)028-61800231(电子信箱)56649923@qq.com。

性的研究,对食用土当归总有机酸的报道主要针对于其提取纯化和抗炎镇痛药效学方面,质量控制方面的研究未见报道;此外,2015年版《中国药典(一部)》未收载该药,而2010年版《四川中药材标准》也缺乏详细而深入的研究,该药的质量标准基本还处于空白状态。故本试验中通过建立测定贝壳杉烯酸和海松酸含量的高效液相色谱-二极管阵列检测器(HPLC-DAD)法,为食用土当归总有机酸的质量控制提供参考,也为食用土当归药材标准的建立奠定基础。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

LC-20AT型HPLC仪,SPD-M20A型DAD检测器(日本岛津公司);BUG25-12型超声清洗器(必能信超声有限公司);色谱柱为YMC-Pack ODS-AQ柱(250 mm×4.6 mm,5 μm);FA2004N型电子天平(上海民怡仪器仪表有限公司);BP121S型电子天平(德国Sartorius公司);DZG-6020型真空干燥箱(上海信森实验仪器有限公司);DZKW-4型电子恒温水浴锅(北京中兴伟业仪器有限公司)。

1.2 试剂

乙腈、甲醇均为色谱纯(美国天地公司);磷酸为分析纯(成都科龙化工试剂厂);优普UPT系列超纯水(成都优普电子有限公司);其他试剂均为分析纯。

贝壳杉烯酸对照品、海松酸对照品(均为实验室自制,HPLC仪检测纯度超过98%);食用土当归 *Aralia cordata* Thunb. 药材购自四川省成都市荷花池中药材市场,经成都中医药大学药学院蒋桂华教授鉴定为五加科槲木属植物食用土当归 *Aralia cordata* Thunb. 的根及根茎;食用土当归总有机酸(10批自制食用土当归药材样品,批号分别为201301,201302,201303,⋯,201310,棕褐色稠膏状)。

2 方法与结果

2.1 溶液制备

混合对照品溶液:称取干燥至恒重的贝壳杉烯酸及海松酸对照品适量,精密称定,加甲醇制成每1 mL分别含225.7 μg和283.9 μg的混合对照品溶液。

食用土当归总有机酸^[7]:取食用土当归粉末,加8倍量95%乙醇回流提取2次,每次1 h,抽滤,合并滤液,减压浓缩干燥,得食用土当归乙醇提取物,乙醇提取物20倍量水溶解后,加NaCl使质量分数达0.50%,2倍量石油醚萃取4次,萃取液浓缩至乙醇提取物20倍量体积,再用1.0% KOH溶液等体积萃取3次,碱水层加浓盐酸使pH达1,加NaCl使质量分数达0.50%,用等体积石油醚萃取3次,减压回收石油醚,干燥,即得。

供试品溶液:取食用土当归总有机酸约25 mg,精密称定,置25 mL容量瓶中,加甲醇超声溶解,定容至刻

度,摇匀,即得。

2.2 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱:YMC-Pack ODS-AQ柱(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:乙腈-0.1%磷酸水溶液(76:24);检测波长:202 nm;流速:1.0 mL/min;柱温:30℃;进样量:15 μL。在上述色谱条件下分别取混合对照品溶液、供试品溶液自动进样,记录色谱图(见图1)。

