

UPLC 法同时测定山茱萸生品与酒制品中 5 个组分的含量

喻喜华 毕开顺 李泽运 戴荣华 陈晓辉*

(沈阳药科大学药学院 沈阳 110016)

摘要 目的:建立 UPLC 法同时测定山茱萸中没食子酸、5-羟甲基糠醛、莫诺苷、马钱苷和当药苷的含量。方法:ACQUITY UPLC™ HSS C₁₈ 色谱柱(2.1 mm × 100 mm, 1.8 μm);流动相:乙腈(A)-0.1% 甲酸水(B);梯度洗脱(0~3 min 5% A; 3~12 min 5% A→20% A);流速:0.2 mL·min⁻¹;检测波长:250 nm;柱温:30 ℃。结果:在上述条件下,没食子酸、5-羟甲基糠醛、莫诺苷、马钱苷和当药苷的质量浓度分别在 10.50~525.2 μg·mL⁻¹ ($r=0.9993$), 10.85~542.5 μg·mL⁻¹ ($r=0.9994$), 13.50~652.4 μg·mL⁻¹ ($r=0.9999$), 11.85~592.6 μg·mL⁻¹ ($r=0.9992$), 5.06~252.8 μg·mL⁻¹ ($r=0.9991$) 范围内与色谱峰面积呈良好的线性关系;低、中、高浓度的平均加样回收率($n=3$)均在 97.5%~102.5% 之间, RSD 均小于 2.9%。结论:该方法简便、快速、准确,重复性好,可用于山茱萸药材的质量控制。

关键词: 中药; 山茱萸; 生品; 酒制品; 含量测定; 超高效液相色谱法; 没食子酸; 5-羟甲基糠醛; 莫诺苷; 马钱苷; 当药苷
中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2011)08-1463-04

UPLC simultaneous determination of five components in crude and wine treat Fructus Corni

YU Xi-hua, BI Kai-shun, LI Ze-yun, DAI Rong-hua, CHEN Xiao-hui*

(School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

Abstract Objective: To establish a method for the determination of gallic acid, 5-hydroxymethylfurfural, morroniside, loganin and sweroside in Fructus Corni. **Method:** The separation was performed on an ACQUITY UPLC™ HSS C₁₈ (2.1 × 100 mm, 1.8 μm) column with a gradient elution (0–3 min 5% A; 3–12 min 5% A→20% A) composed of acetonitrile and 0.1% formic acid. The temperature was set at 30 ℃ with flow rate of 0.2 mL·min⁻¹ and the detective wavelength was set at 250 nm. **Results:** The linear ranges were 10.50–525.2 μg·mL⁻¹ ($r=0.9993$), 10.85–542.5 μg·mL⁻¹ ($r=0.9994$), 13.50–652.4 μg·mL⁻¹ ($r=0.9999$), 11.85–592.6 μg·mL⁻¹ ($r=0.9992$) and 5.06–252.8 μg·mL⁻¹ ($r=0.9991$) respectively. The average recoveries ($n=3$) of five components were 97.5%–102.5% with RSDs of recoveries were less than 2.9%. **Conclusion:** The method is simple, rapid, accurate and reproducible for the quality control of Fructus Corni.

Key words: traditional Chinese medicine; Fructus Corni; crude drugs; wine products; assay; UPLC; gallic acid; 5-hydroxymethylfurfural; morroniside; loganin; sweroside

山茱萸为中国药典收载的常用中药,其性酸、涩,微温。具有补益肝肾、涩精固脱的作用,用于眩晕耳鸣、腰膝酸痛、阳痿遗精、遗尿尿频、崩漏带下、大汗虚脱、内热消渴^[1]。山茱萸中主要活性成分有没食子酸、马钱苷、莫诺苷、当药苷和 5-羟甲基糠醛(5-HMF)^[2],目前文献报道多为山茱萸中马钱苷、莫诺苷等单一组分的含量测定,不能对药材进行全面的质量控制,且分析时间较长^[3~6]。本研究采

