

## 二十味肉豆蔻丸质量标准研究

吴梅<sup>1</sup>, 阿萍<sup>2</sup>, 周雪杉<sup>1</sup>, 谭睿<sup>1\*</sup>

(1. 西南交通大学生命科学与工程学院, 成都 610031; 2. 西藏自治区药品检验所, 拉萨 850000)

**[摘要]** 目的: 建立二十味肉豆蔻丸(肉豆蔻、沉香、丁香、红花等)的质量控制方法。方法: 采用薄层色谱法(TLC)对方中乳香、丁香、降香、沉香进行定性鉴别; 采用高效液相色谱法(HPLC)测定肉豆蔻中去氢二异丁香酚, 色谱柱为 Comatex C<sub>18</sub> (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相甲醇-水(68:32), 检测波长 274 nm, 体积流量 1.0 mL·min<sup>-1</sup>。结果: 薄层鉴别均斑点清晰, 阴性对照无干扰。去氢二异丁香酚在 0.036 8~0.184 μg 线性关系良( $r=0.999\ 6$ ), 平均回收率为 100.17%, RSD 1.11%。结论: 研究建立的方法专属性强、简便、灵敏、重复性好, 能有效控制二十味肉豆蔻丸的内在质量。

**[关键词]** 二十味肉豆蔻丸; 肉豆蔻; 去氢二异丁香酚; 薄层色谱; 高效液相色谱

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)19-0111-04

**[doi]** 10.11653/syfy2013190111

## Quality Standard for Ershiwei Roudoukou Pills

WU Mei<sup>1</sup>, A Ping<sup>2</sup>, ZHOU Xue-shan<sup>1</sup>, TAN Rui<sup>1\*</sup>

(1. Department of Bioengineering, Southwest Jiaotong University, Chengdu 610031, China;

2. Institute for Drug Control of Tibetan, Lasa 850000, China)

**[Abstract]** **Objective:** To establish the quality standard for Ershiwei Roudoukou pills (Myristicae semen, Aquilariae Lignum Resinatum, Caryophylli Flos and Carthami Flos etc.). **Method:** Olibanum, Caryophylli Flos, Dalbergiae Odoriferae Lignum, Aquilariae Lignum Resinatum were identified by TLC and HPLC was applied to the quantitative determination of dehydrodiisoeugenol. The method was performed on a Comatex C<sub>18</sub> column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) with methanol-water (68:32) as the mobile phase. UV detection wavelength was set at 274 nm; the column temperature was kept at 35 °C and the flow rate was maintained at 1.0 mL·min<sup>-1</sup>. **Result:** The TLC sports were fairly clear, and the blank test showed no interference. Dehydrodiisoeugenol showed a good linear relationship within the range of 0.036 8-0.184 μg ( $r=0.999\ 6$ ). The average recovery was 100.25% and RSD was 1.16%. **Conclusion:** The methods are simple, sensitive, reliable, reproducible, and can be used for the qualitative and quantitative control of Ershiwei Roudoukou pills.

**[Key words]** Ershiwei Roudoukou pills; Myristicae semen; dehydrodiisoeugenol; TLC; HPLC

二十味肉豆蔻丸是由肉豆蔻、沉香、广枣、藏茴香、余甘子等 20 味雪域天然珍贵藏药材运用藏药独特的炮制工艺与现代中医药提取工艺制成的复方制剂, 具有安神开窍、疏肝健脾、调节气血, 增强免疫力

等功效, 用于“宁龙”病引起的神志紊乱、烦躁、精神恍惚、失眠、头晕、健忘、耳鸣、颤抖、惊悸。

二十味肉豆蔻丸是《中华人民共和国卫生部药品标准》藏药第 1 册收载的藏药品种<sup>[1]</sup>, 在该标准中仅有二十味肉豆蔻丸性状描述和简单的理化鉴别, 无法有效控制该药品的有效性和均一性。本实验对方中丁香、降香、乳香、肉豆蔻进行了定性、定量研究, 建立了丁香、降香、乳香、沉香的 TLC 鉴别方法和肉豆蔻去氢二异丁香酚的 HPLC 测定方法。

