

栽培与野生山茱萸中马钱苷和莫诺苷含量分析

赵平^{1,2}, 闫润红¹, 刘养清^{1*}, 王永辉¹, 李祥¹

(1. 山西中医学院, 山西 太原 030024; 2. 天津中医药大学, 天津 300193)

[摘要] 目的: 建立山茱萸中马钱苷和莫诺苷的 RP-HPLC 含量测定方法; 对栽培和野生山茱萸中的马钱苷和莫诺苷含量进行比较。方法: 采用 RP-HPLC 法, DIKMA C₁₈ 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-0.1% 醋酸水溶液(38: 62); 马钱苷的检测波长为 238 nm, 莫诺苷的检测波长为 241 nm。结果: 马钱苷与莫诺苷分别在(0.024 5~ 0.367 5) μg($r = 0.999\ 7$)、(0.064 5~ 0.967 5) μg($r = 0.999$) 范围内线性关系良好。栽培山茱萸中马钱苷和莫诺苷的平均含量高于野生山茱萸。

[关键词] 山茱萸; 马钱苷; 莫诺苷; 高效液相色谱法

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2009)04-0007-03

Analysis on Contents of Loganin and Morroniside in Cultivated and Wild Fructus Corni

ZHAO Ping^{1,2}, YAN Run-hong¹, LIU Yang-qing^{1*}, WANG Yong-hui¹, LI Xiang¹

(1. Shanxi College of TCM, Taiyuan Shanxi 030024, China;

2. Tianjin University of TCM, Tianjin 300193, China)

[Abstract] **Objective:** To develop an HPLC method for the determination of loganin and morroniside in both the cultivated and wild Fructus Corni. **Method:** A nalysis was carried out on a DIKMA C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) column with acetonitrile-0.1% acetic acid solution (38: 62) as the mobile phase. The detection wavelength of loganin was at 238 nm and that of morroniside was at 241 nm. **Results:** Loganin and morroniside showed a good linear relationship in the range of(0.024 5~ 0.367 5) μg($r = 0.999\ 7$) and(0.064 5~ 0.967 5) μg($r = 0.999\ 9$) respectively. The average content levels of loganin and morroniside of the cultivated Fructus Corni were higher than that of the wild.

[Key words] Fructus Corni; loganin; morroniside; RP-HPLC

山茱萸系山茱萸科植物山茱萸 *Cornus officinalis* Siebet Zucc. 的干燥成熟果肉, 具有补益肝肾, 涩精固脱的功效。临床常用于内热消渴, 眩晕耳鸣, 腰膝酸痛, 阳痿遗精, 尿遗尿频, 崩漏带下, 大汗虚脱等证^[1]。

八十年代中期以来, 我国在十余个省份进行了山茱萸的人工移植栽培, 这一举措有效缓解了山茱萸药材市场供应的紧张局面。目前认为山茱萸中的

水溶性成分马钱苷和莫诺苷是主要活性成分^[2~3], 但 2005 年版中国药典山茱萸药材含量测定仅规定测马钱苷, 并规定不得少于 0.6%^[4]。我们受近代名医张锡纯用山茱萸“救脱”(强心抗休克)经验的启发, 发现了山茱萸的强心抗心律失常作用^[5~6], 并进一步探讨了其有效成分。近些年来, 山茱萸制剂中马钱苷和莫诺苷的含量分别测定已有文献[7], 但鲜见同时用马钱苷和莫诺苷两种成分来控制其药材质量的报道。本次实验不仅为考核栽培与野生山茱萸中马钱苷和莫诺苷的含量差异、用“栽培”代替“野生”提供了科学依据, 同时也提供了一种科学、快捷的山茱萸药材质量控制方法。

1 仪器与材料

[收稿日期] 2008-10-13

[基金项目] 山西省自然科学基金资助研究项目(2006011102)

[通讯作者] * 刘养清, Tel: (0351) 2272085, E-mail: soh2004@

163.com

1.1 仪器 高效液相色谱仪, 包括美国 DIONEX 全自动进样液相色谱仪, PDA 二极管阵列检测器, P680 四元泵, CTT-100ASVP 柱温箱系统控制器; FA/JA 万分之一电子分析天平(上海精密科学仪器有限公司); METTLER TOLEDO AB135-S 型十万分之一分析天平(上海天平仪器厂); SK250H 超声波清洗器(上海科导超声仪器有限公司)。

