

· 化学与分析 ·

苦木药材中 3 种有效成分的含量测定

易宇阳¹, 赖正权¹, 石书江¹, 陈海明¹, 孔松芝¹, 黄思涵¹, 苏子仁^{1,2*}

(1. 广州中医药大学新药开发研究中心, 广州 510006;

2. 东莞广州中医药大学中医药数理工程研究院, 广东 东莞 523808)

[摘要] 目的: 建立苦木药材中 3-甲基-铁尿米-5,6-二酮、4-甲氧基-5-羟基铁尿米酮以及 4,5-二甲氧基-铁尿米酮 3 种生物碱的含量测定方法。方法: 用 phenomenex Gemini C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 以乙腈-乙酸铵缓冲盐(25 mmol·L⁻¹, 冰乙酸调 pH 4.0) 为流动相, 采用梯度洗脱, 检测波长为 254 nm。结果: 3-甲基-铁尿米-5,6-二酮等 3 种对照品分别在 0.004 56~0.182 40, 0.012~0.480, 0.002 6~0.104 0 μg 线性良好($r \geq 0.999 9$), 平均回收率均 > 96.72% (RSD < 0.78%)。结论: 含量测定方法简便、稳定、重复性好, 为苦木药材质量控制和评价提供了可靠的方法。

[关键词] 苦木; 3-甲基-铁尿米-5,6-二酮; 4-甲氧基-5-羟基铁尿米酮; 4,5-二甲氧基-铁尿米酮; 高效液相色谱法

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2012)12-0071-04

Content Determination of Three Effective Constituents in *Picrasmae Ramulus et Folium*

YI Yu-yang¹, LAI Zheng-quan¹, SHI Shu-jiang¹, CHEN Hai-ming¹,

KONG Song-zhi¹, HUANG Si-han¹, SU Zi-ren^{1,2*}

(1. Research and Development Center of New Drug Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China; 2. Dongguan Mathematical Engineering Academy of Chinese Medicine and Guangzhou University of Chinese Medicine, Dongguan 523808, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a method for determination of the content of three alkaloids 3-methyl-canthin-5, 6-dione, 4-methoxy-5-hydroxycanthin-6-one and 4, 5-dinethoxycanthin-6-one in *Picrasmae Ramulus et Folium*. **Method:** The determination was carried out with Phenomenex Gemini C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm). The mobile phase consisted of 0.25 mmol·L⁻¹ ammonium acetate buffer (pH 4.0 by HAC) (A) - acetonitrile (B) with gradient elution. The detection wavelength was at 254 nm. **Result:** 3-methyl-canthin-5, 6-dione, three reference substances were in good linearity between 0.004 56-0.182 40, 0.012-0.480, 0.002 6-0.104 0 μg ($r \geq 0.999 9$), and the average recovery was greater than 96.72% (RSD < 0.78%). **Conclusion:** The determination method is simple and convenient, stable and repeatable, it would provided a reliable approach to evaluate and control the quality of *Picrasmae Ramulus et Folium*.

[Key words] *Picrasmae Ramulus et Folium*; 3-methyl-canthin-5, 6-dione; 4-methoxy-5-hydroxycanthin-6-one; 4, 5-dinethoxycanthin-6-one; HPLC

苦木收载于《中国药典》2010 年版一部, 为苦木 科植物苦木的干燥枝与叶, 性寒, 味苦, 具有清热、祛

[收稿日期] 20110719(011)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(U0732004)

[第一作者] 易宇阳, 硕士研究生, 从事中药新药开发研究, Tel:020-39358517, E-mail: yyy448429@yahoo.com.cn

[通讯作者] * 苏子仁, 研究员, 博士生导师, 从事中药新药开发研究, Tel:020-39358517, E-mail: suziren@gzhtcm.edu.cn

