

HPLC法测定不同产地莪术中羟基异吉马呋内酯的含量^Δ

邓英君^{1*},王菊²,陆兔林^{2#},陈佩东²,毛春芹²,胡俊扬²(1.南京市中医院,南京 210001;2.南京中医药大学药学院,南京 210023)

中图分类号 R284.1;R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)43-4073-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.43.14

摘要 目的:建立测定莪术中羟基异吉马呋内酯含量的方法,并比较不同产地莪术中羟基异吉马呋内酯的含量差异。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为Kromasil C₁₈(250 mm×4.6 mm,5 μm),流动相为乙腈-水(梯度洗脱),流速为1.0 ml/min,检测波长为214 nm,柱温为25 ℃。结果:羟基异吉马呋内酯的质量浓度在1.47~14.68 μg/ml范围内与其峰面积积分值呈良好线性关系($r=0.9997$);精密性、稳定性、重复性试验的RSD<3%;平均加样回收率为95.31%~95.80%,RSD为0.07%~1.36%($n=3$)。不同产地同品种、同产地不同时期莪术中羟基异吉马呋内酯的含量存在差异。结论:该方法分离度好、专属性强、重复性好、简便易行,可用于莪术中羟基异吉马呋内酯的含量测定,并能完善现行莪术药材的质量标准。

关键词 莪术;高效液相色谱法;羟基异吉马呋内酯;含量测定

Content Determination of Hydroxyisogermafurenolide in Curcuma Rhizoma from Different Habitats by HPLC

DENG Ying-jun¹, WANG Ju², LU Tu-lin², CHEN Pei-dong², MAO Chun-qin², HU Jun-yang²(1.Nanjing Hospital of TCM, Nanjing 210001, China; 2. College of Pharmacy, Nanjing University of TCM, Nanjing 210023, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the method for the content determination of hydroxyisogermafurenolide in Curcuma Rhizoma, and to compare the content difference of hydroxyisogermafurenolide in Curcuma Rhizoma from different habitats. METHODS: HPLC method was adopted. The separation was performed on Kromasil C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) column with mobile phase consisted of acetonitrile-water (gradient elution) at the flow rate of 1.0 ml/min. The detection wavelength was set at 214 nm and column temperature was 25 ℃. RESULTS: The linear range of hydroxyisogermafurenolide were 1.47-14.68 μg/ml ($r=0.9997$). RSDs of precision, stability and reproducibility tests were all lower than 3%. The average recovery were 95.31%-95.80% (RSD were 0.07%-1.36%, $n=3$). The contents of hydroxyisogermafurenolide in same types of Curcuma Rhizoma from different habitats were different from that of Curcuma Rhizoma from same habitats at different periods. CONCLUSIONS: The method is well-separated, specific, reproducible, simple and feasible. It can be used for the content determination of hydroxyisogermafurenolide in Curcuma Rhizoma and improve the present quality standard of Curcuma Rhizoma.

KEY WORDS Curcuma Rhizoma; HPLC; Hydroxyisogermafurenolide; Content determination

莪术为姜科植物蓬莪术 *Curcuma phaeocaulis* Val.、广西莪术 *C. kwangsiensis* S.G. Lee et C.F.Liang 或温郁金 *C. wenyujin* Y.H.Chen et C.Ling 的干燥根茎^[1],味辛、苦,性温,归肝、脾经,具行气破血、消积止痛的功效^[1],常用于治疗癥瘕痞块、瘀血经闭、胸痹心痛、食积胀满等证。莪术作为传统中药材,具有抗肿瘤、抗癌、抗血栓、保肝等药理作用^[2-3]。有文献报道^[4-5],莪术中主要含有挥发油和姜黄素类等成分,其中挥发油成分主要为倍半萜类。目前,有关莪术含量测定的研究多集中在莪术二酮、莪术醇、吉玛酮、呋喃二烯及β-榄香烯^[6-10]等倍半萜类成分上。羟基异吉马呋内酯为倍半萜内酯类物质,具有抗菌、抗病毒作用,对实验性肝损伤有预防作用^[11]。本试验首次建立了以高效液相色谱(HPLC)法测定不同产地莪术中羟基异吉马