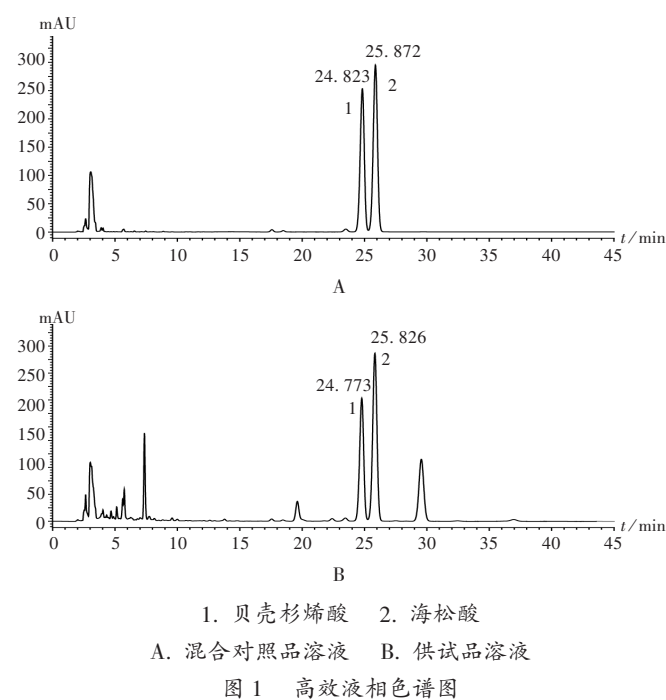


图1 高效液相色谱图

2.3 耐用性考察

色谱柱考察:按2.2项下色谱条件,考察了Phenomenex Luna C₁₈柱(250 mm×4.6 mm,5 μm),Agilent Eclipse plus C₁₈柱(250 mm×4.6 mm,5 μm),YMC-Pack ODS-AQ柱(250 mm×4.6 mm,5 μm)3种色谱柱对供试品中贝壳杉烯酸及海松酸的影响,结果见表1。可见,3种色谱柱均可用于食用土当归总有机酸的贝壳杉烯酸和海松酸的含量测定。

表1 色谱柱考察结果

成分	含量(%)			RSD(%)
	Phenomenex Luna 柱	Agilent 柱	YMC-Pack 柱	
贝壳杉烯酸	19.66	20.58	20.32	2.35
海松酸	27.52	28.24	27.85	1.29

流速考察:按2.2项下色谱条件,以YMC-Pack ODS-AQ柱(250 mm×4.6 mm,5 μm)为色谱柱,考察不同流速对供试品溶液中贝壳杉烯酸及海松酸含量的影响,结果见表2。可见,流速在0.8~1.2 mL/min时,测得含量的RSD值小于3%,分离度也好,均可作为食用土当归总有机酸中贝壳杉烯酸和海松酸的含量测定用流速。

表 2 流速考察结果

成分	含量 (%)			RSD (%)
	0.8 mL/min	1.0 mL/min	1.2 mL/min	
贝壳杉烯酸	20.39	19.74	19.34	2.67
海松酸	27.32	27.95	27.61	1.14

柱温考察:按 2.2 项下色谱条件,考察不同柱温对供试品溶液中贝壳杉烯酸及海松酸含量的影响,结果见表 3。可见,柱温在 25~35℃ 之间时, RSD 值均在 3% 以内,分离度也好,均可作为食用土当归总有机酸中贝壳杉烯酸和海松酸的含量测定用柱温。

表 3 柱温考察结果

成分	含量 (%)			RSD (%)
	25℃	30℃	35℃	
贝壳杉烯酸	18.74	19.33	19.13	1.57
海松酸	27.29	27.95	27.44	1.26

2.4 方法学考察

线性关系考察:取混合对照品溶液自动进样,分别进样 10, 12, 14, 16, 18, 20 μL, 以进样量 (X) 为横坐标、峰面积 (Y) 为纵坐标分别绘制标准曲线,得贝壳杉烯酸回归方程为 $Y = 1.6 \times 10^6 X + 25\ 642$ ($R^2 = 0.999\ 6$, $n = 6$), 海松酸回归方程为 $Y = 1.6 \times 10^6 X - 20\ 531$

表 4 贝壳杉烯酸与海松酸加样回收试验结果 ($n = 6$)

