

HPLC 法同时测定台湾市售女贞子中红景天苷、女贞子苷的含量

李元圆^{1,3}, 何玉铃^{2*}, 张永勋³

(1. 浙江医学高等专科学校 杭州 310053; 2. 弘光科技大学, 台中 43302; 3. 中国医药大学, 台中 40402)

摘要 目的: 采用反相高效液相色谱法同时测定台湾市售女贞子中红景天苷和女贞子苷的含量。方法: 以 Dikma inspire C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm 5 μm), 甲醇-水为流动相, 梯度洗脱, 流速 1.0 mL · min⁻¹, 柱温 30℃, 检测波长 220 nm。结果: 红景天苷在 1.8 ~ 58.5 mg · mL⁻¹ ($r = 0.9999$)、女贞子苷在 13.2 ~ 423.5 mg · mL⁻¹ ($r = 0.9999$) 范围内与峰面积呈良好线性关系; 平均加样回收率($n = 9$) 分别为 100.9% 和 98.3%。结论: 10 批台湾市售女贞子的含量测定结果表明, 该方法简便、快速, 重复性好, 为评价女贞子药材质量提供了参考。

关键词: 女贞子; 红景天苷; 女贞子苷; 高效液相色谱法; 含量测定

中图分类号: R917 文献标志码: A 文章编号: 0254-1793(2013)02-0230-04

HPLC simultaneous determination of salidroside, nuezhenide in Fructus Ligustri Lucidi from Taiwan market

LI Yuan-yuan^{1,3}, HO Yu-ling^{2*}, CHANG Yuan-shiun³

(1. Zhejiang Medical College, Hangzhou, Zhejiang 310053, China; 2. Hungkuang University, Taichung 43302, China; 3. China Medical University, Taichung 40402, China)

Abstract Objective: To establish a quantitative method for simultaneous determination of salidroside and nuezhenide in Fructus Ligustri lucidi. **Method:** The separation was performed on a Dikma inspire C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm 5 μm) at 30 °C with a gradient elution consisting of mobile phases A (water) and B (methanol) at a flow rate of 1.0 mL · min⁻¹. The detection wavelength was 220 nm. **Result:** The linear ranges of salidroside and nuezhenide were 1.8 - 58.5 mg · mL⁻¹ ($r = 0.9999$) and 13.2 - 423.5 mg · mL⁻¹ ($r = 0.9999$), respectively. The average recoveries ($n = 9$) of salidroside and nuezhenide were 100.9% and 98.3%, respectively. **Conclusion:** The established method was applied for the analysis of ten samples from Taiwan market, and the results indicate that the method is simple, rapid and reliable for quality evaluation of Fructus Ligustri lucidi.

Key words: Fructus Ligustri Lucidi.; salidroside; nuezhenide; HPLC; assay

女贞子(Fructus Ligustri Lucidi)为木犀科植物女贞 *Ligustrum lucidum* Ait. 的干燥成熟果实^[1], 主产于浙江、云南、贵州、广东等省。女贞子及其炮制品酒女贞子具有滋补肝肾、明目乌发的功效, 被中医视为养阴佳品, 在大陆及台湾地区广泛使用。现代研究表明女贞子具有抗氧化、抗炎、保肝、耐缺氧、降血糖、抗肿瘤等多种药理活性^[2-8]。其主要活性成分为裂环烯醚萜类的女贞子苷(nuezhenide)和苯乙醇苷类的红景天苷(salidroside)及三萜类的熊果酸等^[9], 其中裂环烯醚萜苷类成分在酒制后易水解生成次级苷红景天苷^[10], 具有免疫调节、抗衰老、保肝等活性^[11]。

近年来已有测定女贞子及其复方“二至丸”中相关成分的报道^[12-15]。但未见同时测定女贞子药材中红景天苷及女贞子苷的研究。中国药典 2010 年版一部和香港中药材标准分别以特女贞苷和红景天苷为指标成分对女贞子进行质量控制^[1,16], 表明红景天苷及裂环烯醚萜苷类的含量代表了女贞子药材的内在质量。本研究同时测定了女贞子药材中红景天苷及女贞子苷的含量, 该方法简便可靠、专属性强, 为全面评价女贞子药材质量提供了依据。

1 仪器与试剂

Waters Alliance e2695 系列高效液相色谱仪

* 通讯作者 Tel: (+886) 4-22030380; E-mail: elaine@sunrise.hk.edu.tw

(waters e2695 separations Module、2998 PDA Detector、HT-220A 柱温箱); METTLER AT201 型电子天平(十万分之一); Delta DC200H 数控超声波清洗器(功率 200 W 频率 40 kHz)。

