

反相高效液相色谱法测定木香非药用部位药效成分含量*

史沁芳¹, 陈义娟¹, 张雪², 杨宪¹, 颜华³

(1. 重庆师范大学 生命科学学院, 重庆 401331; 2. 重庆医药高等专科学校 药学院, 重庆 401331;

3. 重庆市开州区林业科技推广站, 重庆 开州 405400)

摘要:【目的】建立通过反相高效液相色谱测定木香(*Ancklandia lappa*)非药用部位药效成分木香烯内酯和去氢木香内酯含量的方法。【方法】采用岛津 LC-15C 色谱仪和岛津 C18-WR 色谱柱(5.0 mm×150 mm, 4.6 μm);以乙腈-水($V_{乙腈} : V_{水} = 48 : 52$)为流动相,柱温为 30 ℃,流速为 1.0 mL·min⁻¹。【结果】木香烯内酯进样质量浓度(X_1)为 0.005 937 5~0.19 mg·mL⁻¹时,与峰面积(Y_1)的回归方程分别为 $Y_1 = 7 \times 10^7 X_1 + 61\ 685$ ($R^2 = 0.999\ 6$);去氢木香内酯进样质量浓度(X_2)为 0.003 75~0.12 mg·mL⁻¹时,与峰面积(Y_2)的回归方程分别为 $Y_2 = 1 \times 10^7 X_2 - 3\ 873.1$ ($R^2 = 0.999\ 3$);样品进样质量浓度在所测范围内与峰面积的线性关系良好。木香烯内酯和去氢木香内酯的平均回收率分别为 99.72% 和 99.88%,回收率相对标准偏差分别为 0.37% 和 0.25%。【结论】该方法具有简便、准确、快速、灵敏度高以及重复性和回收率好的特点,可为木香的综合开发利用提供依据。

关键词:反相高效液相色谱;木香烯内酯;去氢木香内酯;木香;非药用部位

中图分类号:R917

文献标志码:A

文章编号:1672-6693(2018)06-0112-05

菊科(Asteraceae)植物木香(*Ancklandia lappa*)又称广木香或云木香,为多年生草本^[1]。木香的干燥根具有行气止痛、健脾消食等诸多功效,是多种中药复方配方的重要原料药材;当前国内众多制药企业以之为原料,因而该植物具有很大的市场潜力^[2-4]。在重庆地区,人工栽培木香的历史较为悠久,栽植地点分布较广;而在渝东北地区,木香主要种植在海拔 1 500 m 以上的区域,其中开州区木香的种植面积为国内最大^[5-6]。在整个生长过程中,传统意义上的木香非药用部位的生物量占了相当大的部分。但截止目前,这些部分均没有被充分开发利用。而实验测定表明这些部位也含有一些药效成分,包括木香中所含的典型药效成分即木香烯内酯和去氢木香内酯,因此开展对木香非药用部分的相关研究很有必要。为此,本研究通过反相高效液相色谱法(Reversed-phase high performance liquid chromatography, RP-HPLC)建立了一套测定木香的非药用部位即基生叶、主茎叶、主茎和花蕾中木香烯内酯和去氢木香内酯的含量的方法体系,以便为木香的综合利用提供理论依据^[7-8]。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

本研究使用的主要仪器有岛津 LC-15C 色谱仪、岛津 C18-WR 色谱柱(5.0 mm×150 mm, 4.6 μm)、Mettler AE163 十万分之一电子天平和 KQ-1000 型超声波处理器(昆山市超声仪器有限公司生产)。木香烯内酯标准品(No. 111524-201710)、去氢木香内酯标准品(No. 111525-201711)由国家标准物质信息中心提供,甲醇和乙腈为色谱纯,其余试剂为分析纯,水为去离子水。

