

枸杞子药材中12种有机酸类成分含量测定与分析^Δ

李佳兴^{1,2*}, 周利¹, 金艳¹, 余意³, 马方励³, 杨健¹, 郭兰萍^{1,2#}[1. 中国中医科学院中药资源中心/道地药材国家重点实验室培育基地, 北京 100700; 2. 广东药科大学中药学院, 广州 510006; 3. 无限极(中国)有限公司, 广州 510663]

中图分类号 R284.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)24-3344-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.24.08

摘要 目的: 建立同时测定枸杞子药材中12种有机酸类成分含量的方法, 比较不同产区、品种药材样品的成分含量差异并研究其相关性。方法: 采用超高效液相色谱-三重四级杆串联质谱法测定药材样品中水杨酸、香草酸、肉桂酸、咖啡酸、对羟基苯甲酸、阿魏酸、对香豆酸、富马酸、3,4-二羟基苯甲酸、酒石酸、丁香酸和原儿茶酸的含量。色谱柱为Acquity UPLC BEH C₁₈, 流动相为0.1%甲酸溶液(A)-乙腈(B), 梯度洗脱, 流速为0.5 mL/min, 柱温为40 ℃, 进样量为1.0 μL; Turbo VTM离子源, 电离模式为电喷雾离子化(ESI⁻), 气帘气体积流量为30 L/min, 喷雾电压为-4 500 V, 雾化气体积流量为50 L/min, 加热辅助气体积流量为50 L/min, 采用质谱多反应监测扫描模式, 离子化温度为550 ℃。对不同产区、品种药材样品的成分含量差异进行比较, 并进行成分相关性分析。结果: 水杨酸、香草酸、肉桂酸、咖啡酸、对羟基苯甲酸、阿魏酸、对香豆酸、富马酸、3,4-二羟基苯甲酸、酒石酸、丁香酸和原儿茶酸检测质量浓度线性范围分别为0.01~1.00 μg/mL($r=0.999\ 9$)、0.01~1.00 μg/mL($r=0.999\ 8$)、0.01~1.00 μg/mL($r=0.996\ 0$)、0.01~1.00 μg/mL($r=0.998\ 2$)、0.08~8.00 μg/mL($r=0.999\ 2$)、0.08~8.00 μg/mL($r=0.998\ 9$)、0.20~20.00 μg/mL($r=0.996\ 0$)、0.08~8.00 μg/mL($r=0.998\ 4$)、0.008~0.80 μg/mL($r=0.996\ 9$)、0.16~16.00 μg/mL($r=0.997\ 5$)、0.001~0.10 μg/mL($r=0.993\ 8$)、0.008~0.80 μg/mL($r=0.995\ 1$); 定量限分别为3.20、10.00、8.00、10.00、0.64、0.64、1.60、2.56、8.00、16.00、1.00、8.00 ng/mL, 检测限分别为0.80、6.40、0.40、1.60、0.32、0.16、0.20、0.64、0.64、1.28、0.08、1.28 ng/mL; 精密性、稳定性、重复性试验的RSD均小于3%; 加样回收率为95.62%~104.65% (RSD为1.23%~3.43%, $n=6$)。15批药材样品中对香豆酸平均含量最高; 新疆产药材样品中总有机酸平均含量最高; 宁杞七号总有机酸类平均含量略高于宁杞五号。香草酸含量与对羟基苯甲酸、阿魏酸和丁香酸含量存在极显著正相关($P<0.01$); 肉桂酸含量与富马酸和酒石酸含量存在极显著正相关($P<0.01$); 咖啡酸含量与阿魏酸、酒石酸和丁香酸含量存在极显著正相关($P<0.01$); 对羟基苯甲酸含量与丁香酸含量存在极显著正相关($P<0.01$); 阿魏酸含量与丁香酸含量存在极显著正相关($P<0.01$); 3,4-二羟基苯甲酸含量与原儿茶酸含量存在极显著正相关($P<0.01$)。结论: 该方法操作简便、准确, 精密性、稳定性、重复性好, 可用于同时测定枸杞子药材中12种有机酸类成分含量。不同品种、产区药材样品中有机酸类成分含量有所不同, 且某些成分间有一定的相关性。

关键词 枸杞子; 有机酸; 超高效液相色谱-三重四级杆串联质谱法; 含量测定

Content Determination and Analysis of 12 Kinds of Organic Acid in *Lycium barbarum*

LI Jiaying^{1,2}, ZHOU Li¹, JIN Yan¹, YU Yi³, MA Fangli³, YANG Jian¹, GUO Lanping^{1,2}[1. National Resource Center for Chinese Materia Medica/State Key Lab of Dao-di Herbs Breeding Base, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China; 2. College of Traditional Chinese Medicine, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China; 3. Infinitus (China) Co., Ltd., Guangzhou 510663, China]

