

高效液相色谱法同时测定榅桲籽中蔷薇酸和委陵菜酸的含量

哈及尼沙*

(新疆医科大学药学院, 乌鲁木齐 830011)

摘要: **目的** 建立高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)同时测定榅桲籽中蔷薇酸和委陵菜酸含量的分析方法。**方法** 样品经石油醚脱脂后, 用甲醇超声提取, 采用 Kromasil 100-5-C₁₈ (4.6 mm×250 mm, 5 μm)色谱柱分离, 以甲醇-0.2%磷酸(70:30, V:V)作为流动相, 流速 1.0 mL/min, 柱温 30 °C, 进样体积为 10 μL, 在 210 nm 波长下进行检测。**结果** 蔷薇酸和委陵菜酸分别在 7.92~55.44 μg/mL 和 3.76~18.8 μg/mL 浓度范围内线性关系良好, 相关系数均大于 0.999, 加样回收率为 90.4%~98.2%(n=6)。**结论** 该方法简便、快速、准确、重现性好, 可用于榅桲籽中蔷薇酸和委陵菜酸的快速测定。

关键词: 榅桲籽; 高效液相色谱法; 蔷薇酸; 委陵菜酸

Simultaneous determination of euscaphic acid and tormentic acid in *Cydonia oblonga* seeds by high performance liquid chromatography

HAJINISHA*

(College of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for the simultaneous determination of euscaphic acid and tormentic acid in *Cydonia oblonga* seeds by high performance liquid chromatography. **Methods** Sample were defatted by petroleum ether and extracted with methanol. The chromatographic separation was achieved on a Kromasil 100-5-C₁₈ column(4.6 mm×250 mm, 5 μm)with methanol-0.2% phosphoric acid (70:30, V:V) as mobile phase, the flow rate was 1.0 mL/min, the column temperature was 30 °C, injection volume was 10 μL, and detection wavelength was 210 nm. **Results** The euscaphic acid and tormentic acid were separated well and showed good linearity in the range of 7.92–55.44 g/mL and 3.76–18.8 g/mL, and the correlation coefficients were all greater than 0.999. The average recoveries were 90.4%–98.2%(n=6). **Conclusion** This method is simple, rapid, accurate, credible and repeatable. It can be used for determination of euscaphic acid and tormentic acid in *Cydonia oblonga* seeds.

KEY WORDS: *Cydonia oblonga* seeds; high performance liquid chromatography; euscaphic acid; tormentic acid

0 引言

榅桲(*Cydonia oblonga* Mill.)为蔷薇科榅桲属植物^[1]。在我国新疆、陕西、福建等地有一定栽培。榅桲俗称木梨或木瓜, 是药食兼用植物, 有很好的保健营养及药用价值,

其果实、种子、叶等部分均可入药。榅桲籽具有补脑益心、健脾胃、健胃消食、降压、降脂、降糖、止咳和止泻等功效^[2]。该药材在新疆民间制成不同配方的浸膏和糖浆用于主治消化器官疾病、糖尿病及心脑肝等器官疾病^[3]。现代研究表明, 榅桲籽中含有多种活性物质^[4-10], 其中三萜类

*通信作者: 哈及尼沙, 博士, 副教授, 主要研究方向为药用植物研究。E-mail: ajinsa@sina.com

*Corresponding author: HAJINISHA, Ph.D, Associate Professor, College of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China. E-mail: ajinsa@sina.com

成分具有较好的镇痛抗炎作用^[11]。DANIELA 等^[12]从椴椴籽中分离得到三萜类化合物, 并报道椴椴三萜具有抗氧化、抑制黑色素瘤细胞增殖作用。郑光海等^[13]研究表明齐墩果酸、熊果酸、蔷薇酸和委陵菜酸等五环三萜类具有显著的降血糖作用。本课题组^[14]前期工作中从椴椴籽中分离得到委陵菜酸、熊果酸、齐墩果酸和蔷薇酸等五环三萜类化合物, 发现委陵菜酸和熊果酸具有较好的抑制 PTP1B 活性, 并建立了总三萜定量测定方法^[15]和椴椴三萜类成分的多指标同时薄层鉴别方法^[16]。由于蔷薇酸具有较好的抗炎镇痛作用, 委陵菜酸具有清热解毒, 凉血止痢的作用^[17], 故可将其作为药材品质质量评价指标之一。鉴于三萜类物质的特殊药理作用, 其具有较好的开发前景。但尚未见有对椴椴三萜类成分的含量测定相关报道。比色法和高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)是三萜类化合物定量分析的主要方法, 其中 HPLC 法由于分离效果好、重现性好、灵敏度高、分析时间短、结果准确可靠等特点, 已越来越多地应用于药物的质量控制研究中。本研究在前期工作基础上, 建立 HPLC 同时测定椴椴籽中委陵菜酸和蔷薇酸 2 种五环三萜类成分含量的方法, 以期为该植物药材及其新产品品质评价与质量控制提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

