

不同产地山茱萸中 4 种活性成分含量的 HPLC 分析

刘艳妮, 李慧敏, 徐融, 韦春桃, 康杰芳^①

(陕西师范大学 药用资源与天然药物化学教育部重点实验室 西北濒危药材资源开发国家工程实验室, 陕西 西安 710062)

Content analysis of four active components in *Cornus officinalis* from different locations by HPLC LIU Yanni, LI Huimin, XU Rong, WEI Chuntao, KANG Jiefang^① (Key Laboratory of Medicinal Resource and Natural Pharmaceutical Chemistry of Ministry of Education, National Engineering Laboratory for Resource Developing of Endangered Chinese Crude Drug in Northwest of China, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, China), *J. Plant Resour. & Environ.* 2013, 22(2): 108-110

Abstract: Taking twenty flesh samplings of *Cornus officinalis* Sieb. et Zucc. collected from seven locations in four provinces as experimental materials, simultaneous determination of four active components of loganin, gallic acid, 5-hydroxymethylfurfural (5-HMF) and protocatechuic acid was carried out by the high performance liquid chromatographic method with diode array detection (HPLC-DAD). The results show that contents of loganin, gallic acid, 5-HMF and protocatechuic acid are 2.632 9-7.762 4, 0.027 3-0.360 9, 0.003 9-0.026 3 and 0.158 1-0.837 4 mg · g⁻¹, respectively. There are obvious differences in contents of four active components among samplings collected from different locations or among different samplings collected from same location, showing that it is related to environmental factors of locations.

关键词: 山茱萸; HPLC-DAD; 马钱苷; 没食子酸; 5-羟甲基糠醛; 原儿茶酸

Key words: *Cornus officinalis* Sieb. et Zucc.; HPLC-DAD; loganin; gallic acid; 5-hydroxymethylfurfural; protocatechuic acid

中图分类号: Q946.8; R284.2 文献标志码: A 文章编号: 1674-7895(2013)02-0108-03

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7895.2013.02.15

中药山茱萸为山茱萸科(Cornaceae)植物山茱萸(*Cornus officinalis* Sieb. et Zucc.)的干燥成熟果肉,具有补益肝肾、收涩固脱的功效^[1-2];主产河南、浙江和陕西,四川、安徽和山东也有栽培^[3]。山茱萸还具有调节免疫、降血糖、抗氧化及抗癌等作用,包含有机酸及其酯类、五环三萜及其酯类、环烯醚萜类、鞣质、维生素、氨基酸和矿物质等活性成分^[4-7],其中,马钱苷是山茱萸药材检测的标准成分^[2],没食子酸具有抗肿瘤作用^[8],5-羟甲基糠醛(5-HMF, 5-hydroxymethylfurfural)有保护肝肾、抗氧化等药理活性^[9-10],原儿茶酸具有抗菌及抗肿瘤作用^[11],因此,这4种成分可作为山茱萸药材和饮片质量控制的指标成分。目前,对山茱萸有效成分含量的测定多集中于少数成分^[12-13],并不能从整体上反映其内在质量^[14]。

作者采用HPLC-DAD法对来源于不同产地的山茱萸果肉中前述4种活性成分的含量进行测定,以期建立山茱萸有效成分的多组分高效液相检测方法,为山茱萸药材质量的整体评价提供依据,也为山茱萸的优种选育提供基础数据。

1 材料和方法

1.1 材料

供试鲜果样品分别采自陕西、浙江、河南和安徽,其中,1至3号样品于2011年10月16日采自陕西丹凤日月镇;4和5号样品于2011年10月17日采自陕西丹凤流岭;6至10号样品于2011年10月4日采自浙江淳安瑶山乡;11至14号样品于2011年10月22日采自河南西峡二郎坪乡;15号样品于2011年10月22日采自河南西峡太平镇;16和17号样品于2011年10月10日采自安徽歙县杞梓里镇;18至20号样品于2011年10月10日采自安徽歙县金川乡。样品均经陕西师范大学生命科学院植物学教研室鉴定为山茱萸成熟果肉。鲜果肉于50℃烘干、粉碎后过40目筛,于4℃干燥保存。

LC-2010A HT型高效液相色谱仪(日本SHIMADZU公司)、超纯水仪(美国Millipore公司)、Centrifuge 5804R冷冻台

收稿日期: 2012-11-05

基金项目: 国家“十二五”科技支撑计划项目(2011BAI06B06); 陕西师范大学校级大学生创新性实验计划项目(CX12061)

