

中图分类号: R917; R927 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2024)18-0063-03  
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2024.18.014



# 高效液相色谱法测定黑老虎根中内消旋二氢愈创木脂酸含量\*

杨伟业<sup>1</sup>, 曹春芽<sup>2</sup>, 金岸<sup>2</sup>, 蔡伟<sup>2</sup>, 吴卫华<sup>1,2Δ</sup>

(1. 徐州医科大学药学院, 江苏 徐州 221004; 2. 湖南医药学院药学院·中药合成生物学研究湖南省重点实验室, 湖南 怀化 418000)

**摘要:**目的 建立测定黑老虎根乙酸乙酯提取物(ET)及抗炎有效部位ET5中内消旋二氢愈创木脂酸(*meso*-DGA)含量的高效液相色谱法。方法 色谱柱为BDS Hypersil C<sub>18</sub>柱(150 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为0.1%甲酸水溶液-乙腈(梯度洗脱), 流速为1.0 mL/min, 检测波长为282 nm, 柱温为45 °C, 进样量为10 μL。结果 *meso*-DGA质量浓度在1.0~50.0 μg/mL范围内与峰面积线性关系良好( $R^2 = 0.9994, n = 6$ ); 精密性、稳定性、重复性试验结果的RSD均不大于2.0%; 平均加样回收率为100.08%, RSD为1.02% ( $n = 6$ )。结论 所建立的方法操作简便、重复性好、结果准确, 可用于测定黑老虎根ET及ET5中*meso*-DGA的含量。

**关键词:**黑老虎根; 内消旋二氢愈创木脂酸; 高效液相色谱法; 含量测定

## Determination of *meso*-Dihydroguaiaretic Acid in *Kadsura Coccinea* Root by HPLC

YANG Weiye<sup>1</sup>, CAO Chunya<sup>2</sup>, JIN An<sup>2</sup>, CAI Wei<sup>2</sup>, WU Weihua<sup>1,2</sup>

(1. School of Pharmacy, Xuzhou Medical University, Xuzhou, Jiangsu, China 221004; 2. School of Pharmaceutical Sciences, Hunan University of Medicine · Hunan Provincial Key Laboratory for Synthetic Biology of Traditional Chinese Medicine, Huaihua, Hunan, China 418000)

**Abstract: Objective** To establish a high-performance liquid chromatography method for determining the content of *meso*-dihydroguaiaretic acid (*meso*-DGA) in the ethyl acetate extract (ET) and anti-inflammatory active fraction ET5 of *Kadsura coccinea* root. **Methods** The chromatographic column was the BDS Hypersil C<sub>18</sub> column (150 mm × 4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was 0.1% formic acid aqueous solution - acetonitrile (gradient elution), the flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelength was 282 nm, the column temperature was 45 °C, the injection volume was 10 μL. **Results** The linear range of *meso*-DGA was 1.0 - 50.0 μg/mL ( $R^2 = 0.9994, n = 6$ ). The RSDs of precision, stability and repeatability tests were not greater than 2.0%. The average recovery rate of *meso*-DGA was 100.08%, with an RSD of 1.02% ( $n = 6$ ). **Conclusion** The established method is easy, repeatable and accurate, which can be used to determine the content of *meso*-DGA in ET and ET5 of *Kadsura coccinea* root.

