

# 虎掌南星总有机酸含量测定

王琴霞, 池玉梅\*

(南京中医药大学药学院, 南京 210023)

**[摘要]** 目的:研究专属、灵敏的总有机酸含量测定方法。方法:利用羧基在 *N,N*-二环己基碳酰亚胺(DDC)体系中与高氯酸羟胺(HAP)形成羟肟酸,产物在酸性条件下与高氯酸铁显色的原理,以虎掌南星为载体,柠檬酸为指标,采用分光光度法测定。结果:经显色条件优化,建立了测定方法。方法学考察结果显示,符合含量测定要求。对照品柠檬酸在 0.078 ~ 0.390 g·L<sup>-1</sup>,吸光度值与浓度呈现良好的线性关系( $r=0.9998$ ),平均加样回收率为 99.91% (RSD 1.32%,  $n=9$ )。结论:该方法简便灵敏,具有可操作性,可用于测定药材中总有机酸的含量。

**[关键词]** 虎掌南星; 有机酸; 含量测定; 分光光度法; 羟肟酸铁

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)07-0089-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2014070089

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13422/j.cnki.syfjx.000022.html>

**[网络出版时间]** 2014-01-21 9:24

## Determination of Total Organic Acids in *Pinellia pedatisecta*

WANG Qin-xia, CHI Yu-mei\*

**[收稿日期]** 20131105(014)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(30973939);南京中医药大学中药学一级学科开放课题(2011zyx2-007)

**[第一作者]** 王琴霞,硕士研究生,从事中药制剂分析研究, Tel:025-85811053, E-mail:wangqinxia1988@163.com

**[通讯作者]** \*池玉梅,硕士,教授,从事药物分析研究, Tel:025-85811053, E-mail:ymchii@njutcm.edu.cn

号峰)、大黄素(16号峰)、大黄酚(17号峰)、大黄素甲醚(18号峰)均为赤芍、大黄药对中的指标性成分,但芍药苷在指纹图谱中峰位适中,峰形对称性好,且相对稳定,因此选其作为参照峰。

不同比例赤芍、大黄药对的指纹图谱虽然都出现了相应的特征性成分峰,但峰高比值不尽相同,图谱差异较大。选择芍药苷和大黄酸作为特征峰,根据保留时间,确定药对的配伍,根据峰高比值,确定配伍比例。

### [参考文献]

- [1] 胥庆华. 中药药对大全[M]. 北京:中国中医药出版社,1996:364.
- [2] 高学敏. 中药学[M]. 北京:中国中医药出版社,2002:170,181.
- [3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:147.
- [4] 尤春雪,张振秋,李峰,等. HPLC 波长切换技术对葛

根中 8 种成分的测定及指纹图谱研究[J]. 中草药, 2013,44(5):616.

- [5] 谢剑琳,张振秋,梁朔,等. HPLC 波长切换法同时测定大黄、牡丹皮药对提取物中 11 个成分的含量[J]. 药物分析杂志,2013,33(1):103.
- [6] 刘峰,张振秋,赵金明,等. 黄连及炮制品 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中药材,2010,33(9):1382.
- [7] 李妍,杨燕云,张振秋,等. HPLC 法同时测定白芍、甘草药对提取物中 9 种有效成分[J]. 中成药,2013,35(1):100
- [8] 李伟铭,赵月然,杨燕云,等. HPLC 波长切换法同时测定白芍饮片中 9 个成分的含量[J]. 药物分析杂志,2011,31(12):2208.
- [9] 陈斌,蔡宝昌,潘杨,等. 不同产地掌叶大黄 HPLC 指纹图谱的比较[J]. 中草药,2013,34(5):457.
- [10] 高明,赵镭,赵光树,等. 白芍和赤芍 HPLC 指纹图谱比较研究[J]. 中草药,2010,41(11):1904.