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the method for simultaneous determination of 12 kinds of organic acid in *Lycium barbarum*, and to compare the component contents of samples with different production and types areas, and to study its correlation. METHODS: UPLC-triple quadrupole tandem mass spectrometry was used to determine the contents of salicylic acid, vanillic acid, cinnamic acid, caffeic acid, *p*-hydroxybenzoic acid, ferulic acid, *p*-coumaric acid, fumaric acid, 3, 4-dihydroxybenzoic acid, tartaric acid, syringic acid and protocatechuic acid in samples. The determination was performed on Acquity UPLC BEH C₁₈ column with mobile phase consisted of 0.1% formic acid solution (A)-0.1% formic acid acetonitrile solution (B) for gradient elution at the flow rate of 0.5 mL/min. The column temperature was 40 ℃, and sample size was 1.0 μL. The ion source was Turbo VTM ion source, and ionization mode was electrospray ionization (ESI⁻). Air curtain gas volume flow

^Δ 基金项目: 中央本级重大增减支项目(No.2060302); 宁夏回族自治区重点研发计划项目(No.2017BY079); 中国中医科学院基本科研业务费自主选题项目(No.ZZ10-27)

* 硕士研究生。研究方向: 中药资源开发与品质评价。E-mail: 15712372317@163.com

通信作者: 研究员。研究方向: 中药资源生态学。E-mail: glp01@163.com

rate was 30 L/min; spray voltage was -4 500 V; atomizing gas volume flow rate was 50 L/min; heating auxiliary gas volume flow rate was 50 L/min. The mass spectrometry multiple reaction monitoring scanning mode was adopted and the ionization temperature was 550 ℃. The differences of component content in samples with different production areas

and types were compared, and component relationship analysis was performed. RESULTS: The linear ranges of salicylic acid, vanillic acid, cinnamic acid, caffeic acid, *p*-hydroxybenzoic acid, ferulic acid, *p*-coumaric acid, fumaric acid, 3, 4-dihydroxybenzoic acid, tartaric acid, syringic acid and protocatechuic acid were 0.01-1.00 $\mu\text{g/mL}$ ($r=0.999\ 9$), 0.01-1.00 $\mu\text{g/mL}$ ($r=0.999\ 8$), 0.01-1.00 $\mu\text{g/mL}$ ($r=0.996\ 0$), 0.01-1.00 $\mu\text{g/mL}$ ($r=0.998\ 2$), 0.08-8.00 $\mu\text{g/mL}$ ($r=0.999\ 2$), 0.08-8.00 $\mu\text{g/mL}$ ($r=0.998\ 9$), 0.20-20.00 $\mu\text{g/mL}$ ($r=0.996\ 0$), 0.08-8.00 $\mu\text{g/mL}$ ($r=0.998\ 4$), 0.008-0.80 $\mu\text{g/mL}$ ($r=0.996\ 9$), 0.16-16.00 $\mu\text{g/mL}$ ($r=0.997\ 5$), 0.001-0.10 $\mu\text{g/mL}$ ($r=0.993\ 8$), 0.008-0.80 $\mu\text{g/mL}$ ($r=0.995\ 1$), respectively. The limits of quantitation were 3.20, 10.00, 8.00, 10.00, 0.64, 0.64, 1.60, 2.56, 8.00, 16.00, 1.00, 8.00 ng/mL; the limits of detection were 0.80, 6.40, 0.40, 1.60, 0.32, 0.16, 0.20, 0.64, 0.64, 1.28, 0.08, 1.28 ng/mL, respectively. RSDs of precision, stability and reproducibility tests were all lower than 3%. The recoveries were 95.62%-104.65% (RSD were 1.23%-3.43%, $n=6$). Average content of *p*-coumaric acid was the highest in 10 batches of samples; average contents of total organic acid were highest in samples from Xinjiang. The total organic acid content of Ningqi No. 7 was slightly higher than that of Ningqi No.5. Vanillic acid content was positively correlated with *p*-hydroxybenzoic acid, ferulic acid and syringic acid content ($P<0.01$); cinnamic acid content was positively correlated with fumaric acid and tartaric acid content ($P<0.01$); caffeic acid content was positively correlated with ferulic acid, tartaric acid and syringic acid content ($P<0.01$); formic acid content was positively correlated with syringic acid content ($P<0.01$); ferulic acid content was positively correlated with syringic acid content ($P<0.01$); and 3,4-dihydroxybenzoic acid content was positively correlated with catechuic acid content ($P<0.01$). CONCLUSIONS: The method is simple, accurate, precise, stable and reproducible. It can be used to determine the contents of 12 kinds of organic acid in *L. barbarum*. The contents of organic acids in samples with different production areas and types are different; there is certain relationship among some components.

