

HPLC法同时测定蒙药复方肉豆蔻五味中2种木脂素类成分的含量[△]

朱小玲^{1,2*},董玉^{1#},孙国园¹(1.内蒙古医科大学药学院,呼和浩特 010059;2.内蒙古国际蒙医医院药学部,呼和浩特 010065)

中图分类号 R284.1;R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)18-2538-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.18.31

摘要 目的:建立同时测定蒙药复方肉豆蔻五味中2种木脂素类成分[去氢二异丁香油酚和2,3-二氢-7-甲氧基-2-(3,4-亚甲二氧基苯基)-3-甲基-5-(*E*)-丙烯基-苯并二氢呋喃(简称为:木脂素类成分2号)]含量的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为Elite C₁₈,流动相为水-甲醇(梯度洗脱),流速为1.0 ml/min,柱温为30℃,检测波长为225 nm,进样量为20 μl。结果:去氢二异丁香油酚、木脂素类成分2号进样量分别在0.202~2.02、0.204~2.04 μg范围内与其峰面积呈良好的线性关系($r=0.999\ 9$ 、 $0.999\ 9$);精密性、稳定性、重复性试验的RSD<2%;平均加样回收率分别为101.54%、99.43%,RSD分别为0.60%、1.09%($n=6$)。结论:该方法简便、灵敏、准确,可用于蒙药复方肉豆蔻五味中去氢二异丁香油酚和木脂素类成分2号的含量测定。

关键词 复方肉豆蔻五味;去氢二异丁香油酚;2,3-二氢-7-甲氧基-2-(3,4-亚甲二氧基苯基)-3-甲基-5-(*E*)-丙烯基-苯并二氢呋喃;高效液相色谱法

Content Determination of the 2 Lignan Components in Mongolian Medicine Compound Nutmeg-5 by HPLC

ZHU Xiao-ling^{1,2}, DONG Yu¹, SUN Guo-yuan¹(1.College of Pharmacy, Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010059, China; 2.Dept. of Pharmacy, Inner Mongolia International Mongolian Hospital, Hohhot 010065, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the determining contents of 2 lignan components[dehydrodiisoeugenol and 2,3-dihydro-7-methoxy-2-(3,4-methylenedioxyphenyl)-3-methyl-5-(*E*)-propenyl-benzofuran (referred to "lignanoid 2")]. METHODS: HPLC method was adopted. The column was Elite C₁₈ with the mobile phase of water-methanol (gradient elution) at the flow rate of 1.0 ml/min; the detection wavelength was 225 nm and the column temperature was 30℃. The sample size was 20 μl. RESULTS: There was a good linear relationship between sample quantity and the peak area in the range of 0.202-2.02 μg($r=0.999\ 9$) and 0.204-2.04 μg($r=0.999\ 9$) for 2 lignan components. The RSD of precision, stability and repeatability tests were less than 2% with the average recovery of 101.54% (RSD=0.60%, $n=6$) and 99.43% (RSD=1.09%, $n=6$). CONCLUSIONS: The method is simple, sensitive and accurate, and can be used for the quantization determination of dehydrodiisoeugenol and lignanoid 2 in nutmeg-5.

KEYWORDS Nutmeg-5; Dehydrodiisoeugenol; 2,3-dihydro-7-methoxy-2-(3,4-methylenedioxyphenyl)-3-methyl-5-(*E*)-propenyl-benzofuran; HPLC

蒙药复方肉豆蔻五味收载于《中华人民共和国卫生部药品标准》(蒙药分册),处方由肉豆蔻100 g、木香80 g、土木香80 g、广枣50 g、葶苈10 g组成,用于治疗心烦失眠、心神不安,对心“赫依”病(可出现心悸、心慌、胸胀、心烦不安、唉声叹气、

头昏目赤等症)尤为有效,为蒙医临床常用药品^[1]。许海杰等^[2]对复方肉豆蔻五味中各味药材的主要化学成分及药理作用进行了系统的归纳总结。王旭梅等^[3]对该药中肉豆蔻、广枣、葶苈进行定性鉴别,并对其中没食子酸的含量进行定量测

[9] 冯向东,黄海欣,高光伟,等.HPLC-ELSD测定心宁片中三七皂苷R₁、人参皂苷R_g、人参皂苷R_b的含量[J].中成药,2007,29(12):1786.

