

HPLC-PDA 同时测定乌梅肉中 3 种特征成分

安苗¹, 黎雄², 赵亚², 李耿¹, 卢传坚^{2*}, 吴庆光¹

(1. 广州中医药大学 中药学院, 广州 510006; 2. 广州中医药大学 第二附属医院, 广州 510120)

[摘要] 目的:建立 HPLC-PDA 多波长检测法同时测定乌梅肉中柠檬酸,5-羟甲基糠醛(5-HMF),新绿原酸的含量。方法:采用 XBridgeTM C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),以(A)0.5% 磷酸二氢铵溶液(pH 3.0)-(B)乙腈为流动相进行梯度洗脱(0~10 min,95%~80% A;10~15 min,80%~70% A;15~16 min,70%~95% A;16~21 min,95% A),流速 0.8 mL·min⁻¹,柱温 25 ℃,检测波长分别为 210,284,327 nm。结果:通过对线性关系的考察,乌梅肉中柠檬酸,5-HMF,新绿原酸分别在 63.30~8100.00 mg·L⁻¹($r=0.9999$),0.50~32.00 mg·L⁻¹($r=0.9999$),0.19~12.00 mg·L⁻¹($r=0.9998$)内线性良好,各成分的回收率在 97.21%~101.01%,RSD 均 <2.0%,供试品溶液中 3 种指标性成分至少在 24 h 内稳定性良好。在不同产地乌梅肉样品中柠檬酸的平均质量分数为 318.71 mg·g⁻¹,5-HMF 的平均质量分数为 1.99 mg·g⁻¹,新绿原酸的平均质量分数为 2.01 mg·g⁻¹,以浙江和四川产的乌梅质量最好。结论:该方法准确、快速、成本较低,可用于乌梅肉中这 3 个成分的含量测定,为乌梅在食品和药品开发的质量控制方面提供了参考。

[关键词] 乌梅肉; 柠檬酸; 5-羟甲基糠醛; 新绿原酸; 高效液相色谱; 含量测定

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)23-0052-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017230052

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170912.1449.062.html>

[网络出版时间] 2017-09-12 14:49

Simultaneous Determination of Three Main Components in Mume Fructus Pulp by HPLC-PDA

AN Miao¹, LI Xiong², ZHAO Ya², LI Geng¹, LU Chuan-jian^{2*}, WU Qing-guang¹

(1. School of Chinese Materia Medica, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China;
2. Second of Affiliated Hospital, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510120, China)

[Abstract] **Objective:** To establish the HPLC-PDA multiwavelength detection method for the simultaneous determination of citric acid, 5-hydroxymethyl furfural (5-HMF) and neochlorogenic acid contents in **Method:** XBridgeTM C₁₈ (4.6 mm×250 mm, 5 μm) column was used with (A) with 0.5% ammonium biphosphate solution (pH 3.0) -acetonitrile (B) as the mobile phase for gradient elution (0-10 min, 95%-80% A; 10-15 min, 80%-70% A; 15-16 min, 70%-95% A; 16-21 min 95% A). The flow rate was 0.8 mL·min⁻¹, and the column temperature was 25 ℃. The detection wavelength was set at 210, 284 and 327 nm. **Result:** The good linear relationships was shown within 63.30-8100.00 mg·L⁻¹ ($r=0.9999$) for citric acid, 0.50-32.00 mg·L⁻¹ ($r=0.9999$) for 5-hydroxymethyl furfural, and 0.19-12.00 mg·L⁻¹ ($r=0.9998$) for neochlorogenic acid. The recovery of each component was in the range of 97.21%-101.01% and the RSD was less than 2.0%. The three kinds of indicator components in the test solution showed good stability at least within 24 h. The average mass fraction of citric acid, 5-HMF and neochlorogenic acid in Mume Fructus Pulp from different origins was 318.71,

[收稿日期] 20170410 (008)