对照品红景天苷、女贞子苷由上海中药标准化研究中心提供,纯度 $\geq 98\%$; 甲醇为色谱纯; 水为重蒸水; 其余溶剂为分析纯。

女贞子药材分别购于台北、台中、台南,经中国医药大学吴坤璋博士鉴定为女贞子 *Fructus Ligustri lucidi*。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱: Dikma Inspire C_{18} (250 mm \times 4.6 mm 5 μ m); 流动相: 以水为 A 相, 以甲醇为 B 相 梯度洗脱: 0-16 min, 17% B; 16-25 min, 17-35% B; 25-50 min, 35% B; 流速: 1 mL \cdot min $^{-1}$; 柱温为 30 $^{\circ}$ C; 检测波长为 220 nm; 进样量 10 μ L。此条件下红景天苷和女贞子苷的保留时间分别为 12.762 min、42.858 min。

2.2 对照品溶液的制备 精密称取对照品红景天苷 1.17 mg、女贞子苷 8.47 mg 置 10 mL 量瓶中, 以 80% 甲醇溶解并稀释至刻度, 制得红景天苷、女贞子苷浓度分别为 0.117 mg \cdot mL $^{-1}$ 、0.847 mg \cdot mL $^{-1}$ 的混合对照品储备液。

2.3 供试品溶液的制备 取本品粉末(三号筛) 0.2 g 精密称定, 置 50 mL 离心管中, 加入 80% 甲醇 10 mL, 超声提取 30 min, 离心 10 min (3000 \times g), 滤过, 滤液转移至 25 mL 量瓶中, 重复提取 1 次, 残渣以少量 80% 甲醇洗涤, 合并滤液。加 80% 甲醇至刻度, 摇匀, 以 0.45 μ m 微孔滤膜滤过, 即得。

2.4 检测限与定量限 以信噪比为 3:1 确定红景天苷、女贞子苷的检测限为 0.0760 mg \cdot mL $^{-1}$ 、0.225 mg \cdot mL $^{-1}$ 。以信噪比为 10:1 确定红景天苷、女贞子苷的定量限为 0.457 mg \cdot mL $^{-1}$ 、1.50 mg \cdot mL $^{-1}$, RSD 分别为 1.0%、1.9%。

2.5 线性关系 精密吸取混合对照品储备液适量, 配成系列浓度的对照品溶液。分别精密吸取 10 mL, 按上述色谱条件进样分析。以进样浓度 (X , mg \cdot mL $^{-1}$) 为横坐标, 峰面积积分值 (Y) 为纵坐标, 制作标准曲线, 得红景天苷、女贞子苷的回归方程分别为:

$$Y = 1.237 \times 10^4 X - 3.564 \times 10^3 \quad r = 0.9999$$

$$Y = 1.074 \times 10^4 X + 4.421 \times 10^3 \quad r = 0.9999$$

结果表明, 红景天苷和女贞子苷分别在浓度 1.8 ~ 58.5 mg \cdot mL $^{-1}$ 和 13.2 ~ 423.5 mg \cdot mL $^{-1}$ 与峰面

积积分值呈良好线性关系 ($n = 5$)。

2.6 精密度试验

日内精密度 ($n = 5$) 准确吸取同一供试品溶液 10 μ L 连续进样 5 次, 求得红景天苷、女贞子苷峰面积的 RSD 分别为 0.3%、0.2%。

日间精密度 ($n = 15$) 上述供试品分别测定 3 d, 每天测定 5 次, 求得红景天苷、女贞子苷峰面积的 RSD 分别为 0.5%、0.4%。

2.7 重复性试验 取同一样品(湖南) 6 份, 精密称定, 按“供试品溶液制备”项下操作, 在上述色谱条件下进样测定, 红景天苷、女贞子苷的平均含量分别为 0.283%、2.66%; RSD 分别为 1.4%、0.6%。

2.8 稳定性试验 准确吸取同一供试品溶液 10 mL, 分别在 0、1、2、4、8、12、24、36、48、72 h 进行测定, 红景天苷、女贞子苷峰面积的 RSD 分别为 0.6%、0.4%。表明, 样品在 72 h 内稳定。