1.2 实验材料

木香药用部位块根和非药用部位基生叶、主茎、主茎叶及花蕾均来自重庆市开州区大进镇木香药材基地。

1.3 研究方法

1.3.1 对照品和供试品溶液制备 与药用部位相比,木香非药用部位药效成分含量较低,因此加大了供试品的称

* 收稿日期:2017-11-28 修回日期:2018-08-26 网络出版时间:2018-09-26 13:26

资助项目:重庆师范大学成果转化基金(No. 201612000671);重庆市林业重点科技项目(No. 2018-12);活性物质生物技术教育部工程研究中心资助项目(2018)

第一作者简介:史沁芳,女,研究方向为中药饲料添加剂,E-mail:619250064@qq.com;通信作者:杨宪,男,教授,博士,E-mail:464997677@qq.com

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1165.N.20180926.1326.042.html>

样量。经反复实验,除了将两种对照品溶液中木香烃内酯和去氢木香内酯质量浓度分别确定为 $0.002\ 969$, $0.001\ 875\ \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 以外,还确定了供试品溶液的制备方法,即:分别取木香药材(块根)、基生叶、主茎叶、主茎和花蕾样品粉末约 $5.0\ \text{g}$,精密称定,分别置于 $100\ \text{mL}$ 具塞锥形瓶中,均加入甲醇 $50\ \text{mL}$;然后经 $250\ \text{W}$, $35\ \text{kHz}$ 超声波处理 $30\ \text{min}$;待液体冷却后摇匀,过滤,取续滤液,加热挥干后加色谱级甲醇溶解并定容到 $25\ \text{mL}$,即为供试品溶液。

1.3.2 色谱条件的筛选 色谱柱、流动相、流速、柱温、进样量和检测波长参考《中华人民共和国药典 2015 年版一部》木香项下^[1],即:选用岛津 C18-WR 色谱柱($5.0\ \text{mm} \times 150\ \text{mm}$, $4.6\ \mu\text{m}$),流动相为甲醇-水($V_{\text{甲醇}}:V_{\text{水}}=65:35$),流速为 $1.0\ \text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$,柱温为 $30\ ^\circ\text{C}$,进样量为 $20\ \mu\text{L}$,木香烃内酯和去氢木香内酯检测波长均为 $225\ \text{nm}$ 。分别精密吸取对照品溶液与供试品溶液各 $20\ \mu\text{L}$,注入色谱仪进行检测。结果发现:木香烃内酯和去氢木香内酯对照品色谱峰峰形尖锐、对称性好;但非药用部位供试品中的木香烃内酯和去氢木香内酯色谱峰分离效果较差,与前后其他峰分离度小于 1.5 ,且基线也不能有效分离。因此,本研究对流动相进行了筛选。经过反复实验,当以乙腈-水($V_{\text{乙腈}}:V_{\text{水}}=48:52$)为流动相时,检测结果显示:木香烃内酯和去氢木香内酯对照品色谱峰峰形尖锐、对称性好(图 1a);供试品木香药材及木香非药用部位中的木香烃内酯和去氢木香内酯色谱峰对称性好,与前后其他峰分离度大于 1.5 ,达到基线分离(图 1b)。因此,本研究最终将流动相定为乙腈-水($V_{\text{乙腈}}:V_{\text{水}}=48:52$)而其他色谱条件不变,并对此方法进行方法学考察验证,同时采用此方法对木香各部位中的木香烃内酯和去氢木香内酯含量进行了测定。