KEYWORDS *Lycium barbarum*; Organic acid; UPLC-triple quadrupole tandem mass spectrometry; Content determination

枸杞子为茄科植物宁夏枸杞(*Lycium barbarum* L.)的干燥成熟果实,具有滋补肝肾、益精明目的功效,主要用于虚劳精亏、腰膝酸痛、眩晕耳鸣、阳痿遗精、内热消渴、血虚萎黄、目昏不明等症的治疗^[1-2]。研究结果显示,枸杞子含有多糖、有机酸、黄酮、氨基酸、维生素和微量元素等^[3-4],具有抗氧化、降血脂、降血糖、抗肿瘤和调节免疫力等作用^[5-8]。

有机酸类成分是中药中酸味的主要来源,中医五味讲“酸入肝”“酸收敛”,相关研究发现有机酸类成分具有抗炎、抗血栓、抑制血小板凝聚等多种药理活性^[9-11]。据文献报道,枸杞子中含有草酸、酒石酸等多种有机酸^[12],但目前其相关含量测定研究较少见。本研究采用超高效液相色谱-三重四级杆串联质谱法对不同产地的枸杞子药材中水杨酸、香草酸、肉桂酸、咖啡酸、对羟基苯甲酸、阿魏酸、对香豆酸、富马酸、3,4-二羟基苯甲酸、酒石酸、丁香酸和原儿茶酸等12种有机酸类成分的含量进行了测定,并进行了成分含量差异分析,以期对枸杞子的质量控制提供依据。

1 材料

1.1 仪器

AB SCIEX 6500型质谱仪(美国 Applied Biosystems 公司);Acquity UPLC I-Class 系统,包括四元高压梯度泵、真空脱气机、自动进样器、柱温箱、二极管阵列检测器、Empower™ 色谱工作站(美国 Waters 公司);SB-800DTD型超声波清洗器(宁波新芝生物科技股份有限公司);MM型400混合球磨仪(德国 Retsch 公司);DHG-9145AZ型电热干燥箱(上海恒科仪器有限公司);New Classic MS-S型电子分析天平[梅特勒-托利多(上

海)有限公司];5810R型高速离心机(德国 Eppendorf 公司)。

1.2 试剂

咖啡酸对照品(批号:K003161216,纯度:≥98%)、对香豆酸对照品(批号:RD794160825,纯度:≥98%)、富马酸对照品(批号:F016170426,纯度:≥98%)、3,4-二羟基苯甲酸对照品(批号:RY568160920,纯度:≥98%)、酒石酸对照品(批号:J065161216,纯度:≥98%)均购自北京融诚鑫德科技发展有限公司;香草酸对照品(批号:S27M7115319,纯度:≥98%)、对羟基苯甲酸对照品(批号:MKBK3576V,纯度:≥98%)、阿魏酸对照品(批号:16051311,纯度:≥98%)、丁香酸对照品(批号:S23F7K9842,纯度:≥98%)均购自上海源叶生物科技有限公司;原儿茶酸对照品(上海同田生物技术股份有限公司,批号:15050521,纯度:≥98%);水杨酸对照品(批号:PS1136-0025,纯度:≥98%)、肉桂酸对照品(批号:PS0094-0100,纯度:≥98%)均购自成都普思生物科技有限公司;乙腈、甲醇、甲酸均为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为超纯水。

1.3 药材

枸杞子药材采自宁夏、青海、甘肃、新疆等枸杞子主产区,共15批(见表1),经中国中医科学院中药资源中心金艳副研究员鉴定为真品。

2 方法与结果

2.1 试验条件

2.1.1 色谱条件 色谱柱:Acquity UPLC BEH C₁₈(100 mm×2.1 mm,1.8 μm);流动相:0.1%甲酸溶液(A)-乙腈(B),梯度洗脱(0~1 min,5% B→25% B;1~3.5 min,

25% B→40% B; 3.5~4.5 min, 40% B→50% B); 流速: 0.5 mL/min; 柱温: 40 ℃; 进样量: 1.0 μL。

2.1.2 质谱条件 离子源: Turbo VTM离子源; 电离模式:

表1 枸杞子药材来源

Tab 1 Sources of *L. barbarum*

样品编号	采集地	品种	采集时间
1	甘肃靖远县五合乡	宁杞七号	七月上旬
2	甘肃武威市民勤县	宁杞七号	七月上旬
3	甘肃玉门市下西号乡	宁杞七号	七月中旬
4	甘肃景泰县草窝滩镇	宁杞五号	七月上旬
5	甘肃酒泉市	宁杞五号	七月下旬
6	青海格尔木市大格勒乡	宁杞七号	七月下旬
7	青海格尔木市大格勒乡	宁杞五号	七月上旬
8	青海格尔木市大格勒乡	宁杞五号	七月下旬
9	青海德令哈市	宁杞七号	七月下旬
10	宁夏中宁县	宁杞七号	七月上旬
11	宁夏中宁县	宁杞五号	七月下旬
12	新疆博尔塔拉州精河县托里镇	宁杞七号	七月下旬
13	新疆博尔塔拉州精河县托里镇	宁杞五号	七月中旬
14	新疆博尔塔拉州精河县托里镇	宁杞七号	七月下旬
15	新疆阿勒泰地区清水县	宁杞五号	七月下旬

电喷雾离子化(ESI⁻); 气帘气体积流量: 30 L/min; 喷雾电压: -4 500 V; 雾化气体积流量: 50 L/min; 加热辅助气体积流量: 50 L/min; 扫描方式: 质谱多反应监测(MRM); 离子化温度: 550 ℃。优化的条件参数见表2, 提取离子流图见图1。