用 UPLC 法测定山茱萸生品和酒制品中 5 个组分的含量,结果表明该方法快速、简便、准确,可用于山茱萸药材的质量控制。

1 仪器与试剂

Waters ACQUITY UPLC™: 二元泵系统,自动进样器,2996 二极管阵列检测器,Empower 色谱工作站; AT200,XP56 型电子分析天平(Mettler Toledo),KQ-250DB 型超声清洗仪(昆山市超声仪器有限公司)。

* 通讯作者 Tel: (024) 23986259; E-mail: cxh_syphu@yahoo.cn

没食子酸(批号 110831-200803)、马钱苷(批号 111640-200604)、当药苷(批号 111742-200501)均购自中国药品生物制品检定所,5-羟甲基糠醛(5-HMF 批号 42909112,纯度 99%)购自 Sigma 公司,莫诺苷(纯度大于 98%)购自上海尚谊化工科技有限公司。甲醇、乙腈、甲酸(色谱纯)购于 Sigma 公司,水(Milli-Q 纯水处理系统,Millipore)。

山茱萸生品和酒制品分别购自河南、陕西、安徽、浙江,经沈阳药科大学中药学院孙启时教授鉴定为山茱萸(*Cornus officinalis* Sieb. et Zucc.)的干燥成熟果肉。将以上药材粉碎,过筛,取 60 目以下粉末放入真空干燥箱 60 ℃ 下干燥 24 h,取出后放入干燥器内备用。

2 方法与结果

2.1 混合对照品溶液 分别精密称取没食子酸 5.252 mg、5-羟甲基糠醛 5.425 mg、莫诺苷 6.524 mg、马钱苷 5.926 mg、当药苷 2.528 mg,置 10 mL 棕色量瓶中,加体积分数为 90% 的甲醇溶液溶解并定容,即得混合对照品储备液。分别精密吸取一定量的混合对照品储备液,置 10 mL 棕色量瓶中并加体积分数为 90% 的甲醇溶液制成 6 个浓度的混合对照品溶液,其中没食子酸、5-羟甲基糠醛、莫诺苷、马钱苷、当药苷的浓度范围分别为 10.50 ~ 525.2 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 10.85 ~ 542.5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 13.50 ~ 652.4 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 11.85 ~ 592.6 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 5.06 ~ 252.8 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.2 供试品溶液 取山茱萸粉末约 1.0 g,精密称定,置 100 mL 具塞锥形瓶中,加体积分数为 90% 的甲醇溶液 50 mL,称重,超声提取(功率 250 W,频率 20 kHz) 30 min,取出,再称重,用体积分数为 90% 的甲醇溶液补足损失的重量,取上清液过 0.22 μm 微孔滤膜,即得。

2.3 色谱条件与系统适用性试验 色谱柱: ACQUITY UPLCTM HSS C₁₈ (2.1 mm × 100 mm, 1.8 μm); 流动相: 乙腈(A) - 0.1% 甲酸水(B); 梯度洗脱(0 ~ 3 min 5% A; 3 ~ 12 min 5% A → 20% A); 流速: 0.2 mL · min⁻¹; 检测波长: 250 nm; 柱温: 30 ℃; 进样体积: 1 μL 。在上述色谱条件下,各被测组分理论塔板数均不低于 10000,样品中各被测组分与相邻峰分离度均大于 1.5,对照品及样品色谱图见图 1。