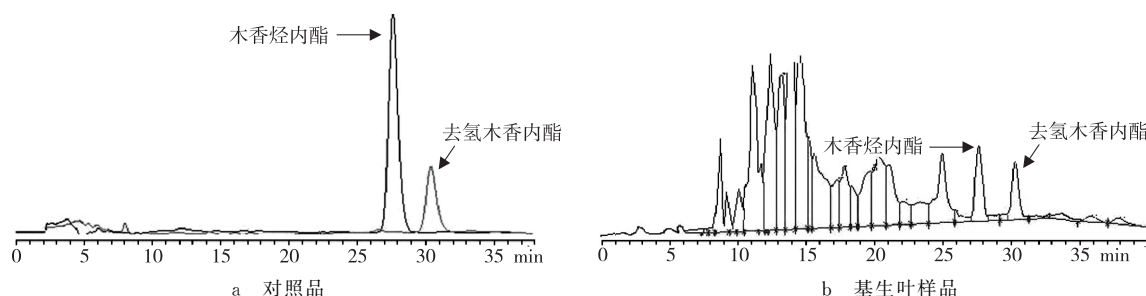


图 1 对照品和木香基生叶样品中木香烃内酯和去氢木香内酯在本研究确定色谱条件下的色谱图像

Fig. 1 Chromatogram of costunolide and dehydrocostus lactone in the control article and in basal leaves samples of *A. lappa* under the chromatographic condition established in the study

2 结果

2.1 线性范围考察

精密称取经减压干燥至恒质量的木香烃内酯 $0.001\ 9\ \text{mg}$,置 $10\ \text{mL}$ 容量瓶中,加入甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,作为母液。将母液依次稀释 $2, 4, 8, 16$ 和 32 倍,得到的溶液质量浓度依次为 $0.095, 0.047\ 5, 0.023\ 75, 0.011\ 875, 0.005\ 937\ 5\ \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$;分别依次注入色谱柱,按照拟定的色谱条件项进样并测定峰面积,结果见表 1。以木香烃内酯质量浓度(X_1)作为横坐标,峰面积(Y_1)作为纵坐标,绘制木香烃内酯标准曲线,得到线性回归方程: $Y_1 = 7 \times 10^7 X_1 + 61\ 685$ ($R^2=0.999\ 6$)。结果表明,去木香内酯质量浓度在 $0.005\ 937\ 5 \sim 0.19\ \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内线性关系良好。

精密称取经减压干燥至恒质量的去氢木香内酯 $0.001\ 2\ \text{mg}$,置 $10\ \text{mL}$ 容量瓶中,加入甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,作为母液。将母液依次稀释 $2, 4, 8, 16$ 和 32 倍,得到的溶液质量浓度依次

表 1 木香烃内酯和去氢木香内酯线性范围的考察

Fig. 1 Investigation on the linear range of costunolide and dehydrocostus lactone

木香烃内酯质量浓度 (X_1)/($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	峰面积(Y_1)	去氢木香内酯质量浓度 (X_2)/($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	峰面积(Y_2)
0.19	12 638 798	0.12	1 636 071
0.095	6 415 449	0.06	786 671
0.047 5	3 395 251	0.03	387 509
0.023 75	1 593 789	0.015	201 918
0.011 875	767 570	0.007 5	112 227
0.005 937 5	422 194	0.003 75	54 119

为 0.06, 0.03, 0.015, 0.007 5 和 0.003 75 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$; 分别依次注入色谱柱, 按照拟定的色谱条件项进样并测定峰面积, 结果入表 1 所示。以去氢木香内酯浓度(X_2)作为横坐标, 峰面积(Y_2)作为纵坐标, 绘制去氢木香内酯标准曲线, 得线性回归方程: $Y_2 = 1 \times 10^7 X_2 - 3\ 873.1$ ($R^2 = 0.999\ 3$), 表明去氢木香内酯质量浓度在 0.003 75~0.12 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内线性关系良好。

2.2 仪器精密度

分别取质量浓度为 0.011 875, 0.015 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的木香烯内酯和去氢木香内酯对照品溶液 20 μL , 均重复进样 6 次, 测定峰面积(表 2), 计算相对标准偏差。结果显示: 木香烯内酯的平均峰面积为 715 550, 峰面积相对标准偏差为 1.31%; 去氢木香内酯平均峰面积和峰面积相对标准偏差分别为 197 119 和 1.47%。上述结果表明仪器精密度良好。

2.3 供试品溶液稳定性

取同一供试品溶液, 分别于常温下放置 0, 2, 4, 6 和 8 h 后进样 20 μL , 测定峰面积(表 3)并计算相对标准偏差。计算得到不同放置时间下的木香烯内酯和去氢木香内酯峰面积的相对标准偏差分别为 1.87% 和 1.53%, 表明供试品溶液至少在 8 h 内稳定性良好。

