

· 化学与分析 ·

HPLC 测定山茱萸不同炮制品中 5-羟甲基糠醛和没食子酸的含量

诸明娜¹, 陆兔林^{2*}, 毛春芹², 胡俊扬²

(1. 江苏省无锡市第二人民医院, 江苏 无锡 214002;

2. 南京中医药大学 江苏省中药炮制重点实验室, 南京 210046)

[摘要] 目的:测定山茱萸及其炮制品中5-羟甲基糠醛和没食子酸的含量。方法:色谱条件,Kromasil® -C₁₈(4.6 mm × 250 mm, 5 μm)色谱柱,以乙腈-水(5:95),流速1.0 mL·min⁻¹,检测波长240 nm,柱温30℃。测定没食子酸的色谱条件,Kromasil® -C₁₈(4.6 mm × 250 mm, 5 μm)色谱柱,以甲醇-0.1%磷酸(8:92),流速1.0 mL·min⁻¹,检测波长271 nm,柱温30℃。结果:与生品相比,炮制品中5-羟甲基糠醛为新增加成分,没食子酸含量明显增加;高压蒸制中两种成分含量高于常压蒸制,但没有显著性差异。结论:该方法稳定可靠、简便可行,可以为制定山茱萸的炮制工艺提供依据。

[关键词] 山茱萸; 炮制; 5-羟甲基糠醛; 没食子酸

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2012)07-0064-04

Determination of 5-Hydroxymethyl Furfural and Gallic Acid from Different Processed Products of *Cornus officinalis* by HPLC

ZHU Ming-na¹, LU Tu-lin^{2*}, MAO Chun-qin², HU Jun-yang²

(1 Wuxi No. 2 People's Hospital of Jiangsu Province, Wuxi 214002, China; 2. Nanjing University of Chinese Medicine, Jiangsu Province Key Research Laboratory of Chinese Medicine Processing, Nanjing 210046, China)

[Abstract] **Objective:** To compare the content of 5-hydroxymethyl furfural and gallic acid in the raw medical material and the different processed products of *Cornus officinalis*. **Method:** Kromasil® -C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) was used. The mobile phase was acetonitrile-water (5:95), detection wavelength was at 240 nm for 5-hydroxymethyl furfural and methanol-0.1% phosphoric acid (8:92), and detection wavelength was at 271 nm for gallic acid, respectively. The flow rate was 1.0 mL·min⁻¹ and the column temperature was at 30℃. **Result:** Compared to the *C. officinalis*, 5-hydroxymethyl furfural was a new competent and gallic acid was significantly increased. The content of 5-hydroxymethyl furfural and gallic acid in high-pressure processed products were higher than traditional pressure products, but there was no significantly difference. **Conclusion:** The HPLC method developed for determination of 5-hydroxymethyl furfural and gallic acid from different processed products of *C. officinalis* is simple and valid. This study can provide a scientific basis for establishing rational preparing process.

[Key words] *Cornus officinalis*; processed; 5-hydroxymethyl furfural; Gallic acid

山茱萸为山茱萸科植物山茱萸的干燥成熟果 肉,具有补益肝肾、涩精固脱之功效,用于眩晕耳鸣、

[收稿日期] 20110516(015)

[基金项目] 国家“十一五”攻关课题(2006BAI09B06-06)

[第一作者] 诸明娜,主管中药师,从事中药质量标准研究, Tel:13861825966, E-mail:zhumingna3114@126.com

[通讯作者] * 陆兔林,教授,博导,从事中药炮制工艺及质量标准研究, Tel:025-85811835, E-mail:lutuling2005@126.com

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]。山茱萸中主要含有没食子酸、熊果酸、齐墩果酸、山茱萸苷、马钱子苷、多糖类等有效成分,具有降低血糖、增强免疫、抗炎等药理作用^[2]。

山茱萸传统炮制方法繁多,有酒制、蒸制、醋制、盐制等^[3],近代炮制方法除去核外,主要有清蒸和酒蒸,其中又以酒蒸为常见,并认为山茱萸生用以敛阴止汗力强,制后以补肾涩精、固精缩尿力胜,加酒后借酒力温通,助药势,降低其酸性,滋补作用强^[4]。有文献报道,5-羟甲基糠醛对 CCl₄ 肝损伤模型及血管内皮细胞具有良好的保护作用^[5],说明山茱萸高压蒸制后补益作用增强。文献表明一些补益药蒸制后也会产生 5-羟甲基糠醛^[6-7],因此推测 5-羟甲基糠醛是补益类药物经炮制后的一个共性成分,可以作为山茱萸炮制品的一个重要指标活性成分,在饮片的质量控制中应当建立该成分的含量测定,确保酒蒸山茱萸的质量和临床应用的安全,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。

