

RP-HPLC法测定二十味肉豆蔻散中去氢二异丁香酚的含量^Δ

杨巧虹^{1*},康新莉²,周雪杉²,阿萍³,顾健⁴,谭睿^{2#}(1.重庆医疗器械质量检验中心,重庆 401147;2.西南交通大学生命科学与工程学院,成都 610031;3.西藏自治区药品检验所,拉萨 850000;4.西南民族大学民族医院研究院,成都 610051)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)27-3834-02

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.27.32

摘要 目的:建立测定二十味肉豆蔻散中去氢二异丁香酚含量的方法。方法:采用反相高效液相色谱法。色谱柱为Comatex C₁₈,流动相为甲醇-水(68:32, V/V),流速为1.0 ml/min,检测波长为276 nm,柱温为30 ℃,进样量为10 μl。结果:去氢二异丁香酚进样量在0.036 8~0.184 0 μg范围内与峰面积呈良好线性关系($r=0.999 7$);精密度、稳定性、重复性试验的RSD均≤2.84%;平均加样回收率为101.39%,RSD为1.42%($n=6$)。结论:本方法简便、准确,可用于检测二十味肉豆蔻散中去氢二异丁香酚的含量。

关键词 二十味肉豆蔻散;去氢二异丁香酚;含量测定;反相高效液相色谱法

Content Determination of Dehydrodiisoeugenol in Ershiwei Roudoukou Pulvis by RP-HPLC

YANG Qiao-hong¹, KANG Xin-li², ZHOU Xue-shan², A Ping³, GU Jian⁴, TAN Rui²(1.Chongqing Quality Testing and Inspection Center for Medical Devices, Chongqing 401147, China; 2.College of Life Science and Engineering, Southwest Jiaotong University, Chengdu 610031, China; 3.Tibetan Institute for Drug Control, Lasa 850000, China; 4.Institute of Ethnic Hospital, Southwest University for Nationalities, Chengdu 610051, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the content determination of dehydrodiisoeugenol in Ershiwei roudoukou pulvis. METHODS: RP-HPLC was performed on the column of Comatex C₁₈ with the mobile phase of methanol-solution(68:32, V/V) at flow rate of 1.0 ml/min, detection wavelength was 276 nm, column temperature was 30 ℃ and the volume was 10 μl. RESULTS: The linear range of dehydrodiisoeugenol was 0.036 8-0.184 0 μg($r=0.999 7$); RSDs of precision, stability and reproducibility tests were no more than 2.84%; average recovery was 101.39% (RSD=1.42%, $n=6$). CONCLUSIONS: The established method is simple, accurate, and can be used for the content determination of dehydrodiisoeugenol in Ershiwei roudoukou pulvis.

KEYWORDS Ershiwei roudoukou pulvis; Dehydrodiisoeugenol; Content determination; RP-HPLC

肉豆蔻散是由肉豆蔻、沉香、丁香、降香、藏茴香和余甘子等20味藏药材组方的复方制剂^[1]。二十味肉豆蔻散是在丸剂的基础上改制的新剂型,具有易分散、起效快的特点,较丸剂的适用范围更广。新剂型的开发,需要对其主要药效成分的含量进行控制,以确保其临床疗效。为此,笔者参考有关文献^[2-3],建立了采用反相高效液相色谱(RP-HPLC)法测定二十味肉豆蔻散中去氢二异丁香酚的含量,以为二十味肉豆蔻散的质量标准提供可靠依据。

1 材料

LC-10A型HPLC仪,包括CLASS-VP5.03色谱工作站(日本岛津公司);SK7200LH型超声波清洗器(上海科导超声仪器有限公司);BSA224S型电子天平(德国赛多利斯公司)。

二十味肉豆蔻散(批号:20111205、20111021、20120214)、缺肉豆蔻的阴性样品均由青海省藏医院制剂科提供;去氢二异丁香酚对照品(成都市食品药品检测中心,批号:110725-201112);甲醇为色谱纯,无水乙醇、乙酸乙酯为分析纯,水为

超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Comatex C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:甲醇-水(68:32, V/V);流速:1.0 ml/min;检测波长:276 nm;柱温:35 ℃;进样量:10 μl。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液 精密称取去氢二异丁香酚对照品0.5 mg,加甲醇定容至10 ml量瓶中,摇匀,作为对照品母液;精密量取上述对照品母液1 ml,置于50 ml量瓶中,用甲醇稀释至刻度,摇匀,即得。

2.2.2 供试品溶液 称取样品粉末约2.0 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入无水乙醇40 ml,称定质量,超声(功率:120 W,频率:40 kHz)处理40 min,放冷,再次称定质量,用无水乙醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.2.3 阴性对照溶液 取缺肉豆蔻的阴性样品适量,按“2.2.2”项下方法制备,即得。

2.3 系统适用性试验

精密吸取“2.2”项下对照品溶液、供试品溶液、阴性对照溶液各10 μl,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱,色谱见图1。理论板数按去氢二异丁香酚计均不低于3 000,分离度>1.5。

2.4 线性关系考察

Δ 基金项目:重大新药创制国家科技重大专项“中药新药安全性检测技术与标准研究”子课题(No.2014ZX09304307001-019);2011—2012年度国家药品标准提高工作(中药)科研项目(No.892)

