

HPLC 测定微波消解后无梗五加果实中齐墩果酸的含量

王晓彤¹, 刘玉强², 才谦^{2*}

(1. 辽宁中医药大学附属医院, 沈阳 110847; 2. 辽宁中医药大学药学院, 辽宁大连 116600)

[摘要] 目的:建立高效液相色谱法测定无梗五加果实微波消解后齐墩果酸含量的方法。方法:采用微波消解法对无梗五加果实中的齐墩果酸苷类成分进行水解,并采用高效液相色谱法测定苷元齐墩果酸的含量,色谱条件为 Promosil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相甲醇-0.2% 乙酸水溶液(90:10),流速 1.0 mL·min⁻¹,检测波长 210 nm。结果:消解的条件为 9% 的盐酸,0.1 MPa 微波消解 0.5 h;齐墩果酸的线性范围是 0.781 6~3.908 μg($r=0.999\ 6$),平均回收率为 97.3% (RSD 1.2%)。结论:该方法准确、可靠,可用于无梗五加果实的质量控制。

[关键词] 无梗五加;微波消解;齐墩果酸;高效液相色谱法;含量测定

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)07-0061-03

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015070061

Determination of Oleanolic Acid in Fruit of *Acanthopanax sessiliflorus* by Microwave Digestion with HPLC

WANG Xiao-tong¹, LIU Yu-qiang², CAI Qian^{2*} (1. Affiliated Hospital of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Shenyang 110847, China; 2. College of Pharmacy, Liaoning University of TCM, Dalian 116600, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a method for determining the content of oleanolic acid in the fruit of *Acanthopanax sessiliflorus*. **Method:** Microwave digestion procedure was applied for digesting the glycosides of oleanolic acid. HPLC was used for determining the content. A Promosil C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) was used with a mobile phase of methanol-0.2% acetic acid (90:10). The flow rate was set at 1.0 mL·min⁻¹. The UV detection wavelength was set at 210 nm. **Result:** The fruits were digested with 9% HCl at 0.1 MPa for 0.5 h; the liner range of oleanolic acid was 0.781 6-3.908 μg ($r=0.999\ 6$). The average recovery of oleanolic acid was 97.3% (RSD 1.2%). **Conclusion:** The method is accurate and reliable and can be used for the quality control of the fruits of *A. sessiliflorus*.

[Key words] *Acanthopanax sessiliflorus*; microwave digestion; oleanolic acid; HPLC; content determination

无梗五加又称短梗五加,为五加科多年生药食两用植物,主要分布于我国东北、河北、山西、内蒙古,朝鲜以及俄罗斯远东地区^[1-2]。东北地区人们食用无梗五加已有几千年历史了,将其奉为野蔬中的精品。近年来,随着刺五加的大量开发利用,其野生资源不断减少,多将无梗五加当作刺五加疗效相似的替代品药用,未见不良反应报道^[3]。无梗五加除根皮、茎、叶等药用外,果实也具有抗肿瘤等多方面的生理活性^[4]。化学成分研究表明,无梗五加果实中的主要化学成分为多糖类、黄酮类、三萜类、苯丙素类等^[5-9]。已有报道无梗五加果实中黄酮类、

苯丙素类成分的含量测定方法^[10-12]。本课题组前期从无梗五加果实中分离出多个以齐墩果酸为苷元的三萜苷类化合物,如齐墩果酸-3-*O*-β-*D*-葡萄糖醛酸苷,齐墩果酸-3-*O*-α-*L*-阿拉伯糖苷等^[13],但无此类成分含量测定方法的报道,本文采用消解法^[14]对无梗五加果实中含有的齐墩果酸苷类成分进行水解,制定苷元齐墩果酸的含量测定方法^[15],为更好地控制其质量和深入开发奠定基础。

1 材料

1.1 仪器 1100 系列高效液相色谱仪(美国安捷伦科技有限公司),MDS-6 型微波消解仪(上海新仪

[收稿日期] 20141104(016)