目前山茱萸的炮制还都采用常压蒸制的传统炮制工艺,生产效率比较低,蒸制时间长,资源浪费比较大,而且炮制参数不容易控制,制得的饮片质量又难以得到控制。高压蒸制使用先进设备,使炮制参数得到控制,资源利用率升高,生产效率提高,同时高压蒸制中还有杀菌的作用,补益作用比常压蒸制有所增强。本实验通过对山茱萸生品、传统炮制品、高压炮制品中的没食子酸和 5-羟甲基糠醛的含量进行比较分析,为制定山茱萸最佳炮制工艺标准和进一步研究其药效物质提供科学的依据。

1 材料

1.1 仪器 Agilent 1100 型高效液相色谱系统(安捷伦科技有限公司),CP225D 微量天平(德国 Sartorius),热压灭菌柜(日本三洋),KQ-500E 型医用超声清洗器(昆山超声仪器有限公司)。

1.2 试药 5-羟甲基糠醛(中国药品生物制品检定所,批号 127860-200508),没食子酸(中国药品生物制品检定所,批号 110831-200302),山茱萸饮片购自安徽丰原铜陵中药饮片有限公司,经南京中医药大学药学院陈建伟教授鉴定为山茱萸科植物山茱萸 *Cornus officinalis* Sieb. et Zucc. 的干燥成熟果肉,乙腈、甲醇为色谱纯,其余所有试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 样品制备

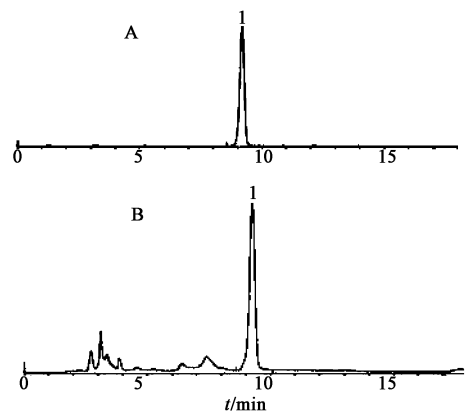
2.1.1 山茱萸 取原药材,除去杂质及果柄,洗净,干燥。

2.1.2 常压蒸制 取山茱萸,加入黄酒拌匀(黄酒用量为 20%),密闭,闷润 1 h,置蒸锅中蒸制 6 h,取出,60 °C 干燥,即得。

2.1.3 高压蒸制 取山茱萸,加入黄酒拌匀(黄酒用量为 20%),密闭,闷润 1 h,置热压灭菌柜在压力 1.2 kg·cm⁻² 和温度 105 °C 下蒸制 1.5 h,取出,60 °C 干燥,即得。

2.2 5-羟甲基糠醛的含量测定

2.2.1 色谱条件 Kromasil® -C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱,以乙腈-水(5:95),流速 1.0 mL·min⁻¹,检测波长 240 nm,柱温 30 °C,进样量 10 μL。见图 1。



A. 对照品;B. 山茱萸样品;1. 5-羟甲基糠醛

图 1 山茱萸中 5-羟甲基糠醛色谱图

2.2.2 对照品溶液的制备 精密称定 5-羟甲基糠醛对照品适量,加甲醇制成每 1 mL 含 34.8 μg 溶液,即得。

2.2.3 供试品溶液的制备 取本品粉末(过三号筛)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,超声提取(功率 250 W,频率 20 kHz)25 min,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。

2.2.4 线性关系考察 分别精密吸取对照品溶液 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mL 于 1 mL 量瓶中,用甲醇定容至刻度。分别精密吸取 10 μL 注入高效液相色谱仪,测定。以峰面积平均值对浓度进行线性回归。结果表明 5-羟甲基糠醛在 3.48 ~ 34.80 mg·L⁻¹ 线性良好,回归方程为 $Y = 414.62X + 20.264$ ($r = 0.9997$)。

2.2.5 精密度试验 将浓度为 13.92 mg·L⁻¹ 对照品溶液,按上述色谱条件连续进样 6 次,记录各自峰

面积,结果 RSD 为 0.08%,表明仪器精密度良好。

2.2.6 重复性试验 精密称取常压蒸制山茱萸饮片粉末 0.1 g,平行 6 份,按 2.2.3 项下方法制备成供试品溶液,按 2.2.1 项色谱条件进行 HPLC 分析。根据所得峰面积计算其在样品中的含量。结果显示 5-羟甲基糠醛含量为 0.36%,RSD 0.45%,说明此方法重复性良好。