作者简介: 刘艳妮(1986—),女,陕西兴平人,硕士研究生,主要从事药用植物资源与应用方面的研究。

^①通信作者 E-mail: kangjiefang@snnu.edu.cn

式离心机(德国 Eppendorf 公司)、FA2004N 型电子分析天平(上海天平仪器总厂)和 KQ5200 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);乙腈和甲酸均为色谱纯、水为超纯水、甲醇为分析纯。对照品为没食子酸(中国药品生物制品检定所,批号 110831-200302,纯度 $\geq 90.1\%$)、5-HMF(中国药品生物制品检定所,批号 111626-200503,纯度 $\geq 98\%$)、原儿茶酸(上海一林生物科技有限公司,批号 0424121,纯度 $\geq 98\%$)和马钱苷(成都曼斯特生物科技有限公司,批号 MUST-11052813,纯度 $\geq 98\%$)。

1.2 方法

1.2.1 色谱条件 Phenoemex C₁₈ 色谱柱(250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m)。流动相 A 为体积分数 0.1% 甲酸溶液、B 为乙腈;梯度洗脱:0~15 min, 2% B; 15~50 min, 4%~16% B; 50~57 min, 16%~18% B; 57~67 min, 18%~90% B; 67~77 min, 90%~2% B。柱温 30 $^{\circ}$ C; 流速 1.0 mL \cdot min⁻¹; 二极管阵列检测器, 检测波长分别为 240、260、265 和 280 nm; 进样量 10 μ L。

1.2.2 对照品溶液制备及标准曲线绘制 分别精密称取马钱苷、没食子酸、5-HMF 和原儿茶酸对照品 1.00 mg, 加入体积分数 80% 甲醇溶解并定容至 1 mL, 0.22 μ m 微孔滤膜过滤; 分别稀释 2、100、1 000 和 20 倍后再用 0.22 μ m 微孔滤膜过滤, 分别获得 0.50 mg \cdot mL⁻¹ 马钱苷、0.05 mg \cdot mL⁻¹ 原儿茶酸、0.01 mg \cdot mL⁻¹ 没食子酸和 0.001 mg \cdot mL⁻¹ 5-HMF 对照品溶液。分别精密吸取马钱苷对照品溶液 1、3、4、5、6 和 10 μ L, 没食子酸对照品溶液 1、2、4、10、20 和 40 μ L, 5-HMF 对照品溶液 1、2、4、8、10 和 20 μ L, 原儿茶酸对照品溶液 1、2、4、6、10 和 20 μ L, 按照上述色谱条件依次进样分析。

以峰面积值为纵坐标 y 、对照品进样质量为横坐标 x 绘制标准曲线。马钱苷对照品的回归方程为 $y = (3.2727 \times 10^6)x + (2.1486 \times 10^4)$ ($r = 0.9990$), 线性范围 0.500~5.000 μ g; 没食子酸对照品的回归方程为 $y = (1.5467 \times 10^7)x + (3.7925 \times 10^4)$ ($r = 0.9994$), 线性范围 0.010~0.400 μ g; 5-HMF 对照品的回归方程为 $y = (9.1309 \times 10^6)x + (3.4545 \times 10^2)$ ($r = 0.9999$), 线性范围 0.001~0.020 μ g; 原儿茶酸对照品的回归方程为 $y = (5.4320 \times 10^5)x + (2.4671 \times 10^3)$ ($r = 0.9998$), 线性范围 0.050~1.500 μ g。

1.2.3 供试样品溶液制备及色谱分析 精密称取果肉粉末 1.00 g, 加入 25 mL 体积分数 80% 甲醇, 称量后超声提取(功率 600 W, 频率 40 kHz) 45 min, 用体积分数 80% 甲醇补足减失的质量; 在室温下于 8 000 r \cdot min⁻¹ 离心 8 min, 上清液用 0.22 μ m 微孔滤膜过滤, 滤液即为供试样品溶液, 按照上述色谱条件进样分析, 进样量 10 μ L。

1.3 方法学考察

1.3.1 精密度实验 精密吸取 2 号供试样品液 10 μ L, 按照上述色谱条件连续进样 6 次, 马钱苷、没食子酸、5-HMF 和原儿茶酸峰面积值的 RSD 值分别为 1.57%、1.97%、1.30% 和 1.93%, 表明仪器精密度良好。

1.3.2 重现性实验 称取 2 号样品粉末 6 份, 每份 1.00 g, 按上述方法制备供试样品液并按照上述色谱条件进样测定, 马钱苷、没食子酸、5-HMF 和原儿茶酸峰面积值的 RSD 值分别为 1.33%、1.79%、2.23% 和 1.89%, 表明仪器重现性良好。

1.3.3 稳定性实验 取 2 号供试样品溶液, 按照上述色谱条件分别于 0、2、4、8、12 和 24 h 进样测定, 马钱苷、原儿茶酸、没食子酸和 5-HMF 峰面积值的 RSD 值分别为 0.73%、1.22%、1.15% 和 1.65%, 表明样品溶液在 24 h 内稳定性良好。

