

双波长高效液相色谱法测定山茱萸中多种成分的含量

龚卫红¹, 赵希贤²

(1. 北京中医药大学中药学院, 北京 100102; 2. 北京市崇文区药品检验所, 北京 100075)

[摘要] 目的: 建立双波长 HPLC 测定山茱萸 *Cornus officinalis* Sieb. et Zucc. 中熊果酸、马钱苷含量的方法。方法: 用十八烷基键合硅胶为固定相 Shim-pack VP-ODS 柱, 以乙腈为流动相 A, 以 0.02% 磷酸水为流动相 B, 进行梯度洗脱, 检测波长为 210, 238 nm。结果: 熊果酸在 0.1 ~ 2.0 μg 线性良好 ($r = 0.9999$)。回收率为 99.44% (RSD 0.39%, $n = 6$)。马钱苷在 0.08 ~ 1.6 μg 线性良好 ($r = 0.9999$)。回收率为 98.92% (RSD 0.75%, $n = 6$)。结论: 本方法简便快速, 可同时测定山茱萸中多种成分含量, 结果准确。

[关键词] 高效液相色谱法; 熊果酸; 马钱苷; 山茱萸; 含量测定

[文献标识码] R284.1 **[中图分类号]** B **[文章编号]** 1005-9903(2010)14-0058-03

Determination of Double-wavelength Multiple of Content in *Cornus officinalis*

GONG Wei-hong¹, ZHAO Xi-xian²

(1. Beijing University of Chinese Medicine, School of Chinese Materia Medica, Beijing 100102, China;
2. Chongwen District, Beijing Institute for Drug Control, Beijing 100075, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a dual-wavelength HPLC method for the determination of ursolic acid and loganin from *Cornus officinalis*. **Method:** Octadecyl bonded silica stationary phase Shim-pack VP-ODS column was used. Gradient elution was performed with acetonitrile as mobile phase A, 0.02% phosphoric acid water as mobile phase B. The detection wavelength was set at 210 nm and 238 nm. **Result:** UA was linear in the range of 0.1-2.0 μg, ($r = 0.9999$). The average recovery was 99.44% (RSD 0.39%, $n = 6$). Loganin was linear in the range of 0.08-1.6 μg. ($r = 0.9999$). The average recovery was 98.92% (RSD 0.75%, $n = 6$). **Conclusion:** The method established was simple, rapid and accurate and could be used for simultaneous determination of ursolic acid and loganin from dogwood.

[Key words] HPLC; ursolic acid; loganin; *Cornus officinalis*; content

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。文献多采用单一成分(如马钱苷或齐墩果酸)作为指标成分, 指纹图谱^[1-3]或莫诺苷及马钱苷^[4-7], 马钱苷和没食子酸^[9], 马钱素、熊果酸和齐墩果酸^[9]对山茱萸药材进行含

量测定或质量控制, 笔者采用双波长 HPLC 法对山茱萸中熊果酸、马钱苷含量进行同时测定, 该方法简便、准确、高效, 为山茱萸的质量控制提供依据。

1 仪器与试剂

岛津 LC-2010HTA 高效液相色谱仪, 熊果酸对照品、马钱苷对照品(中国药品生物制品检定所提供); 山茱萸为河北安国购买, 经崇文区药品检验所检验均符合规定。试验用水为超纯水, 乙腈、磷酸为色谱纯; 其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱 Shim-pack VP-ODS 柱(150 mm × 4.6 mm); 流动相以乙腈为流动相 A, 以

[收稿日期] 20100609(004)

[第一作者] 龚卫红, 硕士学位, 主管药师, 研究方向新药研究, 工商管理, Tel: 15210946612, E-mail: gongwh508@163.com