[责任编辑 蔡仲德]

(Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China)

**[ Abstract ] Objective:** Study on a specific and sensitive determination method of the total organic acid. **Method:** It has been developed the method that by citric acid as index based on the formation of hydroxamic acid from the organic acid in the presence of dl-cyclohexylcarbodiimide (DCC) and hydroxylamine perchlorate (HAP) as well as the formation of purple ferric hydroxamate from hydroxamic acid in the presence of acidic ferric perchlorate solution in *Pinellia pedatisecta*. **Result:** A determination method has established by optimization of conditions. Through the study methodology, approach was consistent with requirements determination: citric acid has a good linear relationship between the concentrations and the absorbance of schaftoside in the ranges of 0.078-0.390 g · L<sup>-1</sup> ( $r=0.9998$ ), and the average recovery was 99.91% (RSD 1.32%,  $n=9$ ). **Conclusion:** The performance of the method was convenient, sensitive and has a good reproducibility, and can be used to determination of the organic acids in Chinese medicine.

**[ Key words ]** *Pinellia pedatisecta*; organic acids; content determination; spectrophotometry; ferric hydroxamate

有机酸是指含有羧基的一类有机化合物,在中药中普遍存在,具有多种活性功能<sup>[1]</sup>。目前常见有酸碱滴定法、电位滴定法、液相色谱法、气相色谱法及色谱质谱联用法等,分别用于总含量和单体含量的测定<sup>[2]</sup>。但酸碱滴定法用于中药中总有机酸含量测定是根据酸碱指示剂的颜色变化来确定滴定终点,而一部分中药的提取液颜色较深,会干扰滴定终点<sup>[3]</sup>;电位滴定法是根据电位的变化来确认滴定终点,但是其灵敏度受低浓度时电极电位测量准确度的限制;液相色谱法分析有机酸的条件较为苛刻,大量使用流动相不利环境友好;气相色谱法则需要对较难挥发的有机酸进行衍生化处理,样品前处理费时费力;色谱质谱联用法测定有机酸成本较为昂贵,不利推广中药材中有机酸质量控制等。本文利用羧基在 DCC 体系中与 HAP 形成羟肟酸,在酸性条件下与高氯酸铁溶液显色的原理<sup>[4]</sup>,拟采用分光光度法,研究建立中药中总有机酸含量测定方法,以期为其含量测定拓展新方法。

虎掌南星又名掌叶半夏,为天南星科半夏属植物掌叶半夏的干燥块茎,味苦、辛,性温,有毒,归肺、肝、脾经,具有降逆止呕、燥湿化痰、祛风定惊、消痞散结等功效<sup>[5]</sup>。始载于《神农本草经》,尚未收录于《中国药典》,但在安徽、河北、四川等地有大面积的种植,个小者常作为天南星科半夏属植物半夏使用,而大多为天南星科天南星属植物天南星的主流商品使用,自古使用多混乱。2010 年版《中国药典》收录的半夏采用有机酸含量作为质控指标,虎掌南星中有机酸类成分是其主要有效部位之一,在镇静镇痛、祛痰、抗肿瘤、抗炎等方面起重要的作用。本文以柠

檬酸为指标,采用分光光度法建立虎掌南星中总有机酸含量测定方法,以期质量控制提供研究基础。

## 1 材料

**1.1 仪器** UV-2401 型分光光度计(日本岛津), UV-752 型分光光度计(上海分析化学仪器)。

**1.2 试剂** 柠檬酸、琥珀酸、戊二酸、癸二酸、壬二酸、十二酸、十四酸、十六酸、硬脂酸(均为分析纯),盐酸羟胺、高氯酸钠、*N,N*-二环己基碳酰亚胺、酸性高氯酸铁(阿拉丁公司),重蒸水(自制)。

高氯酸羟胺(实验室自制:以盐酸羟胺和高氯酸钠为原料,甲醇作为反应介质,60℃反应 24 h,取上清液蒸干)。

虎掌南星(表 1),经南京中医药大学谈献和教授鉴定为天南星科植物掌叶半夏 *Pinellia pedatisecta* Schott. 的干燥块茎;药材粉碎过 60 目筛,备用。