呋内酯含量的方法,可为莪术的进一步开发提供科学依据。

1 材料

1.1 仪器

1100型HPLC仪,包括四元梯度泵、自动进样器、柱温箱、紫外检测器(美国Agilent公司);KQ-500E型医用超声清洗器(昆山市超声仪器有限公司);NewClassic MS型电子天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司];Milli-Q Gradient A10型超纯水器(美国Millipore公司)。

1.2 试剂

羟基异吉马呋内酯对照品(上海源叶生物科技有限公司,纯度>98%,批号:20110730);乙腈、甲醇为色谱纯,其他试剂均为分析纯,水为重蒸水。

1.3 中药饮片

莪术(产地:浙江、广西、四川)购自安徽丰原铜陵中药饮片有限公司,经南京中医药大学陈建伟教授鉴定分别为温郁金 *C. wenyujin* Y. H. Chen et C. Ling、广西莪术 *C. kwangsiensis* S. G. Lee et C. F. Liang 以及蓬莪术 *C. phaeocaulis* Val. 的干燥根茎,并根据2010年版《中国药典》莪术饮片制法项下自制得

Δ 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81173548);国家药品标准提高暨2015版药典科研课题

* 副主任中药师。研究方向:中药化学分析。E-mail: zxm872600@yeah.net

通信作者:教授,博士研究生导师。研究方向:中药炮制。E-mail: ltl209@163.com

莪术饮片。

2 方法与结果

2.1 对照品贮备液的制备

精密称取羟基异吉马吠内酯对照品适量,加甲醇使之溶解,制备成每1 ml含羟基异吉马吠内酯58.72 μg的对照品贮备液。

2.2 供试品溶液的制备

取莪术饮片,粉碎,过三号筛,取粉末0.5 g,精密称定,加乙醚10 ml,超声(功率:250 W,频率:30 kHz)提取10 min,重复3次,合并3次滤液;残渣及滤器用少量乙醚洗涤,合并滤液和洗涤液,挥干乙醚,残留物加甲醇溶解并定容至5 ml,摇匀,即得。

2.3 色谱条件

色谱柱:Kromasil C₁₈(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:乙腈(A)-水(B),梯度洗脱(0~35 min,45% A→70% A;>35~40 min,75% A→90% A;>40~60 min,90% A→95% A);流速:1.0 ml/min;柱温:25 ℃;检测波长:214 nm;进样量:10 μl。色谱见图1。

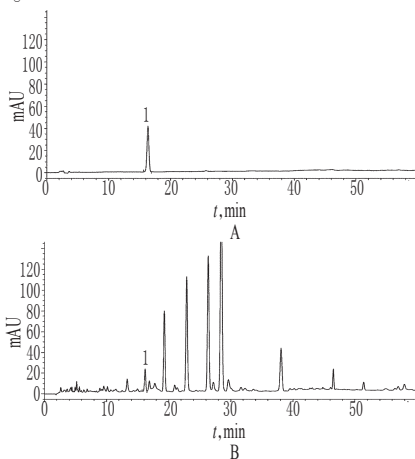


图1 高效液相色谱图

A.莪术对照品;B.供试品;1.羟基异吉马吠内酯

Fig 1 HPLC chromatograms

A. Curcuma Rhizoma control; B. test sample; 1. hydroxyisogermafurenolide

2.4 线性关系考察

精密吸取对照品贮备液0.25、0.50、1.00、1.50、2.00、2.50 ml,分别置于10 ml量瓶中,加甲醇稀释至刻度,分别精密吸取10 μl注入HPLC仪,按上述色谱条件测定,记录峰面积。以峰面积积分值(y)为纵坐标,对照品质量浓度(x)为横坐标,进行线性回归,得回归方程为 $y=32\ 941x+7.930\ 9$ ($r=0.999\ 7$, $n=6$)。结果表明,羟基异吉马吠内酯的质量浓度在1.47~14.68 μg/ml内与峰面积积分值呈良好线性关系。

2.5 精密度试验

取同一羟基异吉马吠内酯对照品溶液10 μl,按上述色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果显示,RSD=2.83%($n=6$),表明仪器精密度良好。

2.6 重复性试验

取同一莪术饮片(批号:110602,产地:浙江)粉末0.5 g,共6份,精密称定,分别按“2.2”项下方法制备供试品溶液,再按上述色谱条件进样测定,记录峰面积,并根据峰面积计算样品含量。结果显示,样品中羟基异吉马吠内酯的含量为106.1 μg/g,