1.3.4 加样回收率实验 称取 2 号样品粉末 6 份, 每份 1.000 g, 分别准确加入对照品马钱苷、没食子酸、5-HMF 和原儿茶酸 5.667、0.069、0.014 和 0.456 mg, 按上述方法制备供试样品液并进样分析, 计算加样回收率。马钱苷、没食子酸、5-HMF 和原儿茶酸的加样回收率分别为 98.56%、100.93%、101.17% 和 101.40%, RSD 值分别为 2.01%、2.76%、1.93% 和 1.34%。

2 结果和分析

来源于 4 个省份 7 个产地的山茱萸果肉中 4 种活性成分含量的测定结果见表 1。由表 1 可见: 不同产地样品中 4 种成分的含量均有一定差异。总体上看, 马钱苷含量在来源于安徽歙县的样品中最高、在来源于浙江淳安县的样品中最低; 没食子酸含量在来源于陕西丹凤县的样品中最高、在来源于河南西峡县的样品中最低; 5-HMF 和原儿茶酸含量均在来源于浙江淳安县的样品中最高、在来源于河南西峡县的样品中最低。另外, 即使是来源于同一产地的样品, 其 4 种成分的含量也有明显差异, 例如 18、19 和 20 号样品均来源于安徽歙县金川乡, 但 20 号样品的马钱苷含量在 20 个样品中最高(7.762 4 mg \cdot g⁻¹), 而 19 号样品的马钱苷含量在 20 个样品中几乎最低(2.777 1 mg \cdot g⁻¹), 前者为后者的 2.8 倍。

由表 1 还可见: 4 种成分中, 马钱苷含量最高(2.632 9~7.762 4 mg \cdot g⁻¹), 没食子酸(0.027 3~0.360 9 mg \cdot g⁻¹) 和原儿茶酸(0.158 1~0.837 4 mg \cdot g⁻¹) 含量居中, 5-HMF 的含量最低(0.003 9~0.026 3 mg \cdot g⁻¹)。

3 讨论和结论

由上述测定结果可以看出: 不同产地山茱萸果肉中 4 种活性成分的含量差异较大, 浙江淳安产山茱萸果肉中马钱苷含量均未达到 0.6%^[2] 的标准, 说明产地的环境因素(包括温度、湿度、土壤、光照时间和海拔等)对山茱萸果肉中活性成分的含量有较大影响。而同一产地不同个体间同一成分的含量也有较大差异, 例如采自浙江淳安的 6 个样品没食子酸含量相差近 10 倍。因此, 在评价及考察山茱萸药材质量时应综合考虑其活性成分含量及产区等因素。

本研究采用高效液相二极管阵列检测法(HPLC-DAD), 结合体积分数 0.1% 甲酸-乙腈流动相梯度洗脱, 在 67 min 内

表1 来源于不同产地的山茱萸果肉中4种活性成分的含量($\bar{X}\pm SD, n=3$)
Table 1 Content of four active components in flesh of *Cornus officinalis* Sieb. et Zucc. from different locations ($\bar{X}\pm SD, n=3$)

样号 ¹⁾ No. of sample ¹⁾	含量/mg·g ⁻¹ Content					
	马钱苷 Loganim	没食子酸 Gallic acid	5-HMF	原儿茶酸 Protocatechuic acid		
1	6.896 4±0.051 2	0.031 6±0.000 3	0.009 1±0.001 3	0.230 5±0.062 3		
2	5.666 6±0.050 3	0.030 4±0.000 2	0.011 6±0.001 2	0.278 4±0.031 5		
3	3.240 0±0.026 1	0.102 5±0.000 5	0.019 4±0.000 6	0.231 6±0.002 9		
4	2.632 9±0.036 4	0.360 9±0.003 1	0.008 5±0.000 8	0.648 5±0.140 4		
5	3.935 6±0.023 7	0.287 4±0.005 2	0.007 9±0.000 9	0.557 2±0.069 6		
6	2.878 4±0.023 2	0.112 7±0.001 6	0.019 4±0.000 7	0.837 4±0.016 5		
7	2.978 3±0.073 3	0.042 8±0.001 4	0.024 5±0.002 6	0.647 3±0.139 4		
8	2.848 0±0.141 3	0.027 3±0.002 5	0.017 9±0.002 4	0.509 7±0.072 2		
9	3.724 5±0.008 2	0.298 5±0.000 5	0.026 3±0.000 5	0.791 7±0.020 9		
10	4.270 9±0.063 5	0.158 3±0.003 6	0.010 4±0.001 9	0.512 5±0.018 1		
11	5.504 8±0.032 9	0.061 1±0.002 4	0.006 5±0.001 8	0.421 6±0.046 3		
12	6.896 0±0.042 7	0.062 3±0.001 7	0.003 9±0.000 7	0.369 2±0.063 2		
13	4.763 0±0.065 2	0.051 4±0.001 9	0.007 4±0.000 6	0.257 5±0.017 5		
14	2.923 9±0.030 1	0.044 2±0.002 1	0.008 2±0.001 9	0.243 9±0.028 7		
15	5.504 0±0.043 1	0.037 3±0.003 5	0.007 6±0.000 7	0.207 4±0.002 4		
16	6.143 2±0.082 3	0.078 9±0.000 3	0.005 8±0.001 6	0.507 2±0.004 5		
17	7.169 2±0.059 4	0.078 4±0.002 2	0.005 5±0.001 3	0.340 8±0.014 5		
18	5.628 3±0.052 3	0.165 9±0.019 2	0.005 7±0.001 8	0.402 6±0.001 9		
19	2.777 1±0.063 4	0.071 5±0.002 1	0.005 2±0.001 5	0.158 1±0.007 2		
20	7.762 4±0.060 2	0.265 2±0.004 7	0.007 4±0.001 3	0.257 2±0.009 5		