[基金项目] 广东省省级科技计划项目(2015B020211013);广东省自然科学基金项目(S2013030011515)

[第一作者] 安苗,在读硕士,从事岭南中药新药开发,Tel:17875671916,E-mail:1365236552@qq.com

[通讯作者] *卢传坚,教授,博士生导师,从事中药活性成分及其临床应用研究,Tel:13822250116,E-mail:Luchuanjian888@vip.sina.com

1.99, 2.01 mg · g⁻¹ respectively, and the quality of Mume Fructus Pulp in Zhejiang and Sichuan was the best.
Conclusion: This method is accurate and rapid, with low cost, so it can be used for the determination of the three components in Mume Fructus Pulp, providing a reference for quality control in the food and medicine development of ebony.

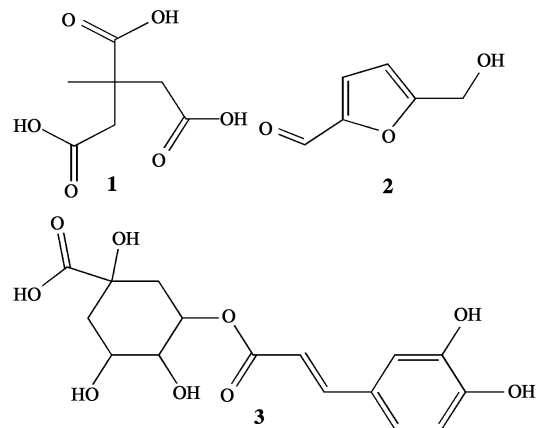
[**Key words**] Mume Fructus Pulp; citric acid; 5-hydroxymethyl furfural; neochlorogenic acid; HPLC; content determination

乌梅^[1]是蔷薇科植物梅的干燥近成熟果实经过炮制加工而成,首载于《神农本草经》,全国以四川产量最大,为川产药材主流品种,是一种安全性高的药食同源的药材,具有敛肺涩肠、生津止渴、驱虫止痢的功效。已有文献报道对乌梅不同部位的药理作用进行了比较深入的研究,乌梅的核壳及其种仁具有很强的镇咳作用,而乌梅肉则没有此药效,乌梅肉及其核壳具有止泻的作用,而种仁与其作用恰好相反,具有一定的泻下作用^[2],乌梅不同部位药效作用之所以不尽相同取决于不同部位的化学成分间的差异^[3],本课题组前期对乌梅不同部位的化学成分做了初步研究,发现有机酸类成分是乌梅药材的主要活性成分,特别是苹果酸和柠檬酸,前期果实未成熟阶段以苹果酸含量最大,成熟后果实及市售乌梅药材以柠檬酸为主,且主要集中在乌梅肉当中,所以乌梅肉是乌梅的主要药效部位。研究认为,乌梅及五味子等鲜果果肉在加热烘干过程中,会产生一定量的 5-羟甲基糠醛(5-HMF)^[4],5-HMF 具有抗氧化^[5],改善血液流变学^[6]等一系列药理作用,但其含量过高时也具有一定毒副作用^[7],而对于乌梅肉中 5-HMF 的含量测定还未见报道。此外,前人对于乌梅及其他中药材中绿原酸的研究已经较为透彻,经检测发现新绿原酸是绿乌梅肉中含量最大的一种绿原酸类物质,对乌梅肉中新绿原酸的含量测定研究却未见文献报道。本文参考 2015 年版《中国药典》乌梅中枸橼酸 HPLC 含量测定方法^[8],利用 HPLC-PDA 在不同波长下同时对乌梅肉中柠檬酸、新绿原酸和 5-HMF 进行含量测定,旨在为乌梅药材用药的规范化及其质量标准的建立提供理论依据。