2.2.7 稳定性试验 取同一山茱萸供试品溶液,室温放置 0,2,4,8,12,24 h 后,按上述色谱条件进行 HPLC 分析,测定 5-羟甲基糠醛的峰面积。结果显示 5-羟甲基糠醛在不同时间峰面积的 RSD 0.12%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.2.8 加样回收率试验 精密称取 5-羟甲基糠醛对照品适量,加甲醇制成浓度为 0.178 g·L⁻¹的对照品溶液,备用。精密称取已知 5-羟甲基糠醛含量的常压蒸制山茱萸粉末约 0.05 g,共 9 份。根据其含量的 80%,100%,120%,分别加入对照品溶液 0.8,1.0,1.2 mL,各 3 份,按 2.2.3 项下方法制备成供试品溶液,按 2.2.1 项色谱条件进行 HPLC 分析,根据测得量和加入量计算回收率。结果表明其加样回收率为 99.99%,RSD 0.73%。具体结果见表 1。

表 1 5-羟甲基糠醛加样回收率试验

取样量 /g	样品含量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
0.051 3	0.182 7	0.142 4	0.325 1	100.00		
0.049 8	0.177 4	0.142 4	0.318 7	99.26		
0.049 5	0.176 3	0.142 4	0.318 9	100.15		
0.050 4	0.179 5	0.178 0	0.356 5	99.44		
0.050 5	0.179 8	0.178 0	0.357 8	99.97	99.99	0.73
0.049 8	0.177 4	0.178 0	0.355 9	100.31		
0.050 3	0.179 1	0.213 6	0.392 1	99.70		
0.052 1	0.185 5	0.213 6	0.397 8	99.37		
0.050 4	0.179 5	0.213 6	0.396 7	101.69		

2.2.9 5-羟甲基糠醛含量测定 取 3 种山茱萸饮片,粉碎,过三号筛,精密称取约 0.1 g,各 3 份。按照 2.2.3 项下制备成供试品溶液,按上述色谱条件进行 HPLC 分析,分别进样 10 μL,记录峰面积,根据外标法计算样品中 5-羟甲基糠醛的百分含量,结果见表 2。

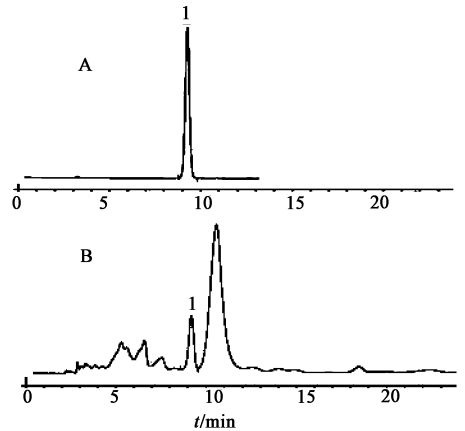
2.3 没食子酸的含量测定

2.3.1 色谱条件 Kromasil® -C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱,以甲醇-0.1% 磷酸(8:92),流速 1.0 mL·min⁻¹,检测波长 271 nm,柱温 30 °C,进样

表 2 山茱萸不同炮制品中 5-羟甲基糠醛和没食子酸的含量 %

No.	5-羟甲基糠醛	没食子酸
生品	-	0.25
常压蒸制品	0.36	1.32
高压蒸制品	0.42	1.38

量 10 μL。色谱图见图 2。



A. 对照品; B. 山茱萸样品; 1. 没食子酸

图 2 山茱萸中没食子酸色谱

2.3.2 对照品溶液的制备 精密称定没食子酸对照品适量,加 80% 甲醇制成每 mL 含 126.8 μg 的溶液,即得。

2.3.3 供试品溶液的制备 同 2.2.3 项下的供试品溶液制备方法。

2.3.4 线性关系考察 分别精密吸取对照品溶液 0.05,0.1,0.2,0.4,0.8,1.0 mL 于 1 mL 量瓶中,用甲醇定容至刻度。分别精密吸取 10 μL 注入高效液相色谱仪,测定。以峰面积平均值对浓度进行线性回归。结果表明没食子酸在 12.68 ~ 126.80 mg·L⁻¹ 线性良好,回归方程为 Y = 42.491X + 14.6 (r = 0.999 8)。

2.3.5 精密度试验 将浓度为 50.72 mg·L⁻¹ 对照品溶液,按 2.3.1 项色谱条件连续进样 5 次,记录各自峰面积,并计算样品含量。结果 RSD 为 0.75%,表明仪器精密度良好。

2.3.6 重复性试验 精密称取常压蒸制山茱萸饮片粉末 0.1 g,平行 5 份,按 2.3.3 项下方法制备成供试品溶液,按 2.3.1 项色谱条件进行 HPLC 分析。根据所得峰面积计算其在样品中的含量。结果显示没食子酸含量为 1.32%,RSD 0.43%,说明此方法重复性良好。

