

· 研究报告 ·

应用高效液相色谱法测定猫人参中积雪草酸的含量

吕 昉,周 瑾,费 扬,陈 雨,张国庆,赵 亮 (第二军医大学附属东方肝胆外科医院药材科,上海 200438)

[摘要] 目的 建立猫人参药材中积雪草酸的含量测定方法。方法 采用高效液相色谱法,色谱柱为 Agilent HC-C₁₈ 柱(4.6 mm×250 mm,5.0 μm),流动相为乙腈(30 mmol/L)-醋酸铵水溶液(35:65),流速 1.0 ml/min,柱温 25 °C,紫外检测波长 210 nm,进样量 25 μl,运行时间 35 min。结果 积雪草酸与周围干扰峰达到基线分离,线性范围 25.3~506.0 μg/ml, $r=0.9996$;日内及日间精密度均 $<3\%$ ($n=5$),平均回收率为 99.4% (RSD=1.9%, $n=6$),猫人参中积雪草酸的含量为 0.751 mg/g。结论 该法简便快捷、测定结果准确、实用性强,可用于猫人参药材中积雪草酸的含量测定。

[关键词] 猫人参;积雪草酸;含量测定;高效液相色谱法

[中图分类号] R284.2;O657.72

[文献标志码] A

[文章编号] 1006-0111(2015)04-0356-03

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2015.04.017

Determination of asiatic acid in the root of *Actinidia valvata* by HPLC

LÜ Fang, ZHOU Jin, FEI Yang, CHEN Yu, ZHANG Guoqing, ZHAO Liang (Department of Pharmacy, Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital Affiliated to Second Military Medical University, Shanghai 200438, China)

[Abstract] **Objective** To establish a method for the determination of asiatic acid in the root of *Actinidia valvata*. **Methods** HPLC-VWD was used in the analysis. The column was Agilent HC-C₁₈ (4.6 mm×250 mm,5μm);the mobile phase was acetonitrile; (30 mmol/L) acetic acid amine solution (35:65); the flow rate was 1.0 ml/min; the temperature of column was 25 °C; the detection wavelength was set at 210 nm; the injection volume was 25 μl; the running time was 35 min. **Results**

Asiatic acid was separated with interference in baseline. The linear range was 25.30-506.0 μg/ml with linear correlation of 0.9996 for asiatic acid. The result of intra-day and inter-day precisions were both within 5% ($n=3$), and the average recovery was 99.4% with RSD 1.9% ($n=6$). **Conclusion** The method was simple, rapid, accurate and convenient for quality control of asiatic acid in the root of *Actinidia valvata*.

[Key words] *Actinidia valvata*; asiatic acid; determination; HPLC

猫人参为猕猴桃科植物馥合猕猴桃(*Actinidia valvata* Dunn)的根,具有清热解毒、消肿疔的功效,主要用于治疗骨髓炎、疮疡脓肿、肝硬化、黄疸、腹水、消化系统肿瘤等^[1]。药理学研究表明,猫人参提取液具有良好的抗肝癌作用^[2,3],对猫人参药材化学成分的研究表明其含有积雪草酸^[4,5]。积雪草酸是乌苏烷型五环三萜酸,具有抑制肝癌细胞增生、保肝及诱导肿瘤细胞凋亡等多种作用^[6-9]。目前针对猫人参药材的质量控制方法鲜有报道,而积雪草酸的含量测定方法文献报道也较少^[10]。为了对猫人参药材进行质量控制,保障临床用药安全有效,本研究以积雪草酸为对象,采用高效液相色谱(HPLC)法对猫人参中的积雪草酸进行含量测定。

[作者简介] 吕 昉,药师。Tel:(021)81875577;E-mail:lvfang-2005@163.com

[通讯作者] 赵 亮,主管药师。研究方向:中药质量控制研究。Tel:(021)81875584,E-mail:zhaoliangphar@163.com

1 仪器与试剂

Agilent-1100 系列 HPLC 仪(美国安捷伦公司),包括 G1379A 真空脱气机、G1311A 四元泵、G1367A 自动进样器、G1316A 柱温箱和 G1315A 单波长紫外检测器;AE240 型十万分之一电子天平(瑞士梅特勒公司)。