### 1 材料

岛津 LC-10A 型高效液相色谱仪(2 个 LC-10A

**[收稿日期]** 20121210(031)

**[基金项目]** 国家药典委国家药品标准提高项目(2012S38001)

**[第一作者]** 吴梅, 硕士研究生, 从事中药质量标准研究, Tel: 13551070446, E-mail: 472765669@qq.com

**[通讯作者]** \* 谭睿, 博士, 教授, 从事中药质量标准规范化和新制剂研发, Tel: 028-87600993, E-mail: tanrui@swjtu.edu.cn

泵, DG $\mu$ -12A 在线脱气机, SPD-10A 检测器, SIL-10A 自动进样器, CTO-10A 柱温箱), 配 CLASS-VP 5.03 色谱工作站, Comatex C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5  $\mu$ m), SK7200LH 型超声清洗仪(上海科导超声仪器有限公司), Sartorius BS110 型电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司)。

乳香对照药材(批号 120970-200904, 鉴别用), 丁香酚对照品(批号 110725-201112, 定量测定用), 去氢二异丁香酚(批号 111838-201102, 定量测定用)均购自成都市食品药品检定所, 甲醇为色谱纯, 其他试剂均为分析纯, 水为超纯水。二十味肉豆蔻丸样品由西藏自治区藏药厂(批号 10338A), 西藏神猴药业有限责任公司(批号 20120407, 20120509), 西藏金珠雅砻藏药有限责任公司(批号 120101, 110601, 111202), 西藏昌都地区藏医院(120401), 西藏日喀则地区藏医院(120115)提供。

## 2 薄层色谱鉴别

**2.1 乳香的鉴别** 取本品 10 g, 研细, 加乙醇 50 mL, 超声处理 30 min, 滤过, 滤液蒸干, 残渣加甲醇 1 mL 使溶解, 作为供试品溶液。另取乳香对照药材 1 g, 同法制成对照药材溶液。再取缺乳香的阴性对照样品, 同供试品溶液制备法制得阴性对照溶液。照薄层色谱法(《中国药典》2010 年版一部附录 VI B)试验, 吸取上述 3 种溶液各 5  $\mu$ L, 分别点于同一以羧甲基纤维素钠为黏合剂的硅胶 G 薄层板上, 以正己烷-醋酸乙酯(5:1)为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 喷以 5% 香草醛硫酸溶液, 加热至斑点显色清晰。供试品色谱中, 在与对照药材色谱相应的位置上, 显相同颜色的斑点, 阴性对照无干扰。

**2.2 降香的鉴别** 取本品 10 g, 研细, 加乙醇 50 mL, 超声处理 30 min, 滤过, 滤液蒸干, 残渣加甲醇 1 mL 使溶解, 作为供试品溶液。另取降香对照药材 1 g, 同法制成对照药材溶液。再取缺降香的阴性对照样品, 同供试品溶液制备法制得阴性对照溶液。照薄层色谱法(《中国药典》2010 年版一部附录 VI B)试验, 吸取上述 3 种溶液各 5  $\mu$ L, 分别点于同一以羧甲基纤维素钠为黏合剂的硅胶 G 薄层板上, 以石油醚(60~90  $^{\circ}$ C)-醋酸乙酯(9:2)展开剂, 展开, 取出, 晾干, 喷以 5% 香草醛硫酸溶液, 加热至斑点显色清晰。供试品色谱中, 在与对照药材色谱相应的位置上, 显相同颜色的斑点, 阴性对照无干扰。

**2.3 丁香的鉴别** 取本品 10 g, 粉碎, 加乙醇 50 mL, 超声处理 30 min, 滤过, 滤液蒸干, 残渣加甲醇 1 mL 使溶解, 作为供试品溶液。另取丁香对照药

材 1 g, 用乙醚 30 mL, 超声处理 30 min, 滤过, 滤液蒸干, 残渣加氯仿 1 mL 使溶解。再取缺丁香的阴性对照样品, 同供试品溶液制备法制得阴性对照溶液。照薄层色谱法(《中国药典》2010 年版一部附录 VI B)试验, 吸取上述 3 种溶液各 5  $\mu$ L, 分别点于同一以羧甲基纤维素钠为黏合剂的硅胶 G 薄层板上, 以氯仿(60~90  $^{\circ}$ C)-乙醚(10:1)为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 喷以 5% 香草醛硫酸溶液, 加热至斑点显色清晰。供试品色谱中, 在与对照药材色谱相应的位置上, 显相同颜色的斑点, 阴性对照无干扰。