取样量 (g)	样品含量 (mg)		加入量 (mg)		测得量 (mg)		回收率 (%)		$\bar{X}$ (%)		RSD (%)	
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
0.012 5	2.402 6	3.413 1	1.922 1	2.730 5	4.305 3	6.130 2	98.99	99.51	100.30	99.65	1.68	1.46
0.012 5	2.402 6	3.413 1	1.922 1	2.730 5	4.311 6	6.106 5	99.32	98.64				
0.012 5	2.402 6	3.413 1	1.922 1	2.730 5	4.292 2	6.173 9	98.31	101.11				
0.012 5	2.402 6	3.413 1	1.922 1	2.730 5	4.343 5	6.134 6	100.98	99.67				
0.012 5	2.402 6	3.413 1	1.922 1	2.730 5	4.353 5	6.077 0	101.50	97.56				
0.012 5	2.402 6	3.413 1	1.922 1	2.730 5	4.376 4	6.182 1	102.69	101.41				

2.5 样品含量测定

分别称取不同批号的食用土当归总有机酸,依法制备供试品溶液,按 2.2 项下色谱条件进样 15 μL,测定样品中贝壳杉烯酸和海松酸的峰面积,按外标一点法计算,结果见表 5。

3 讨论

食用土当归总有机酸中贝壳杉烯酸和海松酸的总平均含量为 46.87%,表明提取纯化后的总有机酸中仍可能含有脂肪酸等其他小分子酸。课题组今后可对其纯化研究工艺进行进一步优化,以期得到含量更高的总有机酸,完善以贝壳杉烯酸和海松酸为指标的食用土当归总有机酸的质量标准,同时结合生产,实施工艺放大验证,为食用土当归总有机酸的工业化生产提供依据。海松酸和贝壳杉烯酸均有抗炎镇痛活性,且海松酸平均含量比贝壳杉烯平均含量高 8.41%,由此可设想从 2 个

($R^2 = 0.999\ 6$, $n = 6$)。结果表明,贝壳杉烯酸对照品溶液进样量在 2.257~4.514 μg,海松酸对照品溶液进样量在 2.839~5.678 μg 范围内与峰面积线性关系良好。

精密密度试验:按 2.2 项下色谱条件,精密吸取混合对照品溶液 15 μL,连续进样 6 次。结果贝壳杉烯酸和海松酸峰面积的 RSD 分别为 0.27% 和 0.25% ($n = 6$),均小于 3%,表明仪器精密密度良好。

稳定性试验:精密吸取同一供试品溶液,于配制后 0, 4, 8, 12, 16, 24 h 时进样 15 μL,测定贝壳杉烯酸和海松酸峰面积。结果的 RSD 分别为 0.27% 和 0.32% ($n = 6$),均小于 3%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

重复性试验:称取食用土当归总有机酸(批号为 201307)6 份,每份约 25 mg,精密称定,依法制备供试品溶液,以 2.2 项下色谱条件进样 15 μL,测定。结果贝壳杉烯酸和海松酸平均含量分别为 19.20% 和 27.43%, RSD 分别为 2.24% 和 1.34% ($n = 6$),均小于 3%,表明该方法重复性良好。

加样回收试验:称取已知含量的同一批(批号为 201307)食用土当归总有机酸 6 份,约 12.5 mg,精密称定,分别精密加入一定量混合对照品溶液,依法制备供试品溶液,按 2.2 项下色谱条件进样 15 μL。结果见表 4。

表 5 样品中贝壳杉烯酸和海松酸的含量测定结果 (% , $n = 10$)

样品批号	贝壳杉烯酸		海松酸	
	含量	均值	含量	均值
201301	18.54	19.23	30.95	27.64
201302	19.70		27.42	
201303	19.13		28.53	
201304	20.51		27.96	
201305	18.75		26.59	
201306	18.38		29.99	
201307	19.20		27.43	
201308	18.98		26.50	
201309	21.46		24.60	
201310	17.69		26.47	

单体成分在总有机酸中含量不同的角度,对各自的抗炎镇痛活性程度进行对比研究。