2.3.7 稳定性试验 取同一山茱萸供试品溶液,室温放置 0,2,4,8,12,24 h 后,按上述色谱条件进行

HPLC 分析,测定没食子酸的峰面积。结果显示没食子酸在不同时间峰面积的 RSD 0.60%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.3.8 加样回收率试验 精密称取没食子酸对照品适量,加甲醇制成浓度为 $0.656 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的对照品溶液,备用。精密称取已知没食子酸含量的常压蒸制山茱萸粉末约 0.05 g,共 9 份。根据其含量的 80%,100%,120%,分别加入对照品溶液 0.8,1.0,1.2 mL,各 3 份,按 2.2.3 项下方法制备成供试品溶液,按 2.3.1 色谱条件进行 HPLC 分析,根据测得量和加入量计算回收率。结果表明其加样回收率为 100.12%,RSD 0.80%。具体结果见表 3。

表 3 没食子酸的加样回收率试验

取样量 /g	样品含量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
0.050 3	0.664 5	0.524 8	1.199 8	102.01		
0.051 2	0.676 4	0.524 8	1.201 1	99.99		
0.051 4	0.679 0	0.524 8	1.198 2	98.93		
0.049 8	0.657 9	0.656 0	1.314 1	100.04		
0.049 7	0.656 5	0.656 0	1.312 6	100.01	100.12	0.80
0.050 8	0.671 1	0.656 0	1.325 8	99.81		
0.049 9	0.659 2	0.787 2	1.446 4	100.00		
0.049 2	0.649 9	0.787 2	1.438 9	100.22		
0.052 1	0.688 3	0.787 2	1.475 8	100.04		

2.3.9 没食子酸含量测定 取 3 种山茱萸饮片,粉碎,过三号筛,精密称取约 0.1 g,各 3 份。按照 2.2.3 项下制备成供试品溶液,按上述色谱条件进行 HPLC 分析,分别进样 10 μL ,记录峰面积,根据外标法计算样品中没食子酸的百分含量,结果见表 2。

3 讨论

3.1 提取方法考察 根据文献,本文比较了不同浓度甲醇(60%,80%,100%)3 种溶剂对 5-羟甲基糠醛和没食子酸提取率的影响,结果显示其提取效果 80% 甲醇 > 甲醇 > 60% 甲醇,故以 80% 甲醇作为提取溶剂;考察了超声提取法和回流提取法,结果显示超声提取效率高于连续回流提取效率;同时考察了

超声时间(15,25,35 min)对提取效率的影响,结果显示超声提取时间 25 min 与 35 min 明显高于 15 min,然 25 min 与 35 min 之间没有差别。所以本实验选择以 80% 甲醇为提取溶剂,超声提取 25 min 对被测成分进行提取。

3.2 色谱条件的选择 在研究过程中,我们考察了多个色谱条件,希望在同一色谱条件下,能够对两种物质同时进行含量测定,然而实验中我们发现,所有考察的色谱条件,二者分离度不够,相互干扰,或者山茱萸中其他成分对其有干扰,故本文选择了两个不同色谱条件进行含量测定,所选色谱条件均达到了含量测定的要求。

本实验结果表明,山茱萸经炮制后其中 5-羟甲基糠醛和没食子酸含量都有不同程度的增加,并且高压蒸制品两者的含量均略高于常压蒸制品,说明从化学成分方面分析,山茱萸高压蒸制工艺是科学可行的,而且高压蒸制过程中蒸制参数可以控制,生产效率得到很大提高,同时具有杀菌的作用。本实验研究可以为制定山茱萸最佳炮制工艺提供科学的依据,同时对其进行药效研究提供物质基础。炮制前后山茱萸中其他成分含量的变化,尚待进一步实验研究。

[参考文献]

- [1] 中国药典.一部[S].2010;26.
- [2] 潘扬,王天山.植物山茱萸化学成分的研究概况[J].南京中医药大学学报,1998,14(1):61.
- [3] 栾妮娜,王健.山茱萸的炮制历史沿革及现代研究进展[J].齐鲁药事,2008,27(12):737.
- [4] 丁安伟.中药炮制学[M].北京:高等教育出版社,2007;292.
- [5] 童荣生.高效液相色谱法测定山茱萸中没食子酸的含量[J].实用医院临床杂志,2006,3(4):27.
- [6] 朱梅芬,刘向前,吴柱熹,等.地黄的炮制对梓醇和 5-羟甲基糠醛含量的影响[J].中国中药杂志,2007,32(12):1156.
- [7] 杨云,许闯,冯云霞.黄精不同炮制品中 5-羟甲基糠醛的含量测定[J].中药材,2008,31(1):17.

[责任编辑 蔡仲德]