RSD=2.25%($n=6$),表明本方法重复性良好。

2.7 稳定性试验

取同一莪术饮片(批号:110602,产地:浙江)制备的供试品溶液适量,按上述色谱条件分别于0、2、4、8、12 h进样测定,记录峰面积。结果显示,RSD=2.91%($n=5$),表明供试品溶液在12 h内稳定。

2.8 准确度试验

取已知含量的莪术饮片(批号:110602,产地:浙江)粉末约0.250 g,精密称定,共9份,每3份为一组,分别加入羟基异吉马吠内酯对照品溶液(27.70 μg/ml)0.8、1.0、1.2 ml,按“2.2”项下方法制备供试品溶液,再按上述色谱条件进样测定,计算加样回收率,结果见表1。

表1 准确度试验结果($n=3$)

取样量,g	样品含量,mg	加入量,mg	测得量,mg	回收率,%	\bar{x} ,%	RSD,%
0.248 8	0.026 4	0.022 2	0.048 0	97.30		
0.249 0	0.026 4	0.022 2	0.047 5	95.05	95.80	1.36
0.248 6	0.026 4	0.022 2	0.047 5	95.05		
0.254 8	0.027 0	0.027 7	0.053 4	95.31		
0.251 9	0.026 7	0.027 7	0.053 1	95.31	95.31	0.07
0.244 1	0.025 9	0.027 7	0.052 3	95.31		
0.240 9	0.025 6	0.033 2	0.057 2	95.18		
0.240 2	0.025 5	0.033 2	0.057 0	94.88	95.38	0.56
0.243 5	0.025 8	0.033 2	0.057 7	96.08		

2.9 样品含量测定

取不同产地的莪术饮片各适量,粉碎,过三号筛,取粉末0.5 g,精密称定,按“2.2”项下方法制备供试品溶液,再按上述色谱条件进样测定,记录峰面积,并以峰面积计算样品中羟基异吉马吠内酯的含量,结果见表2。

表2 莪术中羟基异吉马吠内酯的含量测定结果(mg/g, $n=3$)

Tab 2 Results of content determination of hydroxyisogermafurenolide in Curcuma Rhizoma(mg/g, $n=3$)

产地	批号	羟基异吉马吠内酯
浙江(温郁金)	110602	0.107 2
	110615	0.137 5
	110701	-
广西(广西莪术)	110522	0.083 5
	110602	0.028 7
四川(蓬莪术)	110615	-
	091226	-

注:“-”表示未检出

note:“-” means not detected

3 讨论

在选择样品提取方法时,笔者考察了乙醚回流提取和乙醚超声提取法,发现两者的提取效率相差不大,因超声提取较方便,故选择乙醚超声提取,每次10 min,重复操作3次。

由本试验结果可知,不同产地莪术中羟基异吉马吠内酯的含量存在差异,总体上温郁金中的含量较高,广西莪术次之,而在蓬莪术中测不到其含量;同产地不同时期莪术中羟基异吉马吠内酯的含量也有差别,温莪术中有个别批次未测得其含量,这可能与气候、土壤和降雨量等生态环境因素、采收期以及产地加工有关,或者由于采集批次较少,样品存在个体差异所致。具体原因有待进一步研究。

2010年版《中国药典》仅要求对莪术的总挥发油作定量测定,而莪术的产地较多,广西、四川、浙江均有出产,这造成了

补肾壮骨配方颗粒的HPLC指纹图谱研究^Δ

陈行愉*, 韩丽萍#, 邓伟民(广州军区广州总医院药剂科, 广州 510010)

中图分类号 R283.627;R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)43-4075-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.43.15

摘要 目的:建立补肾壮骨配方颗粒的指纹图谱。方法:采用高效液相色谱(HPLC)法。色谱柱为Inertsil C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为乙腈-水(梯度洗脱),流速为1 ml/min,检测波长为285 nm。采用直观分析和相似度软件评价10批补肾壮骨配方颗粒指纹图谱的相似度。结果:建立了补肾壮骨配方颗粒的指纹图谱,10批样品共标定了9个共有峰,各色谱峰分离度较好、相似度较高,符合中药色谱指纹图谱研究的技术要求。结论:该方法准确、可靠,建立的HPLC指纹图谱可为补肾壮骨配方颗粒的质量控制提供科学准确的依据。