1 材料

Waters 高效液相色谱仪(2695 型泵,2998 型 PDA 检测器,Empower 2 数据处理软件,美国 Waters 公司); AB135-S 型 1/10 万电子分析天平(瑞士 Mettler 公司),电热套及回流提取装置。乙腈(德国 Merck 公司)和磷酸[批号 C1208028,阿拉丁试剂(上海)有限公司]为色谱纯,水为超纯水,磷酸二氢铵(批号 20140101-1,广州化学试剂厂)为分析纯。

乌梅药材购自全国各大药材集散地,产地分别为四川、浙江、广东等地。所有样品均由广州中医药大学中药学院吴庆光教授鉴定,为蔷薇科植物梅 *Prunus mume* 的干燥近成熟果实的炮制加工品。对照品柠檬酸(中国食品药品检定研究院,批号 111679-200401),新绿原酸(成都曼斯特生物科技有限公司,批号 MUST-16021806),5-HMF(美仑生物有限公司,批号 67-47-0),各对照品纯度均 ≥ 98%,可用于含量测定,各对照品的结构见图 1。



1. 柠檬酸;2. 5-HMF;3. 新绿原酸

图 1 乌梅肉中 3 种成分的化学结构

Fig. 1 Chemical Structure of three ingredients in pulp of Mume Fructus

2 方法与结果

2.1 色谱条件 XBridge™ C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm);流动相(A)0.5% NH₄H₂PO₃ 水溶液(磷酸调 pH 3.0)-(B)乙腈进行梯度洗脱(0 ~ 10 min, 95% ~ 80% A; 10 ~ 15 min, 80% ~ 70% A; 15 ~ 16 min, 70% ~ 95% A; 16 ~ 21 min, 95% A),柱温 25 °C,流量 0.8 mL · min⁻¹,进样量 10 μL,检测波长分别为 210, 284, 327 nm。

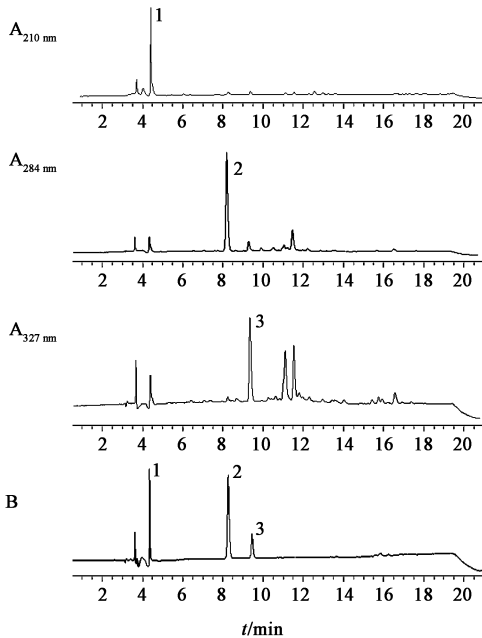
2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液 精密称取柠檬酸, 5-HMF, 新绿原酸对照品适量,置于 5 mL 的量瓶中,用 20% 甲醇水溶解并定容至刻度,制备成质量浓度分别为 16 200.00, 64.00, 24.00 mg · L⁻¹ 的混合对照

品溶液。

2.2.2 供试品溶液 乌梅饮片,去核,取乌梅肉低温烘干,碾碎,过 40 目筛,精密称取 0.20 g,置于 250 mL 的圆底烧瓶中,精密加水 50 mL,称定质量,再进行加热回流提取,提取时间为 1 h,放冷,用水补足减失质量,摇匀,过 0.22 μm 滤膜,离心,取上清,精密吸取 500 μL,加 20% 甲醇稀释至 1 mL,即得。

2.3 系统适应性试验 分别精密吸取混合对照品溶液与供试品溶液各 10 μL,按照 2.1 项下的色谱条件,进样测定,检测波长依次为柠檬酸(210 nm),5-HMF(284 nm),新绿原酸(327 nm),记录色谱图,乌梅中 3 个成分的 HPLC 色谱图见图 2。在本实验条件下,供试品及各对照品的色谱图吸收峰的理论塔板数均不低于 3 000,对应的色谱峰分离度均 > 1.5。