¹⁾ 1-3: 采自陕西丹凤日月镇 Collected from Riyue Town in Danfeng County of Shaanxi Province; 4-5: 采自陕西丹凤流岭 Collected from Liuling in Danfeng County of Shaanxi Province; 6-10: 采自浙江淳安瑶山乡 Collected from Yaoshan Village in Chun'an County of Zhejiang Province; 11-14: 采自河南西峡二郎坪乡 Collected from Erlangping Village in Xixia County of He'nan Province; 15: 采自河南西峡太平镇 Collected from Taiping Town in Xixia County of He'nan Province; 16-17: 采自安徽歙县杞梓里镇 Collected from Qizili Town in Shexian County of Anhui Province; 18-20: 采自安徽歙县金川乡 Collected from Jinchuan Village in Shexian County of Anhui Province.

实现1次进样可在不同波长下同时测定4种成分的含量,色谱峰峰形好、分离度较高,能够准确测定4种活性成分的含量。本方法操作简单,精密度、重现性和稳定性良好,为山茱萸药材有效成分的质量控制和药效评价奠定了实验基础。

参考文献:

- [1] 袁菊丽,姜红波. 山茱萸的主要化学成分及药理作用[J]. 化学与生物工程, 2011, 28(5): 7-9.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2010年版(一部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 26.
- [3] 陈随清. 山茱萸种质资源的研究及优良品种的筛选[D]. 北京: 北京中医药大学药学院, 2003: 7.
- [4] 李慧敏,康杰芳. 山茱萸降血糖作用研究进展[J]. 中药材, 2012, 35(9): 1527-1530.
- [5] 韩超,季晖,薛城锋,等. 山茱萸总萜的降血糖作用[J]. 中国天然药物, 2006, 4(2): 125-129.
- [6] 励建荣,夏道宗. 山茱萸有效成分和药理作用的研究进展及其在食品工业中的应用[J]. 食品科学, 2003, 24(3): 161-163.
- [7] 周京华,李春生,李电东. 山茱萸有效化学成分的研究进展[J]. 中国新药杂志, 2001, 10(11): 808-812.
- [8] 李沐涵,殷美琦,冯靖涵,等. 没食子酸抗肿瘤作用研究进展

[J]. 中医药信息, 2011, 28(1): 109-111.

- [9] ABDULMALIK O, SAFO M K, CHEN Q, et al. 5-hydroxymethyl-2-furfural modifies intracellular sickle haemoglobin and inhibits sickling of red blood cells[J]. British Journal of Haematology, 2005, 128(4): 552-561.
- [10] CHOI C W, JUNG H A, KANG S S, et al. Antioxidant constituents and a new triterpenoid glycoside from Flos Lonicerae[J]. Archives of Pharmacal Research, 2007, 30(1): 1-7.
- [11] YIN M C, LIN C C, WU H C, et al. Apoptotic effects of protocatechuic acid in human breast, lung, liver, cervix, and prostate cancer cells: potential mechanisms of action[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009, 57(14): 6468-6473.
- [12] 许丹,樊宝娟,孙文基. 不同生长期和不同产地山茱萸中马钱苷的测定[J]. 西北大学学报: 自然科学版, 2008, 38(4): 602-604.
- [13] 罗燕子. HPLC法测定山茱萸中没食子酸的含量[J]. 亚太传统医药, 2010, 6(4): 18-19.
- [14] 陆兔林,石上梅,蔡宝昌,等. 基于一测多评的中药多成分定量研究进展[J]. 中草药, 2012, 43(12): 2525-2529.

(责任编辑: 惠红)