**2.4 沉香的鉴别** 取本品 10 g, 粉碎, 加乙醇 50 mL, 超声处理 30 min, 滤过, 滤液蒸干, 残渣加甲醇 1 mL 使溶解, 作为供试品溶液。另取沉香对照药材 1 g, 用乙醚 30 mL, 超声处理 30 min, 滤过, 滤液蒸干, 残渣加氯仿 1 mL 使溶解。再取缺沉香的阴性对照样品, 同供试品溶液制备法制得阴性对照溶液。照薄层色谱法(《中国药典》2010 年版一部附录 VI B)试验, 吸取上述 3 种溶液各 5  $\mu$ L, 分别点于同一以羧甲基纤维素钠为黏合剂的硅胶 G 薄层板上, 以石油醚(60~90  $^{\circ}$ C)-醋酸乙酯(5:1)展开剂, 展开, 取出, 晾干, 置紫外光灯(365 nm)下检视。供试品色谱中, 在与对照药材色谱相应的位置上, 显相同颜色的斑点, 阴性对照无干扰。

## 3 去氢二异丁香酚的含量测定

**3.1 色谱条件** Comatex C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5  $\mu$ m), 流动相甲醇-水(68:32), 体积流量 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 柱温 35  $^{\circ}$ C, 检测波长 274 nm, 理论板数按去氢二异丁香酚计算不低于 3 000。

**3.2 对照品溶液的制备** 精密称取去氢二异丁香酚对照品适量, 加甲醇制成每 1 mL 含 0.046 mg 的溶液, 作为对照品贮备液; 再精密量取上述贮备液 1 mL, 置 50 mL 量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀, 作为对照品溶液(每 1 mL 含去氢二异丁香酚 9.2  $\mu$ g)。

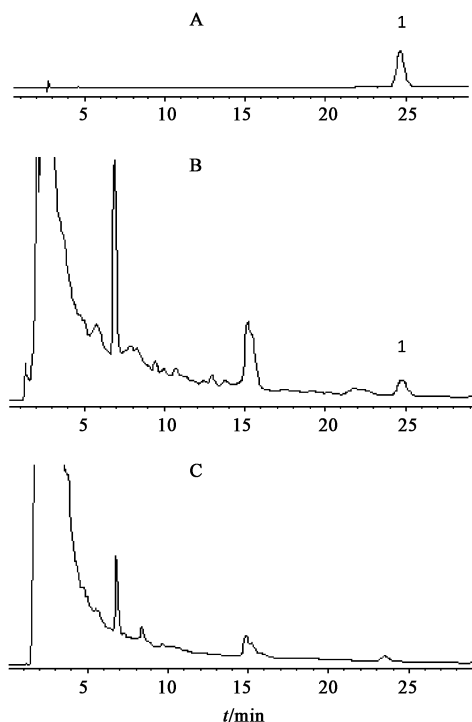
**3.3 供试品溶液的制备** 取本品适量, 研细, 精密称定本品 2.00 g, 置具塞锥形瓶中, 精密加入无水乙醇 40 mL, 称定质量, 超声处理(功率 400 W, 120 kHz) 40 min, 放冷, 再称定质量, 用无水乙醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液即得。

