

## RP-HPLC 法测定山茱萸生品和酒制品中没食子酸、5-羟甲基糠醛、莫诺苷和马钱素

杜伟锋<sup>1</sup>, 蔡皓<sup>1</sup>, 丁霞<sup>1,2</sup>, 蔡宝昌<sup>1\*</sup>

(1. 南京中医药大学 江苏省中药炮制重点实验室, 江苏 南京 210029; 2. 南京农业大学, 江苏 南京 210095)

**摘要:**目的 建立用RP-HPLC法同时测定山茱萸生品和酒制品中没食子酸、5-羟甲基糠醛、莫诺苷和马钱素的方法, 同时进行比较。方法 分别用水煎煮和甲醇超声两种方法提取山茱萸生、制品, 用RP-HPLC法测定4种成分并进行比较。结果 甲醇超声提取液中没食子酸、5-羟甲基糠醛的量分别上升了250%、1200%, 莫诺苷、马钱素的量分别下降了27.7%、9.9%; 水煎提取液中没食子酸、5-羟甲基糠醛的量分别上升了222%、250%, 莫诺苷、马钱素的量分别下降了24.5%、11.7%。结论 该方法可用于同时测定山茱萸生品和酒制品中没食子酸、5-羟甲基糠醛、莫诺苷和马钱素的量; 山茱萸经酒蒸制后, 4种有效成分的变化很大。

**关键词:**山茱萸; 炮制; 没食子酸; 5-羟甲基糠醛; 莫诺苷; 马钱素; 高效液相色谱

**中图分类号:**R286.1 **文献标识码:**A **文章编号:**0253-2670(2008)12-1813-03

山茱萸为山茱萸科植物山茱萸 *Cornus officinalis* Sieb. et Zucc. 的干燥成熟果肉。临床上多用山萸肉、酒山萸肉。山萸肉长于敛汗固脱, 用于自汗或大汗不止, 阴虚盗汗; 经酒蒸制后, 补益肝肾作用增强, 多入滋补方剂, 常用于治疗眩晕耳鸣、阳痿遗精、遗尿、尿频、月经过多或崩漏、腰部酸痛等症<sup>[1]</sup>。目前普遍认为莫诺苷、马钱素、没食子酸、熊果酸、齐墩果酸、多糖等是山茱萸的主要有效成分。本实验室前期研究发现, 被认为有一定副作用的5-羟甲基糠醛在山茱萸炮制前后变化很大, 而且药理实验证实其具有保护肝肾、抗氧化等良好的药理活性, 因此被本实验选为测定指标之一。本实验采用RP-HPLC法对山茱萸生品和制品的不同溶媒提取液中的没食子酸、5-羟甲基糠醛、莫诺苷和马钱素进行了分析比较, 旨在为制定山茱萸炮制工艺标准和阐明其炮制机制提供依据。

### 1 仪器与试剂

Agilent 1100 高效液相色谱仪, Mettler AG285 电子天平(0.01 mg), Buchi V800 旋转蒸发仪, KQ-500E 型超声清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

山茱萸药材购自河南省西峡县山茱萸医药公司, 经南京中医药大学陈建伟教授鉴定为山茱萸 *C. officinalis* Sieb. et Zucc. 的干燥成熟果肉; 山茱萸酒制品, 由南京中药饮片厂按《中国药典》2005年版加工制得; 将以上药物粉碎, 过筛, 取60目以下粉末

放入真空干燥箱内于50℃下干燥24h, 取出后放入干燥器内, 备用。

5-羟甲基糠醛对照品(质量分数≥99%)购自上海有思生物技术有限公司; 莫诺苷、马钱素对照品(质量分数≥99.5%), 实验室自制; 没食子酸对照品为分析纯, 购自中国医药集团上海化学试剂公司; 甲醇、磷酸为分析纯, 乙腈为色谱纯, 水为重蒸水。