## 2 方法与结果

### 2.1 方法

**2.1.1 对照品溶液制备** 精密称取柠檬酸(纯度 99.5%, Lot # A1311017)97.60 mg 于 25 mL 量瓶,70% 乙醇溶解并定容,精密量取该溶液 10 mL 于 50 mL 量瓶中,稀释定容,对照品储备液(I)。

**2.1.2 供试品溶液制备** 取药材粉末(过 4 号筛)0.25 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密量取 20 mL 60% 乙醇,密塞,称重,超声处理 45 min,放冷,再称重,用 60% 乙醇补足质量,摇匀,滤过,取滤液作为供试品溶液<sup>[6]</sup>。

**2.1.3 显色与测定方法** 精密量取 2.1.2 项下供试品溶液 4.0 mL 于 10 mL 量瓶,依次加 1.0 mL 无水乙醇,1.0 mL 0.2 mol · L<sup>-1</sup> HAP、0.5 mL 0.6

表1 虎掌南星来源

No.	产地	No.	产地
HZ-1	河北安国市章令村	HZ-7	安徽
HZ-2	河南	HZ-8	河南
HZ-3	安国市北堡村	HZ-9	东北
HZ-4	安国市立家庄	HZ-10	广西
HZ-5	山东泰安东平乡	HZ-11	南京玄武湖
HZ-6	本校药苑	HZ-12	陕西

$\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  DDC,  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$  放置 15 min 后,加入 2.0 mL  $0.04\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  酸性高氯酸铁溶液,用无水乙醇定容,按 2010 年版《中国药典》一部附录 VA 紫外-可见分光光度法,以试剂空白作为参比溶液,在 520 nm 处测定吸光度。

## 2.2 方法学考察

**2.2.1 线性范围及工作曲线考察** 分别精密量取 2.1.1 项下柠檬酸对照品液(I) 1, 2, 3, 4, 5 mL 于 10 mL 量瓶,分别用 70% 乙醇溶液补至 5 mL,按 2.1.3 项测定吸光度,结果显示柠檬酸对照品在  $0.078\sim 0.390\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,吸光度与浓度呈现良好的线性关系,  $A=2.1788C+0.011(r=0.9998)$ 。

**2.2.2 重复性、稳定性及精密度试验** 取同一药材(HZ-2) 6 份,按 2.1.2 项的方法制备供试品溶液,按 2.1.3 项显色测定吸光度,结果 RSD 1.26%,表明方

法重复性良好;将同一供试品溶液在 120 min 内每隔 20 min 测定其吸光度,结果显示供试品溶液在 120 min 中内无显著变化, RSD 0.26%,表明供试品溶液稳定性较好;取线性考察的 3 号对照品溶液,连续测定吸光度 6 次, RSD 0.10%,表明仪器精密度良好。