猫人参药材饮片(产地:安徽,批号:120503、100901;产地:湖南,批号:130601),经第二军医大学生药学教研室孙连娜副教授鉴定为猕猴桃科植物馥合猕猴桃的根;对照品积雪草酸购自成都思曼特生物科技有限公司(纯度 $\geq 98.0\%$),醋酸铵为分析纯(上海国药集团),甲醇为色谱纯(美国 Honeywell),水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱 Agilent HC-C₁₈ 柱

(4.6 mm×250 mm, 5.0 μm), 流动相: 乙腈(30 mmol/L)-醋酸铵(35:65); 流速 1.0 ml/min, 柱温 25 °C, 紫外检测波长 210 nm, 进样量 25 μl, 运行时间 35 min。

2.2 供试品溶液的制备 取猫人参药材饮片适量, 置粉碎机中打碎, 过 60 目筛, 取粉末约 1 g, 精密称定, 置 50 ml 锥形瓶中, 加入甲醇 20 ml, 超声提取 60 min, 过滤, 收集滤液; 置水浴(90 °C)浓缩甲醇至约 5 ml, 转移至 10 ml 量瓶中, 用甲醇定容至刻度, 混匀, 用 0.45 μm 有机滤膜滤过, 取续滤液, 即得供试品溶液。

2.3 对照品储备液的配制 精密称取积雪草酸对照品 10.12 mg, 置 10 ml 量瓶中, 加入甲醇溶解并定容至刻度, 得积雪草酸浓度为 1.012 mg/ml 的对照品储备液。

2.4 方法学考察

2.4.1 系统适应性 取积雪草酸对照品溶液, 按照“2.1”项下色谱条件进样 25 μl, 结果见图 1。积雪

草酸保留时间约为 27.5 min, 峰形对称, 理论塔板数>8 000, 与周围干扰峰分离度均>1.5。

2.4.2 线性关系 按逐级稀释法, 精密量取积雪草酸对照品储备液适量, 置 5 ml 量瓶中, 用甲醇定容至刻度, 得浓度分别为 506.0、253.0、101.2、50.6、25.3 μg/ml 的系列对照品溶液, 按上述色谱条件进样分析, 以浓度为横坐标(X), 色谱峰面积为纵坐标(Y)进行线性回归, 得积雪草酸回归方程: $Y = 7.4363 X + 2.6319$, $r = 0.9996$, 线性范围 25.3~506.0 μg/ml。

2.4.3 精密度的实验 取积雪草酸低(25.3 μg/ml)、中(101.2 μg/ml)、高(506.0 μg/ml)3 个浓度的对照品溶液, 按上述色谱条件进样, 在 1 d 内分别进样 5 次, 以及连续 3 d 每天分别进样 2 次, 考察日内、日间精密度。积雪草酸在低、中、高浓度的日内精密度分别为 1.8%、2.2%、0.9%, 日间精密度分别为 2.3%、2.1%、0.9%, 均<3%, 表明此法精密度良好。

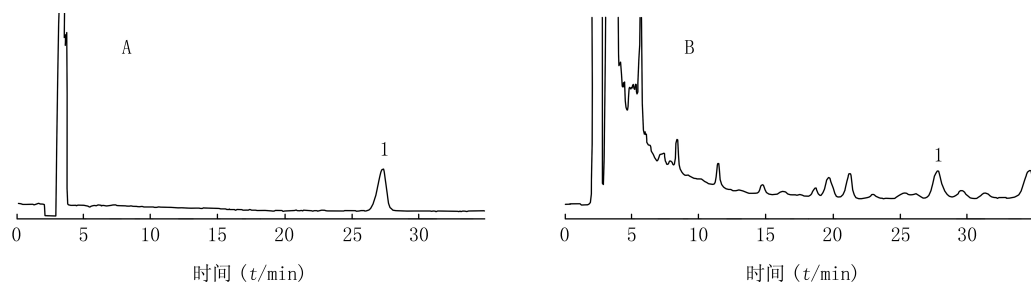


图 1 猫人参提取物 HPLC 图

A. 对照品; B. 样品; 1. 积雪草酸

2.4.4 重复性实验 取猫人参样品(批号:120503)粉末约 1 g, 精密称定, 按“2.2”项下方法制备供试品溶液, 平行操作 6 份, 按“2.1”项下色谱条件进样分析, 计算积雪草酸的含量, 积雪草酸含量 RSD = 2.6%, 表明此法重复性良好。