### 2 方法与结果

#### 2.1 供试品溶液的制备

2.1.1 水煎样品供试品溶液的制备: 称取山茱萸生品和制品粉末各2g, 精密称定, 分别置50mL烧杯中, 加20mL蒸馏水, 水浴煮沸30min, 滤过, 药渣再加20mL蒸馏水, 煮沸20min, 滤过, 合并滤液, 浓缩至40mL, 加乙醇至含醇量为80%, 4℃冷藏过夜, 滤过, 滤液减压回收溶剂, 残留物加甲醇溶解, 滤过, 滤液用甲醇定容至50mL, 即得。

2.1.2 甲醇提取样品供试品溶液的制备: 称取山茱萸生、制品粉末各1g, 精密称定, 分别置50mL锥形瓶中, 加25mL 80%甲醇, 密塞, 称定质量, 超声提取45min, 再次称定质量, 用甲醇补充丢失的质量, 即得。

2.2 对照品溶液的制备: 精密称取没食子酸对照品适量, 用甲醇溶解并定容, 得质量浓度为618μg/mL的对照品母液。精密吸取一定量母液, 加甲醇定容配制成质量浓度为30.9、61.8、123.6、185.4、247.2、309μg/mL系列对照品溶液, 备用。

收稿日期: 2008-04-01

基金项目: 国家“十五”科技攻关课题(2001BA701A11)

作者简介: 杜伟锋(1984-), 男, 河北任县人, 硕士, 从事中药复方研究和新药开发。

Tel: (025)86798281 E-mail: duweifeng\_200158@sohu.com

\* 通讯作者 蔡宝昌 Tel: (025)51995100 E-mail: bccai@hotmail.com

精密称取 5-羟甲基糠醛对照品适量,用甲醇溶解并定容,得质量浓度为 500  $\mu\text{g/mL}$  的对照品母液。精密吸取一定量母液,加甲醇定容配制成质量浓度为 25、50、100、125、200、250  $\mu\text{g/mL}$  系列对照品溶液,备用。

精密称取莫诺苷对照品适量,用甲醇溶解并定容,得质量浓度为 474  $\mu\text{g/mL}$  的对照品母液。精密吸取一定量母液,加甲醇定容配制成质量浓度为 23.7、59.2、119、237、356、474  $\mu\text{g/mL}$  的系列对照品溶液,备用。

精密称取马钱素对照品适量,用甲醇溶解并定容,得质量浓度为 146  $\mu\text{g/mL}$  的对照品母液。精密吸取一定量母液,加甲醇定容配制成质量浓度为 7.3、18.3、36.5、73、110、146  $\mu\text{g/mL}$  系列对照品溶液,备用。

2.3 色谱条件:Lichrospher  $\text{C}_{18}$  色谱柱(250 mm  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ );流动相为乙腈-0.1%磷酸水溶液,梯度洗脱,0~5 min,2%乙腈,5~10 min,5%乙腈,10~30 min,10%乙腈;30~50 min,15%乙腈,50~60 min,45%乙腈,60~70 min,65%乙腈,70~80 min,85%乙腈,80~90 min,100%乙腈;检测波长:218 nm(没食子酸)、284 nm(5-羟甲基糠醛)、240 nm(莫诺苷和马钱素);柱温:30  $^{\circ}\text{C}$ ;体积流量:1 mL/min。色谱图见图 1。

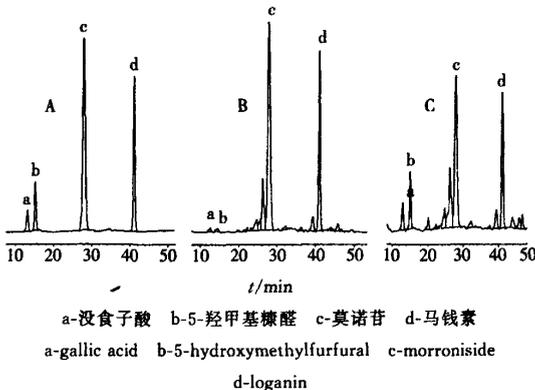


图 1 混合对照品(A)和山茱萸生品(B)、制品(C) 甲醇超声提取的 HPLC 图谱(240 nm)

Fig. 1 HPLC Chromatograms of mixture reference substance (A) and samples (B and C) (240 nm) ultrasonically extracted by methanol