1. 柠檬酸;2. 5-HMF;3. 新绿原酸;A. 供试品;B. 对照品

图 2 乌梅肉样品与对照品的 HPLC 色谱

Fig. 2 HPLC chromatograms of pulp of Mume Fructus sample and reference substance

2.4 线性关系考察 将 2.2.1 项下的混合对照品溶液,用 20% 甲醇水溶液依次稀释 2 倍,得到系列对照品溶液,柠檬酸的质量浓度依次为 8 100.00, 4 050.00, 2 025.00, 1 012.50, 506.30, 253.10, 126.60, 63.30 mg·L⁻¹,5-HMF 的质量浓度依次为 32.00, 16.00, 8.00, 4.00, 2.00, 1.00, 0.50 mg·L⁻¹,新绿原酸原酸的质量浓度依次为 12.00, 6.00, 3.00, 1.50, 0.75, 0.38, 0.19 mg·L⁻¹,按照 2.1 项下色谱条件,分别进样 10 μL 进行测定。以峰面积积

分值(Y)作为纵坐标,对应的对照品质量浓度作为横坐标(X),进行回归分析,得到回归方程。相关系数(r)及线性范围见表 1。

表 1 乌梅肉中 3 个主要成分的线性关系

Table 1 Linear relationships of 3 major components in pulp of Mume Fructus

成分	回归方程	r	线性范围 /mg·L ⁻¹	检测限 /mg·L ⁻¹	定量限 /mg·L ⁻¹
柠檬酸	Y = 681.4X + 30 313	0.999 9	63.30 ~ 8 100.00	0.120	0.401
5-HMF	Y = 117 290X - 72 086	0.999 9	0.50 ~ 32.00	0.021	0.070
新绿原酸	Y = 48 662X - 1 300.4	0.999 8	0.19 ~ 12.00	0.046	0.092

2.5 精密度试验 取同一供试品溶液,按照 2.1 项下的色谱条件,连续进样 6 次,结果柠檬酸,5-HMF,新绿原酸峰面积的 RSD 分别为 1.5%, 1.3%, 0.9%。

2.6 稳定性试验 取同一供试品溶液,室温放置,分别在制备后 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 按照 2.1 项下色谱条件进样,每次进样 10 μL,记录各成分的峰面积,所得柠檬酸,5-HMF,新绿原酸峰面积积分的 RSD 分别为 1.6%, 2.1%, 1.5%。表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.7 重复性试验 精密称取同一批次(批号 160902001)的乌梅肉粉末 6 份,按照 2.2.2 项下的方法平行制备 6 份供试品溶液,按照 2.1 项下色谱条件,每次进样 10 μL,测定 3 个成分的峰面积,并计算含量,6 批样品中柠檬酸,5-HMF,新绿原酸的平均质量分数分别为 316.85, 1.97, 1.85 mg·g⁻¹, RSD 分别为 2.5%, 2.2%, 1.8%。

2.8 加样回收率试验 精密称取同一批次(批号 160902001)已知含量的乌梅肉样品粉末共 9 份,平均分成 3 组,分别按照质量分数 80%, 100%, 120% 加入低、中、高 3 个不同浓度的 3 种对照品,按照 2.2.2 项下方法制备供试品溶液,依照 2.1 项下色谱条件进行检测,每次进样 10 μL,计算各成分的加样回收率。结果见表 2。

2.9 样品测定 取不同产地的乌梅药材共 7 个批次,去核,取乌梅肉低温烘干,碾碎,分别精密称取各批次乌梅肉样品粉末 3 份,按照 2.2.2 项下的方法制备供试品溶液,在 2.1 项色谱条件下测定,外标法计算含量,结果见表 3。