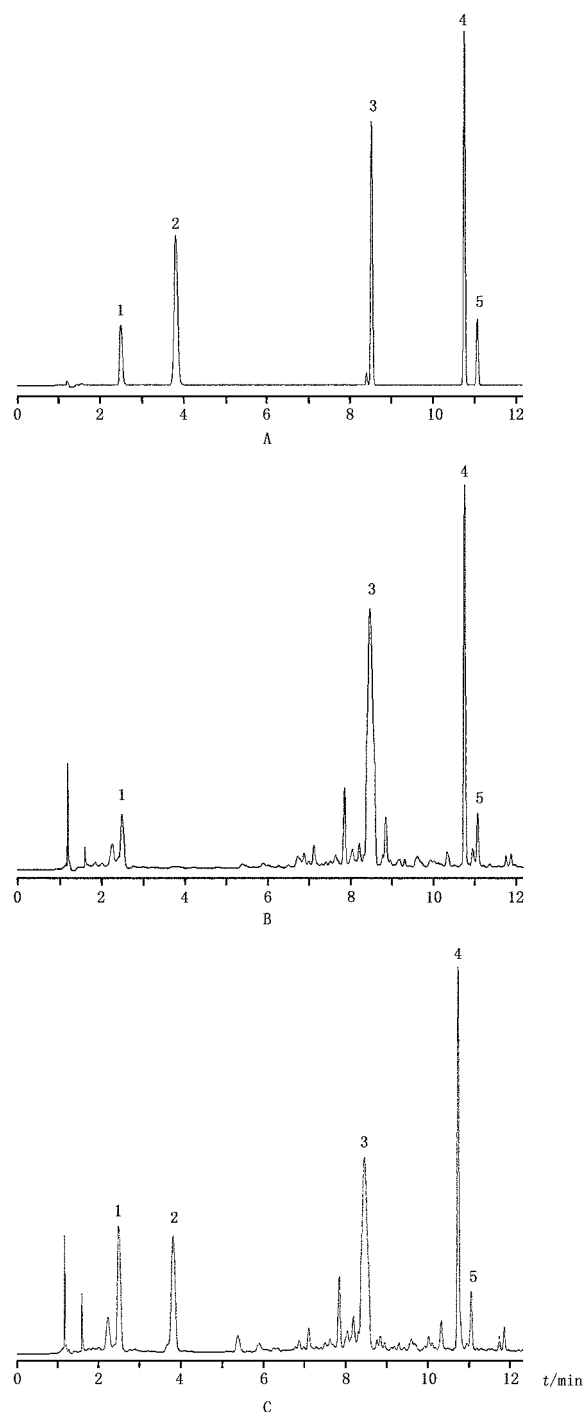


图 1 对照品(A)和山茱萸生品(B)及酒制品(C)色谱图

Fig 1 Chromatograms of a mixture of reference substances(A), crude (B) and wine processed Fructus Corni(C)

1. 没食子酸(gallic acid) 2. 5-羟甲基糠醛(5-hydroxymethylfurfural) 3. 莫诺苷(morroniside) 4. 马钱苷(loganin) 5. 当药苷(sweroside)

2.4 线性关系的考察 取系列混合对照品溶液,按上述色谱条件进样分析,以对照品质量浓度(X)为

横坐标,峰面积(Y)为纵坐标,绘制标准曲线,计算得各组分的回归方程,见表1。

表1 山茱萸中5个成分的标准曲线方程、检测限、定量限和线性范围

Tab 1 Regression equations, LOD, LOQ and linear ranges of five components in Fructus Corni

化合物 (compound)	回归方程 (regression equation)	r	检测限 (LOD) / $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	定量限 (LOQ) / $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	线性范围 (linear range) / $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$
没食子酸(gallic acid)	$Y = 6.45 \times 10^3 X + 1.93 \times 10^4$	0.9993	1.00	3.50	10.50 – 525.20
5-羟甲基糠醛(5-hydroxymethylfurfural)	$Y = 5.62 \times 10^3 X - 2.34 \times 10^4$	0.9994	1.00	3.20	10.85 – 542.50
莫诺苷(morroniside)	$Y = 5.53 \times 10^3 X - 5.34 \times 10^3$	0.9999	0.80	2.50	13.50 – 652.40
马钱苷(loganin)	$Y = 5.83 \times 10^3 X - 1.62 \times 10^4$	0.9992	0.70	2.50	11.85 – 592.60
当药苷(sweroside)	$Y = 1.29 \times 10^4 X - 6.44 \times 10^3$	0.9991	1.00	2.50	5.06 – 252.80

2.5 精密度的试验 取同一浓度的混合对照品溶液,在上述色谱条件下,连续进样6次,计算没食子酸、5-HMF、莫诺苷、马钱苷、当药苷峰面积的RSD分别为1.0%、0.8%、2.3%、1.5%、1.2%。