* 本科。研究方向:药品及医疗器械质量检验。E-mail:87831702@qq.com

通信作者:教授,博士。研究方向:中药质量标准规范化和新制剂研发。电话:028-8734667。E-mail:tanrui@swjtu.edu.cn

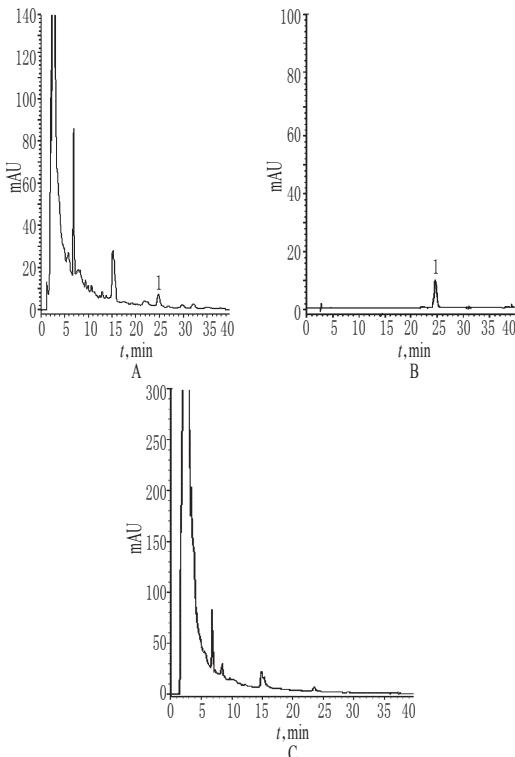


图1 高效液相色谱图

A.供试品溶液;B.对照品溶液;C.阴性对照溶液;1.去氢二异丁香酚

Fig 1 HPLC chromatograms

A.solution of test sample;B.solution of reference; C.solution of negative control; 1.dehydrodiisoeugenol

精密吸取“2.2.1”项下对照品溶液4、7、10、13、16、20 μl,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以进样量(x, μg)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归,得去氢二异丁香酚的回归方程为 $y=4\ 302\ 637.68x-80\ 552.67$ ($r=0.999\ 7$)。结果表明,去氢二异丁香酚进样量在0.036 8~0.184 0 μg 范围内与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”项下对照品溶液适量,按“2.1”项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果,RSD=1.94% ($n=6$),表明仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验

精密吸取同一供试品(批号:20111205)溶液适量,分别于放置0、2、4、6、8、10、12 h时按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,RSD=1.82% ($n=7$),表明供试品溶液在12 h内稳定。

2.7 重复性试验

取同一批样品(批号:20111205)6份,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,RSD=2.84% ($n=6$),表明本方法重复性良好。

2.8 加样回收率试验

称取已知含量的同一样品(批号:20111205)共6份,精密称定,置于100 ml具塞锥形瓶中,加入“2.2.1”项下对照品母液130 μl,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,计算加样回收率,结果见表1。

2.9 样品含量测定

取3批样品各适量,按“2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,并计算样品含量,结果见表2。

表1 加样回收率试验结果($n=6$)

Tab 1 Results of recovery test($n=6$)

取样量, 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, %
1.05	0.110 2	0.120 0	0.235 1	104.08		
1.02	0.117 3	0.120 0	0.238 6	101.08		
1.00	0.100 8	0.120 0	0.221 6	100.67		
1.02	0.110 1	0.120 0	0.231 5	101.17	101.39	1.42
1.00	0.110 0	0.120 0	0.229 8	99.83		
1.01	0.111 1	0.120 0	0.232 9	101.50		

表2 样品含量测定结果($n=3$)

Tab 2 Results of content determination of samples($n=3$)

批号	去氢二异丁香酚含量, mg/g
20111205	0.107
20111021	0.112
20120214	0.108

3 讨论

3.1 色谱条件的选择

在色谱条件的建立过程中,笔者参考相关文献^[4-6]分别考察了柱温为25、30、35、40 ℃时的色谱行为。结果表明,柱温对色谱峰影响不大,故选择常用柱温30 ℃。笔者又分别考察了甲醇-水(70:30, V/V)、甲醇-水(68:32, V/V)和甲醇-水(66:34, V/V)等不同流动相系统,结果甲醇-水(68:32, V/V)作为流动相时分离度、峰形均较好。取去氢二异丁香酚对照品溶液进行全波长扫描,结果去氢二异丁香酚和肉豆蔻醚的最大吸收波长分别为201、276 nm,但在201 nm波长处流动相的吸收较大,影响基线,故以276 nm为检测波长。

3.2 样品的处理方法

笔者分别以甲醇、80%甲醇、无水乙醇、80%乙醇、乙酸乙酯为提取溶剂,结果无水乙醇提取含量最高;又分别比较了超声提取、回流提取、振摇提取的提取率,结果超声提取时提取率较高;又考察了超声10、20、30、40、50、60 min的提取效率,结果提取30 min提取率基本稳定,故选择超声提取30 min。

3.3 测定结果的分析

由于本试验仅局限于3批样品,去氢二异丁香酚的平均含量为0.109 mg/g,为了对其质量标准的制订提供依据,建议质量控制时样品中去氢二异丁香酚的含量不得低于0.098 mg/g。

参考文献

- [1] WS₃-BC-0164-95.中华人民共和国卫生部药品标准:藏药:第一册:肉豆蔻散[S].
- [2] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2010年版.北京:中国医药科技出版社,2010:142-143.
- [3] 谭锐,张良.藏药二十味肉豆蔻丸中丁香酚的HPLC测定[J].中国药事,2003,17(4):224.
- [4] 袁子民,陈剑锋,贾天柱.RP-HPLC测定麸煨肉豆蔻中去氢二异丁香酚的含量[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(18):60.
- [5] 王旭梅,庞玉华.肉蔻五味丸质量标准研究[J].中国药房,2008,19(30):2382.
- [6] 田伟刚.肉豆蔻提取物的药理作用[J].中国社区医师:医学专业,2012,14(16):44.

(收稿日期:2015-07-20 修回日期:2015-08-05)

(编辑:余庆华)