3 讨论

3.1 pH 的影响 在其他色谱条件不变的情况下,

表 2 乌梅肉中 3 个成分的加样回收率

Table 2 Recoveries of 3 analytes in pulp of Mume Fructus

成分	称样量 /g	样品中量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
柠檬酸	0.200 1	63.402	50.747	114.125	99.95	99.35	1.1
	0.200 5	63.528	50.747	113.102	97.69		
	0.200 1	63.402	50.747	113.627	98.97		
	0.200 2	63.434	63.434	125.890	98.45		
	0.200 4	63.497	63.434	125.775	98.17		
	0.200 0	63.370	63.434	126.912	100.17		
	0.200 2	63.434	76.121	139.563	100.01		
	0.200 1	63.402	76.121	139.442	99.89		
	0.200 3	63.465	76.121	140.241	100.86		
5-HMF	0.200 1	0.394	0.315	0.705	98.73	99.13	1.3
	0.200 5	0.395	0.315	0.713	100.95		
	0.200 1	0.394	0.315	0.710	100.32		
	0.200 2	0.394	0.394	0.781	98.22		
	0.200 4	0.395	0.394	0.778	97.21		
	0.200 0	0.394	0.394	0.790	100.51		
	0.200 2	0.394	0.473	0.861	98.73		
	0.200 1	0.394	0.473	0.865	99.58		
	0.200 3	0.395	0.473	0.858	97.89		
新绿原酸	0.200 1	0.370	0.296	0.658	97.30	99.37	1.1
	0.200 5	0.371	0.296	0.670	101.01		
	0.200 1	0.370	0.296	0.662	98.65		
	0.200 2	0.370	0.370	0.735	98.65		
	0.200 4	0.371	0.370	0.737	98.92		
	0.200 0	0.370	0.370	0.741	100.28		
	0.200 2	0.370	0.444	0.813	99.77		
	0.200 1	0.370	0.444	0.811	99.32		
	0.200 3	0.371	0.444	0.817	100.45		

表 3 乌梅肉中 3 个成分的含量测定

Table 3 Determination of content of 3 ingredients in pulp of Mume Fructus

产地	批号	柠檬酸	5-HMF	新绿原酸
四川	160902001	316.85	1.97	1.85
四川	150301	307.03	1.83	2.47
四川	160101	209.50	1.88	3.03
四川	160407111	389.15	3.28	1.10
广东	160716	297.00	1.73	2.81
广东	150204F110	309.05	2.21	1.08
浙江	0150408	402.41	1.01	1.72

参考 2015 年版《中国药典》对乌梅中枸橼酸含量测定方法,在小范围内调整流动相的 pH,对 3 个成分的分度是有一定影响的,实验发现 pH 越小,3 个成分与其周围物质的分度越小,但 pH > 3.5 时,各物质的分度反而会变小,经过多次试验,最终确定 pH 3.0 时分度最好且 HPLC 检测用时最短,将其确定为最佳 pH 条件。

3.2 5-HMF 稳定性考察及其限度问题 对乌梅肉中的 5-HMF 进行日内稳定性考察,测定其峰面积的 RSD 2.1%,说明其在 24 h 内基本稳定,但对其进行日间稳定性考察,其峰面积波动范围较大,对已进行日内稳定性测试的样品每隔 24 h 测定,测定 3 次,发现其峰面积的 RSD 24.6%,因为 5-HMF 的化学性质比较活泼,对光和空气较为敏感,可以发生氧化、氢化、缩合等化学反应^[9],所以一般应该尽量避免,密封保存,且乌梅肉提取液也应及时测定。2015 年版《中国药典》仅对于葡萄糖注射液中 5-HMF 含量限度有明确规定,经计算,其质量分数不得超过 0.02%,本文乌梅肉中 5-HMF 远高于此限度;此外,乌梅中 5-HMF 的含量也远高于文献研究中能引起细胞显示弱毒性、动物的某些指标发生一定变化的浓度。而日常生活中乌梅一般作为食品和药品使用,欧盟食品安全委员会认为每人每天摄入的 HMF 类物质的上限为 1.6 mg,但 5-HMF 广泛存在于各种食品及中药材中,日平均摄入量远高于此限度,乌梅及五味子等中药材中含量更高,目前并没有有力的证据表明其在生活中引起了健康危害,所以乌梅等中药材中 5-HMF 对于人体是否具有潜在危害及其限度问题还有待进一步研究。