2.6 重复性试验 取山茱萸粉末(河南西峡酒制品)6份,每份约1.0 g,精密称定,按“2.2”项下的方法制备供试品溶液,在“2.3”项色谱条件下进样分析,测得没食子酸、5-羟甲基糠醛、莫诺苷、马钱苷、当药苷含量平均值分别为3.94、4.35、13.65、7.26、0.56 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$; RSD分别为1.5%、1.1%、2.0%、1.5%、1.9%。

2.7 稳定性试验 取山茱萸供试品溶液,于室温下放置,在“2.3”项色谱条件下分别于0、2、4、8、12、24 h进样分析,测得没食子酸、5-羟甲基糠醛、莫诺苷、马钱苷、当药苷峰面积的RSD分别为1.9%、1.7%、2.1%、0.9%、1.2%,表明供试溶液在24 h内稳定性良好。

2.8 回收率试验 称取已知含量的山茱萸粉末(河南西峡酒制品)9份,每份约0.5 g,精密称定,按样品中各成分含有量的80%、100%、120%分别精密加入没食子酸、5-羟甲基糠醛、莫诺苷、马钱苷、当药苷的对照品,按“2.2”项下方法制备3个浓度的供试液,各3份,在“2.3”项色谱条件下进样分析并计算回收率。结果见表2。没食子酸、5-羟甲基糠醛、莫诺苷、马钱苷和当药苷平均回收率($n=9$)分别为98.3%、99.1%、99.3%、98.7%、101.1%。

2.9 样品含量测定 分别取不同产地的山茱萸生品和酒制品粉末约1.0 g,精密称定,按“2.2”项下方法制备供试品溶液,在“2.3”项色谱条件下进样分析,代表性色谱图见图1,各组分含量测定结果见表3。

表2 回收率试验结果($n=3$)

Tab 2 Results of recovery determination

化合物 (compound)	原有量 (original) /mg	加入量 (added) /mg	回收率 (recovery) /%	RSD /%
没食子酸(gallic acid)	1.96	1.60	97.5	2.2
	1.96	2.00	98.0	2.2
	1.96	2.40	99.4	1.5
5-羟甲基糠醛 (5-hydroxymethylfurfural)	2.16	1.60	100.0	2.7
	2.16	2.00	98.8	0.8
	2.16	2.40	98.3	0.9
莫诺苷(morroniside)	6.85	5.50	99.2	0.3
	6.85	6.85	99.2	0.8
	6.85	8.20	99.5	1.7
马钱苷(loganin)	3.60	2.80	98.2	1.9
	3.60	3.60	98.6	1.7
	3.60	4.30	99.3	1.2
当药苷(sweroside)	0.28	0.20	98.3	2.9
	0.28	0.30	102.2	1.9
	0.28	0.40	102.5	1.0

3 讨论

3.1 提取方法的优化 比较了不同提取方法,结果表明,回流提取和煎煮提取温度均较高,会增加5-羟甲基糠醛的含量,用常温超声提取法可避免上述缺陷。考察了体积分数为50%、60%、70%、80%、90%、100%的甲醇溶液对山茱萸粉末的超声提取效果,结果90%甲醇溶液提取的溶液中5个被测组分含量最大。考察了25、50、80倍溶剂用量对提取率的影响,结果显示50倍的提取溶剂即可提取完全。以90%甲醇溶液超声提取山茱萸粉末10、20、30、45、60 min,结果30 min后,没食子酸、5-羟甲基糠

醛、莫诺苷、马钱苷、当药苷 5 个组分即可提取完全。 声提取 30 min 制备供试品溶液。
综合考虑,选择采用 50 倍量的 90% 甲醇作溶剂,超

表 3 山茱萸中 5 种成分含量测定结果($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ $n=3$)
Tab 3 Analytical results of five component in Fructus Corni