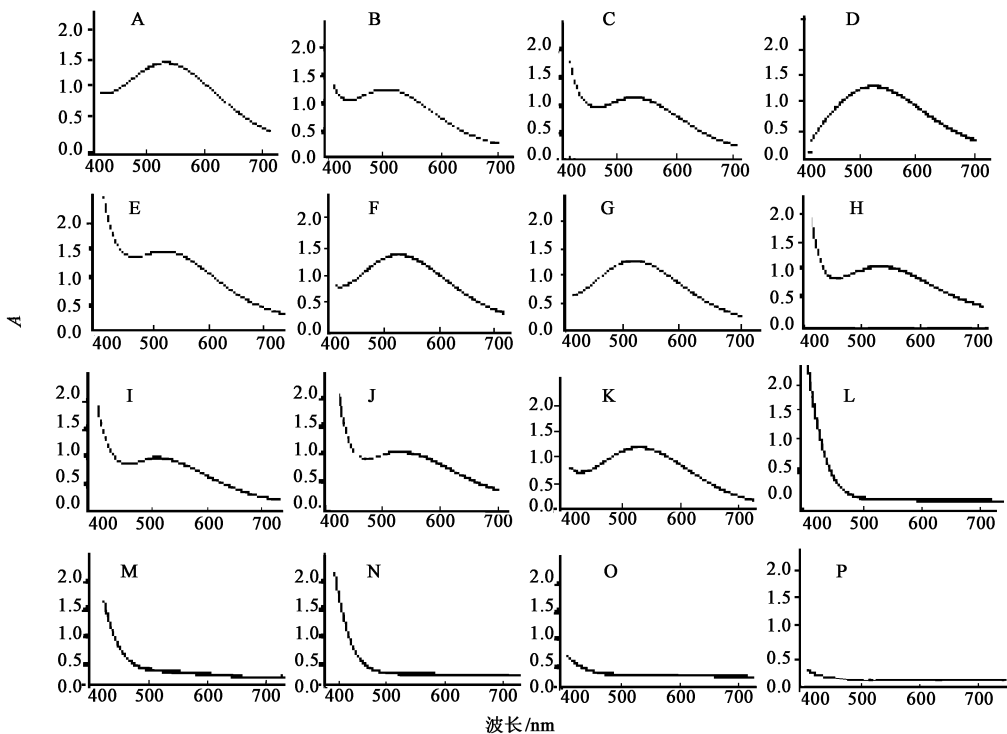
**2.2.3 准确性试验** 取药材粉末 0.12 g,精密称定,共 9 份,分为 3 组,分别以 80%, 100%, 120% 精密加入相应柠檬酸对照品溶液 20 mL,以供试品溶液制备及显色测定方法进行试验(表 2),平均回收率 99.91%, RSD 1.32% ( $n=9$ )。

**2.2.4 样品测定** 每份样品均取 3 份,按照 2.1.2 和 2.1.3 项下方法测定表 1 中各药材,平行测定一次,取平均值,结果显示 RSD 均  $<1\%$  (表 3),符合含量测定要求。

## 3 讨论

**3.1 专属性试验** 取供试品溶液和柠檬酸对照品溶液,并取丁二酸、戊二酸、己二酸、壬二酸、癸二酸、十二酸、十四酸、十六酸、十八酸对照品适量配制相应适宜溶液,按 2.1.3 项显色,在 400~800 nm 测定吸收光谱,结果显示在 520 nm 有最大吸收波长(图 1)。

另取适量芹菜素、虎掌南星黄酮部位(自制)和虎掌南星生物碱部位(自制)配制成相应溶液,按



A. 供试品显色; B. 柠檬酸; C. 丁二酸; D. 戊二酸; E. 己二酸; F. 壬二酸; G. 癸二酸; H. 十二酸; I. 十四酸; J. 十六酸; K. 十八酸; L. 芹菜素; M. 黄酮部位; N. 生物碱部位; O. 供试品; P. 试剂空白

图1 虎掌南星供试品溶液及各对照品显色溶液的吸收光谱

表2 虎掌南星中柠檬酸加样回收试验

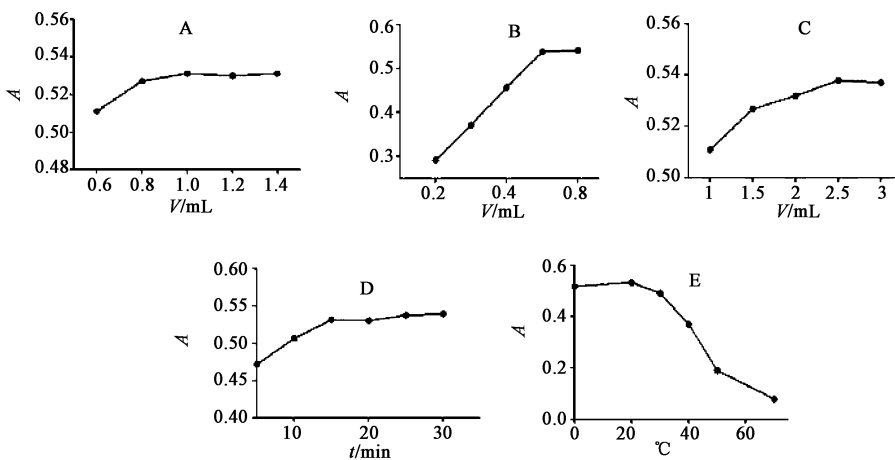
No.	样重 /g	吸光度 A	测得量 /mg	原有量 /mg	加入量 /mg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
1	0.124 2	0.406	1.773	1.006	0.781	98.21		
2	0.125 1	0.415	1.808	1.026	0.781	100.13		
3	0.124 6	0.411	1.791	1.009	0.781	100.13		
4	0.125 2	0.450	1.973	1.014	0.937	102.35		
5	0.124 4	0.432	1.894	0.973	0.937	98.29	99.91	1.32
6	0.124 8	0.466	1.954	1.011	0.937	100.64		
7	0.125 0	0.492	2.168	1.012	1.171	98.72		
8	0.124 9	0.501	2.208	1.031	1.171	100.51		
9	0.125 7	0.497	2.191	1.018	1.171	100.17		