表2 优化的条件参数

Tab 2 Optimized conditional parameters

待测成分	MRM离子对(<i>m/z</i>)	去簇电压, V	碰撞能量, eV	射频电压, V
水杨酸	137.0/92.9	-48	-21	-11
香草酸	166.9/122.8	-38	-16	-16
肉桂酸	146.9/103.0	-48	-14	-13
咖啡酸	179.0/134.8	-99	-21	-16
对羟基苯甲酸	136.9/92.8	-89	-17	-14
阿魏酸	163.0/134.0	-76	-22	-13
对香豆酸	162.9/118.9	-109	-25	-14
富马酸	114.9/71.2	-53	-10	-8
3,4-二羟基苯甲酸	152.9/108.9	-50	-19	-6
酒石酸	148.9/86.8	-65	-16	-9
丁香酸	196.9/166.9	-64	-25	-9
原儿茶酸	152.8/109.0	-72	-19	-13

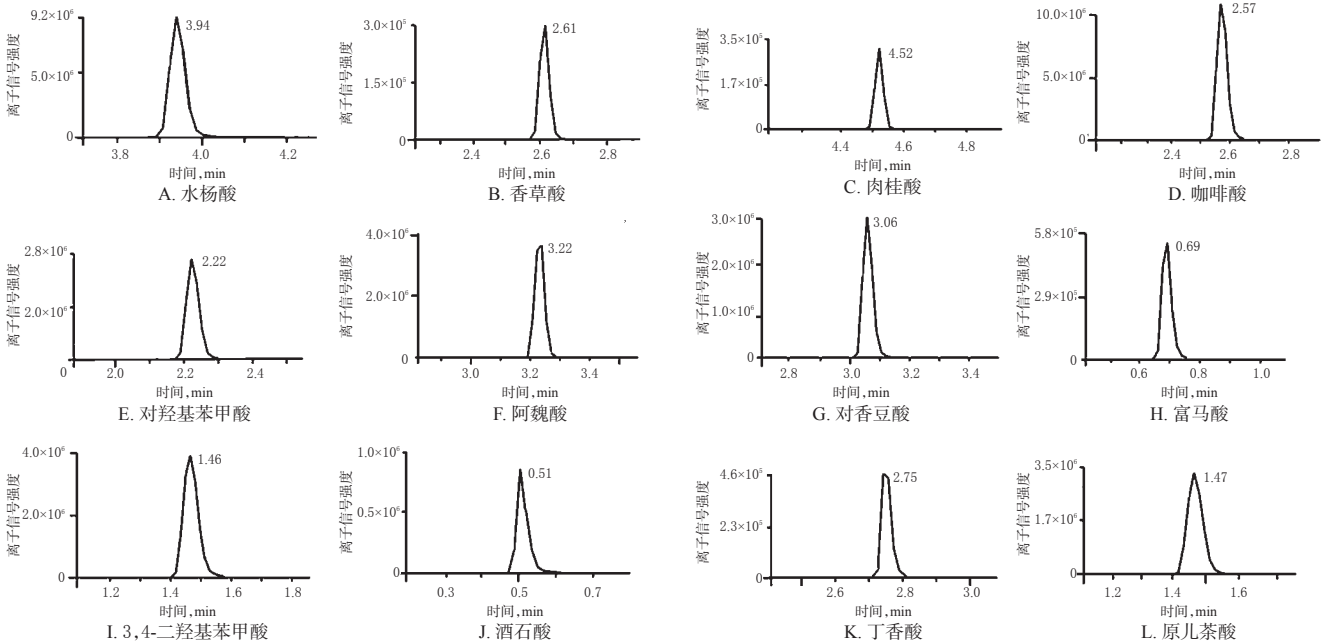


图1 提取离子流图

Fig 1 Extraction ion flow graph

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液 分别精密称取各待测成分对照品适量, 用甲醇制成质量浓度均为 1 mg/mL 的单一对照品贮备液。分别精密量取上述单一对照品贮备液各适量, 用甲醇分组制成含水杨酸、香草酸、肉桂酸、咖啡酸、对羟基苯甲酸、阿魏酸、对香豆酸、富马酸质量浓度均为 20 μg/mL 的混合对照品溶液和含 3,4-二羟基苯甲酸、酒石酸、丁香酸、原儿茶酸质量浓度均为 20 μg/mL 的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 精密称取药材样品细粉(过 4 号筛) 50 mg, 置于 2 mL 离心管中, 精密加入甲醇 1.5 mL, 称定

质量, 超声(功率: 250 W, 频率: 40 kHz, 下同)处理 30 min, 放冷至室温, 再次称定质量, 用甲醇补足减失的质量, 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 经 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

2.3 线性关系考察

分别精密量取“2.2.1”项下单一对照品贮备液各适量, 用甲醇稀释制成系列单一对照品溶液。精密量取上述系列单一对照品溶液各 1.0 μL, 按“2.1”项下试验条件进样测定, 记录离子信号强度。以待测成分的质量浓度(*x*, μg/mL)为横坐标、离子信号强度(*y*)为纵坐标进行线性回归, 回归方程和线性范围见表 3。

表3 回归方程、线性范围、定量限、检测限考察结果

Tab 3 Results of regression equations, linear ranges, limit of quantity and limit of detection