2.4 方法学考察

2.4.1 标准曲线的绘制:精密吸取没食子酸和 5-羟甲基糠醛系列对照品溶液各进样 10  $\mu\text{L}$ ,测定,以质量浓度为横坐标,峰面积为纵坐标绘制标准曲线,计算得没食子酸回归方程为  $Y = 76.237 X - 27.215$ ,

$r = 0.9995$ ,线性范围为 30.9~309  $\mu\text{g/mL}$ ;5-羟甲基糠醛的回归方程为  $Y = 72.933 X - 41.15$ , $r = 0.9998$ ,线性范围为 25~250  $\mu\text{g/mL}$ 。

精密吸取莫诺苷和马钱素系列对照品溶液各进样 20  $\mu\text{L}$ ,测定,以质量浓度为横坐标,峰面积为纵坐标绘制标准曲线,计算得莫诺苷回归方程为  $Y = 29.645 X + 56.656$ , $r = 0.9999$ ,线性范围为 47.4~948  $\mu\text{g/mL}$ ;马钱素的回归方程为  $Y = 46.201 X + 62.875$ , $r = 0.9991$ ,线性范围为 14.6~292  $\mu\text{g/mL}$ 。

2.4.2 精密度试验:分别精密吸取制品的甲醇提取供试液、水煎液 10  $\mu\text{L}$ ,各连续进样 6 次,测得没食子酸、5-羟甲基糠醛、莫诺苷和马钱素峰面积的 RSD 分别为 0.99%、1.58%;0.72%、0.62%;0.71%、1.15%;0.90%、1.05%。

2.4.3 重复性试验:称取制品粉末 1 g,精密称定,共 5 份,制备甲醇提取供试品溶液,进样 10  $\mu\text{L}$  测定,测得没食子酸、5-羟甲基糠醛、莫诺苷和马钱素峰面积的 RSD 分别为 1.73%、3.31%、1.54%、0.69%;同法,再称 5 份,提取方法同水煎样品的制备,进样 10  $\mu\text{L}$  测定,测得没食子酸、5-羟甲基糠醛、莫诺苷和马钱素峰面积的 RSD 分别为 2.01%、3.33%、1.49%、1.98%。

2.4.4 稳定性试验:分别取山茱萸制品的甲醇提取供试液、水煎液,分别于 0、2、4、8、12 h 进样 10  $\mu\text{L}$  测定,测得没食子酸、5-羟甲基糠醛、莫诺苷和马钱素峰面积的 RSD 分别为 1.27%、2.04%;0.74%、0.57%;1.53%、2.14%;0.99%、1.22%,可见两种供试品溶液在 12 h 内都较稳定。

2.4.5 加样回收率试验:称取制品粉末 1 g,精密称定,共 5 份,分别加入 2.75 mg 没食子酸、8.20 mg 5-羟甲基糠醛、13.60 mg 莫诺苷和 11.60 mg 马钱素对照品,提取方法同甲醇提取样品的制备,进样测定,计算,结果没食子酸、5-羟甲基糠醛、莫诺苷和马钱素的回收率和 RSD 分别为 99.50%、2.66%;100.40%、1.30%;99.78%、1.96%;100.48%、1.84%。

同法,再称 5 份,分别加入 2.90 mg 没食子酸、8.40 mg 5-羟甲基糠醛、14.20 mg 莫诺苷和 12.80 mg 马钱素对照品,方法同水煎样品的制备,计算,结果没食子酸、5-羟甲基糠醛、莫诺苷和马钱素的回收率和 RSD 分别为 102.83%、1.35%,101.79%、4.32%,95.14%、2.67%,99.98%、1.41%。

2.5 测定:吸取山茱萸生、制品供试品溶液,按上述色谱条件测定,结果见表 1。

表 1 山茱萸炮制前后有效成分的比较 (n=3)

Table 1 Quantitative analysis of active compositions in crude and processed *Fructus Cornis* (n=3)