[基金项目] 辽宁省自然科学基金项目(20102147)

[第一作者] 王晓彤,硕士,讲师,从事中医传统疗法研究,Tel:024-31961877,E-mail:wangxt1116@163.com

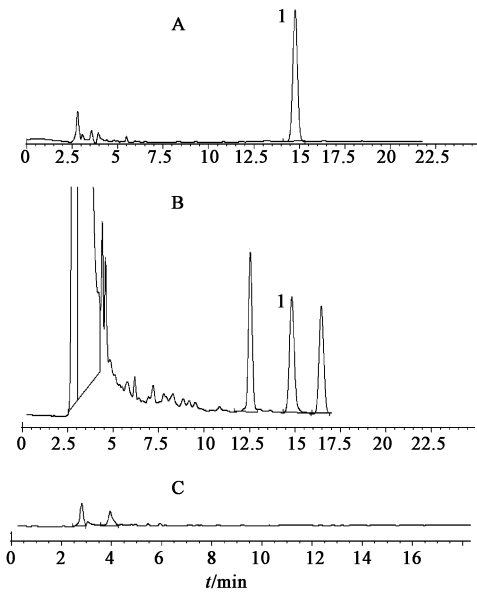
[通讯作者] *才谦,博士,教授,从事中药化学的教学和科研,Tel:0411-87586318,E-mail:caiqianmail@sina.com

微波化学科技有限公司), MDS-6 型单罐消解罐(上海新仪微波化学科技有限公司), CP225D 型电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司)。

1.2 试药 11 批无梗五加果实采于辽宁省丹东市周边地区, 经辽宁中医药大学药用植物教研室王冰教授鉴定为无梗五加 *Acanthopanax sessiliflorus* 的果实。齐墩果酸对照品(自制, 经液相色谱法用归一化法测定, 含量 > 98%)。甲醇(色谱纯, 天津市科密欧化学试剂有限公司), 三级水(娃哈哈有限公司), 乙酸(分析纯, 天津市凯信化学工业有限公司)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 采用 Promosil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm)(天津博纳艾杰尔科技有限公司), 流动相甲醇-0.2% 乙酸水溶液(90:10), 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 210 nm。见图 1。



A. 对照品; B. 供试品; C. 消解前样品; 1. 齐墩果酸

图1 无梗五加果实 HPLC 色谱

Fig.1 HPLC chromatograms of *Acanthopanax sessiliflorus*

2.2 对照品溶液的制备 精密称取齐墩果酸对照品适量, 加甲醇溶解配制成 0.390 8 g·L⁻¹ 的对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备 取无梗五加果实粉末 1 g, 精密称定。加入 9% 的盐酸水溶液 25 mL, 0.1 MPa 微波消解 0.5 h, 水解液用三氯甲烷回流提取 1 h, 分取三氯甲烷层, 水解液再用三氯甲烷萃取 3 次, 合并三氯甲烷并浓缩回收溶剂, 定容到 5 mL 量瓶中, 过 0.45 μm 微孔滤膜, 即得。

2.4 线性范围的考察 取齐墩果酸对照品(0.390 8

g·L⁻¹) 溶液 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10.0 μL, 注入液相色谱仪, 按前述色谱条件进行分析, 测定峰面积, 以进样量(X)为横坐标, 峰面积(Y)为纵坐标, 得回归方程 $Y = 396.81X - 3.52$ ($r = 0.9996$), 结果表明齐墩果酸在 0.781 6 ~ 3.908 μg 具有良好线性关系。

2.5 稳定性试验 取同一供试品溶液, 分别在配制后 0, 4, 8, 12, 24, 48 h 进样, 每次 20 μL, 测定齐墩果酸的峰面积, RSD 2.3%, 表明供试品溶液在制备后 48 h 内稳定。