关键词 补肾壮骨配方颗粒;指纹图谱;高效液相色谱法

Study on HPLC Fingerprints of Bushen Zhuanggu Formula Granules

CHEN Xing-yu, HAN Li-ping, DENG Wei-min (Dept. of Pharmacy, Guangzhou General Hospital of Guangzhou Military Command, Guangzhou 510010, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish HPLC fingerprint of Bushen zhuanggu formula granules. METHODS: HPLC method was adopted. The separation was performed on Inertsil C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm) column with mobile phase consisted of acetonitrile-water (gradient elution) at the flow rate of 1 ml/min. The detection wavelength was set at 285 nm. The fingerprint similarity of 10 batches of Bushen zhuanggu formula granules was evaluated by visual analysis and similarity software. RESULTS: Fingerprint spectrum of Bushen zhuanggu formula granules was established. 10 batches of samples were detected and 9 peaks in the chromatogram were common. There was a high similarity and each chromatographic peak was obtained with good separation, which were in line with the technical requirements of fingerprint of TCM. CONCLUSIONS: This method is accurate and reliable, and HPLC fingerprint provides a scientific basis for the quality control of Bushen zhuanggu formula granules.

KEY WORDS Bushen zhuanggu formula granules; Fingerprint; HPLC

补肾壮骨颗粒为我院非标制剂,由淫羊藿、骨碎补等七味药材合煎,经浓缩、干燥、制粒等工序制成,具有补肾壮骨、健

脾和胃、祛瘀止痛的作用^[1]。方中淫羊藿、骨碎补为主药。前期研究发现,因市面上淫羊藿药材质量参差不齐,不同批次的

药物成分及成分含量的不同,故单纯控制挥发油的含量不能有效控制莪术的内在质量,否则会影响莪术相关产品的质量及临床应用的安全、有效。本试验利用HPLC的分离效能,采用梯度洗脱,首次对莪术中羟基异吉马呋内酯的含量进行检测,并对不同产地莪术中该成分的含量进行比较,所建方法具有准确、快速、重复性好、灵敏度高等特点,可为评价莪术中的倍半萜内酯类活性成分提供一种可靠的分析方法,同时可为进一步完善莪术的质量控制方法提供理论依据。

参考文献

- [1] 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, 2010:257.
- [2] 成晓静, 刘华钢, 赖茂祥. 莪术的化学成分及药理作用研究概况[J]. 广西中医学院学报, 2007, 10(1):79.

Δ 基金项目:全军“十一五”军队中医药研发推广专项课题(No.2006062005);广东省药学会骨质疏松合理用药专项(No.2012GS04)

* 药师。研究方向:中药新药的开发与利用。电话:020-88652005。E-mail:yjk_cxy@163.com

通信作者:主任药师,硕士。研究方向:中药新药的开发与利用。电话:020-88654456。E-mail:hanliping@163.com

- [3] 黄臣虎, 陆茵, 孙志广, 等. 莪术抗癌作用机制研究进展[J]. 中草药, 2010, 41(10):1745.
- [4] 李国栋, 许付, 沈爱军. 莪术油的研究进展[J]. 中国药学杂志, 2002, 37(11):807.
- [5] 李勇, 孙秀燕, 林翠英, 等. 3个品种莪术挥发油化学成分的比较[J]. 中草药, 2005, 36(12):1786.
- [6] 彭炳先, 陈受惠. HPLC测定不同产地莪术中3种有效成分的含量[J]. 中国药学杂志, 2009, 44(22):1742.
- [7] 何欢, 马双成, 田颂九, 等. HPLC测定莪术油及其注射液中的6种成分的含量[J]. 中国中药杂志, 2010, 45(6):461.
- [8] 张鹏, 祝明, 唐登峰, 等. HPLC同时测定莪术油中3种倍半萜类成分的含量[J]. 药物分析杂志, 2009, 29(11):1825.
- [9] 周欣, 梁光义, 沈万雁, 等. 不同产地莪术挥发油的研究[J]. 华西药理学杂志, 2002, 17(3):201.
- [10] 姜国非, 毛春芹, 陆兔林, 等. 不同产地醋莪术饮片中β-榄香烯的含量比较[J]. 中国药房, 2010, 21(39):3696.
- [11] 俞桂新, 王峥涛, 徐珞珊, 等. 乌药的化学成分及药理作用[J]. 中国野生植物资源, 2010, 18(3):5.

(收稿日期:2013-05-27 修回日期:2013-08-07)