湿、解毒之功效。现代药理研究表明,苦木具有抗菌消炎^[1]、解热^[2]、降压^[3]、抗癌^[4]、抗蛇毒^[5]、抗疟^[4]等疗效。其中生物碱类成分 3-甲基-铁屎米-5,6-二酮、4-甲氧基-5-羟基铁屎米酮以及 4,5-二甲氧基-铁屎米酮具有较强的抑菌作用^[6],为苦木抗菌消炎类中药制剂的有效成分。目前,中药制剂产品质量参差不齐,一个最主要的原因就是投料中药材的质量不一、差异明显。为了更好的从源头对苦木制剂的质量进行控制,本文采用高效液相色谱方法对苦木药材中 3 种抗菌有效成分进行同时测定。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 日本岛津 LC-20AT 型 HPLC 仪;SPD-20A 紫外-可见检测器;LCsolution 色谱工作站,试验室专用超纯水机(重庆利迪现代水技术设备有限公司),Sartorius BP110s 型 1/万电子天平(德国 Sartorius 公司),CP225D 型 1/10 万电子天平(德国 Sartorius 公司)。

1.2 试剂 3-甲基-铁屎米-5,6-二酮,4-甲氧基-5-羟基铁屎米酮以及 4,5-二甲氧基-铁屎米酮(分别简称铁、己、丁,由广州中医药大学新药开发研究中心

从苦木茎中分离得到,经四大光谱检测,HPLC 归一法测定纯度在 99% 以上,可供含量测定用);苦木药材分别由江西青峰药业有限公司和广东万年青制药有限公司提供(产地为广东英德、广东翁德、广东清远、江西、广西,共 20 批),经广州中医药大学中药学院苏子仁教授鉴定为苦木科植物苦木 *Picrasma quassioides* (D. Don) Benn 的干燥枝与叶。乙腈为色谱纯,水为重蒸水,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 phenomenex gemin C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),乙腈(A)-乙酸铵缓冲盐(B, 浓度 25 mmol·L⁻¹, 冰乙酸调 pH 4.0)为流动相,采用梯度洗脱(0~6 min, 15%~19.5% A; 6~7 min, 19.5%~22.5% A; 7~14 min, 22.5%~23% A; 14~20 min, 23%~30% A; 20~25 min, 30%~40% A; 25~40 min, 40%~50% A),流速 1.0 mL·min⁻¹,柱温 30 ℃,检测波长 254 nm。在此条件下,苦木药材中各色谱峰分离良好,对照品铁、己、丁与其相邻色谱峰分离度大于 1.5。结果见图 1, 2, 理论塔板数均大于 5 000。

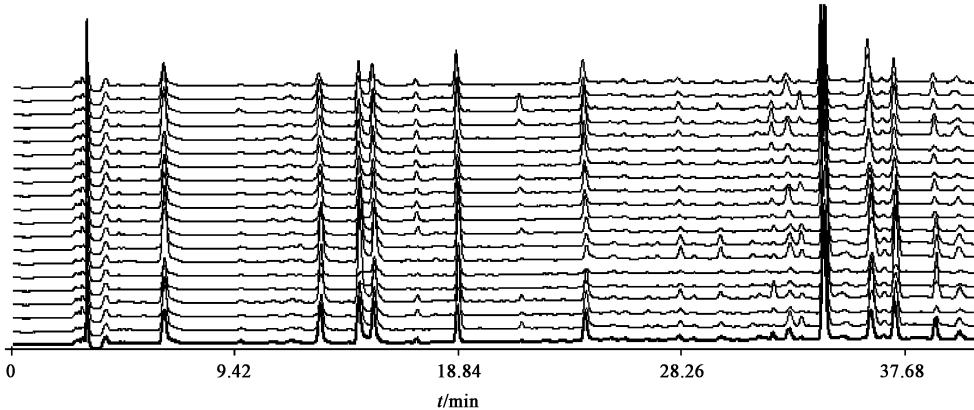
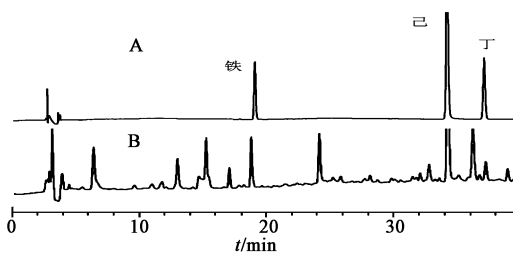


