

不同产地木瓜及其酒制品中 绿原酸的 HPLC 含量测定研究

陈建真 敖志辉 陈建明

摘要 目的 研究不同产地木瓜及其酒制品中绿原酸的 HPLC 含量测定方法。方法 采用 HPLC 法, Agilent SB - C18 (4.6mm × 250mm, 5 μ m); 流动相: 甲醇: 1% 冰醋酸 (80: 20) 流速: 1.0ml/min; 检测波长: 326nm; 柱温: 25℃。结果 绿原酸在 5.47 ~ 71.14 μ g/ml 范围内 ($r=0.9999$) 线性关系良好, 回收率为 101.98%, RSD 为 2.08% ($n=6$)。结论 不同产地木瓜中绿原酸含量存在差异, 酒制后含量有上升趋势, 该方法可作为木瓜的质量控制方法。

关键词 木瓜 HPLC 法 绿原酸 含量测定

Determination of Chlorogenic Acid in Fructus Chaenomelis and Its Wine Processing Products of Different Area by HPLC. Chen Jianzhen, Ao Zhihui, Chen Jianming. Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China

Abstract Objective To establish a HPLC method to determine the content of chlorogenic acid in Fructus Chaenomelis and its wine processing products. **Methods** Separation column was Agilent SB - C18 (4.6mm × 250mm, 5 μ m) with the column temperature of 25℃. The mobile phase composition was methanol - 1% HAc (80: 20). The mobile speed was 1.0ml/min. The UV detection wavelength was 326 nm. **Results** A good linearity was obtained in the range of 5.47 ~ 71.14 μ g/ml, with $r=0.9999$. The average recovery was 101.98%, and RSD was 2.08% ($n=6$). **Conclusion** The content of chlorogenic acid was vary with the producing area of Fructus Chaenomelis. After wine processing, the content of chlorogenic acid was raised. The method was good for determining chlorogenic acid in Fructus Chaenomelis.

Key words Fructus chaenomelis; HPLC; Chlorogenic acid; Content determination

木瓜为蔷薇科植物贴梗海棠 *chaenomeles speciosa* (Sweet) Nakai 的干燥近成熟的果实, 味酸性温, 归肝、脾经, 具有平肝舒筋、和胃化湿等功效, 主要用于治疗湿痹拘挛, 腰膝关节酸重疼痛, 吐泻转筋, 脚气水肿^[1]。木瓜药材中含绿原酸等有机酸类活性物质, 绿原酸具有利胆、升高白细胞、抗菌、清除体内自由基、预防心血管疾病、糖尿病和某些癌症等作用^[2]。由于现行《中国药典》中, 木瓜的质量控制方法只有薄层鉴别而无定量控制指标, 且由于木瓜品种多, 在使用中出现了许多混淆品和伪品, 使得质量优劣难以评价。本实验采用 HPLC 法对不同产地的木瓜及其酒制品中活性成分之一绿原酸进行含量测定, 为木瓜的质量控制提供参考依据。

材料与方法

1. 仪器: Agilent 1200 Series 高效液相色谱仪; 美国 Agilent 公司; Milli - Q Synthesis A10 纯水仪; Millipore 公司; KQ5200B 型超声清洗器; 昆山市超声仪器有限公司。

2. 试剂与药材: 绿原酸对照品: 中国药品生物制品检定所, 供含量测定用, 批号: 110753 - 200413; 流动相甲醇为色谱纯; 超纯水; 其余试剂均为分析纯; 药材经本校中药资源鉴定教研室陈孔荣副教授鉴定为皱皮木瓜 *chaenomeles speciosa* (Sweet) Nakai, 酒木瓜: 自制。

3. 方法: (1) 色谱条件^[3]与系统适用性试验: 色谱柱: Agilent SB - C₁₈ (4.6mm × 250mm, 5 μ m); 流动相: 甲醇: 1% 冰醋酸 (80: 20); 流速: 1.0ml/min; 检测波长: 326nm; 柱温: 25℃; 进样量 10 μ l。在此条件下达到色谱峰基线分离, 分离度大于 1.5, 理论塔板数以绿原酸峰计算应不低于 7000, 色谱图见图 1。(2) 对照品溶液的制备: 精密称取减压干燥恒重的绿原酸对照品 6.84mg, 置 25ml 容量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 得到浓度为 273.6 μ g/ml 的绿原酸对照品溶液。(3) 供试品溶液的制备: 称取木瓜粉末约 1g, 精密称定, 加甲醇 50ml, 精密称定重量, 于 60℃ 条件下超声提取 1h, 放冷, 擦干瓶外壁, 再称定重量。用甲醇补足减失的重量, 摇匀, 滤过, 过 0.45 μ m 滤膜, 取续滤液即得。(4) 标准曲线的制备: 精密吸取对照品溶液 0.1ml、0.3ml、0.5ml、0.7ml、0.9ml、1.1ml、1.3ml 分别置于 5ml 容量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀。分别精密吸取 10 μ l 注入色谱仪, 按上述色谱条件, 测定峰面积。以绿原酸浓度 (μ g/ml) 为横坐标 (x), 峰面积为纵坐标 (y), 绘制标准曲线, 得回归方程: $y = 6.654x + 1.2536$, $r = 0.9999$, 在