2.6 精密度试验 取同一供试品溶液, 连续进样 6 次, 每次 20 μL, 测定齐墩果酸的峰面积, RSD 2.1%, 表明该方法精密度良好。

2.7 重复性试验 取同一供试品 6 份, 每份 1 g, 精密称定, 按 2.3 项下方法制备供试品溶液, 进样, 测定得齐墩果酸平均质量分数为 0.887 4 mg·g⁻¹, RSD 2.7%, 表明该方法重复性良好。

2.8 回收率试验 取同一供试品 6 份, 每份 0.5 g (齐墩果酸含量为 0.887 4 mg·g⁻¹), 精密称定, 分别加入对照品溶液 1 mL (齐墩果酸含量为 0.390 8 g·L⁻¹), 挥干甲醇, 按前述方法制备和测定, 齐墩果酸的加样回收率结果, 见表 1。

表1 无梗五加果实中齐墩果酸的加样回收率测定

Table 1 Determination of recovery of oleanolic acid in fruits of *Acanthopanax sessiliflorus*

称样量 /g	样品中量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
0.502 8	0.446 2	0.822 5	96.3		
0.500 5	0.444 1	0.818 5	95.8		
0.500 7	0.444 3	0.824 5	97.3	97.3	1.2
0.501 8	0.445 3	0.826 7	97.6		
0.500 2	0.443 9	0.827 3	98.1		
0.500 8	0.444 4	0.830 5	98.8		

注: 加入量均为 0.390 8 mg。

2.9 样品测定 按上述方法测定不同样品中齐墩果酸的含量, 见表 2。

3 讨论

无梗五加果实中分离得到的齐墩果酸苷多为苷元与葡萄糖醛酸成苷, 这种苷在通常的水解条件下较难被水解, 本文方法学考察丹东农科院收集的无梗五加果实, 曾尝试采用酸水解、碱水解等方法均无法水解得到苷元, 故本文选用微波消解法辅助进行酸水解, 实验中考察了酸浓度、消解时间和三氯甲烷萃取方式等因素, 确定了最佳的消解参数, 水解得到苷元。

本实验尝试了乙腈-水溶液、甲醇-水溶液、甲醇-

表 2 无梗五加果实中齐墩果酸的含量测定

Table 2 Contents of oleanolic acid in fruits of *Acanthopanax sessiliflorus* mg·g⁻¹

No.	产地	齐墩果酸
1	丹东农业科学院	0.883 4
2	凤城市白旗镇吴家村 9 组	0.288 6
3	凤城市白旗镇吴家村 2 组	0.614 3
4	新宾县下夹河乡双河村	0.297 4
5	凤城市旭光村	0.626 1
6	凤城市白旗镇吴家村 10 组	0.195 7
7	凤城市白旗镇黄旗村 1 队	0.204 9
8	宽甸县毛甸子镇肖家堡村 11 组	0.197 7
9	凤城市边门镇大东村 5 组	0.197 8
10	凤城市白旗镇吴家村 7 组	0.203 5
11	凤城市朱场长农场	0.281 1

0.2% 乙酸水溶液、乙腈-0.1% 磷酸水溶液、甲醇-0.4% 磷酸水溶液等流动相系统,在甲醇-0.2% 乙酸水溶液系统中,齐墩果酸的分离度及对称性均良好,故选用此系统。通过不同比例的选择确定甲醇-0.2% 乙酸水溶液(90:10)分离效果最好,保留时间适中。

考察以双相酸水解、双相碱水解、消解 3 种水解方式进行水解,水解时间分别为 1,1,0.5 h。结果表明,采用双相酸水解和双相碱水解无法得到苷元齐墩果酸,采用消解的方法进行水解,可明显测得水解后的齐墩果酸,因此选定消解法为本实验的水解方法。

取无梗五加果实粉末 1 g,共 4 份,精密称定。分别加入 5%,7%,9%,12% 的盐酸水溶液 25 mL,0.1 MPa 微波消解 0.5 h,水解液用三氯甲烷萃取,合并三氯甲烷并回收溶剂,定容,进样,测定。结果表明,随酸浓度的加大,样品中齐墩果酸含量逐渐增加,但 12% 较 9% 增加不明显,因此确定酸水解的浓度为 9%。