山茱萸	没食子酸/%	RSD/%	5-羟甲基糠醛/%	RSD/%	莫诺苷/%	RSD/%	马钱素/%	RSD/%
甲醇提取	生品	0.08	1.85	0.06	3.06	1.91	1.57	1.41
	制品	0.28	1.79	0.78	3.08	1.38	1.45	1.27
	变化率/%	250		1 200		-27.7		-9.9
水煎	生品	0.09	1.92	0.24	3.31	1.88	1.41	1.45
	制品	0.29	1.82	0.84	2.97	1.42	1.86	1.28
	变化率/%	222		250		-24.5		-11.7

### 3 讨论

5-羟甲基糠醛主要是由己糖经加热分解产生,广泛存在于含有糖类物质的植物和食品中,一般在炮制或加热后其量会增加<sup>[2]</sup>。本实验发现山茱萸酒蒸品中5-羟甲基糠醛的量较生品中明显增加,这证实了蒸制能增加5-羟甲基糠醛的量;另外,还发现生品水煎煮提取物中5-羟甲基糠醛的量也较甲醇超声提取物中的高出约3倍,而制品则差别不大,这也证实了加热对5-羟甲基糠醛的量确有很大的影响。

本实验建立了在同一高效液相色谱条件下测定山茱萸中没食子酸、5-羟甲基糠醛、莫诺苷和马钱素峰的分析方法,这为进一步研究山茱萸炮制前后指纹图谱奠定了基础,也为制定山茱萸炮制工艺标准、探讨其炮制机制提供了依据。

目前普遍认为5-羟甲基糠醛有一定的毒副作用,

但近几年来研究表明它还具有抗氧化、改善血流变学等对人体有利的作用<sup>[2]</sup>。本实验室的研究发现山茱萸二氯甲烷部位具有特异性体液免疫增强作用,经分离分析得知其主要成分为5-羟甲基糠醛。此外,药理实验还表明5-羟甲基糠醛对小鼠急性肝损伤具有保护作用,对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>所致血管内皮细胞SOD活力减低有逆转作用,可保护血管内皮细胞。因此,5-羟甲基糠醛可以作为山茱萸的一个重要指标活性成分,这为制定山茱萸炮制工艺标准,研究山茱萸炮制机制提供了新的思路。

#### 参考文献:

- [1] 中国药典[S].一部.2005.
- [2] Geng F, Wang X J. Present situation of study on 5-hydroxymethyl-2-furfural [J]. 世界科学技术——中医药现代化,2005,7(6):52-56.

## 总丹参酮不同纯化工艺的比较

吴婉莹,杨 洲,侯晋军,果德安

(中国科学院上海生命科学研究院药物研究所,上海 201203)

**摘要:**目的 比较总丹参酮不同的纯化工艺,以期寻找到一种有效部位质量分数大于50%,方便可行,适于大生产的提取工艺。方法 以总丹参酮和丹参酮ⅠA的质量分数作为考察指标,对水沉和大孔树脂纯化工艺进行考察。结果 水沉后上大孔树脂再纯化及直接上大孔树脂纯化所得总丹参酮质量分数与直接醇提水沉所得结果没有显著性差异。结论 采用醇提水沉即可得到符合要求的总丹参酮。

**关键词:**丹参;总丹参酮;醇提水沉;大孔吸附树脂;纯化

中图分类号:R286.1 文献标识码:A 文章编号:0253-2670(2008)12-1815-04

丹参为唇形科植物丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bunge 的干燥根及根茎,其活性成分为水溶性酚酸类成分和脂溶性丹参酮类成分,其中脂溶性成分主要有丹参酮ⅡA、异丹参酮、隐丹参酮等<sup>[1]</sup>。丹参中脂

溶性成分提取工艺已有相关研究报道<sup>[2,3]</sup>,但对于适于生产的获取高质量分数的丹参酮的研究报道较少。根据丹参酮的性质,本实验采用95%乙醇提取后,分别考察了不同的纯化工艺,并以总丹参酮、丹

收稿日期:2008-04-07

基金项目:上海市科委中药现代化专项项目(05DZ19701)

作者简介:吴婉莹(1973—),女,黑龙江省哈尔滨市人,副研究员,博士,从事新药的研究与开发以及中药制剂及药代动力学的研究,在该领域已发表论文10余篇。Tel:(021)50805522-2208 Fax:(021)50272789 E-mail:wuwanying902@yahoo.com.cn