2.9 加样回收率试验 取已知红景天苷、女贞子苷含量(0.291%、2.64%) 的女贞子药材粉末 9 份, 每份约 0.1 g, 精密称定, 分别精密加入高、中、低 3 个水平的红景天苷、女贞子苷标准品(红景天苷 0.334、0.263、0.215 mg, 女贞子苷 3.388、3.049、2.372 mg), 每个水平平行 3 份, 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 在上述色谱条件下进样测定, 计算回收率, 结果见表 1。红景天苷、女贞子苷的平均回收率 ($n = 9$) 分别为 100.9%、98.3%; RSD 分别为 2.9%、2.8%。

2.10 耐用性试验 对同一批样品按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 分别考察了不同流速、柱温、色谱柱条件下方法的耐用性。在流速分别为 0.9、1.0、1.1 mL \cdot min $^{-1}$ 时, 测得红景天苷、女贞子苷含量的 RSD 分别为 1.5%、0.1%。在柱温分别为 25、30、35 $^{\circ}$ C 时, 测得红景天苷、女贞子苷含量的 RSD 分别为 1.5%、0.9%。分别采用 Dikma Inspire C_{18} (250 mm \times 4.6 mm 5 μ m)、Alltech Alltima C_{18} (250 mm \times 4.6 mm 5 μ m)、Ascentis C_{18} (250 \times 4.6 mm 5 μ m) 色谱柱, 测得红景天苷、女贞子苷含量的 RSD 分别为 2.4%、0.4%。测定结果表明, 本文建立的女贞子药材中红景天苷、女贞子苷的含量测定方法具有较好的耐用性。

2.11 样品含量测定 按照本方法的测定条件, 分别测定 10 批女贞子药材样品, 每个批次平行 2 份, 每份样品平行进样 2 针, 以外标法计算样品中红景天苷、女贞子苷的含量, 结果见表 2。对照品和样品的色谱图见图 1。

表1 加样回收率试验考察结果($n=9$)

Tab 1 Recoveries of salidroside and nuezhenide in samples

化合物 (compound)	称样量 (sample weight) /g	含量 (content of sample) /mg	加入量 (added) /mg	测得量(measured quantity) /mg	回收率 (recovery) /%	平均回收率 (average recovery) /%	RSD /%
红景天苷 (salidroside)	0.1018	0.296	0.215	0.515	101.9	100.9	2.9
	0.1006	0.292	0.215	0.498	95.8		
	0.1003	0.291	0.215	0.511	102.3		
	0.1005	0.292	0.263	0.548	97.3		
	0.1019	0.296	0.263	0.567	103.0		
	0.0998	0.290	0.263	0.566	104.9		
	0.1018	0.296	0.334	0.629	99.7		
	0.1021	0.297	0.334	0.641	103.0		
	0.1020	0.296	0.334	0.630	100.0		
女贞子苷 (nuezhenide)	0.1018	2.69	2.37	4.95	95.4	98.3	2.8
	0.1006	2.66	2.37	5.02	99.6		
	0.1003	2.65	2.37	4.91	95.4		
	0.1005	2.65	3.05	5.72	100.7		
	0.1019	2.69	3.05	5.64	96.7		
	0.0998	2.64	3.05	5.53	94.8		
	0.1018	2.69	3.39	6.12	101.2		
	0.1021	2.70	3.39	6.09	100.0		
	0.1020	2.69	3.39	6.13	101.5		

表2 各批次女贞子药材中红景天苷和女贞子苷的含量($n=2$)

Tab 2 Contents of salidroside and nuezhenide in Fructus Ligustri lucidi.

编号 (sample No.)	采购地 (purchase place)	样品来源 (source)	药材含量(content) /%		
			红景天苷 (salidroside)	女贞子苷 (nuezhenide)	加和 (total)
1	台北(Taipei)	湖南(Hunan)	0.100	0.976	1.08
2	台北(Taipei)	湖南(Hunan)	0.291	2.62	2.91
3	新北(Xinbei)	安徽(Anhui)	0.190	3.51	3.70
4	桃园(Taoyuan)	湖北(Hubei)	0.0530	0.515	0.568
5	苗栗(Miaoli)	广东(Guangdong)	0.131	2.27	2.40
6	台中(Taizhong)	广东(Guangdong)	0.0960	0.294	0.390
7	台南(Tainan)	湖南(Hunan)	0.107	1.63	1.74
8	高雄(Gaoxiong)	江苏(Jiangsu)	0.0930	1.60	1.69
9	高雄(Gaoxiong)	广东(Guangdong)	0.0620	1.11	1.17
10	台东(Taidong)	安徽(Anhui)	0.242	1.85	2.09
平均值(average)			0.137	1.64	1.77