△ 基金项目:内蒙古自治区自然科学基金面上项目(No.2013JQ03);内蒙古自治区高等学校“青年科技英才计划”项目(No.NJYT-14-A12)

* 药师,硕士。研究方向:中蒙药(复方)有效物质基础研究及药物创新。电话:0471-5182280。E-mail:zhuxiaoling519@126.com

通信作者:教授,博士。研究方向:中蒙药(复方)有效物质基础研究及药物创新。电话:0471-6653084。E-mail:dongyu010@126.com

[10] 单玉,白鹏.心宁片中芍药苷含量测定[J].辽宁中医药大学学报,2009,11(7):179.

[11] 康博欣,王冬梅,王强,等.RP-HPLC法同时测定心宁片中芍药苷、阿魏酸和芦丁的含量[J].沈阳药科大学学报,2008,25(8):656.

[12] 周滢,杨军宣.不同厂家川芎配方颗粒中阿魏酸含量比较[J].医药导报,2014,33(7):947.

(收稿日期:2014-10-23 修回日期:2015-04-22)

(编辑:陈宏)

定。本课题组前期对该药中具有心血管药理作用的酯类成分进行测定^[4]。在此基础上,本课题组对前期试验^[6]分离纯化得到的木脂素类成分,即去氢二异丁香油酚和2,3-二氢-7-甲氧基-2-(3,4-亚甲二氧基苯基)-3-甲基-5-(*E*)-丙烯基-苯并二氢呋喃(简称为:木脂素类成分2号)进行含量测定,以全面控制该药的质量。

1 材料

1.1 仪器

1260型高效液相色谱(HPLC)仪,包括DEACB06007梯度泵、DEAAC 21236自动进样器、DEAAX04861检测器、JPAAJ82372柱温箱、DEACN22944化学工作站(美国Agilent公司);AB135-S型超声波清洗仪(昆山市超声仪器有限公司);BS224S型电子分析天平(北京赛多利斯仪器系统公司)。

1.2 药品与试剂

去氢二异丁香油酚、木脂素类成分2号对照品由本课题组从复方肉豆蔻五味中分离、纯化得到,经紫外光谱(UV)、核磁共振氢谱(¹H-NMR)、核磁共振碳谱(¹³C-NMR)、质谱(MS)分析鉴定结构;经1260型HPLC仪二极管阵列(DAD)检测器进行峰纯度检测,纯度分别为99.99%、99.93%;用面积归一化法计算纯度分别为99.78%、99.46%。复方肉豆蔻五味由本课题组制备,所用各味药材均由安国市康达中药材有限公司提供,分方法学考察用[肉豆蔻(批号:201008018)、木香(批号:201008018)、土木香(批号:201008015)、广枣(批号:201008018)、荜茇(批号:20100508)均产于广东]和含量测定用[第一批(肉豆蔻产于广西,批号:20110708;木香产于云南,批号:20110911;土木香产于河北,批号:20111015;广枣产于安徽,批号:20110921;荜茇产于广东,批号:20110808);第二批(肉豆蔻产于广东,批号:20120711;木香产于四川,批号:20121001;土木香产于河北,批号:20121025;广枣产于福建,批号:20120911;荜茇产于广东,批号:20120903);第三批(肉豆蔻产于广西,批号:20120728;木香产于云南,批号:20120911;土木香产于四川,批号:20121125;广枣产于广东,批号:20121007;荜茇产于云南,批号:20120828)],经我院乔俊缠教授鉴定为真品。甲醇为色谱纯(美国Sigma公司),水为纯净水(杭州娃哈哈集团),其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Elite C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:水(A)-甲醇(B),梯度洗脱(0~15 min, 70% B→70% B; 15~20 min, 70% B→75% B; 20~40 min, 75% B→90% B);流速:1.0 ml/min;柱温:30 ℃;检测波长:225 nm;进样量:20 μl。