蔷薇酸(批号 B30288)、委陵菜酸(批号 B30371)(上海源叶生物科技有限公司); 甲醇(色谱纯, 批号 WXBD1642V, 美国 Sigma 公司); 磷酸(色谱纯, 批号 H1824074, 上海瀚思化工有限公司); 石油醚(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司); 实验用水由艾柯超纯水仪制备。

椴椴籽采购于新疆上阿图什镇, 经中国科学院新疆生态与地理研究所植物分类研究室沈观冕研究员鉴定为蔷薇科植物椴椴种子。椴椴籽晒干, 粉碎, 过 40 目筛, 备用。

1.2 实验仪器

LC-20AB-4 型高效液相色谱仪(配 SPD-20A 型二极管阵列检测器, 日本岛津公司); MS105DU 电子天平(北京赛多利斯天平有限公司); AS20500ADT 型超声波清洗机(天津奥特塞恩斯仪器有限公司); JZ7114 型粉碎机(上海定久中草药机械有限公司); 艾柯超纯水仪(美国密理博公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 对照品溶液的制备

精密称取蔷薇酸和委陵菜酸对照品各 1.98 mg 和 0.94 mg, 加甲醇溶解制成蔷薇酸 0.396 mg/mL、委陵菜酸 0.188 mg/mL 的对照品溶液, 备用。

1.3.2 供试品溶液的制备

精密称取 1.0 g 椴椴籽, 分别置于 50 mL 具塞瓶中, 加

20 mL 色谱甲醇, 盖好瓶塞, 封口膜封, 41 °C 超声 40 min, 经 0.45 μm 滤膜滤过, 备用。

1.3.3 色谱条件

色谱柱为 Kromasil 100-5-C₁₈(4.6 mm×250 mm, 5 μm), 以甲醇-0.2%磷酸(7:3, V:V)为流动相, 流速为 1.0 mL/min, 检测波长为 210 nm, 柱温 30 °C, 进样量 10 μL。以色谱峰的保留时间定性, 采用外标法峰面积定量。

1.3.4 标准曲线的绘制

精密吸取混合对照溶液 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7 mL, 分别置于 5 mL 容量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 配制为蔷薇酸 7.92、15.84、23.76、31.68、39.60、47.52、55.44 μg/mL 和委陵菜酸 3.76、7.52、11.28、15.04、18.80、22.56、26.32 μg/mL 不同浓度系列的混合对照品溶液, 按色谱条件进样, 测定峰面积, 以峰面积(A)为纵坐标, 质量浓度(C)为横坐标, 绘制标准曲线, 进行线性回归分析。

1.3.5 方法学考察

专属性对照品和供试品溶液按色谱条件进样, 记录保留时间、分离度和理论塔板数。

精密度: 混合对照品溶液, 按色谱条件重复进样 6 次, 记录峰面积并计算相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)。

重复性: 称取同一椴椴籽样品 6 份, 制备供试品溶液, 按色谱条件进样, 记录峰面积并计算 RSD。

稳定性: 取同一椴椴籽供试品溶液, 分别于 0、2、4、8、10、12 h, 按色谱条件分别进样测定, 记录峰面积并计算 RSD。

加样回收率: 精密称取同一椴椴籽样品 6 份, 精密加入蔷薇酸和委陵菜酸质量浓度分别为 524 μg/mL 和 212 μg/mL 对照品溶液 0.7 mL, 按 1.3.2 项方法制备供试品溶液, 各进样 10 μL, 按 1.3.3 项色谱条件进行分析, 计算回收率与 RSD。

