

## 二神丸中药物炮制前后化学成分含量变化

耿媛媛, 胡昌江\*, 潘新, 胡麟, 赵玲, 熊瑞

(成都中医药大学药学院, 成都 610075)

**[摘要]** **目的:**建立同时测定二神丸中 3 种成分含量的 HPLC, 比较二神丸中药物炮制前后补骨脂素、异补骨脂素和去氢二异丁香酚含量的变化。拟阐明炮制对方中药物化学成分的影响。**方法:**二神丸中的药物补骨脂盐炙, 肉豆蔻麸煨, 采用 HPLC 测定 2 味药炮制前后 3 种成分的含量变化。**结果:**该测定方法补骨脂素的线性范围 0.164 ~ 2.05  $\mu\text{g}$ , 回收率 101.76%, RSD 2.02%; 异补骨脂素的线性范围 0.115 ~ 1.44  $\mu\text{g}$ , 回收率 96.15%, RSD 1.55%; 去氢二异丁香酚的线性范围 0.086 4 ~ 1.08  $\mu\text{g}$ , 回收率 99.61%, RSD 1.96%。二神丸中药物炮制后, 补骨脂素和异补骨脂素的含量均降低, 去氢二异丁香酚的含量亦降低。**结论:**该方法简单准确, 重复性好。二神丸中药物炮制后补骨脂素、异补骨脂素和去氢二异丁香酚的含量均发生了一定变化。

**[关键词]** 二神丸; 补骨脂素; 异补骨脂素; 去氢二异丁香酚

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)13-0117-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2014130117

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20140513.1509.010.html>

**[网络出版时间]** 2014-05-13 15:09

## Contents Change of Chemical Compositions in Ershen Pills Before and After Preparation

GENG Yuan-yuan, HU Chang-jiang\*, PAN Xin, HU Lin, ZHAO Ling, XIONG Rui

(Pharmacy Department, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075, China)

**[Abstract]** **Objective:** To establish an HPLC method for simultaneous determination of three components in Ershen pills and compare the content changes of psoralen, isopsoralen and dehydrodiisoeugenol in this prescription before and after processing, and to investigate the influence of processing on chemical compositions. **Method:** Psoralea was stir-fried with salt and Nutmeg was roasted with wheat bran. HPLC was applied to determine the content changes of psoralen, isopsoralen and dehydrodiisoeugenol in this prescription before and after processing. **Result:** The average recoveries of psoralen, isopsoralen and dehydrodiisoeugenol were 101.76%, 96.15%, 99.61%, with RSD being 2.02%, 1.55%, 1.96%. The psoralen, isopsoralen and dehydrodiisoeugenol samples showed a good linear relationship in the ranges of 0.164-2.05, 0.115-1.44, 0.086 4-1.08  $\mu\text{g}$ , respectively, in the chosen HPLC conditions. After preparation, the three compositions were reduced. **Conclusion:** The method is simple, accurate and reproducible. The contents of psoralen, isopsoralen and dehydrodiisoeugenol in Ershen pills can be changed after processing.

**[Key words]** Ershen pill; psoralen; isopsoralen; dehydrodiisoeugenol

二神丸出自宋·许叔微的《普济本事方》,由补骨脂和肉豆蔻 2 味药组成,为临床治疗脾肾阳虚之

五更泄泻的基础方,具有温肾暖脾、涩肠止泻之功效<sup>[1]</sup>。其中,补骨脂主要含有呋喃香豆精类化合

**[收稿日期]** 20130724(013)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81274085)

**[第一作者]** 耿媛媛,在读硕士,从事中药炮制原理的研究, Tel:13438020595, E-mail:yyg1103@126.com

**[通讯作者]** \* 胡昌江,博士生导师,教授,从事中药炮制原理与质量标准方面的研究, Tel:13980980796, E-mail:hhcejj@hotmail.com

物、黄酮及查尔酮类化合物及萘酚类化合物<sup>[2-5]</sup>,其主要成分为补骨脂素和异补骨脂素,目前补骨脂药材及其中成药制剂的质量评价均以这 2 种成分的含量为依据;肉豆蔻主要成分为挥发油、脂肪油、苯丙素和木脂素等<sup>[6-7]</sup>,收载于 2010 年版《中国药典》,以去氢二异丁香酚为其含量测定的指标性成分<sup>[2]</sup>。

中医临床用药以饮片炮制和复方入药为特色,而目前中药炮制研究多集中在单味药上,在复方层面的研究较少,本实验将补骨脂和肉豆蔻纳入复方中研究炮制前后 3 种化学成分的变化,符合中医用药的实际,具有研究意义。

本实验建立同时测定二神丸中补骨脂素、异补骨脂素和去氢二异丁香酚 3 种成分含量的 HPLC 并比较了炮制前后此 3 种成分的含量变化,为二神丸中药物炮制机制的研究提供一定的实验依据。