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液 精密称取去氢二异丁香油酚对照品5.05 mg、木脂素类成分2号对照品5.10 mg同时置于10 ml量瓶中,甲醇溶解并定容,摇匀,吸取5 ml至25 ml量瓶中,以甲醇定容至刻度,即得混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 精密称取复方肉豆蔻五味4 g(含肉豆蔻1.250 0 g,木香1.000 0 g,土木香1.000 0 g,广枣0.625 0 g,荜茇0.125 0 g),用10倍量95%乙醇提取2次,每次2 h,合并滤液,至旋转蒸发仪减压浓缩后,用95%乙醇转移并定容至25 ml量

瓶中,吸取5 ml提取液,用95%乙醇定容至25 ml量瓶中,摇匀后用0.45 μm微孔滤膜滤过,取续滤液,即得供试品溶液。

2.2.3 缺肉豆蔻阴性对照溶液 照处方量制备缺肉豆蔻的阴性样品,按“2.2.2”项下方法制备阴性对照溶液。

2.2.4 空白样品溶液 不称取复方肉豆蔻五味样品,而直接量取95%乙醇,按“2.2.2”项下方法制备,即得空白样品溶液。

2.3 系统适用性试验

分别取“2.2”项下混合对照品溶液、供试品溶液、缺肉豆蔻阴性对照溶液、空白样品溶液各适量,按“2.1”项下色谱条件依次进样测定。结果表明,在“2.1”项色谱条件下去氢二异丁香油酚、木脂素类成分2号与其他组分色谱峰可完全分离。缺肉豆蔻阴性对照和空白样品溶液对2种木脂素类成分的测定均无干扰,色谱详见图1。

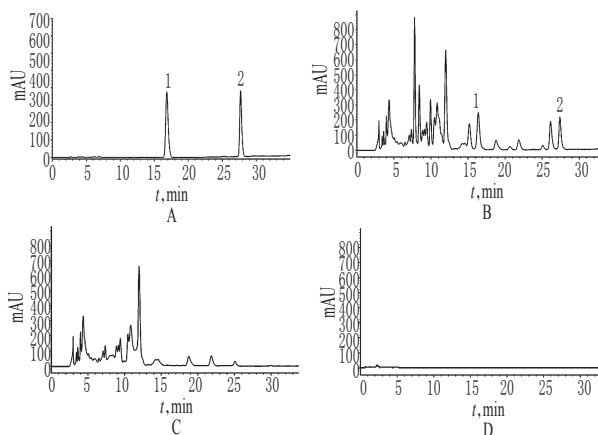


图1 高效液相色谱图

A.混合对照品;B.供试品;C.缺肉豆蔻阴性对照;D.空白样品;1.去氢二异丁香油酚;2.木脂素类成分2号

Fig 1 HPLC chromatograms

A.mixed reference; B.test samples; C.negative control without nutmeg; D.blank sample; 1.dehydrodiisoeugenol; 2.lignanoid 2

2.4 线性关系考察

精密吸取“2.2.1”项下混合对照品溶液2、6、10、12、16、20 μl,分别在“2.1”项色谱条件下进行分析,以溶液的进样量($x, \mu\text{g}$)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标绘制标准曲线,得去氢二异丁香油酚回归方程为 $y=8\ 029.901\ 92x+255.228\ 97$ ($r=0.999\ 9$);木脂素类成分2号回归方程为 $y=6\ 603.060\ 29x+219.699\ 69$ ($r=0.999\ 9$)。结果表明,去氢二异丁香油酚、木脂素类成分2号的进样量分别在0.202~2.02、0.204~2.04 μg范围内与其峰面积呈良好的线性关系。