2.4 供试品重复性

按本研究确定的供试品溶液制备方法, 用木香药材平行制备 6 份供试品溶液, 分别测定其中的木香烯内酯和去氢木香内酯含量(表 4)并计算相对标准偏差。计算结果显示, 6 份样品中木香烯内酯和去氢木香内酯质量分数的相对标准偏差分别为 2.83% 和 2.33%, 表明实验的重复性良好。

2.5 回收率

取已知木香烯内酯和去氢木香内酯质量分数分别为 0.021 51, 0.169 6 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 的木香基生叶样品(重庆市开州区产, 采集时间为 2017 年 9 月 20 日)6 份, 依次编为 1~6 号, 各约 2.5 g, 精密称定后分别加入 6 个 100 mL 锥形瓶中。另取木香烯内酯和去氢木香内酯适量, 按本研究确定的供试品溶液制备方法, 制备成回收供试品溶液, 使供试品溶液中含 6.908 75 mg 的木香烯内酯标准品和 56.6 mg 的去氢木香内酯标准品。按拟定的色谱条件, 各精密吸取 10 μL 注入色谱仪进行测定, 具体测定结果见表 5。采用公式计算两者的回收率。计算结果显示, 木香烯内酯和去氢木香内酯的平均加标回收率分别为 99.72%, 99.88%; 加标回收率相对标准偏差分别为 0.37%, 0.25%。

2.6 样品药用成分含量测定

按上述确定的研究方法对不同采收时期的木香非药用部位及药用部位中木香烯内酯和去氢木香内酯的含量进行了测定, 结果如表 6 所示。

3 讨论与结论

木香为多年生草本中药材, 在种植后第 3 年的 10 月份就可采集地下块根作为药用; 但木香的地上非药用部分如基生叶、主茎叶、主茎及花蕾目前为止还没被开发利用。这些非药用部分的单位产量较大, 也应被有效地加以利用。为此, 笔者在木香生长旺盛时期(7 月份)采集木香各个非药用部位, 然后在木香倒苗前的 9 月底又采集了木香各个非药用部位和药用部位, 采用 RP-HPLC 法, 并优化色谱条件, 测定了上述样品中的药效成分木香烯内酯和去氢木香内酯的含量。结果表明, 9 月底采集的木香各非药用部位中两种药效成分的含量明显较药用部位中的更低。对两次采样得到的样品进行比较, 可以发现: 7—9 月间, 木香基生叶的木香烯内酯含量略有下降, 而去氢木香内酯含量明显升高; 木香主茎叶和主茎的木香烯内酯和去氢木香内酯含量均明显下降; 木香花蕾中木香烯内酯和去氢木香内酯的含量则均有明显升高。该结果说明, 木香的非药用部位实际上存在一定含量的药效成分。鉴于木香的非药用部位还

表 2 仪器精密度实验结果

Fig. 2 Instrument precision test results

进样 次序	木香烯内 酯峰面积	去氢木香内 酯峰面积
第 1 次	726 420	200 625
第 2 次	727 088	195 234
第 3 次	716 509	195 025
第 4 次	707 022	193 477
第 5 次	709 589	198 858
第 6 次	706 673	199 499

表 3 供试品溶液稳定性实验结果

Fig. 3 Test solution stability test results

放置 时间/h	木香烯内 酯峰面积	去氢木香内 酯峰面积
0	4 961 353	3 125 390
2	4 914 414	3 135 888
4	4 930 268	3 165 237
6	5 129 120	3 232 405
8	5 068 244	3 220 343

表 4 重复性实验结果

Fig. 4 Repeatability test results

样品 编号	木香烯内酯 质量分数	去氢木香内 酯质量分数
1	0.929 1	2.393 9
2	0.864 1	2.402 0
3	0.866 8	2.424 5
4	0.872 3	2.475 9
5	0.901 8	2.546 3
6	0.891 1	2.466 7