1.2 试剂和药材 马钱苷与莫诺苷对照品, 均购自芜湖貳尔塔医药公司。山茱萸药材为课题组自采样, 1 号: 山西省阳城县寺头乡(人工种植); 2 号: 山西省阳城县芹池镇(人工种植); 3 号: 山西省阳城县刘西村(人工种植); 4 号: 山西省阳城县莽河后庄一号(人工种植); 5 号: 山西省阳城县莽河后庄二号(人工种植); 6 号: 山西省阳城县莽河后庄三号(人工种植); 7 号: 山西省阳城县莽河杨庄河(野生); 8 号: 山西省阳城县莽河后庄村(野生); 9 号: 山西省阳城县莽河村(野生); 10 号: 山西省阳城县莽河后河北村(野生)。甲醇为色谱纯, 水为高纯水。

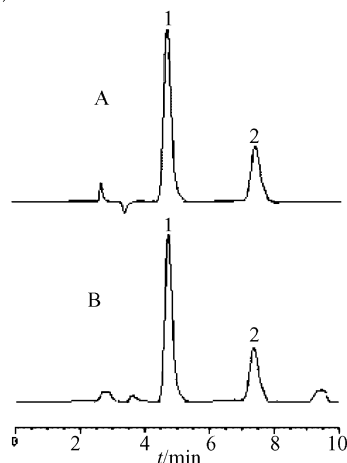


图 1 莫诺苷和马钱苷的 HPLC 图

A. 对照品; B. 样品; 1. 莫诺苷; 2. 马钱苷

2 方法与结果

2.1 色谱条件与检测方法 色谱柱: 迪马 C_{18} 柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m); 流动相: 甲醇-0.1% 醋酸水溶液(38: 62); 流速: 1.0 mL $\cdot$ min $^{-1}$; 检测波长: 马钱苷为 238 nm; 莫诺苷为 241 nm; 柱温: 30 $^{\circ}$ C; 进样量: 5 μ L。在所选择的色谱条件下, 两成分色谱峰分离度大于 1.5, 理论塔板数都大于 3 000, 结果见图 1。

2.2 对照品溶液的制备 精密称取马钱苷对照品 0.49 mg 置 2 mL 量瓶中, 用甲醇溶解并稀释至刻度。精密吸取上述溶液 100 μ L 置 1 mL 量瓶中定容, 配成 0.024 5 mg $\cdot$ mL $^{-1}$ 的马钱苷对照品溶液。

精密称取莫诺苷对照品 1.29 mg 置 2 mL 量瓶

中, 用甲醇溶解并稀释至刻度。精密吸取上述溶液 100 μ L 置 1 mL 量瓶中定容, 配成 0.064 5 mg $\cdot$ mL $^{-1}$ 的莫诺苷对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备 取山茱萸粗粉约 0.1 g, 精密称定, 置 10 mL 量瓶中, 加甲醇 10 mL, 室温超声 20 min, (250 W, 59 kHz) 过滤, 滤渣再加 8 mL 甲醇超声 15 min, 滤过, 合并两次滤液。将溶剂挥干后用甲醇定容至 5 mL 量瓶中, 静置。0.45 μ m 微孔过滤, 弃去初滤液, 取续滤液备用。

2.4 线性关系考察 取马钱苷和莫诺苷对照品溶液, 分别进样 1, 2, 5, 10, 15 μ L。按 2.1 项下的色谱条件进行测定, 以峰面积 Y 为纵坐标, 进样量 X (μ g) 为横坐标绘制标准曲线。马钱苷的回归方程为 $Y = 43.425X - 1.136 2$, $r = 0.999 7$, 线性范围为 (0.024 5 ~ 0.367 5) μ g。莫诺苷的回归方程为 $Y = 35.753X - 1.155 5$, $r = 0.999 9$, 线性范围为 (0.064 5 ~ 0.967 5) μ g。

2.5 精密度试验 分别精密吸取马钱苷和莫诺苷对照品溶液, 连续进样 6 次, 测定峰面积, 结果马钱苷和莫诺苷的 RSD 分别为 1.54%、1.75%, 表示精密度良好。

2.6 稳定性试验 精密吸取同一供试品溶液 5.0 μ L, 于 1, 2, 4, 6, 8, 10 h 时进样, 测定峰面积, 结果马钱苷和莫诺苷的 RSD 分别为 1.45%、1.30%, 表明供试品溶液在 10 h 内稳定。

2.7 重复性试验 取同一供试品 6 份, 按 2.3 项下的方法进行操作, 测得马钱苷和莫诺苷的 RSD 分别为 1.41%、1.57%, 表明方法重复性好。

2.8 加样回收率实验 取山茱萸样品粉末 6 份, 每份约 0.05 g, 精密称定, 置 10 mL 量瓶中, 分别加入马钱苷和莫诺苷对照品混合溶液, 按照 2.3 项下操作。精密吸取供试品溶液各 5 μ L, 注入色谱仪, 计算回收率。结果如表 1 和表 2。

表 1 马钱苷加样回收率试验结果 ($n = 3$)