1.3.6 样品的测定

精密称取 1.0 g 椴椴籽, 按 1.3.2 项方法制备供试品溶液, 按 1.3.3 项色谱条件进样进行测定, 记录峰面积, 计算样品中蔷薇酸和委陵菜酸含量。

2 结果与分析

2.1 标准曲线线性范围与回归方程

实验表明, 椴椴籽蔷薇酸和委陵菜酸的回归方程分别为 $A=5235.2C-5879.4$ ($r=0.9992$), $A=6250.2C-7957.9$ ($r=0.9994$)。在 7.92~55.44 μg/mL 和 3.76~18.8 μg/mL 浓度范围内峰面积与质量浓度线性关系良好。

2.2 专属性

蔷薇酸和委陵菜酸的保留时间分别为 23.638 min 和 25.784 min, 分离度 2.25, 分离效果好。见图 1。

2.3 方法学考察

2.3.1 精密度考察

混合对照品溶液重复进样6次, 蔷薇酸和委陵菜酸的峰面积RSD值分别为1.77%和1.61%, 表明该方法精密度良好。

2.3.2 重复性考察

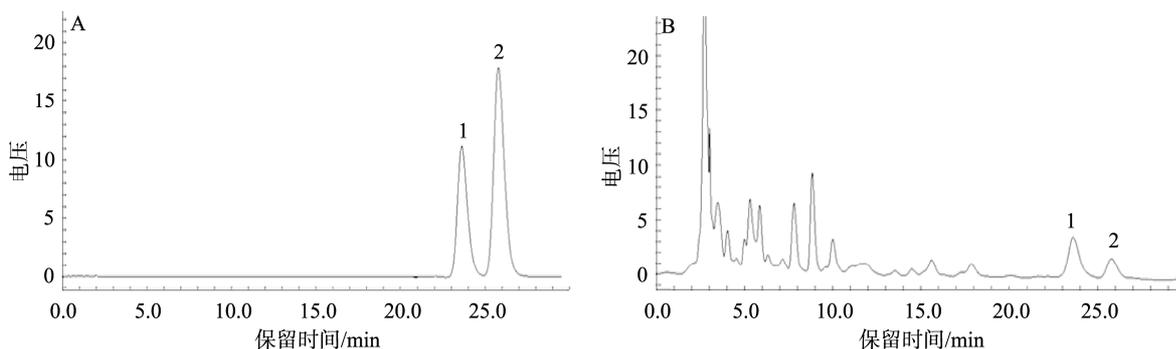
6份样品中蔷薇酸和委陵菜酸的平均质量分数分别为726.8 $\mu\text{g/g}$ 和295.5 $\mu\text{g/g}$, RSD值分别为0.79%和1.37%。结果表明该方法具有较好的重复性。

2.3.3 稳定性考察

同一份供试品在0、2、4、6、8和12 h测定, 蔷薇酸和委陵菜酸峰面积的RSD值分别为0.45%和1.60%, 结果表明所制备的供试品溶液在12 h内进行测定基本稳定。

2.3.4 回收率实验

蔷薇酸和委陵菜酸的平均回收率分别为93.4%和93.9%, RSD分别为2.55%和3.29%, 表明该方法准确度良好, 见表1。



注: 1. 蔷薇酸; 2. 委陵菜酸
理论塔板数分别为 A: 9732.69, B: 11731.46。

图1 HPLC 色谱图

Fig.1 HPLC chromatogram

表1 蔷薇酸和委陵菜酸加样回收率实验结果($n=6$)
Table 1 Experimental results of sample recovery of euscaphic acid and tormentic acid ($n=6$)

化合物	称样量/g	样品含量/ μg	加入量/ μg	测得量/ μg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
蔷薇酸	0.10017	363.50	366.80	699.01	91.5	93.4	2.55
	0.10038	363.66	366.80	699.24	91.5		
	0.10024	363.55	366.80	704.23	92.9		
	0.10082	363.98	366.80	721.42	97.4		
	0.10039	363.66	366.80	701.93	92.2		
	0.10049	363.74	366.80	712.63	95.1		
委陵菜酸	0.10017	147.80	148.40	281.91	90.4	93.9	3.29
	0.10038	147.90	148.40	285.32	92.6		
	0.10024	147.86	148.40	290.73	96.3		
	0.10082	148.03	148.40	293.76	98.2		
	0.10039	147.91	148.40	289.07	95.1		
	0.10049	147.93	148.40	283.07	91.1		