2.5 精密度试验

精密吸取“2.2.1”项下混合对照品溶液5.0 μl,连续进样6次测定。结果,去氢二异丁香油酚、木脂素类成分2号峰面积的RSD分别为0.071%、0.17%,表明仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验

取复方肉豆蔻五味(方法学考察用)适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,分别于放置0、4、8、16、20、24 h时进样测定。结果,去氢二异丁香油酚、木脂素类成分2号峰面积的RSD分别为1.24%、1.23%,表明供试品溶液24 h内稳定性良好。

2.7 重复性试验

取复方肉豆蔻五味(方法学考察用)适量,按“2.2.2”项下方法平行制备供试品溶液6份,在“2.1”项色谱条件下测定,记录峰面积,并计算含量。结果,去氢二异丁香油酚、木脂素类成分2号平均质量分数分别为0.063 59%、0.063 33%,RSD分别为1.39%、1.38%,表明本方法重复性较好。

2.8 加样回收率试验

表1 加样回收率试验结果(n=6)

Tab 1 Results of recovery test(n=6)

成分	称样量,g	样品含量,mg	加入量,mg	测得量,mg	加样回收率,%	平均加样回收率,%	RSD,%
去氢二异丁香油酚	2.000 1	1.271 9	1.262 5	2.548 1	101.09	101.54	0.60
	2.000 0	1.271 8	1.262 5	2.561 0	102.11		
	2.000 2	1.271 9	1.262 5	2.565 3	102.45		
	2.000 2	1.271 9	1.262 5	2.550 8	101.30		
	1.999 9	1.271 7	1.262 5	2.552 1	101.42		
	2.000 2	1.271 9	1.262 5	2.545 5	100.88		
木脂素类成分2号	2.000 1	1.266 7	1.275 0	2.544 1	100.19	99.43	1.09
	2.000 0	1.266 6	1.275 0	2.517 1	98.08		
	2.000 2	1.266 7	1.275 0	2.546 5	100.38		
	2.000 2	1.266 7	1.275 0	2.521 3	98.40		
	1.999 9	1.266 5	1.275 0	2.549 0	100.59		
	2.000 2	1.266 7	1.275 0	2.528 6	98.97		

取3批复方肉豆蔻五味(含量测定用)各适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,精密吸取20 μl进样,记录峰面积,按标准曲线法测定其中去氢二异丁香油酚、木脂素类成分2号的质量分数,结果详见表2。由表2可见,复方肉豆蔻五味中去氢二异丁香油酚的含量高于木脂素类成分2号,且2种木脂素类成分的质量分数均大于0.07%。

表2 不同批次样品含量测定结果(n=3,%)

Tab 2 Results of determination of samples with different batches(n=3,%)

批次	去氢二异丁香油酚		木脂素类成分2号	
	质量分数	RSD	质量分数	RSD
第1批	0.082	0.57	0.075	1.62
第2批	0.087	0.18	0.081	1.17
第3批	0.080	0.39	0.072	0.86

3 讨论

3.1 测定成分的选择

木脂素是一类基本结构由苯丙素组成的多聚体,具有多种生物活性。杨秀伟等^[6]从肉豆蔻中分离得到多种新木脂素类化合物。本课题组前期从复方肉豆蔻五味中分离得到去氢二异丁香油酚和木脂素类成分2号2种木脂素类成分。相关文献^[7-8]报道去氢二异丁香油酚具有抗氧化和抗炎作用,木脂素类成分2号具有抗氧化作用。以上2种物质均具有苯并呋喃结构骨架,属于苯并呋喃类木脂素。该类木脂素具有多种生理活性,如抗增殖、抗血管生成、抗血栓、抗氧化、抗肿瘤以及心血管方面的活性^[9],故其进一步研究、开发与应用具有广阔的前景。而为保障科研工作的顺利进行需要对其含量进行测定,为后续研究奠定物质基础。王莹等^[10]在肉豆蔻中新木脂素类化合物的定量分析中对去氢二异丁香油酚进行测定,但色谱条件复杂。并且,目前仍未见关于木脂素类成分2号含量测定的报道。为此,本试验建立了同时测定肉豆蔻-5中去氢