待测成分	回归方程	<i>r</i>	线性范围, μg/mL	定量限, ng/mL	检测限, ng/mL
水杨酸	$y=20\ 055\ 381.78x+34\ 995.99$	0.999 9	0.01~1.00	3.20	0.80
香草酸	$y=93\ 065.00x+624.06$	0.999 8	0.01~1.00	10.00	6.40
肉桂酸	$y=91\ 960.27x+3\ 244.19$	0.996 0	0.01~1.00	8.00	0.40
咖啡酸	$y=4\ 334\ 898.05x+73\ 395.87$	0.998 2	0.01~1.00	10.00	1.60
对羟基苯甲酸	$y=993\ 734.74x+110\ 005.22$	0.999 2	0.08~8.00	0.64	0.32
阿魏酸	$y=891\ 516.30x+156\ 879.83$	0.998 9	0.08~8.00	0.64	0.16
对香豆酸	$y=1\ 081\ 645.10x+677\ 158.87$	0.996 0	0.20~20.00	1.60	0.20
富马酸	$y=173\ 247.80x+13\ 654.88$	0.998 4	0.08~8.00	2.56	0.64
3,4-二羟基苯甲酸	$y=5\ 272\ 166.67x+1\ 625.33$	0.996 9	0.008~0.80	8.00	0.64
酒石酸	$y=26\ 217.14x-3\ 848.79$	0.997 5	0.16~16.00	16.00	1.28
丁香酸	$y=293\ 620.21x+521.55$	0.993 8	0.001~0.10	1.00	0.08
原儿茶酸	$y=4\ 075\ 500.00x-348.00$	0.995 1	0.008~0.80	8.00	1.28

2.4 定量限与检测限考察

分别精密量取“2.2.1”项下混合对照品溶液各适量,用甲醇倍比稀释,并按“2.1”项下试验条件进样测定,分别以信噪比10:1、3:1计算定量限、检测限,结果见表3。

2.5 精密度试验

取“2.2.1”项下混合对照品溶液各适量,按“2.1”项下试验条件连续进样测定6次,记录离子信号强度。结果,水杨酸、香草酸、肉桂酸、咖啡酸、对羟基苯甲酸、阿魏酸、对香豆酸、富马酸、3,4-二羟基苯甲酸、酒石酸、丁香酸和原儿茶酸离子信号强度的RSD分别为0.48%、0.74%、0.78%、0.96%、0.88%、0.61%、0.52%、0.64%、0.56%、0.95%、0.96%、0.60% ($n=6$),表明仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验

取“2.2.2”项下供试品溶液(编号:11)适量,分别于室温下放置0、2、4、6、8 h时按“2.1”项下试验条件进样测定,记录离子信号强度。结果,水杨酸、香草酸、肉桂酸、咖啡酸、对羟基苯甲酸、阿魏酸、对香豆酸、富马酸、3,4-二羟基苯甲酸、酒石酸、丁香酸和原儿茶酸离子信号强度的RSD分别为1.42%、0.81%、2.00%、1.43%、2.42%、1.36%、1.06%、1.97%、1.58%、1.68%、1.19%、2.31% ($n=5$),表明供试品溶液在室温下放置8 h内基本稳定。

2.7 重复性试验

精密称取药材样品(编号:11)细粉适量,共6份,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下试验条件进样测定,记录离子信号强度并计算含量,结果见表4。

2.8 加样回收率试验

取已知含量的药材样品(编号:11)细粉适量,每份0.1 g,共6份,分别加入一定质量浓度的单一对照品溶液各适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下试验条件进样测定,记录离子信号强度并计算加样回收率,结果见表5。

表4 重复性试验结果($n=6$)Tab 4 Results of reproducibility tests($n=6$)

待测成分	平均含量, μg/g	RSD, %
水杨酸	0.30	1.55
香草酸	1.57	1.63
肉桂酸	3.01	0.97
咖啡酸	1.75	1.39
对羟基苯甲酸	2.89	1.04
阿魏酸	17.80	2.92
对香豆酸	71.43	1.05
富马酸	14.56	0.56
3,4-二羟基苯甲酸	0.68	1.12
酒石酸	11.21	0.73
丁香酸	0.09	2.87
原儿茶酸	0.69	2.12

表5 加样回收率试验结果($n=6$)Tab 5 Results of recovery tests($n=6$)