2.4 样品测定

测定结果表明榲桲籽中蔷薇酸和委陵菜酸的平均含量分别为 734.0 $\mu\text{g/g}$ 和 294.8 $\mu\text{g/g}$, RSD 小于 2%。

3 结论

榲桲果实可鲜食又可入药, 研究发现榲桲果实和种子中含有多种三萜类活性物质, 其中蔷薇酸和委陵菜酸均为五环三萜类化合物, 性质相近, 极性较小。因此本研究以甲醇-0.2%磷酸(70:30, *V:V*)为流动相, 采用 Kromasil 100-5- C_{18} 色谱柱, 建立 HPLC 测定榲桲籽中蔷薇酸和委陵菜酸的定量检测方法。在色谱条件下, 蔷薇酸和委陵菜酸完全分离, 蔷薇酸和委陵菜酸分别在 7.92~55.44 $\mu\text{g/mL}$ 和 3.76~18.8 $\mu\text{g/mL}$ 浓度范围内线性关系好, 相关系数均 0.999 以上。榲桲籽中蔷薇酸和委陵菜酸的平均含量分别为 734.0 $\mu\text{g/g}$ 和 294.8 $\mu\text{g/g}$, RSD 小于 2%, 各考察指标结果说明建立的高效液相色谱法测定榲桲籽中蔷薇酸和委陵菜酸的方法精密度良好、重现性、稳定性好、测定迅速、结果准确。可为榲桲及其产品的质量控制在提供科学依据。

参考文献

- [1] 新疆植物志编辑委员会. 新疆植物志[M]. 乌鲁木齐: 新疆科技卫生出版社, 1995.
Flora Editorial Committee of Xinjiang. Flora of Xinjiang [M]. Urumqi: Xinjiang Science Technology and Health Press, 1995.
- [2] 中华人民共和国国家药典委员会. 中华人民共和国卫生部药品标准[S].
Chinese Pharmacopoeia Commission. The pharmaceutical standards of sanitary ministry of people's republic of China [S].
- [3] 中国医学百科全书编辑委员会. 中国医学百科全书[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2005.
Editorial Committee of Chinese Medical Encyclopedia. Encyclopedia of Chinese medicine [M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 2005.
- [4] SILVA BM, ANDRADE PB, SEABRA RM, *et al.* Composition of quince (*Cydonia oblonga* Miller) seeds: Phenolics, organic acids and free amino acids [J]. Nat Prod Res, 2005, 19(3): 275–281.
- [5] FEDERICO F, SILVA BM, ANDRADE PB, *et al.* Approach to the study of C-glycosyl flavones by ion trap HPLC-PAD-ESI/MS/MS: Application to seeds of quince (*Cydonia oblonga*) [J]. Phytochem Anal, 2003, 14(6): 352–359.
- [6] 哈及尼沙·吾甫尔, 张君萍, 木巴拉克·依明. 榲桲籽油的超临界 CO_2 萃取工艺及其脂肪酸组成分析[J]. 中国油脂, 2016, 41(10): 11–14.
HAJINISHA GPR, ZHANG JP, MUBAREK IM. Supercritical CO_2 extraction of quince seed oil and its fatty acid composition [J]. China Oils and Fats, 2016, 41(10): 11–14.
- [7] MUHAMMAD UA, GULZAR M, MUHAMMAD AH, *et al.* *Cydonia oblonga* M., A medicinal plant rich in phytonutrients for pharmaceuticals [J]. Front Pharm, 2016, 7(163): 1–19.
- [8] SILVA BM, ANDRADE PB, VALENTÃO P, *et al.* Quince (*Cydonia oblonga* Miller) fruit (pulp, peel, and seed) and jam: Antioxidant activity [J]. J Agric Food Chem, 2004, 52(15): 4405–4712.
- [9] CARVALHO M, SILVA BM, SILVAR, *et al.* First report on *Cydonia oblonga* Miller anticancer potential: Differential antiproliferative effect against human kidney and colon cancer cells [J]. J Agric Food Chem, 2010, 58(6): 3366–3370.
- [10] 阿卜杜热合曼·努如拉, 阿米乃木·买买提, 艾再提·克热木, 等. 榲桲子不同提取部位对 α -葡萄糖苷酶的抑制活性及其降血糖作用[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(15): 4018–4023.
ABDURAHMAN N, AMINAIMU M, AIZAITI K, *et al.* Inhibitory activity on α -D-glucosidase and hypoglycemic effect of different extracts from *Cydonia oblonga* seeds [J]. J Food Saf Qual, 2018, 9(15): 4018–4023.
- [11] YOSHIKI K, WANG HK, TSUNEATSU N, *et al.* Anti-AIDS agents. 30. Anti-HIV activity of oleanolic acid, pomolic acid, and structurally related triterpenoids [J]. J Nat Prod, 1998, 61(9): 1090–1095.
- [12] DANIELA A, ANTONELLA C, BRIGIDA DA, *et al.* Antioxidant and antiproliferative activities of phytochemicals from quince (*Cydonia vulgaris*) peels [J]. Food Chem, 2010, 118(2): 199–207.
- [13] 郑光海, 朴惠顺. 三萜及其苷类化合物抗糖尿病的活性研究[J]. 华西药理学杂志, 2011, 26(3): 294–297.
ZHENG GH, PIAO HS. Study on the antidiabetic activity of triterpenoids and their glycosides [J]. West Chin J Pharm Sci, 2011, 26(3): 294–297.
- [14] 哈及尼沙, 阿卜杜热合曼·努如拉, 李改茹, 等. 榲桲籽的化学成分及其 PTP1B 抑制活性[J]. 药学报, 2019, 54(3): 510–513.
HAJINISA, ABDURAHMAN NRL, LI GR, *et al.* Chemical constituents of *Cydonia oblonga* seeds and their PTP1B inhibitory effects [J]. Acta Pharm Sinica, 2019, 54(3): 510–513.
- [15] 阿卜杜热合曼·努如拉, 古丽巴哈尔·艾力, 哈及尼沙, 等. 榲桲子总三萜提取工艺及其 DPPH·自由基抑制作用研究[J]. 新疆医科大学学报, 2020, 43(7): 931–935.
ABDURAHMAN NRL, GULBAHAR EL, HAJINISHA, *et al.* Study on the extraction process of total triterpenes on *Cydonia oblonga* seeds and its DPPH· free radical scavenging effect [J]. J Xinjiang Med Univ, 2020, 43(7): 931–935.