### 1 材料

1200 高效液相色谱仪 (Agilent), 高灵敏度紫外-可见光可变波长检测器 (美国安捷伦科技有限公司), KQ5200DB 型数控超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司), BP211D 型电子天平、JY 系列电子天平 (上海方瑞仪器有限公司)。

5 个批次的补骨脂和肉豆蔻均购自四川省成都荷花池中药材专业市场,经成都中医药大学卢先明教授鉴定分别为豆科植物补骨脂 *Psoralea corylifolia* L. 的干燥成熟果实和肉豆蔻科植物肉豆蔻 *Myristica fragrans* Houtt. 的干燥种仁。

补骨脂素 (批号 MUST-12122112)、异补骨脂素 (批号 MUST-12081804)、去氢二异丁香酚 (批号 MUST-12062804) 对照品均购于成都曼思特生物科技有限公司。

甲醇、乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯,水为纯净水。

### 2 方法与结果

**2.1 药物的炮制** 盐炙补骨脂:分别称取 5 个批次的净补骨脂,加入盐水闷润 24 h,以 40 次/min 的频率于 150 ℃ 的炒锅中炒炙 10 min 后取出,置烘箱内 (40 ℃) 烘干。每 100 g 补骨脂用食盐 2 g,水 50 mL 溶解食盐<sup>[8]</sup>。

麸煨肉豆蔻:分别取 5 个批次的净肉豆蔻与麦麸同置锅内,用文火加热,温度控制在 130 ~ 150 ℃,翻炒 20 min,至麦麸呈焦黄色,肉豆蔻呈棕褐色时取出。麦麸用量以能掩埋药物为度。

#### 2.2 供试品溶液的制备

**2.2.1 提取溶剂和方法的选择** 分别以甲醇、乙

醇、80% 甲醇和 80% 乙醇作为提取溶剂,以及超声提取和回流提取 2 种方式,结果甲醇、乙醇和 80% 乙醇回流提取的样品放置后均出现沉淀,甲醇、乙醇超声提取的样品放置后也出现沉淀,而 80% 乙醇超声提取的样品 3 种成分的含量较高,峰形比 80% 甲醇提取的样品更好,故选 80% 乙醇超声提取。

**2.2.2 提取时间的选择** 分别考察了 80% 乙醇超声提取 20, 40, 60 min 时补骨脂素、异补骨脂素和去氢二异丁香酚的含量,结果见表 1。

表 1 不同提取时间 3 种成分的质量分数比较 %

t/min	补骨脂素	异补骨脂素	去氢二异丁香酚
20	0.397	0.307	0.117
40	0.424	0.333	0.118
60	0.430	0.333	0.118

结果表明,80% 乙醇提取 40 min 时 3 种成分的含量高于提取 20 min,与提取 60 min 接近,故选 80% 乙醇超声提取 40 min。

故本实验采用如下方法制备供试品溶液:取补骨脂粉末 (过三号筛) 约 1.0 g,肉豆蔻粉末 (过三号筛) 约 0.5 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入 80% 乙醇溶液,称质量,超声处理 40 min 取出,放冷,用 80% 乙醇补足失重,摇匀,滤过,取续滤液,即得<sup>[9]</sup>。

**2.3 对照品溶液的制备** 精密称取补骨脂素、异补骨脂素和去氢二异丁香酚对照品适量,用 80% 乙醇溶解,制成含补骨脂素 0.082 0 g·L<sup>-1</sup>、异补骨脂素 0.057 6 g·L<sup>-1</sup>、去氢二异丁香酚 0.043 2 g·L<sup>-1</sup> 的混合对照品溶液,备用。

**2.4 阴性对照溶液的制备** 按供试品溶液的制备方法,分别制备补骨脂单味药和肉豆蔻单味药的溶液,备用。

**2.5 色谱条件** Phenomenex C<sub>18</sub> 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相甲醇-水梯度洗脱 (如表 2), 流速 1 mL·min<sup>-1</sup>, 可变波长检测器检测波长 0 ~ 25 min 246 nm<sup>[10]</sup>, 25 ~ 60 min 274 nm<sup>[11]</sup>, 柱温 30 ℃。