待测成分	样品含量, μg	加入量, μg	测得量, μg	加样回收 率, %	平均加样回 收率, %	RSD, %
水杨酸	0.035 1	0.035 0	0.069 2	97.47	98.67	3.43
	0.035 0	0.035 0	0.071 5	104.30		
	0.035 5	0.035 0	0.070 9	101.18		
	0.035 6	0.035 0	0.069 7	97.29		
	0.035 3	0.035 0	0.068 9	96.14		
	0.035 2	0.035 0	0.068 7	95.62		
香草酸	0.224 5	0.220 0	0.451 0	102.93	99.50	2.14
	0.224 4	0.220 0	0.442 8	99.29		
	0.224 7	0.220 0	0.446 2	100.69		
	0.224 8	0.220 0	0.443 3	99.33		
	0.224 6	0.220 0	0.440 1	97.94		
	0.224 5	0.220 0	0.437 6	96.85		
肉桂酸	0.221 4	0.220 0	0.446 8	102.47	102.05	2.73
	0.221 1	0.220 0	0.450 2	104.16		
	0.221 8	0.220 0	0.444 5	101.22		
	0.221 6	0.220 0	0.434 7	96.87		
	0.221 0	0.220 0	0.448 1	103.22		
	0.221 7	0.220 0	0.451 3	104.36		
咖啡酸	0.279 5	0.300 0	0.575 1	98.54	101.51	2.74
	0.279 2	0.300 0	0.591 1	103.95		
	0.279 7	0.300 0	0.592 3	104.19		
	0.279 0	0.300 0	0.572 4	97.79		
	0.279 2	0.300 0	0.583 6	101.45		
	0.279 6	0.300 0	0.589 1	103.16		
对羟基苯甲酸	0.960 5	0.950 0	1.912 9	100.26	101.96	1.34
	0.960 3	0.950 0	1.925 4	101.59		
	0.960 7	0.950 0	1.936 2	102.69		
	0.960 2	0.950 0	1.950 4	104.23		
	0.960 1	0.950 0	1.926 4	101.72		
	0.960 7	0.950 0	1.922 8	101.28		
阿魏酸	2.532 0	2.500 0	5.108 5	103.06	102.04	1.43
	2.532 5	2.500 0	5.055 8	100.93		
	2.532 2	2.500 0	5.031 8	99.98		
	2.532 4	2.500 0	5.068 6	101.45		
	2.532 1	2.500 0	5.114 1	103.28		
	2.532 4	2.500 0	5.120 6	103.53		
对香豆酸	6.098 5	6.000 0	12.290 2	103.20	102.60	1.96
	6.098 7	6.000 0	12.213 5	101.91		
	6.098 6	6.000 0	12.327 1	103.81		
	6.098 9	6.000 0	12.299 4	103.34		
	6.098 3	6.000 0	12.030 3	98.87		
	6.098 6	6.000 0	12.366 5	104.47		

续表5

Continued tab 5

待测成分	样品含量, μg	加入量, μg	测得量, μg	加样回收 率,%	平均加样回 收率,%	RSD, %
富马酸	1.331 5	1.300 0	2.644 9	101.03	101.63	1.40
	1.331 4	1.300 0	2.657 1	101.98		
	1.331 0	1.300 0	2.629 4	99.88		
	1.331 2	1.300 0	2.642 3	100.85		
	1.331 3	1.300 0	2.657 5	102.01		
	1.331 8	1.300 0	2.684 4	104.05		
3,4-二羟基苯甲酸	0.040 5	0.040 0	0.080 6	100.30	101.57	1.80
	0.040 1	0.040 0	0.081 2	102.83		
	0.040 0	0.040 0	0.081 3	103.16		
	0.040 2	0.040 0	0.080 4	100.58		
	0.040 4	0.040 0	0.081 8	103.50		
	0.040 5	0.040 0	0.080 1	99.06		
酒石酸	1.218 1	1.200 0	2.473 9	104.65	103.46	1.23
	1.218 0	1.200 0	2.438 7	101.72		
	1.218 5	1.200 0	2.445 5	102.25		
	1.218 4	1.200 0	2.475 8	104.78		
	1.218 1	1.200 0	2.457 8	103.31		
	1.218 0	1.200 0	2.466 9	104.08		
丁香酸	0.018 5	0.020 0	0.039 0	102.61	100.62	2.69
	0.018 6	0.020 0	0.039 4	103.88		
	0.018 3	0.020 0	0.038 7	102.06		
	0.018 7	0.020 0	0.038 3	98.02		
	0.018 2	0.020 0	0.037 6	97.02		
	0.018 0	0.020 0	0.038 0	100.14		
原儿茶酸	0.042 5	0.040 0	0.083 2	101.72	101.61	2.49
	0.042 3	0.040 0	0.081 3	97.48		
	0.042 8	0.040 0	0.084 6	104.62		
	0.042 4	0.040 0	0.082 7	100.84		
	0.042 6	0.040 0	0.084 1	103.87		
	0.042 0	0.040 0	0.082 4	101.12		

2.9 样品中有机酸类成分含量测定及分析

取各批药材样品适量,分别按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下试验条件进样测定,平行测定3次,记录离子信号强度并计算药材样品中有机酸类成分含量,然后进行成分含量差异分析和相关性分析,结果见表6~表9。由表6可知,15批药材样品中总有机