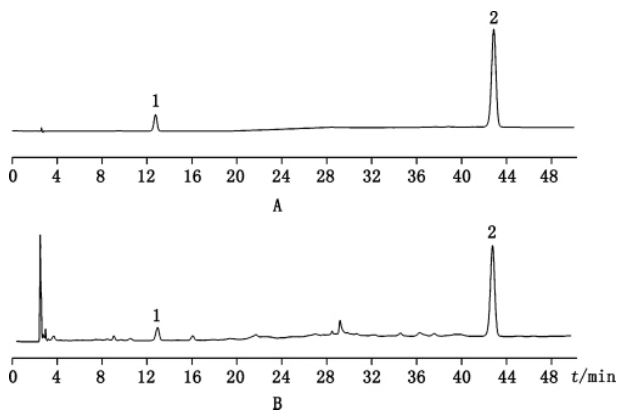


图1 女贞子对照品(A)供试品(B)色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms of reference substances(A) and Fructus Ligustri lucidi(2 Hunan)(B)

1. 红景天苷(salidroside) 2. 女贞子苷(nuezhenide)

3 讨论

3.1 指标成分的选择 近年来对女贞子水溶性化学成分裂环烯醚萜类和苯乙醇苷类的研究越来越受到重视^[17-18]。研究表明女贞子在酒制后其裂环烯醚萜苷类成分易水解生成次级苷红景天苷。而中国药典2010年版一部和香港中药材标准分别以特女贞苷和红景天苷为指标成分对女贞子进行质量控制,表明红景天苷及裂环烯醚萜苷类的含量代表了女贞子药材的内在质量。本文在研究过程中拟测定红景天苷、特女贞苷及女贞苷3个指标成分,但仅购买到红景天苷及女贞苷的对照品,因此,选择红景天苷和裂环烯醚萜苷类成分女贞子苷作为女贞子药材的含量测定指标成分,以期全面评价女贞子药材的质量。

3.2 检测波长的选择 红景天苷、女贞子苷的最大吸收波长分别为 220 nm 和 224 nm。在 220 nm 下两者均有较强的紫外吸收,故选择 220 nm 作为检测波长。

3.3 HPLC 色谱条件的优化 分别考察了乙腈-水系统、甲醇-水系统,结果发现甲醇-水系统有较好的色谱峰形及分离度。优化梯度洗脱条件后发现,在本文确定的洗脱条件下待测成分能获得较好的分离度,且能得到平稳的基线,因此选择此色谱洗脱条件。

3.4 供试品溶液制备方法考察 分别考察了乙醇、50% 乙醇、甲醇和 50%、60%、70%、80%、90% 甲醇为提取溶剂时红景天苷、女贞子苷的提取效率。结果表明 80% 甲醇的提取效率最高。以此溶剂考察了溶剂用量及超声提取次数,结果表明超声提取 2 次,每次 10 mL 即可提取完全,此法操作方便,重现性好。

3.5 小结 台湾市售女贞子药材主要来源于湖南、广东、江苏等省,有酒蒸制品和生品两种。10 批药材中 6 号和 9 号为酒蒸制品,其余各批次为生品。两批酒蒸制品中,红景天苷的含量较生品未见增加,可能与炮制工艺有关。10 批药材测定结果显示,女贞子药材中红景天苷、女贞子苷的含量无明显相关性,红景天苷、女贞子苷的总含量在 0.390% ~ 3.70%。不同批次药材间含量差异较大,其中桃源(湖北)、台中(广东) 2 批药材中红景天苷、女贞子苷的含量偏离平均值较多,其加和量仅为 0.568%、0.390%。因此,为了全面评价女贞子药材的质量,有必要同时测定红景天苷和女贞子苷的含量。

本文建立的女贞子药材 HPLC 含量测定法操作简便、快速准确、耐用性好,适用于女贞子药材炮制品和生品,为全面评价女贞子药材质量提供了参考。

参考文献

- 1 ChP(中国药典). 2010. Vol I (一部): 43
- 2 He ZD, But PPH, Chan TW *et al.* Antioxidative glucosides from the fruits of *Ligustrum lucidum*. *Chem Pharm Bull*, 2001, 49(6): 780
- 3 Yim TK, Wu WK, Pak WF, *et al.* Hepatoprotective action of an oleanolic acid-enriched extract of *Ligustrum lucidum* fruits is mediated through an enhancement on hepatic glutathione regeneration capacity in mice. *Phytother Res* 2001, 15(7): 589
- 4 Li Yang(李阳), Sun Wen-ji(孙文基). Pharmacological research progression of Fructus Ligustri Lucidi(女贞子的药理作用研究). *J Shaanxi Coll Tradit Chin Med*(陕西中医学院学报) 2006 29(5): 58
- 5 Shoemaker M, Hamilton B, Dairkee SH *et al.* *In vitro* anticancer activity of twelve Chinese medicinal herbs. *Phytother Res* 2005 19(7): 649
- 6 HAO Zhi-qi(郝志奇), HANG Bing-qian(杭秉茜). Hypoglycemic effect of Fructus Ligustri Lucidi(女贞子降血糖作用研究).