**Key words:** *Kadsura coccinea* root; *meso*-dihydroguaiaretic acid; HPLC; content determination

黑老虎根为五味子科南五味子属植物黑老虎*Kadsura coccinea* (Lem.) A. C. Smith的干燥根, 主要分布于我国湖南、贵州、江西、福建、广西、广东、四川、云南等地<sup>[1]</sup>。其有行气活血、祛风止痛功效, 常用于风湿痹痛、痛经、腕腹疼痛、跌打损伤等症<sup>[2]</sup>。现代研究表明, 黑老虎具有抗炎、抗氧化等多种药理作用<sup>[3-10]</sup>。黑老虎根乙酸乙酯提取物(ET)与乙醇提取乙酸乙酯萃取物抗炎作用相似, 且前者进一步分离后的5号组分(ET5)抗炎活性更强, 初步确定为黑老虎根抗炎的主要有效部位<sup>[11]</sup>。本课题组在该有效部位中分离鉴定了1个含量较高的单体——内消旋二氢愈创木脂酸(*meso*-DGA)。研究显示, *meso*-DGA存在于黑老虎、五味子、三白草、肉豆蔻、红楠、冷饭藤<sup>[12-16]</sup>等多种植物中, 且具有抗炎<sup>[13]</sup>、

抗氧化<sup>[17]</sup>、抗肿瘤<sup>[17-18]</sup>和保肝<sup>[19]</sup>等多种作用。NAKANO等<sup>[20]</sup>报道, *meso*-DGA可抑制白细胞介素1β诱导的肝细胞一氧化氮生成。LI等<sup>[13]</sup>发现, 10 μmol/L剂量下, *meso*-DGA可显著降低佛波酯诱导脂多糖刺激的人急性单核细胞白血病细胞中白细胞介素6 mRNA的表达。但其在黑老虎提取物及抗炎有效部位中的含量未见报道。为此, 本研究中建立了测定黑老虎粗提取物及抗炎有效部位ET5 *meso*-DGA含量的高效液相色谱(HPLC)法。现报道如下。

## 1 仪器与试剂

### 1.1 仪器

AUW120D型电子天平(日本Shimadzu公司, 精度为0.01 mg); KQ-300DE型数控超声波清洗器(昆山

\*基金项目: 湖南省教育厅科学研究项目[20B414]。

第一作者: 杨伟业, 女, 在读硕士研究生, 研究方向为炎症与免疫药理学, (电子信箱)weiyeweiye@163.com。

Δ通信作者: 吴卫华, 男, 博士, 教授, 研究方向为中药资源开发, (电子信箱)wwh815@hotmail.com。

市超声仪器有限公司); Agilent 1260 型高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司, 配有二极管阵列检测器); U100 型快速制备液相色谱仪(常州三泰科技有限公司); MY-50 型打粉机(广州市场鹰医疗器械有限公司); SKM 型恒温电热套(山东鄞城华鲁电热仪器有限公司); RV3 eco 型旋转蒸发器(德国 IKA 公司); LGJ-10C 型冷冻干燥仪(四环福瑞科仪科技发展 <北京> 有限公司)。

## 1.2 试药

*meso*-DGA 对照品(课题组自制, 从黑老虎根中提取分离, 经核磁共振波谱仪、质谱仪、圆二色光谱仪和旋光仪等结构鉴定确定); 乙腈为色谱纯, 甲酸为分析纯, 水为屈臣氏蒸馏水。黑老虎根(湖南省怀化市通道黑老虎中药材专业合作社), 经湖南医药学院蔡伟教授鉴定为正品。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

色谱柱: BDS Hypersil C<sub>18</sub> 柱(150 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 0.1% 甲酸水溶液(A) - 乙腈(B), 梯度洗脱(0~15 min 时 80%A → 10%A, 15~16 min 时 10%A → 80%A, 16~22 min 时 80%A); 流速: 1.0 mL/min; 检测波长: 282 nm; 柱温: 45 °C; 进样量: 10 μL。