酸平均含量为147.74 μg/g,其中以对香豆酸平均含量最高,达76.35 μg/g;阿魏酸、酒石酸和富马酸平均含量分别为19.25、16.50、15.74 μg/g;对羟基苯甲酸和肉桂酸平均含量较低,分别为8.13、4.90 μg/g;丁香酸平均含量最低,为0.17 μg/g。由表7可知,新疆产区所产药材样品中总有机酸平均含量最高,达209.21 μg/g;其次为青海产区样品,含量达154.31 μg/g;甘肃和宁夏产区样品含量较低。由表8可知,从品种看,宁杞七号总有机酸含量略高,达153.70 μg/g,其中对香豆酸平均含量为80.64 μg/g;宁杞五号总有机酸平均含量略低,为140.94 μg/g,其中对香豆酸平均含量为71.44 μg/g。由表9可知,香草酸含量与对羟基苯甲酸、阿魏酸和丁香酸含量存在极显著正相关($P<0.01$);肉桂酸含量与富马酸和酒石酸含量存在极显著正相关($P<0.01$);咖啡酸含量与阿魏酸、酒石酸和丁香酸含量存在极显著正相关($P<0.01$);对羟基苯甲酸含量与丁香酸含量存在极显著正相关($P<0.01$);阿魏酸含量与丁香酸含量存在极显著正相关($P<0.01$);3,4-二羟基苯甲酸含量与原儿茶酸含量存在极显著正相关($P<0.01$)。

3 讨论

本课题组采用超高效液相色谱-三重四级杆串联质谱法测定了枸杞子药材样品中12种有机酸类成分的含量,由试验结果可知,不同批次的枸杞子药材样品中总有机酸和12种有机酸类成分含量差异较大。推测其原因除了品种这一遗传因素外,不同产区的地理条件、土壤成分、气候特征、光照强度等生态因子也极大地影响了相关有机酸成分的积累^[13-14]。

枸杞子药材样品中各有机酸类成分含量之间相关性分析显示,多种有机酸达到极显著正相关。中药的功效是多种成分共同作用的结果,与其不同成分的含量和比例相关,因此根据本研究结果中枸杞子药材中各有机酸类成分含量的相关性有助于进一步分析该类成分与复杂药效的关系。

表6 药材样品中有机酸类成分含量测定结果($n=3, \mu\text{g/g}$)Tab 6 Content determination results of organic acids in samples($n=3, \mu\text{g/g}$)

样品编号	总有机酸	水杨酸	香草酸	肉桂酸	咖啡酸	对羟基苯甲酸	阿魏酸	对香豆酸	富马酸	3,4-二羟基苯甲酸	酒石酸	丁香酸	原儿茶酸
1	107.70	0.39	3.50	6.86	1.73	5.25	21.60	50.96	3.24	1.32	11.26	0.22	1.37
2	100.32	0.40	2.02	3.69	1.95	6.36	17.62	44.80	4.91	0.76	16.82	0.20	0.81
3	106.48	0.10	2.15	9.06	2.29	3.25	19.92	30.30	22.36	1.03	14.84	0.18	0.99
4	104.64	0.19	1.71	4.65	1.51	3.87	16.53	50.95	13.12	0.50	10.93	0.11	0.57
5	124.25	0.24	2.28	2.64	1.25	12.51	18.40	62.26	13.00	0.34	10.85	0.14	0.36
6	207.33	1.07	1.47	3.34	2.00	11.90	8.80	155.80	11.87	0.35	10.16	0.12	0.45
7	118.85	0.28	1.14	3.42	1.97	5.39	9.94	77.72	7.76	0.38	10.28	0.11	0.46
8	119.77	0.16	2.23	1.06	1.84	8.58	14.86	69.84	8.70	0.83	10.67	0.13	0.85
9	171.27	0.10	2.07	2.45	3.03	4.31	16.64	116.89	14.41	0.34	10.51	0.16	0.37
10	93.66	0.10	1.80	3.67	1.32	3.66	13.60	38.34	15.82	0.54	14.10	0.12	0.60
11	125.02	0.32	1.56	3.05	1.77	2.89	16.72	71.65	14.42	0.67	11.20	0.09	0.68
12	225.51	0.80	2.22	11.92	4.27	5.13	20.33	95.81	27.93	0.92	55.01	0.19	0.97
13	133.96	0.89	4.05	3.06	3.27	21.29	22.04	45.71	16.07	0.90	15.37	0.32	1.00
14	217.31	1.89	2.53	10.23	2.67	8.36	21.10	112.24	35.90	0.54	21.11	0.14	0.60
15	260.06	0.70	4.49	4.43	5.59	19.21	50.64	121.97	26.63	0.81	24.36	0.37	0.85
平均值	147.74	0.51	2.35	4.90	2.43	8.13	19.25	76.35	15.74	0.68	16.50	0.17	0.73

表7 不同产区药材样品中有机酸类成分平均含量比较(μg/g)

Tab 7 Comparison of the average contents of organic acids in samples from different production areas(μg/g)

产区	总有机酸	水杨酸	香草酸	肉桂酸	咖啡酸	对羟基苯甲酸	阿魏酸	对香豆酸	富马酸	3,4-二羟基苯甲酸	酒石酸	丁香酸	原儿茶酸
甘肃	108.68	0.26	2.33	5.38	1.75	6.25	18.81	47.85	11.33	0.79	12.94	0.17	0.82
青海	154.31	0.40	1.73	2.57	2.21	7.55	12.56	105.06	10.68	0.47	10.40	0.13	0.53
宁夏	109.34	0.21	1.68	3.36	1.54	3.27	15.16	55.00	15.12	0.61	12.65	0.10	0.64
新疆	209.21	1.07	3.32	7.41	3.95	13.50	28.53	93.93	26.63	0.79	28.96	0.25	0.85