精密称取6份已知质量分数的样品(方法学考察用)粉末2 g,加入去氢二异丁香油酚(质量浓度为0.505 mg/ml)和木脂素类成分2号(质量浓度为0.51 mg/ml)的混合对照品溶液2.5 ml,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,分别精密吸取6份供试品溶液各20 μl,在“2.1”项色谱条件下进样测定,计算加样回收率及其RSD,结果详见表1。

2.9 样品含量测定

二异丁香油酚和木脂素类成分2号含量的方法。

3.2 流动相的选择

张萌萌等^[11]在测定长形肉豆蔻中赤式-6-溴白木脂素的含量时采用乙腈-水系统。木脂素类成分具有相同的结构单元,本试验借鉴乙腈-水系统,并根据样品性质进行调整。试验过程中对乙腈-水、乙腈-磷酸水溶液、乙腈-醋酸水溶液系统的多种比例进行考察,但在供试品溶液中木脂素类成分2号与其前面的干扰峰达不到基线分离。王彦涵等^[12]在测定五味子属药用植物木脂素的含量时采用甲醇-水为流动相,取得了良好的分离效果。故笔者在前期试验结果不理想的前提下改为甲醇-水系统并进行进一步调整,比较甲醇-磷酸水溶液、甲醇-醋酸水与甲醇-水系统的差异,发现加酸对峰形和分离度的影响不大。为简化试验操作,选择甲醇-水系统作为流动相。在此条件下,供试品溶液无需前处理,即可以达到基线分离。

3.3 检测波长的选择

经DAD检测器,2种对照品在210~225 nm之间的吸光度值差异不大。210 nm时吸光度值虽然略高于225 nm处的吸光度值,但210 nm在甲醇的末端吸收处,信号干扰大,基线不平,所以选取225 nm为检测波长。

综上所述,本法简便、灵敏、准确,可用于蒙药复方肉豆蔻五味中去氢二异丁香油酚、木脂素类成分2号的含量测定。

参考文献

- [1] 国家药典委员会.中华人民共和国卫生部药品标准:蒙药分册[S].1998:89.
- [2] 许海杰,武娜,董玉.蒙药复方肉豆蔻五味的研究进展[J].内蒙古医学院学报,2010,32(3):9.
- [3] 王旭梅,庞玉华.肉豆蔻五味丸质量标准研究[J].中国药房,2008,19(30):2382.
- [4] 朱小玲,马强,董玉.紫外可见分光光度法测定蒙药复方肉豆蔻-5味中酯类成分的含量[J].内蒙古大学学报:自

板蓝根配方颗粒的质量标准研究[△]

巩伟*, 孙旭, 赵庆华, 李兴东, 赵梅, 张琨, 张欣欣(济南军区联勤部药品仪器检验所, 济南 250022)

中图分类号 R284.1;R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)18-2541-04
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.18.32

摘要 目的:建立板蓝根配方颗粒的质量标准。方法:采用薄层色谱法鉴别板蓝根、亮氨酸和精氨酸,按颗粒剂制剂通则进行检查,测定浸出物,并采用高效液相色谱法测定 (R,S) -告依春的含量。色谱柱为Shimadzu VP-ODS C₁₈,流动相为甲醇-0.05%磷酸溶液(7:93, V/V),流速为1.0 ml/min,检测波长为245 nm,柱温为室温,进样量为10 μ l。结果:薄层色谱分离度好,斑点清晰;粒度、水分、溶化性、微生物限度检查均符合规定;浸出物应不少于25.0%;含量测定中, (R,S) -告依春质量浓度在1.565 9~50.109 8 μ g/ml范围内与其峰面积呈良好的线性关系($r=0.999 9, n=6$),精密性、稳定性、重复性试验的RSD $\leq 1.12\%$,平均加样回收率为99.25% (RSD=2.08%, $n=9$),并初步确定 (R,S) -告依春的含量应不少于0.35 mg/g。结论:建立的质量标准增加了含量测定,控制项目更加全面、合理,可用于板蓝根配方颗粒的质量控制。