兼具其他营养物质,可以探索将之用做饲喂家禽和牲畜的动物饲料添加剂,这将对木香非药用部位综合利用的一个重要方向。

表5 木香炔内酯和去氢木香内酯的加标回收率

Fig. 5 Scaling recovery of costunolide and dehydrocostus lactone

被测物	样品编号	样品质量/g	样品中被测物质量/mg	加标的被测物质量/mg	加标后被测物测得质量/mg	加标回收率/%
木香炔内酯	1	2.514 3	0.054 08	0.055 27	0.108 84	99.07
	2	2.532 4	0.054 47	0.055 27	0.109 76	100.03
	3	2.337 6	0.050 28	0.055 27	0.105 42	99.76
	4	2.498 1	0.053 73	0.055 27	0.108 76	99.56
	5	2.503 7	0.053 85	0.055 27	0.109 02	99.81
	6	2.543 2	0.054 70	0.055 27	0.110 02	100.08
去氢木香内酯	1	2.514 3	0.426 40	0.452 80	0.878 50	99.84
	2	2.532 4	0.429 40	0.452 80	0.880 30	99.57
	3	2.337 6	0.396 40	0.452 80	0.848 70	99.88
	4	2.498 1	0.423 60	0.452 80	0.877 50	100.24
	5	2.503 7	0.424 60	0.452 80	0.877 70	100.08
	6	2.543 2	0.431 30	0.452 80	0.882 60	99.68

综上所述,本研究采用岛津 LC-15C 色谱仪和岛津 C18-WR 色谱柱(5.0 mm×150 mm,4.6 μm),以乙腈-水($V_{\text{乙腈}}:V_{\text{水}}=48:52$)为流动相,柱温为 30 ℃,流速为 1.0 mL·min⁻¹,进样量为 20 μL,木香炔内酯和去氢木香内酯检测波长均为 225 nm;然后对木香药用及非药用部位的药效成分木香炔内酯和去氢木香内酯的含量进行了测定。研究结果表明,上述方法具有简便、准确、快速、灵敏度高以及重复性和回收率好的特点,可为木香的综合开发利用提供理论依据。

表6 不同采收时期木香各部位中木香炔内酯和去氢木香内酯的质量分数

Fig. 6 Mass fraction of costunolide and dehydrocostus lactone in all parts of *A. lappa* in different harvest time %

样品采集时间	样品名称	木香炔内酯	去氢木香内酯
2017-07-31	基生叶	0.000 254	0.001 166
	主茎叶	0.005 024	0.018 530
	主茎	0.002 331	0.004 958
	花蕾	0.000 000	0.000 000
2017-09-20	基生叶	0.002 151	0.016 960
	主茎叶	0.000 391	0.005 245
	主茎	0.001 268	0.003 136
	花蕾	0.001 012	0.014 250
	药材	0.824 300	2.289 000

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 2015 年版一部 [M]. 北京:中国医药科技出版社,2015.
State Pharmacopoeia Committee. Pharmacopoeia of Peoples' Republic of China, 2015 edition, part I [M]. Beijing: China Medical Science Press, 2015.
- [2] 魏华,彭勇,马国需,等. 木香有效成分及药理作用研究进展[J]. 中草药,2012,43(3):613-619.
WEI H, PENG Y, MA G X, et al. Advances in studies on active components of *Saussurea lappa* and their pharmacological actions [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2012, 43(3): 613-619.
- [3] 张杰,潘兴娇,罗静,等. 丛枝菌根真菌对云木香根产量及其木香炔内酯和去氢木香炔内酯含量的影响[J]. 中国药房,2017,28(16):2179-2182.
ZHANG J, PAN X J, LUO J, et al. Effects of arbuscular mycorrhizal fungi on the yield and contents of costunolide and dehydrocostus lactone in root of *Saussurea costus* [J]. China Pharmacy, 2017, 28(16): 2179-2182.
- [4] 刘正清. 不同产地和采收时间木香药材中木香炔内酯和去氢木香内酯的测定[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18