作者单位: 310053 杭州, 浙江中医药大学 (陈建真、敖志辉); 310006 杭州, 浙江省中医院 (陈建明)

5.47 μ g/ml~71.14 μ g/ml 范围内,绿原酸浓度与峰面积有良好线性关系,结果见表 1。(5)稳定性试验:精密吸取同一供试品溶液 10 μ l,室温下分别于 0、1、4、6、12、24h,注入色谱仪,测定峰面积,结果分别为 71.3、70.4、70.0、69.5、68.2 和 67.9,RSD 为 1.89%,表明绿原酸在 24h 内稳定性良好。(6)精密度试验:精密吸取同一供试品溶液 10 μ l,注入色谱仪,测定峰面积,连续测定 6 次,结果分别为 71.3、71.4、70.9、70.4、70.3 和 69.9,RSD 为 0.84%。(7)重复性试验:取同一批木瓜粉末 6 份,每份约 1g,精密称定,按“供试品溶液的制备”项下方法制成供试品溶液,精密吸取 10 μ l,注入色谱仪,测定峰面积,外标一点法计算绿原酸的含量,结果分别为

0.526mg/g、0.537mg/g、0.517mg/g、0.542mg/g、0.535mg/g、0.519mg/g,平均含量为 0.530mg/g,RSD 为 1.88%。(8)回收率试验:称取已知含量的木瓜粉末 6 份,每份约 0.5g,精密称定,精密加入绿原酸对照品 0.25mg,按供试品溶液的制备方法制成样品溶液,测定峰面积,计算回收率和 RSD,结果绿原酸回收率在 99.15%~104.45%,平均回收率为 101.98%,RSD 为 2.08%,结果见表 2。(9)样品含量测定:称取不同产地木瓜及其酒制品粉末各约 1g,精密称定,按“供试品溶液的制备”项下方法制成供试品溶液,分别精密吸取 10 μ l,注入色谱仪,测定峰面积,外标一点法计算含量,结果见表 3。

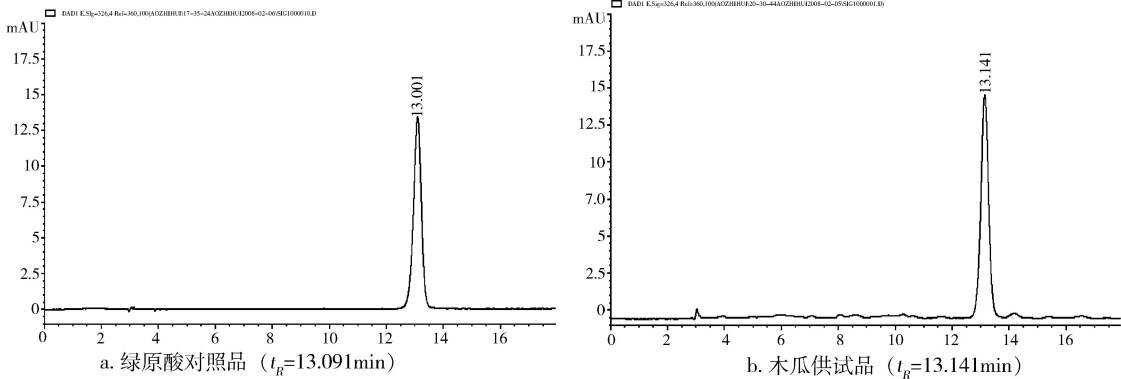


图 1 绿原酸对照品和木瓜供试品 HPLC 图

表 1 绿原酸标准曲线数据

样品号	1	2	3	4	5	6	7
浓度(μ g/ml)	5.47	16.42	27.36	38.30	49.25	60.19	71.14
峰面积(A)	40.5	109.1	181.2	256.4	326.1	405.0	474.6

表 2 回收率试验结果(n = 6)

样品号	样品量(mg)	加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	平均回收率(%)	RSD(%)
1	0.263	0.25	0.524	104.45	101.98	2.08
2	0.264	0.25	0.519	101.81		
3	0.267	0.25	0.515	99.15		
4	0.266	0.25	0.525	103.79		
5	0.264	0.25	0.521	102.82		
6	0.262	0.25	0.512	99.86		

表 3 木瓜及其酒制品绿原酸含量(mg/g)

样品号	产地	木瓜绿原酸含量	酒木瓜绿原酸含量
1	安徽	1.973	2.139
2	四川	0.769	0.967
3	湖北 1	1.886	2.927
4	福建	2.336	3.436
5	湖北 2	1.648	1.631
6	宣城	1.020	1.626
7	湖北 3	0.527	0.579
8	山东	1.846	1.836
9	贵州	1.306	1.380
10	浙江	0.628	0.631
11	广西	0.437	0.445