3.3 样品形态及提取条件的考察 本实验还对乌梅样品形态和提取条件做了相应的考察,对乌梅肉、乌梅核、乌梅仁进行精密称取,均按照 2.2.2 项下的提取方法进行提取制备,依照 2.1 项下色谱条件进样 3 次,每次 10 μL,结果发现,乌梅仁没有本文所要测定的 3 种成分,乌梅核有少量 3 种成分,按照 3 种对照品的线性回归方程进行计算可得,乌梅核中柠檬酸,5-HMF,新绿原酸的质量分数分别为 75.63, 0.16, 0.08 mg·g⁻¹,乌梅肉中 3 种成分的含量是最高的,其中柠檬酸最高可达到 402.4 mg·g⁻¹;对提取条件进行考察,由于 3 个成分均是极性较大的成分,故选择水作为提取溶剂,结果发现,同等的样品量及溶剂水,超声提取 1 h 及加热回流提取 1 h 比较,加热回流提取的方法能够最大程度地提取所测 3 个成分,特别是柠檬酸的含量后者较前者含量明

显较高,其中5-HMF在80℃下进行回流提取其含量是随着温度的升高而增大的,有文献也报道当温度低于80℃时,可以保证5-HMF的含量稳定^[10],所以,选择合适的温度与溶剂,不会影响乌梅中5-HMF的含量。综上,本实验采用的供试品为乌梅肉,提取条件为78℃左右加热回流提取。

[参考文献]

[1] 阮毅铭. 乌梅化学成分及药理作用概述[J]. 中国医药导刊, 2008, 10(5): 793-794.
[2] 王智云, 孙玉刚, 王麟, 等. 乌梅的药理活性研究进展[J]. 实用临床医药杂志, 2015, 19(19): 200-202.
[3] 袁武会, 李景丽. 乌梅肉剥制前炮制方法对化学成分的影响[J]. 中医药导报, 2012, 18(3): 63-64.
[4] 李越, 安开龙, 李德坤, 等. HPLC-UV法测定五味子中5-羟甲基糠醛[J]. 中成药, 2015, 37(1): 141-144.
[5] 丁霞, 王明艳, 余宗亮, 等. 山茱萸中5-羟甲基糠醛的分离鉴定及生物活性研究[J]. 中国中药杂志, 2008, 33(4): 392-396.

[6] 耿放, 王喜军. 5-羟甲基-2-糠醛(5-HMF)在中药复方中的研究现状及相关药效探讨[J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2005, 7(6): 52-56.
[7] Severin I, Dumont C, Jondeau-cabaton A, et al. Genotoxic activities of the food contaminant 5-hydroxymethylfurfural using defident *in vitro* bioassays [J]. Toxicol Lett, 2010, 192(2): 189-194.
[8] 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: 79.
[9] ZHAO Z, Hee S, Hideo S, et al. 5-Caffeoylquinic acid and caffeic acid down regulate the oxidative stress-and TNF- α -induced secretion of interleukin-8 from Caco-2 cells[J]. J Agr Food Chem, 2008, 56(10): 3863-3868.
[10] 鲜洁晨, 张宁, 冯怡, 等. 中药蜜丸炼蜜过程中果糖、葡萄糖、5-羟甲基糠醛的热稳定性研究[J]. 中药材, 2011, 34(9): 1434-1437.

[责任编辑 顾雪竹]