图 1 20 批苦木药材高效液相色谱



A. 苦木对照品; B. 苦木药材

图 2 苦木对照品及苦木药材高效液相色谱

2.2 供试品溶液的制备 称取苦木药材粗粉约 2 g, 精密称定, 置 100 mL 平底烧瓶中, 精密加入 85% 乙醇 100 mL, 称定质量, 回流提取 1.5 h, 放冷, 加 85% 乙醇补足减失的质量。滤过, 取续滤液适量

过微孔滤膜(0.45 μm), 即得。

2.3 对照品溶液的制备 精密称取铁、己、丁 3 种对照品适量, 加甲醇制成浓度分别为 0.045 6, 0.120 01, 0.026 0 g·L⁻¹ 的对照品混合溶液。

2.4 线性关系考察 精密吸取上述对照品混合液 0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0, 4.0 mL, 分别置于 10 mL 量瓶中, 加甲醇定容至刻度, 摇匀, 得到 8 个浓度系列的对照品混合液。在上述色谱条件下分别进样 10 μL 进行测定, 以峰面积(Y)为纵坐标对进样量(X)进行线性回归, 得标准曲线。见表 1。

2.5 精密度试验 精密吸取对照品混合液 10 μL, 重复进样 6 次。测得 3 个对照品 RSD 分别为

表1 线性范围考察

对照品名称	线性范围/ μg	回归方程	r
铁	0.004 56 ~ 0.182 40	$Y = 55\ 482.695\ 62X - 830.491\ 48$	0.999 9
己	0.012 00 ~ 0.480 00	$Y = 44\ 195.460\ 24X + 903.258\ 59$	0.999 9
丁	0.002 60 ~ 0.104 00	$Y = 106\ 094.945\ 12X + 1\ 544.706\ 90$	0.999 9

1.41%, 0.92%, 1.05%, 表明精密度良好。

2.6 稳定性试验 取同一样品(产地广西,样品11),按上述色谱条件于0,2,4,6,8,10,12,24 h 分别测定,测得峰面积并计算含量,结果3个对照品的RSD分别为1.95%,1.29%,1.34%,表明样品在24 h内稳定。

2.7 重复性试验 按2.2项下的供试品制备方法,取同一样品(产地广西,样品11),平行制备6份,测得峰面积并计算含量,结果3个对照品含量平均分

别为0.183, 0.805, 0.210 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。RSD分别为1.01%, 0.84%, 1.18%。表明本方法重复性良好。

2.8 加样回收率试验 取已测含量的苦木药材样品(产地广西,样品11)共6份,每份1 g,精密称定。分别加入3-甲基-铁屎米-5,6-二酮、4-甲氧基-5-羟基铁屎米酮、4,5-二甲氧基-铁屎米酮对照品溶液适量,按供试品溶液制备项下操作,平行操作6份,测定含量,计算回收率,结果见表2。

表2 苦木药材中不同成分的加样回收率测定

成分	No.	称样量/g	样品中含量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
铁	1	1.001 2	0.176 6	0.18	0.350 1	96.4	96.72	0.78
	2	1.000 8	0.180 1	0.18	0.356 0	97.7		
	3	1.000 5	0.180 1	0.18	0.354 3	96.8		
	4	1.001 0	0.180 2	0.18	0.353 0	96.0		
	5	1.001 4	0.180 3	0.18	0.352 9	95.9		
	6	1.000 2	0.180 0	0.18	0.355 5	97.5		
己	1	1.001 2	0.811 0	0.81	1.621 8	100.1	99.22	0.59
	2	1.000 8	0.810 6	0.81	1.618 2	99.7		
	3	1.000 5	0.810 4	0.81	1.608 3	98.5		
	4	1.001 0	0.810 8	0.81	1.614 3	99.2		
	5	1.001 4	0.811 1	0.81	1.612 2	98.9		
	6	1.000 2	0.810 2	0.81	1.611 3	98.9		
丁	1	1.001 2	0.270 3	0.21	0.536 0	98.4	98.25	0.42
	2	1.000 8	0.270 2	0.21	0.535 1	98.1		
	3	1.000 5	0.270 1	0.21	0.534 5	97.9		
	4	1.001 0	0.270 3	0.21	0.537 6	99.0		
	5	1.001 4	0.270 4	0.21	0.535 5	98.2		
	6	1.000 2	0.270 1	0.21	0.534 4	97.9		