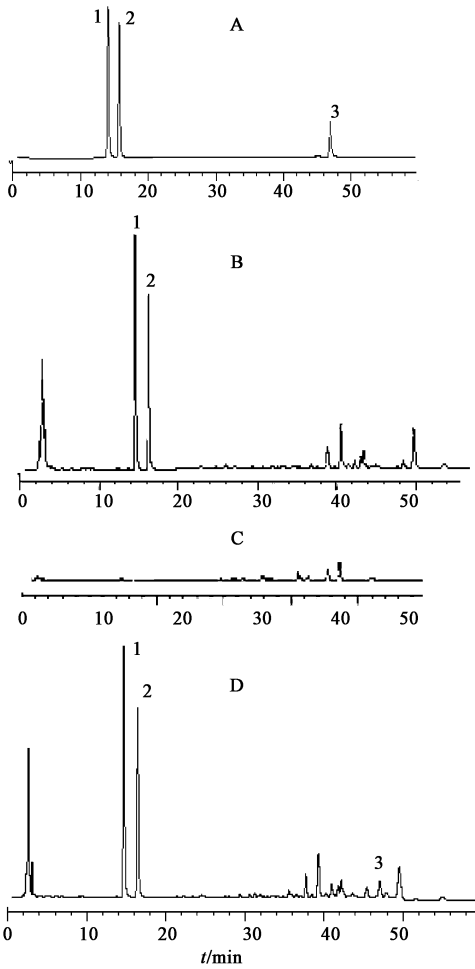
表 2 流动相梯度洗脱程序 %

t/min	甲醇	水
0	45	55
10	50	50
40	75	25
60	65	35

#### 2.6 方法学考察

**2.6.1 专属性考察** 分别取混合对照品溶液、补骨脂供试液、肉豆蔻供试液和二神丸供试液 10 μL,按

上述色谱条件进样,记录色谱图<sup>[11]</sup>,见图1。肉豆蔻在补骨脂素和异补骨脂素相应的保留时间处无吸收峰,补骨脂在去氢二异丁香酚相应的保留时间处无吸收峰。



A. 混合对照品;B. 补骨脂;C. 肉豆蔻;D. 二神丸  
1. 补骨脂素;2. 异补骨脂素;3. 去氢二异丁香酚

图1 二神丸 HPLC

**2.6.2 线性关系的考察** 分别精密吸取混合对照品溶液 2, 5, 10, 15, 20, 25  $\mu\text{L}$ , 注入高效液相色谱仪, 测定各色谱峰的峰面积, 以进样量为横坐标, 峰面积为纵坐标, 做回归方程。补骨脂素:  $Y = 613.36X - 4.6391$  ( $r = 0.9999$ ); 异补骨脂素:  $Y = 413.86X - 31.609$  ( $r = 0.9999$ ); 去氢二异丁香酚:  $Y = 140.97X + 49.730$  ( $r = 0.9998$ )。结果表明补骨脂素、异补骨脂素在 0.164 ~ 2.05, 0.115 ~ 1.44, 0.0864 ~ 1.08  $\mu\text{g}$  与峰面积呈良好的线性关系。

**2.6.3 精密度的考察** 精密吸取混合对照品溶液 10  $\mu\text{L}$ , 连续进样 5 次, 分别测定补骨脂素、异补骨脂素和去氢二异丁香酚的峰面积, 结果表明补骨脂素、异补骨脂素和去氢二异丁香酚峰面积的 RSD 分别

为 0.14%, 0.14%, 1.16%, 表明精密度良好。

**2.6.4 重复性的考察** 取同一批次的样品 5 份, 按 2.2 供试品溶液的制备方法制备供试品溶液, 分别精密吸取 10  $\mu\text{L}$ , 注入色谱仪, 按上述色谱条件记录色谱图, 测定 3 种成分的质量分数。结果表明在二神丸中, 补骨脂素、异补骨脂素、去氢二异丁香酚的平均质量分数分别为 0.535% (RSD 2.40%), 0.494% (RSD 2.94%), 0.235% (RSD 1.72%)。

**2.6.5 稳定性的考察** 分别在 0, 2, 6, 12, 24 h 精密吸取同一供试品溶液 10  $\mu\text{L}$ , 注入液相色谱仪, 按 2.5.2 色谱条件记录色谱图, 测定峰面积, 结果表明补骨脂素、异补骨脂素和去氢二异丁香酚峰面积的 RSD 分别为 0.46%, 1.80%, 2.07%, 这 3 种成分在 24 h 内稳定性良好。

**2.6.6 加样回收率的考察** 取已知 3 种成分含量的二神丸(补骨脂约 1.0 g + 肉豆蔻约 0.5 g)粉末 5 份, 分别精密称定补骨脂和肉豆蔻的质量, 每份样品分别精密加入含补骨脂素 1.41  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、异补骨脂素 1.35  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  和去氢二异丁香酚 1.12  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  的混合对照品溶液 2 mL, 按 2.2 项下的方法制备供试品溶液, 测定 3 种成分的含量。结果 3 种成分平均加样回收率分别为 101.76% (RSD 2.02%), 96.15% (RSD 1.55%), 99.61% (RSD 1.96%)。见表 3 ~ 5。