### 2.2 样品及溶液制备

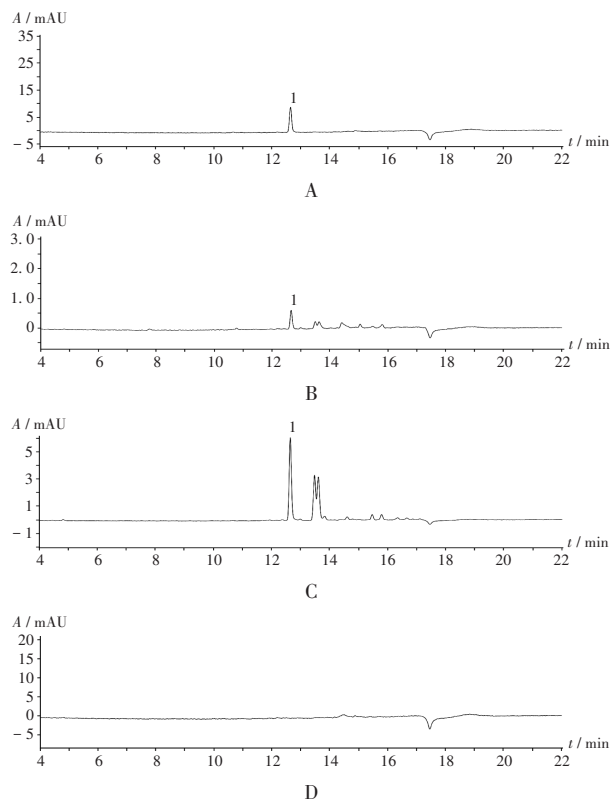
样品制备: 将黑老虎根置烘箱中, 50 °C 烘干<sup>[21]</sup>, 粉碎, 过 100 目筛。取 1.5 kg, 精密称定, 加 10 倍体积的乙酸乙酯, 于恒温加热套上 170 °C 加热回流 2 次, 滤过, 合并提取液, 真空旋蒸浓缩, 冷冻干燥, 即得 ET。用快速制备液相色谱仪进一步分离得 ET5, 冷冻干燥, 备用。

溶液制备: 取 *meso*-DGA 对照品适量, 精密称定, 加甲醇制成质量浓度为 1 mg/mL 的对照品溶液。取 ET 及 ET5 各 1 mg, 精密称定, 分别置离心管中, 精密加入 1 mL 甲醇, 在 30 °C 下超声(功率 300 W, 频率 40 kHz) 提取 30 min, 取上清液, 置离心管中, 10 000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 经 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得 ET 及 ET5 供试品溶液。以空白甲醇为空白对照溶液。

### 2.3 方法学考察

专属性试验: 取 2.2 项下 4 种溶液, 按 2.1 项下色谱条件进样测定, 记录色谱图。结果 *meso*-DGA 峰峰形对称, 与其他杂质峰分离良好, 且阴性对照无干扰。详见图 1。

线性关系考察: 取 2.2 项下对照品溶液适量, 加甲醇逐级稀释, 制成 *meso*-DGA 质量浓度分别为 1.0, 2.5, 5.0, 12.5, 25.0, 50.0 μg/mL 的系列对照品溶液, 按 2.1 项下色谱条件进样测定, 以待测成分质量浓度( $X$ , μg/mL) 为横坐标、峰面积( $Y$ ) 为纵坐标进行线性回归, 得回归方程  $Y = 7.9381X + 3.6535$  ( $R^2 = 0.9994$ ,  $n = 6$ )。结果表明, *meso*-DGA 的质量浓度在 1.0 ~



1. 内消旋二氢愈创木脂酸  
A. 对照品溶液 B, C. 供试品溶液(ET, ET5) D. 空白对照溶液  
图 1 高效液相色谱图  
1. *meso*-DGA  
A. Reference solution B, C. Test solution (ET, ET5) D. Blank reference solution

Fig. 1 HPLC chromatograms

50.0 μg/mL 范围内与峰面积线性关系良好。

精密密度试验: 精密吸取 2.2 项下对照品溶液(质量浓度为 5.0 μg/mL) 适量, 按 2.1 项下色谱条件连续进样测定 6 次, 记录峰面积。结果的  $RSD$  为 0.50% ( $n = 6$ ), 表明仪器精密密度良好。