表8 不同品种药材样品中有机酸类成分平均含量比较(μg/g)

Tab 8 Comparison of the average contents of organic acids in samples with different types(μg/g)

品种	总有机酸	水杨酸	香草酸	肉桂酸	咖啡酸	对羟基苯甲酸	阿魏酸	对香豆酸	富马酸	3,4-二羟基苯甲酸	酒石酸	丁香酸	原儿茶酸
枸杞五号	140.94	0.40	2.50	3.19	2.46	10.53	21.30	71.44	14.24	0.63	13.38	0.18	0.68
枸杞七号	153.70	0.61	2.22	6.40	2.41	6.03	17.45	80.64	17.06	0.72	19.23	0.17	0.77

表9 药材样品中各有机酸类成分含量之间的相关性

Tab 9 Correlation of different organic acids in samples

待测成分	水杨酸	香草酸	肉桂酸	咖啡酸	对羟基苯甲酸	阿魏酸	对香豆酸	富马酸	3,4-二羟基苯甲酸	酒石酸	丁香酸	原儿茶酸
水杨酸	1											
香草酸	0.272	1										
肉桂酸	0.467	0.107	1									
咖啡酸	0.365	0.631*	0.331	1								
对羟基苯甲酸	0.410	0.717**	-0.240	0.505	1							
阿魏酸	0.187	0.817**	0.177	0.780**	0.541*	1						
对香豆酸	0.538*	-0.001	0.033	0.460	0.267	0.160	1					
富马酸	0.611*	0.258	0.655**	0.599*	0.181	0.455	0.343	1				
3,4-二羟基苯甲酸	-0.032	0.565*	0.413	0.244	0.034	0.370	-0.421	-0.013	1			
酒石酸	0.348	0.196	0.708**	0.642**	0.034	0.321	0.192	0.593*	0.297	1		
丁香酸	0.206	0.923**	0.100	0.756**	0.727**	0.819**	0.029	0.229	0.514*	0.298	1	
原儿茶酸	0.025	0.588*	0.405	0.257	0.083	0.358	-0.393	-0.030	0.992**	0.308	0.541*	1

注: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ Note: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

综上所述,该方法操作简便、准确,精密性、稳定性、重复性好,可用于同时测定枸杞子药材中12种有机酸类成分含量。不同产区、品种药材样品中有机酸类成分含量有所不同,且某些成分间有一定的相关性。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 2015版. 北京:中国医药科技出版社,2015:282-283.
- [2] 王静. 枸杞子的药理作用和临床应用价值分析[J]. 亚太传统医药,2014,10(7):50-51.
- [3] 林丽,张裴斯,晋玲,等. 黑果枸杞的研究进展[J]. 中国药房,2013,24(47):4493-4497.
- [4] MOCAN A, MOLDOVAN C, ZENGİN G, et al. UHPLC-QTOF-MS analysis of bioactive constituents from two Romanian Goji (*Lycium barbarum* L.) berries cultivars and their antioxidant, enzyme inhibitory, and real-time cytotoxicological evaluation[J]. *Food Chem Toxicol*, 2018, 115(5):414-424.
- [5] XU W, SAIKI S, MYOJIN T, et al. Lycii fructus extract ameliorates hydrogen peroxide-induced cytotoxicity through indirect antioxidant action[J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2018, 82(10):1812-1820.
- [6] POVOLO C, FOSCHINI A, RIBAUDO G. Optimization of the extraction of bioactive molecules from *Lycium barbarum* fruits and evaluation of the antioxidant activity: a

combined study[J]. *Nat Prod Res*, 2018, 18(4):1-5.

- [7] 侯学谦,祝婉芳,曲玮,等. 枸杞化学成分及药理活性研究进展[J]. 海峡药学,2016,28(8):1-7.
- [8] PARK SY, PARK WT, PARK YC, et al. Metabolomics for the quality assessment of *Lycium chinense* fruits[J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2012, 76(12):2188-2194.
- [9] 周晶,李光华. 枸杞的化学成分与药理作用研究综述[J]. 辽宁中医药大学学报,2009,27(6):93-95.
- [10] 刘慧,张秋燕,王家龙,等. 8种药材中6种有机酸类成分的HPLC含量测定[J]. 中药材,2017,40(5):1103-1113.
- [11] 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):243-246.
- [12] 董秀丽,陈向明. 反相高效液相色谱法测定枸杞中有机酸的含量[J]. 安徽农业科学,2010,38(19):9959-9960.
- [13] YAO R, HEINRICH M, ZOU Y, et al. Quality variation of Goji (fruits of *Lycium* spp.) in China: a comparative morphological and metabolomic analysis[J]. *Front Pharmacol*, 2018(9):151-156.
- [14] 王汉卿,王庆,马玲,等. 枸杞子药材生产区划研究[J]. 中国中药杂志,2016,41(17):3127-3131.

(收稿日期:2018-05-25 修回日期:2018-07-21)

(编辑:张静)