取无梗五加果实粉末 1 g 共 3 份,精密称定。加入 9% 的盐酸水溶液 25 mL,分别于 0.1 MPa 下微波消解 15 min,0.5,1 h,水解液用三氯甲烷萃取,回收溶剂,定容,进样,测定。结果表明,随消解时间延长,样品中齐墩果酸含量增加,但 0.5 h 后,样品中齐墩果酸含量基本不变,因此确定消解时间为 0.5 h。

取无梗五加果实粉末 1 g,共 2 份,精密称定。加入 9% 的盐酸水溶液 25 mL,0.1 MPa 微波消解 0.5 h,其中 1 份水解液用三氯甲烷回流提取 1 h,分取三氯甲烷层,水解液再用三氯甲烷萃取 3 次,另 1 份水解液直接用三氯甲烷萃取 4 次。2 份样品均合

并三氯甲烷并回收溶剂,定容,进样,测定。结果表明,采用三氯甲烷先回流再萃取所得的齐墩果酸含量明显比只用三氯甲烷萃取的含量高,因此确定采用三氯甲烷先回流再萃取的方法。

本实验以齐墩果酸为指标测定无梗五加果实中三萜类化合物的含量,为更好地控制无梗五加果实质量奠定了基础。

[参考文献]

[1] 刘风华. 短梗五加的利用价值及市场开发前景[J]. 生物学通报,2007,42(6):14-15.

[2] 高凤兰,孙振方,哈永年. 无梗五加原植物及其生态分布[J]. 中国中医药科技,1997,4(2):106.

[3] 郑颖,金银萍,王英平,等. 无梗五加的化学成分及药理作用研究进展[J]. 特产研究,2012,34(1):72-74.

[4] Lee S H, Lee Y S, Jung S H, et al. Antitumor and immunostimulating activities of *Acanthopanax sessiliflorus* fruits[J]. Nat Prod Sci,2003,9(2):112-116.

[5] 杨春娟,安琪,宋洋,等. 无梗五加果化学成分的分离与鉴定[J]. 中国中药杂志,2009,34(6):715-717.

[6] 翟思佳,刘玉强,才谦. 无梗五加果实化学成分的分离与鉴定[J]. 中华中医药学刊,2012,30(4):772-773.

[7] 冯颖,孟宪军,建国,等. 无梗五加果多糖组成及生物活性的研究[J]. 食品科学,2008,29(4):378-380.

[8] 安琪,杨春娟,宋洋,等. 无梗五加果化学成分的研究[J]. 天然产物研究与开发,2008,20(5):765-769.

[9] Lee S H, Kim B K, Cho S H, et al. Phytochemical constituents from the fruits of *Acanthopanax sessiliflorus* [J]. Arch Pharm Res, 2002, 25(3):280-284

[10] 刘玉强,才谦. HPLC 同时测定无梗五加果实中金丝桃苷和槲皮素-4'-O-β-D-半乳糖苷的含量[J]. 药物分析杂志,2013,33(2):206-209.

[11] 张智超,刘玉强,才谦. 无梗五加果实中东莨菪内酯和东莨菪内酯苷测定研究[J]. 中成药,2013,35(7):1508-1511.

[12] 韩莹,李遇伯,崔兰冲,等. HPLC 法同时测定无梗五加果中东莨菪内酯和异嗪皮啶的含量[J]. 沈阳药科大学学报,2006,23(9):573-575.

[13] 才谦,刘玉强. 无梗五加果实中齐墩果酸苷的分离与鉴定[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(18):121-123.

[14] 刘小花,封士兰,李芸,等. HPLC 测定肤痒颗粒中齐墩果酸的含量[J]. 中成药,2007,29(2):301-302.

[15] 张振凌,石延帮,陈红,等. 不同商品等级牛膝饮片酒炙前后齐墩果酸的含量比较[J]. 中药材,2008,31(5):650-651.

[责任编辑 顾雪竹]