- (16): 116-118.
- LIU Z Q. Determination of costunolide and dehydrocostus lactone in aucklandiae radix produced in different areas and time by HPLC[J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2012, 18(16): 116-118.
- [5] 尹宏权, 付红伟, 华会明, 等. 云木香的化学成分[J]. 沈阳药科大学学报, 2006(10): 641-643.
- YIN H Q, FU H W, HUA H M, et al. Chemical constituents of *Saussurea lappa* C. B. Clarke[J]. Journal of Shenyang Pharmaceutical University, 2006(10): 641-643.
- [6] 姜泽静, 黄泽豪. GC-MS 法分析红木香药材根和果实中的挥发油成分[J]. 中国药房, 2017, 28(21): 2992-2993.
- JIANG Z J, HUANG Z H. Analysis of volatile oil from roots and fruits of *Kadsura longipedunculata* by GC-MS [J]. China Pharmacy, 2017, 28(21): 2992-2993.
- [7] 王永兵, 许华, 张玉凤. 木香药材的质量评价研究: HPLC 法测定木香中 2 种倍半萜内酯的含量[J]. 药物分析杂志, 2000, 20(6): 366-367.
- WANG Y B, XU H, ZHANG Y F. Quality evaluation of woody herbs: HPLC method for the determination of the wood species in China sesquiterpene lactone content [J]. Journal of Pharmaceutical Analysis, 2000, 20(6): 366-367.
- [8] 赵小民, 殷高彬. 不同产地木香中木香烯内酯和去氢木香内酯的 HPLC 测定[J]. 安徽医药, 2009, 13(6): 617-618.
- ZHAO X M, YIN G B. Determination of costunolide and dehydrocostus lactone in Radix Aucklandiae produced in different areas by HPLC [J]. Anhui Medical and Pharmaceutical Journal, 2009, 13(6): 617-618.

The Determination of Content of Medicinal Ingredients in the Non-Medicinal Parts of *Aucklandia lappa* by RP-HPLC

SHI Qinfang¹, CHEN Yijuan¹, ZHANG Xue², YANG Xian¹, YAN Hua²

(1. College of Life Sciences, Chongqing Normal University, Chongqing 401331;

2. School of Pharmacy, Chongqing Medical and Pharmaceutical College, Chongqing 401331;

3. Chongqing Kaizhou District Forestry Science and Technology Extension Station, Kaizhou Chongqing 405400, China)

Abstract: [Purposes] To establish a HPLC method for the determination of content of two kinds of medicinal composition, costunolide and dehydrocostus lactone, in the non-medicinal parts of *Aucklandia lappa* by RP-HPLC. [Methods] The costunolide and dehydrocostus lactone chromatographic experiments were performed on Shimadzu C18-WR column (5.0 mm×150 mm, 4.6 μm), the mobile phase was acetonitrile-aqueous solution (48:52); column temperature was 30 °C, the flow rate was 1.0 mL·min⁻¹. [Findings] The results showed that the linear response ranges ($n=6$) and linear equation of costunolide and dehydrocostus lactone were $Y_1=7\times 10^7 X_1+61\ 685$ (0.005 937 5~0.19 mg·mL⁻¹, $R^2=0.999\ 6$), and $Y_2=1\times 10^7 X_2-3\ 873.1$ (0.003 75~0.12 mg·mL⁻¹, $R^2=0.999\ 3$), respectively. The average recoveries of costunolide and dehydrocostus lactone were 99.72% and 99.22%, respectively; the RSD values of them were 0.37% and 0.25%, respectively. [Conclusions] The method has the characteristics of simplicity, accuracy, rapidity, high sensitivity, good repeatability and good recovery rate, and can provide a basis for comprehensive development and utilization of woody.

Keywords: RP-HPLC; costunolide; dehydrocostus lactone; *Aucklandia lappa*; non-medicinal parts

(责任编辑 方 兴)