**3.4 阴性样品溶液的制备** 按处方配比, 制备缺肉豆蔻的阴性样品, 按供试品溶液的制备方法制得阴性样品溶液。

**3.5 专属性试验** 分别吸取去氢二异丁香酚对照品溶液、供试品溶液、阴性对照溶液, 进样, 按 3.1 项色谱条件测定, 结果表明, 供试品溶液色谱图中去氢

二异丁香酚的峰形良好,与相邻峰均达到有效分离,且阴性对照无干扰,结果见图1。

**3.6 线性范围的考察** 精密量取去氢二异丁香酚对照品溶液( $9.2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 4,7,10,13,16,20  $\mu\text{L}$ ,按**3.1**项色谱条件测定,以峰面积为纵坐标( $Y$ ),各对照品进样量( $X$ )为横坐标,得标准曲线,回归方程为 $Y=4\ 302\ 637.68X-80\ 552.67(r=0.999\ 6)$  ( $n=6$ ),去氢二异丁香酚在 $0.036\ 8\sim 0.184\ \mu\text{g}$ 呈良好的线性关系。



A. 对照品; B. 供试品; C. 肉豆蔻阴性对照; 1. 去氢二异丁香酚

图1 二十味肉豆蔻丸 HPLC

**3.7 精密度试验** 精密量取**3.2**项下去氢二异丁香酚对照品溶液 $10\ \mu\text{L}$ ,重复进样6次,按**3.1**项色谱条件测定,以峰面积计算RSD 1.87%。

**3.8 重复性试验** 取同一批号(批号111202)样品6份,同供试品溶液的制备方法制备,按**3.1**项色谱条件,进样 $20\ \mu\text{L}$ 测定去氢二异丁香酚含量,计算平均含量为 $0.19\ \text{mg}$ ,RSD 1.50%。

**3.9 稳定性试验** 精密吸取同一供试品溶液 $20\ \mu\text{L}$ ,分别在0,2,4,6,8,10,12进样,按**3.1**项下色谱条件测定去氢二异丁香酚测定的峰面积,RSD 1.93%。

**3.10 加样回收率试验** 精密称取同一批样品(批号111202)1.00 g,共6份,分别精密加入去氢二异丁香酚对照品溶液 $250\ \mu\text{L}$ (质量浓度为 $9.2\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ),按**3.3**方法制备供试品溶液,按**3.1**项色谱条件,进样

$20\ \mu\text{L}$ 测定去氢二异丁香酚含量,计算回收率,结果分别见表1。

表1 去氢二异丁香酚回收率( $n=6$ )

取样量 /g	原有量 /mg	实测值 /mg	回收率 /%	平均回 收率/%	RSD /%
1.000 3	0.091 4	0.207 3	100.78		
1.000 0	0.091 4	0.206 0	99.65		
1.001 1	0.091 5	0.208 5	101.74		
1.000 6	0.091 5	0.206 5	100.00	100.17	1.11
1.000 2	0.091 4	0.204 6	98.43		
1.000 8	0.091 5	0.207 0	100.43		

注:加入量均为 $0.115\ 0\ \text{mg}$ 。

**3.11 样品的测定** 取不同批次二十味肉豆蔻丸样品,按**3.3**方法制备供试品溶液,按**3.1**项色谱条件,进样 $20\ \mu\text{L}$ 测定去氢二异丁香酚含量,计算相对含量。结果见表2。

表2 二十味肉豆蔻丸中去氢二异丁香酚含量测定

批号	含量/mg	相对含量/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$
110601	0.19	0.09
111202	0.18	0.09
120101	0.06	0.08
20120407	0.16	0.08
20120509	0.18	0.09
120401	0.29	0.14
120115	0.18	0.09
10388A	0.17	0.09

## 4 讨论

提取溶剂的选择分别比较了用甲醇、80%甲醇、无水乙醇、80%乙醇、乙酸乙酯的提取情况,结果去氢二异丁香酚在无水乙醇和甲醇在中提取率较其他溶剂高,用无水乙醇提取时杂质种类、杂质提取量均少于用甲醇提取,综合考虑,选择无水乙醇为提取溶剂。

提取方式的选择比较了超声提取、回流和振摇提取,结果超声和回流提取率基本一致,均较振摇提取率高,因此选择超声提取较为方便。

提取时间的选择比较了超声10,20,30,40,50 min,随着提取时间的增加,去氢二异丁香酚的提取量也增加,30 min后去氢二异丁香酚含量几乎稳定,考虑提取效率和充分提取,选择超声40 min。