2.9 含量测定 取20批不同产地苦木药材,按2.2项下供试品溶液制备方法,制成供试品溶液。精密吸取各供试品溶液,按上述色谱条件进行了测定,结果见表3。

3 讨论

3.1 色谱柱的选择 共试验了5种不同厂家的色谱柱,分别是Phenomenex® gemini C₁₈(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), YMC Pack ODS(4.6 mm × 250 mm,

5 μm), Agilent Zorbax SB-C₁₈(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), Alltech Alltima C₁₈(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), Waters SymmetryShield RP₁₈(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),从中选用了Phenomenex® gemini C₁₈(4.60 mm × 250 mm, 5 μm),不仅分离效果好,且pH适用范围在1~12,耐酸性。

3.2 流动相的选择 考察了流动相S1(乙腈-乙酸铵溶液)系统,梯度洗脱;S2(甲醇-乙酸铵溶液)系

表 3 20 批苦木药材含量测定

No.	产地	厂家	铁	己	丁
1	广东英德	江西青峰	0.18	0.58	0.19
2	广东英德	江西青峰	0.38	0.64	0.52
3	广东英德	江西青峰	0.21	0.69	0.10
4	广东英德	江西青峰	0.11	0.58	0.11
5	广东英德	江西青峰	0.29	1.05	0.18
6	广东英德	江西青峰	0.18	1.01	0.17
7	广东英德	江西青峰	0.19	0.92	0.25
8	广东英德	江西青峰	0.22	0.72	0.17
9	广东翁源	江西青峰	0.19	0.91	0.20
10	江西	江西青峰	0.51	1.74	0.66
11	广西	广东万年青	0.18	0.81	0.21
12	广西	广东万年青	0.40	1.66	0.35
13	广西	广东万年青	0.34	1.11	0.72
14	广西	广东万年青	0.19	0.71	0.33
15	广西	广东万年青	0.25	0.76	0.29
16	广西	广东万年青	0.29	1.01	0.34
17	广西	广东万年青	0.23	1.09	0.17
18	广东清远	广东万年青	0.25	0.40	0.33
19	广东清远	广东万年青	0.38	1.19	0.58
20	广东清远	广东万年青	0.20	0.39	0.23

统;S3(乙腈-十二烷基苯磺酸钠水溶液)系统,梯度洗脱;S4(乙腈-磷酸盐缓冲溶液)系统,梯度洗脱;S5(乙腈-氨水)系统,梯度洗脱。结果发现以 S1 系统分离度、峰形及理论塔板数较好,故选择其为流动相。

3.3 检测波长的选择 从 PDA 绘制的三维图谱,

可知各组分的最大吸收波长主要集中在 254 nm 附近,故选择 254 nm 为检测波长。

本实验由于采样较少,试验数据不能完全反映各产地苦木药材的质量情况。但从 20 批苦木药材样品的含测数据可以看出,不同批次、产地的样品间 3-甲基-铁屎米-5,6-二酮、4-甲氧基-5-羟基铁屎米酮、4,5-二甲氧基-铁屎米酮三种抗菌消炎有效成分的含量差异性明显。究其原因可能是由于药材的生长年限、采收期、采收部位的差异造成的。苦木药材的质量不一和不可控性必然导致苦木相关制剂产品质量的不稳定。提示,应从药材质量控制入手,建立苦木 GAP 种植基地,方能从源头对苦木制剂产品的质量进行控制。

[参考文献]

- [1] 宋振玉,周同惠,方程起,等. 中草药现代研究[M]. 北京:北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1996:468.
- [2] 沙静姝. 莲胆注射液[J]. 药学通报,1988,23(7):440.
- [3] 马树德. 苦木总生物碱对心血管系统的作用[J]. 药理学学报,1982,5(5):53.
- [4] 国家医药管理局中草药情报中心站编. 植物有效成分手册[M]. 北京:人民卫生出版社,1986:875,961.
- [5] 梁文法. 苦木的抗蛇毒研究[J]. 中药通报,1987,12(4):54.
- [6] 陈猛,范华英,戴胜军,等. 苦木生物碱抗菌活性成分的研究[C]. 北京:创新药物及新品种研究、开发学术研讨会,2006.

[责任编辑 顾雪竹]