表3 补骨脂素加样回收率

补骨脂称样量/g	肉豆蔻称样量/g	样品质量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
1.0012	0.5008	2.9533	2.82	5.9126	104.94		
1.0001	0.5008	2.9501	2.82	5.8465	102.71		
1.0011	0.5013	2.9530	2.82	5.7905	100.62	101.76	2.02
1.0006	0.5005	2.9515	2.82	5.7866	100.53		
1.0011	0.5006	2.9530	2.82	5.7727	99.99		

表4 异补骨脂素加样回收率

补骨脂称样量/g	肉豆蔻称样量/g	样品质量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
1.0012	0.5008	2.7304	2.70	5.3047	95.35		
1.0001	0.5008	2.7274	2.70	5.2981	95.21		
1.0011	0.5013	2.7301	2.70	5.3651	97.59	96.15	1.55
1.0006	0.5005	2.7287	2.70	5.2849	94.67		
1.0011	0.5006	2.7301	2.70	5.3739	97.92		

表 5 去氢二异丁香酚加样回收率

补骨脂 称样量 /g	肉豆蔻 称样量 /g	样品 质量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均 回收率 /%	RSD /%
1.001 2	0.500 8	2.326 0	2.24	4.572 7	100.30		
1.000 1	0.500 8	2.326 0	2.24	4.599 5	101.49		
1.001 1	0.501 3	2.328 4	2.24	4.507 4	97.28	99.61	1.96
1.000 6	0.500 5	2.324 6	2.24	4.591 5	101.20		
1.001 1	0.500 6	2.325 1	2.24	4.515 8	97.80		

2.7 含量测定 对 5 个批次的样品按上述供试品溶液的制备方法和色谱条件测定补骨脂素、异补骨脂素和去氢二异丁香酚的峰面积,并计算含量,结果见表 6。

表 6 5 批二神丸样品的含量测定 %

No.	补骨脂素		异补骨脂素		去氢二异丁香酚	
	炮制前	炮制后	炮制前	炮制后	炮制前	炮制后
1	0.464	0.275	0.392	0.252	0.125	0.120
2	0.546	0.268	0.505	0.258	0.220	0.143
3	0.441	0.196	0.388	0.182	0.155	0.151
4	0.420	0.366	0.342	0.292	0.126	0.100
5	0.455	0.307	0.370	0.257	0.129	0.124

结果表明,5 个不同批次二神丸中药物炮制后补骨脂素和异补骨脂素的含量均降低,去氢二异丁香酚的含量亦降低。不同批次 3 种成分含量降低的程度不同,这可能与药物的产地、采收、炮制的均匀程度等有关。

### 3 讨论

经上述研究,建立了同时测定二神丸中补骨脂素、异补骨脂素和去氢二异丁香酚含量的方法,该法操作简便,准确可行,重复性好。为二神丸炮制前后

物质基础变化的研究奠定了基础。

二神丸中药物炮制后,补骨脂中补骨脂素和异补骨脂素的含量降低,而肉豆蔻中去氢二异丁香酚的含量亦降低,炮制前后这些成分的变化与二神丸功效改变的关系值得进一步研究。

### [参考文献]

- [1] 王缙,付庆会. 宋明期间二神丸和五味子散两方的发展演变[J]. 四川中医, 2010, 28(9): 115.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 174, 126.
- [3] 洪永福, 范春升. 补骨脂中补骨脂素和异补骨脂素的分离和鉴定[J]. 药学通报, 1979, 14(10): 447.
- [4] 中国医学科学院药物研究所, 北京医学院药系, 南京药学院, 等. 中药志. 第 3 册[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1984: 429.
- [5] 邱蓉丽, 李璘, 乐巍. 补骨脂的化学成分与药理作用研究进展[J]. 中药材, 2012, 33(10): 1656.
- [6] 张蕾, 徐云峰, 沈硕, 等. 肉豆蔻的化学成分研究[J]. 中国现代中药, 2010, 12(6): 16.
- [7] 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.
- [8] 林辉, 胡昌江, 李兴迎, 等. 正交试验法优选补骨脂的盐炙工艺[J]. 中国药业, 2008, 17(7): 35.
- [9] 纪松岗, 吴海棠, 苗华艳, 等. 中药复方二神丸主要化学成分的高效液相-飞行时间质谱分析[J]. 药学实践杂志, 2011, 29(6): 435.
- [10] 李先端, 毛淑杰, 程立平. 高效液相法测定补骨脂生品和炮制品中补骨脂素与异补骨脂素含量[J]. 中国药物应用与监测, 2005, 2(1): 43.
- [11] 袁子民, 代冬梅, 李秀芳, 等. HPLC 法测定肉豆蔻中脱氢二异丁香酚的含量[J]. 中药材, 2005, 28(6): 472.

[责任编辑 邹晓翠]