编号	称样量 (g)	样品值 (mg)	加入量 (mg)	测得值 (mg)	回收率 (%)	平均回 收率 (%)	RSD (%)
1	0.050 0	0.186 5	0.096	0.093 4	97.29	100.19	2.10
2	0.0501	0.1869	0.096	0.0982	102.29		
3	0.0505	0.1884	0.096	0.0977	101.78		
4	0.0508	0.1895	0.192	0.1886	98.23		
5	0.0502	0.1872	0.192	0.1916	99.79		
6	0.0503	0.1876	0.192	0.1954	101.77		

表 2 莫诺昔加样回收率试验结果(n= 3)

编 号	称样量 (g)	样品值 (mg)	加入量 (mg)	测得值 (mg)	回收率 (%)	平均回 收率(%)	RSD (%)
1	0.050 1	1.518	0.744	0.740 7	99.56	98.46	1.93
2	0.050 0	1.515	0.744	0.729 5	98.05		
3	0.050 5	1.530	0.744	0.722 3	97.08		
4	0.050 8	1.539	1.488	1.516 0	101.89		
5	0.050 2	1.521	1.488	1.443 7	97.02		
6	0.050 3	1.524	1.488	1.445 9	97.17		

2.9 样品含量测定 精密吸取供试品溶液各 5.0 mL,按 2.1 项下的条件测定,结果见表 3。

表 3 栽培与野生山茱萸中马钱苷和莫诺昔含量

样品号	马钱苷 含量(%)	莫诺昔 含量(%)	莫诺昔/ 马钱苷(比值)
栽培 1 号	0.64	2.58	4.03
2 号	0.46	1.66	3.57
3 号	0.81	1.89	2.3
4 号	1.22	2.17	1.77
5 号	0.67	2.76	4.14
6 号	0.91	3.01	3.29
野生 7 号	0.08	1.79	23.86
8 号	0.38	8.92	2.35
9 号	0.80	1.56	1.94
10 号	0.37	3.03	8.12

3 结果分析

栽培山茱萸中马钱苷含量均值为 0.785%,莫诺昔含量均值为 2.345%;野生山茱萸中马钱苷含量均值为 0.407%,莫诺昔含量均值为 1.818%。此结果表明,从本实验所采样本的测试来看,栽培山茱萸马钱苷及莫诺昔含量均高于野生山茱萸。

4 讨论

分别采用甲醇-水(40:60),乙腈-水(15:85),甲

醇:0.1% HAc 为流动相。结果表明以甲醇-0.1% HAc(38:62)为流动相,莫诺昔和马钱苷两种成分分离效果最好。

曾使用过甲醇、乙醇、氯仿、正丁醇、石油醚、乙酸乙酯作溶剂,进行提取实验,经比较,甲醇提取的溶剂出峰面积较大且干扰少,故选择甲醇作为提取溶剂。

本次实验中栽培山茱萸比野生山茱萸的活性成分含量高的原因,可能是栽培山茱萸在水分、肥料、耕作、管理方面都比野生者及时、精心、优越得多,故活性成分含量较高。

本实验中多数情况下栽培山茱萸中莫诺昔含量是马钱苷含量的 1.77~ 4.14 倍;野生山茱萸中两者的比值是 1.94~ 23.86 倍。可见栽培山茱萸中莫诺昔和马钱苷比值变化很小,这个趋势提示栽培山茱萸中活性成分的含量较野生山茱萸中活性成分的含量稳定。

本次试验用科学的方法证明栽培山茱萸中马钱苷及莫诺昔含量均优于野生山茱萸;其质量可以用莫诺昔和马钱苷的含量进行控制,从而加大了山茱萸质量的可控性和稳定性,有助于山茱萸品种的规范化生产。

[参考文献]

[1] 李平,余象煜. 山茱萸果实的化学成分[J]. 中国野生植物资源,1990, (3): 13.

[2] 黄泰康,山茱萸. 常用中药成分与药理手册[M]. 北京:中国医药科技出版社,1994: 368.

[3] 赵世萍. 山茱萸化学成分和药理作用的研究进展[J]. 中草药,1997, 28(3): 87.

[4] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 一部,北京:化学工业出版社,2005: 20.

[5] 闫润红,任晋斌,倪艳,等. 山茱萸强心作用的实验观察[J]. 山西中医学院学报,2000, 1(2): 1.

[6] 闫润红,任晋斌,刘必旺. 山茱萸抗心律失常作用的实验研究,山西中医[J]. 2001, 17(5): 52.

[7] 张兰桐,李作平. HPLC 法测定山茱萸注射液中马钱素和莫诺昔的含量[J]. 天然产物研究与开发,1999, 11(4): 49.