关键词 板蓝根配方颗粒;质量标准;薄层色谱法;高效液相色谱法; (R,S) -告依春

Study on the Quality Standard of Banlangen Dispensing Granules

GONG Wei, SUN Xu, ZHAO Qing-hua, LI Xing-dong, ZHAO Mei, ZHANG Kun, ZHANG Xin-xin (Institute for Drug and Instrument Control, Dept. of Joint Logistics, Jinan Military Region, Jinan 250022, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the quality standard of Banlangen dispensing granules. METHODS: Thin layer chromatography (TLC) was used to identify *Isatis indigotica*, leucine and arginine, the items according to granules preparations and the extraction were detected. HPLC was conducted to determine the content of (R,S) -goitrin. The Shimadzu VP-ODS C₁₈ column was used with the mobile phase of methanol-0.05% phosphoric acid (7:93, V/V) at the flow rate of 1.0 ml/min. The detection wavelength was set at 245 nm, and the column temperature was room temperature. The sample size was 10 μ l. RESULTS: TLC showed clear spots and good resolution. Particle size, moisture, dissolubility and microbial limit test were all conformed to the specification. The extraction limit was no less than 25.0%. (R,S) -goitrin showed a good linear relationship in the range of 1.565 9-50.109 8 μ g/ml ($r=0.999 9, n=6$). The average recovery was 99.25% (RSD=2.08%, $n=9$); the RSDs of precision, stability and repeatability tests were no more than 1.12%. The content of (R,S) -goitrin was initially determined as 0.35 mg/g. CONCLUSIONS: The established quality standard has increased content determination, and the control programs are more comprehensive and reasonable. It can be used for the quality control of Banlangen dispensing granules.

KEYWORDS Banlangen dispensing granules; Quality standard; TLC; HPLC; (R,S) -goitrin

- 然科学版, 2013, 44(4): 476.
- [5] 许海杰, 马强, 董玉. 蒙药肉豆蔻-5的化学成分研究[J]. 内蒙古大学学报: 自然科学版, 2013, 44(1): 75.
- [6] 杨秀伟, 黄鑫, 艾合买提·买买提. 肉豆蔻中新的新木脂素类化合物[J]. 中国中药杂志, 2008, 33(4): 397.
- [7] Fujisawa S, Ishihara M, Murakami Y, et al. Predicting the biological activities of 2-methoxyphenol antioxidants: effects of dimers[J]. *In Vivo*, 2007, 21(2): 181.
- [8] Murakami Y, Shoji M, Hirata A, et al. Dehydrodiisoeugenol, an isoeugenol dimer, inhibits lipopolysaccharide-stimulated nuclear factor kappa B activation and cyclooxygenase-2 expression in macrophages[J]. *Arch Biochem Biophys*, 2005, 434(2): 326.
- [9] 杨华. 以微管为靶点的苯并呋喃类木脂素衍生物抗肿瘤细胞增殖活性及作用机理研究[D]. 广州: 中山大学, 2006.
- [10] 王莹, 杨秀伟. 肉豆蔻中新木脂素类化合物的定量分析[J]. 中国现代中药, 2008, 10(2): 103.
- [11] 张萌萌, 许枏. HPLC测定长形肉豆蔻中赤式-6-溴白木脂素的含量[J]. 中国药师, 2010, 13(11): 1 628.
- [12] 王彦涵, 高建平, 陈道峰. 高效液相色谱法测定五味子属药用植物木脂素的含量[J]. 中国中药杂志, 2003, 28(12): 1 155.

[△] 基金项目: 军队医疗机构制剂标准提高科研专项课题(No. 14ZJZ01-2)

* 主管药师, 博士。研究方向: 药品质量分析、新药研究。电话: 0531-51637775。E-mail: gongweicn@foxmail.com

(收稿日期: 2014-06-15 修回日期: 2014-09-08)
(编辑: 余庆华)