2.4.5 回收率实验 取猫人参样品(批号:120503)粉末约 0.5 g, 精密称定, 置 50 ml 锥形瓶中, 再加入新配制浓度为 1.010 mg/ml 的积雪草酸对照品溶液 0.4 ml, 按“2.2”项下方法制备供试品溶液, 平行操作 6 份, 按“2.1”项下色谱条件进样分析, 测定含量。积雪草酸的加样回收率为 101.8%, RSD=1.6%, 符合对准确度的要求。

2.4.6 检测限及定量限 取浓度为 25.3 μg/ml 积雪草酸的对照品溶液进样分析, 以信噪比为 10:1 确定其最低定量限, 积雪草酸的最低定量限为 25.3 μg/ml; 将此溶液稀释后进样, 以信噪比为 3:1 确定其最低检测限, 积雪草酸的最低检测限为

12.65 μg/ml。

2.4.7 稳定性考察 取猫人参样品(批号:120503)粉末约 1 g, 精密称定, 置 50 ml 锥形瓶中, 按“2.2”项下制备供试品溶液, 放入进样器样品盘中, 分别于 0、1、2、4、6、8 h 按“2.1”项下色谱条件进样分析, 代入标准曲线计算积雪草酸的浓度, 计算 RSD = 2.9%, 表明样品溶液在 8 h 内保持稳定。

2.5 含量测定 取不同批次猫人参药材饮片, 按“2.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进样, 测定积雪草酸的含量, 结果见表 1。

3 讨论

3.1 检测波长的选择 由于积雪草酸在紫外检测器上为末端吸收, 且吸收较弱, 采用 210 nm 作为检测波长能够降低背景噪音, 使积雪草酸达到最好的信噪比, 若波长<210 nm 则会因为背景吸收太强而导致色谱图在积雪草酸保留时间处出现倒峰。

表1 猫人參中积雪草酸的含量测定结果

产地	批号	称重 (m/g)	含量 (mg/g)	平均值	RSD (%)
安徽	120503	1.009 6	0.739 3	0.750 8	1.4
		1.002 4	0.753 9		
		1.001 3	0.759 2		
安徽	100901	1.001 4	0.797 5	0.779 6	2.0
		1.012 1	0.767 1		
		1.013 4	0.774 2		
湖南	130601	1.011 3	1.081 5	1.085 1	1.1
		1.014 4	1.098 5		
		1.024 3	1.075 3		

3.2 流动相的考察 由于甲醇在 210 nm 处有紫外吸收,采用含甲醇系统的流动相时,积雪草酸的吸收峰被流动相背景吸收掩盖,故采用乙腈-水系统考察,发现积雪草酸的峰形前延严重、对称性较差。在水相中加入醋酸铵能够改善峰形,考察了浓度为 10、20 及 30 mmol/L 醋酸铵时的色谱峰对称性,发现醋酸铵浓度为 30 mmol/L 时积雪草酸色谱峰形对称,达到定量分析的要求,同时对流动相比例进行了优化,使之与干扰峰达到基线分离。

3.3 色谱柱的考察 猫人參中成分复杂,为达到定量分析的要求,需要对积雪草酸及干扰峰进行完全分离。考察了不同类型填料色谱柱对积雪草酸与杂质分离的影响,如 Chromasil-C₁₈、Waters RP-C₁₈、Agilent XDB-C₁₈、SB-C₁₈、Plus C₁₈ 及 HC-C₁₈ 柱,发现在 Agilent HC-C₁₈ (4.6 mm×250 mm, 5.0 μm) 色谱柱上,积雪草酸色谱峰与周围峰的分度良好、保留时间合适,且峰形对称,符合本研究要求。