[16] 哈及尼沙, 李改茹, 马桂芝. 榲桲委陵菜酸、熊果酸和齐墩果酸等三萜酸类薄层色谱分离鉴别[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(7): 2116-2121.

HAJINISA, LI GR, MA GZ. Identification of triterpenoids including tormentic acid, ursolic acid and oleanolic acid in *Cydonia oblonga* by thin layer chromatography [J]. J Food Saf Qual, 2020, 11(7): 2116-2121.

[17] 刘普, 段宏泉, 潘勤, 等. 委陵菜三萜成分研究[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(22): 1875-1879.

LIU P, DUAN HQ, PAN Q, *et al.* Triterpenes from herb of *Potentilla*

chinesis [J]. China J Chin Materia Med, 2006, 31(22): 1875-1879.

(责任编辑: 王 欣)

作者简介



哈及尼沙, 博士, 副教授, 主要研究方向为药用植物研究。

E-mail: ajinsa@sina.com



“食品保鲜与贮藏”专题征稿函

随着生活水平的逐渐提高, 人们对食品的质量有了更高的要求。因此, 保鲜技术被广泛应用于食品的加工流通过程中。如何保持食品的新鲜度以及食品在储藏过程中的安全性成为目前研究的重点。

鉴于此, 本刊特别策划了“食品保鲜与贮藏”专题, 由浙江大学 罗自生 教授 担任专题主编, 主要围绕 (1)果蔬、粮食、水产品、禽肉制品等食品保鲜方法、技术; (2)食品在储藏中的生理、生化变化; (3)食品腐败以及控制方法等或您认为有意义的领域展开讨论, 计划在 2021 年 6 月出版。

鉴于您在该领域的成就, 本刊主编国家风险评估 吴永宁 研究员 及浙江大学 罗自生教授 特邀请您为本专题撰写稿件, 以期进一步提升该专题的学术质量和影响力。综述、实验报告、研究论文均可, 请在 2021 年 4 月 19 日前通过网站或 E-mail 投稿。我们将快速处理并优先发表。

感谢您的参与和支持!

投稿方式(注明专题): 食品保鲜与贮藏

网站: www.chinafoodj.com

E-mail: jfoodsqa@126.com

《食品安全质量检测学报》编辑部