[通讯作者] * 赵希贤, 副主任药师, 学士学位, 研究方向药物鉴定, 药物分析

表 1 熊果酸、马钱苷流动相条件

时间/min	流动相 A/%	流动相 B/%
0~10	15	85
10~12	15~80	85→20
12~30	80	20

0.02% 磷酸水为流动相 B, 按表 1 中的规定进行梯度洗脱; 检测波长 210, 238 nm; 柱温室温; 进样量 10 μL 。理论板数按马钱苷峰计算不低于 4 000。在上述色谱条件下熊果酸、马钱苷与其他成分分离良好, 见图 1。

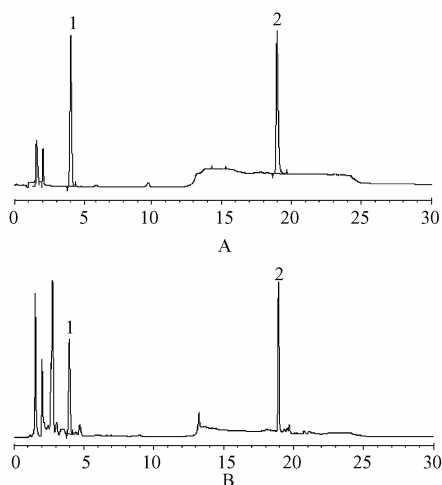


图 1 山茱萸 HPLC 色谱图

A. 对照品溶液; B. 供试品溶液; 1. 马钱苷对照品; 2. 熊果酸对照品。

2.2 对照品溶液的制备 精密称取熊果酸对照品、马钱苷对照品适量, 加 80% 甲醇制成熊果酸 100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、含马钱苷 80 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的对照品混合溶液, 摇匀, 即得。

2.3 供试品溶液的制备 取本品粉末(过 3 号筛)约 0.1 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 80% 甲醇 25 mL, 称定质量, 加热回流 1 h, 放冷, 再称定质量, 用 80% 甲醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.4 方法学考察

2.4.1 线性关系考察 精密吸取熊果酸对照品、马钱苷对照品混合溶液 1.0, 2.0, 5.0, 10.0, 15.0, 20.0 μL , 在上述色谱条件下进样, 测定峰面积, 以对照品量为自变量, 峰面积为因变量, 得回归方程分别为 $Y = 2.26 \times 10^5 X + 2.33 \times 100, r = 0.9999 (n = 6)$; $Y = 1.71 \times 10^{-6} X + 3.08 \times 10^2, r = 0.9999 (n = 6)$; 熊果酸对照品、马钱苷对照品分别在 0.1~2.0 μg , 0.08~1.6 μg , 线性关系良好。

2.4.2 精密度试验 取同一份山茱萸的供试品溶液, 连续进样 5 次, 结果熊果酸对照品、马钱苷对照品峰面积的 RSD 值分别为 0.47%, 0.78%, 表明仪器精密度良好。

2.4.3 稳定性试验 按供试品溶液的制备方法制备得样品溶液, 分别于配制后 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 测定, 熊果酸对照品、马钱苷对照品峰面积的 RSD 分别为 0.36%, 0.45%, 表明样品溶液在 24 h 内稳定。

2.4.4 重复性试验 取同一批山茱萸样品 6 份, 制备供试品溶液, 结果表明样品的重现性良好。RSD 值分别为 0.57%, 0.64%。

2.4.5 回收率测定 取已知含量的山茱萸(含量分别为熊果酸 0.59%、马钱苷 0.77%) 样品 0.05 g, 共 6 份, 精密称定, 分别加入 100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的熊果酸、80 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 马钱苷对照品溶液 3 mL, 依法测定, 计算回收率。结果熊果酸、马钱苷的回收率($n = 6$)分别为 99.44% (RSD 0.39%)、98.92% (RSD 0.75%)。结果见表 2~3。

表 2 熊果酸回收率试验 ($n = 6$)

No.	样品量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收量 /mg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
1	0.295 1	0.3	0.594 2	0.299 1	99.71	99.44	0.39
2	0.296 9	0.3	0.59 53	0.298 4	99.45		
3	0.295 7	0.3	0.593 8	0.298 1	99.36		
4	0.294 8	0.3	0.594 7	0.299 9	99.98		
5	0.295 0	0.3	0.591 5	0.296 5	98.83		
6	0.296 1	0.3	0.594 1	0.298 0	99.33		