稳定性试验: 取 2.2 项下 ET5 供试品溶液适量, 分别于室温下放置 0, 1, 3, 6, 9, 12 h 时按 2.1 项下色谱条件进样测定, 记录峰面积。结果的  $RSD$  为 0.28% ( $n = 6$ ), 表明供试品溶液室温放置 12 h 内基本稳定。

重复性试验: 取 ET5 样品适量, 共 6 份, 按 2.2 项下方法制备 ET5 供试品溶液, 按 2.1 项下色谱条件进样测定, 记录峰面积, 并计算样品含量。结果 *meso*-DGA 的平均含量为  $(16.69 \pm 0.002)\%$ ,  $RSD$  为 1.49% ( $n = 6$ ), 表明方法重复性良好。

加样回收试验: 取已知含量的 ET5 样品 0.12 mg, 精密称定, 置离心管中, 精密加入 *meso*-DGA 溶液(质量浓度为 1 mg/mL) 21.0 μL 和甲醇 854 μL, 按 2.2 项下方法制备 ET5 供试品溶液, 按 2.1 项下色谱条件进样测定, 记录峰面积, 并计算加样回收率。结果见表 1。

表1 加样回收试验结果(n=6)

Tab. 1 Results of the recovery test (n = 6)

样品含量(mg)	加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	$\bar{X}$ (%)	RSD(%)
0.0211	0.0210	0.0422	100.48	100.08	1.02
0.0210	0.0210	0.0420	100.00		
0.0210	0.0210	0.0419	99.52		
0.0211	0.0210	0.0419	99.05		
0.0212	0.0210	0.0421	99.52		
0.0214	0.0210	0.0428	101.90		

## 2.4 样品含量测定

分别取ET及ET5样品适量,按2.2项下方法制备供试品溶液,按2.1项下色谱条件进样测定,平行3次,记录色谱图,并计算平均含量。结果ET及ET5样品中meso-DG平均含量分别为(1.72 ± 0.01)%和(16.83 ± 0.16)%。

## 3 讨论

本研究中,meso-DGA在282 nm波长处信号响应较好,且峰形良好,基线平稳,故以此作为检测波长。同时,考察了不同溶剂(甲醇、乙腈)、不同酸(甲酸和乙酸)及其不同百分含量(0.1%, 0.5%, 1%)对meso-DGA的分离效果的影响,结果表明,采用0.1%甲酸水-乙腈溶液作为流动相时,meso-DGA的峰形和分离效果较好。为进一步优化色谱峰的分离效果,对柱温(25, 30, 35, 40, 45, 50 °C)进行了单因素考察,结果表明,45 °C时分离效果最好。本研究中,黑老虎根ET5中meso-DGA含量明显高于ET。提示ET5中meso-DGA高度富集,且meso-DGA为黑老虎根ET及ET5的主要成分,故可将其作为黑老虎根及其抗炎有效部位的质控指标。但黑老虎根及其抗炎有效部位还存在多种抗炎成分,故需对此进行进一步研究。

综上所述,本研究所建方法专属性强,精密度、稳定性、重复性好,可为黑老虎根的定性分析、质量控制及产品开发提供参考。

## 参考文献

[1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志:第三十卷第一分册[M]. 北京:科学出版社,1996:234-236.  
[2] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草:第六卷[M]. 上海:上海科学技术出版社,1999:895-896.  
[3] ZHANG XY, WEI ZJ, QIAO WL, et al. Discovery of cyclooxygenase-2 inhibitors from *Kadsura coccinea* by affinity ultrafiltration mass spectrometry and the anti-inflammatory activity[J]. *Fitoterapia*, 2021, 151: 104872.  
[4] YANG YP, JIAN YQ, LIU YB, et al. Heilaohuacid G, a new triterpenoid from *Kadsura coccinea* inhibits proliferation, induces apoptosis, and ameliorates inflammation in RA-FLS and RAW 264.7 cells via suppressing NF-κB pathway [J].