- China J Chin Mater Med*(中国中药杂志) 1992, 17(7): 429
- 7 FAN Qin-he(范秦鹤), HOU Ya-ling(侯雅玲), ZHU Ai-hua(朱爱华). Comparising the effects of different preparations of Fructus Ligustri Lucidi on enhancing white blood cell and anti-hypoxia ability(女贞子不同炮制品升高白细胞耐缺氧作用及毒性比较). *Northwest Pharm J*(西北药学杂志) 2004, 19(1): 20
- 8 Yim TK, Wu WK, Pak WF, *et al.* Hepatoprotective action of an oleanolic acid-enriched extract of *Ligustrum lucidum* fruits is mediated through an enhancement on hepatic glutathione regeneration capacity in mice. *Phytother Res* 2001, 15(7): 589
- 9 TONG Hui-juan(全会娟), HU Kui-wei(胡魁伟), KANG Chen(康琛) *et al.* The research progression of *Ligustrum lucidum* Ait in the last 15 years(近十五年中药女贞子研究进展). *China Pract Med*(中国实用医药) 2009 4(36): 1
- 10 ZHANG Xue-lan(张学兰), HOU Jie(侯杰), LI Hui-fen(李慧芬) *et al.* Effect of stewing time on the content of salidroside in *Ligustrum lucidum* Ait(炖制时间对女贞子中红景天苷含量的影响). *Mod Chin Med*(中国现代中药) 2009, 11(4): 35
- 11 CAO Xiao-gang(曹晓钢), YU Gang(于刚), WANG Li-jun(王立军). Progress on salidroside(红景天苷研究进展). *Food Drug*(食品与药品) 2007 9(7): 48
- 12 LÜ Shu-hua(吕曙华), WANG Qiang(王强), XIA Guang-cheng(夏光成) *et al.* Determination of oleanolic acid and ursolic acid in *Ligustrum lucidum* Ait. by HPLC(中药女贞子中齐墩果酸、熊果酸的高效液相色谱分析). *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志), 1993, 13(5): 291
- 13 ZHANG Li-hai(张立海), SONG You-hua(宋友华), SUN Chun-hua(孙春华) *et al.* Determination of salidroside in the Nüzhenzi by RP-HPLC(反相高效液相色谱法测定女贞子中红景天苷的含量). *Chin Pharm J*(中国药理学杂志) 2001 36(11): 760
- 14 HUANG Wen(黄雯), SU Zi-ren(苏子仁), BI Wen-chuan(毕文川) *et al.* HPLC determination of nuezhenide in Fructus Ligustri Lucidi.(HPLC 法测定女贞子药材中女贞苷的含量). *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志), 2009 29(5): 824
- 15 LI Ze-yun(李泽运), CHEN Xiao-hui(陈晓辉), MA Feng(马凤) *et al.* RP-HPLC simultaneous determination of salidroside, nuzhenide and wedelolactone in Erzhi pills(RP-HPLC 法同时测定二至丸中红景天苷、女贞子苷和蟛蜞菊内酯的含量). *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志) 2011 31(1): 19
- 16 Department of Health, the Government of the Hong Kong Special Administrative Region of the People's Republic of China(香港特别行政区卫生署). The Hong Kong Chinese Materia Standards(HKC-MMS) Volume III(香港中药材标准第三册) 2010. 89
- 17 WANG Dan(王丹), LÜ Ya-li(吕亚丽), LIU Chun-sheng(刘春生) *et al.* Content determination of total secoiridoid glucosides in Fructus Ligustri Lucid(女贞子中裂环环醚甙总苷的含量测定). *Pharm Care Res*(药学服务与研究) 2012, 12(1): 52
- 18 HUANG Wan(黄婉), YANG Yao-fang(杨耀芳). Pharmacological and clinical research progression of Privet Berry and its active ingredient(女贞子及其有效成分的药理及临床研究进展). *Mod J Integr Tradit Chin West Med*(现代中西医结合杂志) 2003, 12(7): 772

(本文于 2012 年 8 月 20 日收到)