表 3 马钱苷回收率试验 ($n = 6$)

No.	样品量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收量 /mg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
1	0.385 1	0.24	0.624 3	0.239 2	99.68	98.92	0.75
2	0.387 5	0.24	0.622 6	0.235 1	97.94		
3	0.385 9	0.24	0.623 8	0.237 9	99.12		
4	0.384 7	0.24	0.622 8	0.238 1	99.21		
5	0.385 0	0.24	0.623 9	0.238 9	99.54		
6	0.386 5	0.24	0.621 8	0.235 3	98.06		

2.4.6 样品测定结果 精密称取 3 批样品, 按供试品溶液项下制备, 测定计算。结果见表 4。

表 4 山茱萸样品的测定结果 ($n = 3$)

No.	熊果酸含量 /%	马钱苷含量 /%
1	0.59	0.77
2	0.36	0.68
3	0.29	0.84

3 讨论

3.1 供试品提取条件的确定 比较了 60% 甲醇回流提取,70% 甲醇回流提取、乙醇回流提取、70% 甲醇超声提取、70% 甲醇回流提取等方法,试验表明 70% 甲醇超声提取方法成分含量较高,峰形较好。

3.2 测定条件的选取 二极管阵列检测器检测结果表明,在 210 nm 处熊果酸峰吸收值较大,在 238 nm 处马钱苷峰吸收值较大,故检测波长选取 210, 238 nm 进行测定。

乙腈-磷酸水系统比甲醇-醋酸水、乙腈-醋酸水系统好,杂峰少,样品峰形较好,成分峰与其他峰达到基线分离。

3.3 色谱柱的选择 试验中尝试了 3 种色谱柱,分别是岛津公司 Shim-pack VP-ODS 柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm), Waters 公司 SunFire ODS 柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm), Waters 公司 Symmetry ODS 柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm)。3 种色谱柱均能使各峰相互分离较好,柱效较高。

3.4 山茱萸作为临床常用药,2000 年版和 2005 年版《中国药典》分别以熊果酸和马钱苷作为山茱萸质量控制指标,采用 2 种对照品同时测定,使质量监测简便,准确;为生产中控和产品质量检测提供有效方法。

[参考文献]

- [1] 杜伟锋,梁小娟,蔡皓,等. 山茱萸炮制前后的 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中国药学杂志,2009,44(14):1059.
- [2] 杜伟锋,蔡皓,丁霞,等. 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[J]. 中草药,2008,39(12):1813.
- [3] 张聪,金德庄. 中药山茱萸 HPLC 色谱指纹特征研究[J]. 中成药,2008,30(12):1726.
- [4] 闫润红,赵平,刘养清,等. 不同产地山茱萸中莫诺苷和马钱素含量的研究[J]. 山西中医学院学报,2009,10(2):21.
- [5] 赵平,闫润红,刘养清,等. 栽培与野生山茱萸中马钱苷和莫诺苷含量分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2009,15(4):7.
- [6] 石延榜,张振凌,许丹妮. 不同产地山茱萸药材质量的检测[J]. 时珍国医国药,2007,18(2):3052.
- [7] 劳风云,李小娜,张卫国,等. 山茱萸总苷中莫诺苷及马钱苷 HPLC 法同时测定[J]. 中国公共卫生,2009,25(7):889.
- [8] 刘亚男,郭锦明,王跃飞,等. 波长切换高效液相色谱法测定山茱萸中马钱苷和没食子酸[J]. 天津中医药,2009,26(2):152.
- [9] 喻卫武,黎章矩,曾燕如. 山茱萸良种主要药用有效成分测定与质量评价[J]. 浙江林学院学报,2009,26(2):196.

[责任编辑 顾雪竹]