溶剂用量的选择比较了10,20,30,40,50 mL,结果溶剂用量越大,去氢二异丁香酚含量越大,提取越充分,溶剂用量达40 mL后去氢二异丁香酚含量几乎不再变化,故选择溶剂用量为40 mL。

## 四角蛤蜊软体中脂肪酸成分的 GC-MS 分析

程建明<sup>1,2</sup>, 嵇晶<sup>1,2</sup>, 刘睿<sup>1,2</sup>, 王令充<sup>1,2</sup>, 吴皓<sup>1,2\*</sup>

(1. 南京中医药大学药学院, 南京 210046; 2. 江苏省海洋药物研究开发中心, 南京 210029)

**[摘要]** 目的: 分析四角蛤蜊软体中脂肪酸类成分。方法: 以 Bligh-Dyer 法萃取四角蛤蜊软体中脂肪酸, 经甲酯化后利用气相色谱-质谱联用技术对其脂肪酸组成进行了分析和鉴定。结果: 共分离鉴定出 22 种脂肪酸, 占总脂肪酸含量的 82.51%。其中饱和脂肪酸的相对含量为 24.35%, 主要为十八酸、十六烷酸; 不饱和脂肪酸的相对含量为 58.16%, 主要为 9-十六烯酸、11-二十烯酸、十四烯酸及 5,8,11,14-二十碳四烯酸。结论: 四角蛤蜊软体中含有丰富的脂肪酸类物质, 具有较好的开发价值。

**[关键词]** 四角蛤蜊; 脂肪酸; 气相色谱法-质谱联用

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)19-0114-04

**[doi]** 10.11653/syjf2013190114

## GC-MS Analysis of Fatty Acid from *Macra veneriformis*

CHEN Jian-ming<sup>1,2</sup>, JI Jing<sup>1,2</sup>, LIU Rui<sup>1,2</sup>, WANG Ling-chong<sup>1,2</sup>, WU Hao<sup>1,2\*</sup>

(1. College of Pharmaceutical Science, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China;  
2. Research Center of Marine Drug in Jiangsu Province, Nanjing 210029, China)

**[收稿日期]** 20120511(012)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(30900293); 南京中医药大学青年自然科学基金项目(11XZR10); 南京中医药大学科技创新风险基金项目(CX201105)

**[第一作者]** 程建明, 副研究员, 中药学博士, 从事新药研发研究, Tel:025-86798011, E-mail: cjm7895@163.com

**[通讯作者]** \* 吴皓, 博士生导师, E-mail: whao5795@vip.sina.com

### [参考文献]

- [1] 中华人民共和国药典委员会. 中华人民共和国卫生部药品标准. 藏药. 第 1 册[S]. 北京: 中华人民共和国卫生部, 1995: 165.
- [2] 谭睿, 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.
- [3] 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: 142.
- [4] 赵启苗, 远志, 贾天柱. HPLC 测定长形肉豆蔻及其不同炮制品挥发油中甲基丁香酚、异甲基丁香酚及黄樟醚含量[J]. 中成药, 2009, 31(5): 801.
- [5] 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.
- [6] 王冬冬, 阿萍, 王曙, 等. 藏药二十五味马宝丸中药材的鉴别与丁香酚的测定[J]. 华西药学杂志, 2011, 26(1): 70.
- [7] 王旭梅, 庞玉华. 肉蔻五味丸质量标准研究[J]. 中国药事, 2008, 19(30): 2382.
- [8] 董海彦. 七味螃蟹丸质量标准研究[J]. 中成药, 2012, 34(6): 1100.
- [9] 郭亚红, 倪健, 邵爱新, 等. 痰喘消胶囊质量标准的研究[J]. 中成药, 2002, 24(2): 146.
- [10] 巢志茂, 张楠, 唐春风, 等. 36 种油性中药不皂化物的薄层色谱鉴别研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(3): 226.
- [11] 袁玲艳, 赵永慧, 赵嘉琳, 等. 续断通络胶囊质量标准研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(2): 96.
- [12] 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.

[责任编辑 顾雪竹]