*Phytother Res*, 2022, 36(10): 3900-3910.

[5] 左毅成. 黑老虎提取物及抗氧化、抑菌效果研究[D]. 长沙:中南林业科技大学,2022.  
[6] 李亚军,黄国保,全海燕,等. 黑老虎叶总黄酮提取工艺及其抗氧化活性研究[J]. *广西植物*, 2020, 40(9): 1381-1388.  
[7] 汤立洁. 黑老虎化学成分、质量控制及其果实的抗氧化性研究[D]. 南宁:南宁师范大学,2020.  
[8] 杨赛男,戴斌,潘清平,等. 黑老虎植物资源利用研究进展[J]. *湖南生态科学学报*, 2022, 9(3): 112-120.  
[9] 徐卫权,李艳. 冷饭团对肝纤维化大鼠肝组织 Bcl-2 和 Bax 及 PCNA 表达的影响[J]. *医药导报*, 2019, 38(2): 163-166.  
[10] 范玉梅,赵明,赵媛,等. 黑老虎根提取物调控微小 RNA-193 对肝星状细胞 HSC-T6 增殖凋亡的影响[J]. *安徽医药*, 2022, 26(7): 1296-1300.  
[11] 孙雅慧,董金金,曹春芽,等. 黑老虎抗炎有效部位筛选及机制研究[J]. *中药新药与临床药理*, 2022, 33(12): 1589-1598.  
[12] 孙雅慧,曹春芽,金岸,等. 黑老虎木脂素化学成分及药理作用研究进展[J]. *天然产物研究与开发*, 2022, 34(3): 491-504.  
[13] LI B, QIAO LS, XIAO Q, et al. Effects of diarylbutane lignans from *Schisandra chinensis* fruit on SARS-CoV-2 3CL<sup>pro</sup> and PL<sup>pro</sup> and their in vitro anti-inflammatory properties [J]. *Phytomed Plus*, 2023, 3(2): 100432.  
[14] CHEN HJ, JI T, CHEN JW, et al. Matrix solid-phase dispersion combined with hplc-dad for simultaneous determination of nine lignans in *Saururus chinensis* [J]. *J Chromatogr Sci*, 2019, 57(2): 186-193.  
[15] 马立宇,黄剑坚. 乡土树种红楠的研究进展及开发应用前景[J]. *防护林科技*, 2019(6): 66-68.  
[16] 张进,王志明,刘可春,等. 冷饭藤化学成分及其毒性评价的研究[J]. *药学学报*, 2014, 49(9): 1296-1303.  
[17] HA MT, VU NK, TRAN TH, et al. Phytochemical and pharmacological properties of *Myristica fragrans* Houtt.: an updated review [J]. *Arch Pharm Res*, 2020, 43(11): 1067-1092.  
[18] CHOI MS, JEONG HJ, KANG TH, et al. Meso-dihydroguaiaretic acid induces apoptosis and inhibits cell migration via p38 activation and EGFR/ Src/ integrin β3 downregulation in breast cancer cells [J]. *Life Sci*, 2015, 141: 81-89.  
[19] SIM WC, PARK S, LEE KY, et al. LXR-α antagonist meso-dihydroguaiaretic acid attenuates high-fat diet-induced nonalcoholic fatty liver [J]. *Biochem Pharmacol*, 2014, 90(4): 414-424.  
[20] NAKANO Y, NASU M, KANO M, et al. Lignans from guaiac resin decrease nitric oxide production in interleukin 1β-treated hepatocytes [J]. *J Nat Med*, 2017, 71(1): 190-197.  
[21] 郭霞,陆文,李善志,等. 不同种源黑老虎根茎中总木脂素含量分析及综合评价[J]. *热带林业*, 2020, 48(1): 8-10.  
(收稿日期:2023-09-06;修回日期:2024-05-28)