样品 (sample)	来源 (origin)	没食子酸 (gallic acid)	5-羟甲基糠醛 (5-hydroxymethylfurfural)	莫诺苷 (morroneiside)	马钱苷 (loganin)	当药苷 (sweroside)
生品(crude)	河南 西峡(Xixia ,Henan)	0.93	—	14.21	9.20	0.55
	浙江 杭州(Hangzhou Zhejiang)	0.85	—	12.98	7.52	0.59
	安徽 黄山(Huangshan ,Anhui)	0.76	—	12.49	8.42	0.51
	陕西 佛坪(Foping ,Shaanxi)	0.90	—	14.32	8.79	0.53
酒制品(wine processed)	河南 西峡(Xixia ,Henan)	3.92	4.32	13.69	7.20	0.56
	浙江 杭州(Hangzhou Zhejiang)	3.60	4.93	12.23	7.11	0.54
	安徽 黄山(Huangshan ,Anhui)	4.29	4.88	12.02	7.01	0.53
	陕西 佛坪(Foping ,Shaanxi)	3.52	6.92	13.41	7.89	0.57

注(note): “—”表示未检出(not detected)

3.2 检测波长的选择 取没食子酸、5-羟甲基糠醛、莫诺苷、马钱苷、当药苷对照品溶液进行紫外全扫描,没食子酸在 275 nm 处有最大吸收,5-羟甲基糠醛在 284 nm 处有最大吸收,莫诺苷、马钱苷、当药苷在 240 nm 波长处有最大吸收。综合考虑,在 250 nm 下各组分均有较大紫外吸收,故选取 250 nm 为检测波长。

3.3 流动相系统的选择 考察了甲醇-水、乙腈-水、甲醇-0.1% 甲酸水、乙腈-0.1% 甲酸水、乙腈-0.1% 磷酸水等流动相系统,结果显示,采用乙腈-0.1% 甲酸水系统为流动相时色谱图基线平稳,5 个成分分离效果较好。

3.4 样品测定结果分析 结果显示,不同产地山茱萸药材中各组分含量有所差异,生品与炮制品之间各组分的含量差异较大。5-羟甲基糠醛是炮制生成的产物,没食子酸的含量经炮制后增加,可能是炮制过程中加热其他物质分解而成;而当药苷含量变化不大,马钱苷和莫诺苷经炮制后含量有所降低,可能是加热过程中分解或者是炮制时流失,相关机理有待于进一步的研究。与 HPLC 法相比,UPLC 法分析时间短,溶剂消耗少,具有快速、环保、高效等优点。该法快速、简便、分离效果好,准确度高、可用于山茱萸药材的质量控制。

参考文献

- 1 ChP(中国药典). 2010. Vol I (一部): 26
- 2 ZHOU Jing-hua(周京华), LI Chun-sheng(李春生), LI Dian-dong(李电东). Progress in research of active chemical components of *Cornus officinalis*(山茱萸有效化学成分的研究进展). *Chin J New Drugs*(中国新药杂志) 2001, 10(11): 808
- 3 PAN Yang(潘扬), WANG Tian-shan(王天山), ZHANG Xian(张弦) et al. Determination of loganin in fruit of *Cornus officinalis* with RP-HPLC method(RP-HPLC 法测定中药山茱萸中马钱素的含量). *J Nanjing TCM Univ*(南京中医药大学学报) 2000, 16(1): 25
- 4 LIU Lei(刘磊), DAI Bing(戴冰), XIAO Zi-zeng(肖子曾) et al. Determination of morroneiside in Fructus Corni of different sources(不同来源山茱萸中莫诺苷的含量测定). *Cent South Pharm*(中南药学) 2007, 5(6): 494
- 5 ZHAO Xin-feng(赵新峰), SUN Yu-qing(孙毓庆). Micellar electrokinetic chromatographic determination of morroneiside and loganin in the traditional Chinese medicine *Cornus officinalis* Sieb. et Zucc. (胶束电动毛细管色谱法测定山茱萸中莫罗苷和番木鳖苷的含量). *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志) 2007, 27(8): 1154
- 6 YAN Li-xin(鄢立新), TANG Wei-wen(唐卫文), JI Yuan-qiao(及元乔). Determination of ursolic acid in the pulp of Fructus Corni by HPLC-ELSD(高效液相色谱法蒸发光散射检测器测定山茱萸药材中熊果酸的含量). *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志), 2003, 23(5): 358

(本文于 2011 年 5 月 22 日修改回)