3.4 前处理方法的考察 为能简便、快速地从猫人參药材中提取积雪草酸,将药材饮片粉碎后采用甲醇超声提取,设计三因素、三水平正交试验,考察提取溶剂体积(10、20、30 倍量)、超声时间(20、40、60 min)及超声次数(1、2、3 次)对积雪草酸提取结果的影响,结果表明,影响积雪草酸提取效率的因素

顺序为溶剂倍数>提取时间>提取次数,最终确定样品前处理方法为 20 倍量甲醇超声 60 min 提取 1 次。

本研究建立了 HPLC 法测定猫人參中积雪草酸含量的方法,通过对检测波长、色谱柱及流动相组成等条件的摸索,确定最优色谱条件;同时采用正交试验优化得到猫人參中积雪草酸的提取方法。此法前处理条件简便快速,测定结果准确可靠,重复性好,实用性强,可用于对猫人參药材中积雪草酸的含量测定及质量控制。

【参考文献】

[1] 叶春. 猫人參的研究概述与利用[J]. 中国药业, 2011, 2(6): 68.

[2] 万旭英, 张亚妮, 张晨. 猫人參注射液体外抗肝癌实验研究[J]. 浙江中医学院学报, 2004, 28(2): 45-47.

[3] 万旭英, 张晨, 凌昌全, 等. 猫人參注射液抗肝癌作用和对免疫功能的影响[J]. 浙江中医学院学报, 2004, 28(4): 56-59.

[4] 徐一新, 项昭保, 陈晓晶, 等. 中药猫人參中的抗肿瘤活性成分[J]. 第二军医大学学报, 2011, 32(7): 749-753.

[5] 吕昉, 赵亮, 郑磊, 等. HPLC-TOF/MS 对中药猫人參化学成分的快速鉴别[J]. 中南药学, 2014, (2): 165-168.

[6] 李海艳, 徐燕丰, 辛海量, 等. 科罗索酸对 SMMC-7721 细胞生长抑制作用的初步研究[J]. 山东医药, 2011, 51(52): 44-46, 135.

[7] 杨光, 谭家驹, 何瑞华, 等. 积雪草酸阻断大鼠肝纤维化的实验研究[J]. 中国中医基础医学杂志, 2009, 15(7): 540-542.

[8] 周军, 高静, 方春钱, 等. 积雪草酸对肝癌细胞增殖作用的影响[J]. 江苏大学学报(医学版), 2009, 19(6): 475-479.

[9] 汤丽霞, 杨光, 谭家驹. 积雪草酸诱导大鼠肝星状细胞凋亡[J]. 中草药, 2009, (S1): 230-232.

[10] 夏彬彬, 李伊莎, 徐唯哲, 等. 积雪草中积雪草酸的分离、纯化及其含量测定[J]. 首都医科大学学报, 2011, 32(04): 538-540.

[收稿日期] 2014-03-06 [修回日期] 2014-09-09
[本文编辑] 李睿旻

(上接第 330 页)

[7] 尹利辉, 张雁. 正电性纳米银胶的表征及加入不同凝聚剂后的表面增强拉曼散射光谱[J]. 药物分析学杂志, 2010, 30(12): 2352-2355.

[8] Lee PC, Meisel D. Adsorption and SERS of dyes on silver and gold sols[J]. J Phys Chem, 1982, 86(17): 3391-3995.

[9] Feng QL, Wu J, Chen CQ, et al. A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*[J]. Biomed Mater Res, 2000, 52(4): 662-668.

[10] Kim J, Lee J, Kwon S, et al. Preparation of biodegradable polymer/silver nanoparticles composite and its antibacterial efficacy[J]. Nanosci Nanotechnol, 2009, 9(2): 1098-1102.

[11] Boschman CR, Bodnar UR, Tornatore MA, et al. Thirteen-year evolution of azole resistance in yeast isolates and prevalence of resistant strains carried by cancer patients at a large medical center[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2004, 42(4): 734-738.

[收稿日期] 2014-03-11 [修回日期] 2015-01-14
[本文编辑] 李睿旻