讨 论

实验中采用回流法和超声波法提取木瓜绿原酸,结果两种方法提取效果差异不大,鉴于超声波提取操作方便,故采用超声波提取法。通过对水、无水乙醇和不同浓度甲醇等溶剂进行考察,显示甲醇、水对木瓜绿原酸提取率较高,由于水提液中水溶性杂质多,分离度不够好,且对色谱柱影响较大,故选择甲醇作为提取溶剂。在此基础上,以正交试验法确定了绿原酸较佳的提取条件,以料液比 1: 50 的稀溶液提取可避免多次提取的繁琐。由于绿原酸稳定性较差,本实

验采用甲醇于 60℃ 提取,既能保持绿原酸较高的提取率,又不至于破坏其结构。木瓜酒制工艺经正交试验法考察而确定。

由绿原酸的紫外扫描图谱可知,绿原酸在波长 217nm、233nm 和 326nm 处有最大吸收,比较 3 个波长条件下的出峰情况,波长 326nm 既能检出待测组分,同时受溶剂影响更小,故确定测定波长为 326nm。文献报道^[3,4]流动相系统有甲醇-酸水、乙腈-酸水系统,由于绿原酸呈酸性,加入酸试剂可抑制绿原酸解离,减少拖尾现象。本实验通过比较发现在甲醇:1% 冰醋酸(80:20)条件下,绿原酸能得到较好的分离。

不同产地的木瓜中绿原酸含量差异较大,含量在 0.437 ~ 2.336mg/g,其中福建产木瓜绿原酸含量最高,广西产木瓜绿原酸含量最低。实验中还对河南和山东产的两种光皮木瓜进行了检测,发现光皮木瓜中几乎不含绿原酸,同时采用薄层色谱和 HPLC 指纹图谱进行鉴定亦得到相同结果,提示此特征可能可作为鉴别木瓜和光皮木瓜的参考依据之一。木瓜酒制后

绿原酸含量总体呈上升趋势,提示酒制后有利于绿原酸的溶出。

木瓜药材中,将齐墩果酸作为主要有效物质的报道较多^[5,6],而对于绿原酸研究较少,通过实验发现,绿原酸在木瓜药材中的含量不是太低,可作为质量控制指标之一。

参考文献

- 1 中华人民共和国药典委员会. 中华人民共和国药典 2005 年版. 北京:化学工业出版社,2005:41
- 2 Keiko A, Katsunari L, Masayoshi N, et al. Absorption of chlorogenic and caffeic acid in rats after oral administration. J Agric Food Chem, 1990, 38(12):2104
- 3 李涛,麒麟,苗术,等. HPLC 法测定金茵颗粒剂中绿原酸的含量,中国中医药信息杂志,2007,14(3):43-44
- 4 陶君彦,张晓昱,黄志军,等. HPLC 法同时测定木瓜中绿原酸、咖啡酸的含量. 中国药房,2007,18(12):912-914
- 5 姚秀玲,吕晓玲,李肇奖. 木瓜中齐墩果酸的测定方法研究. 现代食品科技,2005,21(3):127-128
- 6 李东,何伶. 高效液相色谱-紫外光散射检测法同时测定木瓜中齐墩果酸和熊果酸含量. 中国医院药学杂志,2005,25(3):259-261
(收稿:2009-09-02)

早期系统心理-康复干预对脑卒中后抑郁患者功能预后的影响

张晓钰 桑德春 季淑凤

摘要 目的 探讨早期系统心理-康复对脑卒中抑郁患者功能预后的影响。方法 经汉密尔顿抑郁量表(HAMD)筛选出伴抑郁症状的 80 例脑卒中患者,随机分为早期系统心理-康复组和对照组,各 40 例,均给予神经内科常规治疗。研究组在常规治疗的基础上增加由心理医师实施的早期系统心理干预和由专业康复医师实施的运动训练,治疗满 2 周、4 周后再对两组患者进行 HAMD 和神经功能缺损(CNFDS)评分并比较。结果 治疗后,两组患者的神经功能均有所恢复,但研究组 HAMD 评分明显低于对照组($P < 0.01$),神经功能恢复则明显优于对照组($P < 0.01$)。结论 早期系统心理-康复干预治疗可干预明显改善脑卒中后抑郁患者的预后。

关键词 早期系统心理-康复干预 卒中 抑郁 预后

The Effect of a Early Systemic Psycho-rehabilitation Intervention on Patients with Post-stroke Depression. Zhang Xiaoyu, Sang De-chun, Ji Shufeng. Department of General Rehabilitation, Chinese Rehabilitation Research Center, Beijing 100068, China

Abstract Objective To study The effect of a early systemic psycho-rehabilitation intervention on patients with post-stroke depression. **Methods** 80 patients with post-stroke depression were randomly divided into test group ($n = 40$) and control group ($n = 40$) by Hamilton's Depression Scale (HAMD). They were treated conventionally by neurologist. The patients in test group were added systemic psychological intervention administered by psychologist and movement training administered by professional psychiatrist. And then the scores to HAMD and CNFDS (clinical neurological functional defect scoring) between two groups were evaluated until 2 weeks or 4 weeks