表3 虎掌南星中柠檬酸含量测定 %

批号	含量	RSD	批号	含量	RSD
HZ-1	5.07	0.02	HZ-7	3.80	0.86
HZ-2	5.78	0.41	HZ-8	4.32	0.22
HZ-3	5.49	0.73	HZ-9	4.76	0.74
HZ-4	5.08	0.73	HZ-10	5.02	0.16
HZ-5	5.94	0.30	HZ-11	4.47	0.33
HZ-6	5.50	0.09	HZ-12	3.91	0.46

2.1.3 项显色,在 400~800 nm 测定吸收光谱(图 1-L~N),同时测定供试品溶液吸收光谱(图 1-O)和试剂空白的吸收光谱(图 1-P),结果显示在(520±60) nm 处均无吸收。

3.2 显色条件优化 对显色条件进行了优化试验<sup>[7]</sup>,分别对 HAP,DDC、显色剂加入的体积以及反应时间和温度进行考察(图 2)。图 2-A 显示当 HAP 体积改变达到 1 mL 后,吸光度趋于稳定;图 2-B 显示当 DDC 体积达到 0.5 mL 后,吸光度趋于平衡;图 2-C 显示,当显色剂酸性高氯酸铁体积增大到 2 mL 时,已基本稳定;图 2-D 显示,吸光度随着反应时间延长逐渐增大,当增大到 15 min 后,已基本稳定;图 2-E 显示,反应温度对显色反应影响较大,在 20 °C 以内吸光度呈现增长趋势,而 20 °C 以上时,吸光度明显呈现递减趋势,这是因为反应温度越高,其副反应越高,羟肟酸的转化率较低,固在 20 °C 反应最为合理。



A. HAP; B. DDC; C. 高氯酸铁; D. 显色时间; E. 反应温度

图2 虎掌南星有机酸显色条件的优化

[参考文献]

[1] 汤喜兰,刘建勋,李磊.中药有机酸类成分的药理作用及在心血管疾病的应用[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(5):243.  
[2] 许风清,吴皓,周倩,等.半夏药材中总有机酸的定量方法和含量测定研究[J].南京中医药大学学报,2005,21(1):34.  
[3] 马莉,唐健元,李祖伦,等.板蓝根提取物中总有机酸和水杨酸含量测定方法研究[J].中国中药杂志,2006,31(10):804.

[4] Yu-Cai He, Cui-Luan Ma, Jian-He Xu, et al. A high-throughput screening strategy for nitrile-hydrolyzing enzymes based on ferric hydroxamate spectrophotometry [J], Appl Microbiol Biotechnol, 2011, 89(3):817.  
[5] 宋立人.中华本草.第23卷[M].上海:上海科学技术出版社,1999:504.  
[6] 居羚,韩文静,池玉梅.天南星药典品种黄酮含量测定和鉴别方法的研究[J].中成药,2010,32(2):308.  
[7] 牛金刚,梁晓静,刘霞,等.分光光度法测定水溶液中的有机酸含量[J].应用化学,2010,27(3):342.

[责任编辑 蔡仲德]