

HPLC 测定长形肉豆蔻中木脂素类成分的含量

李峰, 张凡, 赵佳丽, 降雪, 贾天柱*
(辽宁中医药大学, 辽宁 大连 11600)

[摘要] 目的: 分析长形肉豆蔻中木脂素类成分, 为质量评价提供依据。方法: 采用高效液相色谱法, 色谱柱为 TC-C₁₈ (4.6 mm × 150 mm, 5 μm), 流动相乙腈-磷酸三乙胺 (55:45), 柱温 40℃, 检测波长 270 nm。结果: 内消旋二氢愈创木酸在 0.286 0 ~ 1.716 0 μg 呈现良好的线性关系 ($r=0.9998$), 长形肉豆蔻中内消旋二氢愈创木酸的平均含量为 0.833 7 mg·g⁻¹。erythro-1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-4-(3,4-methylenedioxy phenyl)-2,3-dimethylbutane 在 0.320 ~ 1.920 μg 呈现良好的线性关系 ($r=0.9998$), 长形肉豆蔻中 erythro-1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-4-(3,4-methylenedioxy phenyl)-2,3-dimethylbutane 的平均含量为 0.572 4 mg·g⁻¹。结论: 高效液相色谱法可以准确的测定长形肉豆蔻中木脂素类成分的含量, 方法简单可行。

[关键词] 长形肉豆蔻; 高效液相色谱法; 木脂素; 含量测定

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)13-0059-03

Determination of Lignan Ingredients in *Mystica argentea* by HPLC

Li Feng, ZHANG Fan, ZHAO Jia-li, JIANG Xue, JIA Tian-zhu*

(Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China)

[Abstract] **Objective:** Lignan ingredients from *Mystica argentea* were analyzed to provide the basis for the quality evaluation. **Method:** Aglient TC-C₁₈ column (4.6 mm × 150 mm, 5 μm) was used in high performance liquid chromatograph, acetonitrile: triethylamine phosphate (55:45) was used as mobile phase. The column temperature was set at 40℃ and the detection wavelength was at 270 nm. **Result:** Meso-dihydro-nor dihydroguaiaretic acid was linear in the range of 0.286 0-1.716 0 μg ($r=0.9998$), the average content of meso-dihydro-nordihydroguaiaretic acid from *M. argentea* was 0.833 7 mg·g⁻¹; erythro-1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-4-(3,4-methylenedioxy phenyl)-2,3-dimethylbutane was linear in the range of 0.320-1.920 μg ($r=0.9998$), the average content of erythro-1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-4-(3,4-methylenedioxy phenyl)-2,3-dimethylbutane from *M. argentea* was 0.572 4 mg·g⁻¹. **Conclusion:** The method for determination of lignan ingredients from *M. argentea* by HPLC was useful and feasible.

[Key words] *Mystica argentea*; HPLC; lignan; determination

肉豆蔻为肉豆蔻科植物 *Mystica fragrans* Houtt. 的干燥成熟种仁, 始载于唐《本草拾遗》。性温, 味辛, 归脾、胃、大肠经。具温中行气, 涩肠止泻之功。主要用于脾胃虚寒, 久泻不止, 虚寒气滞之脘腹胀

痛、食少呕吐等疾病^[1]。现在市场上出售的肉豆蔻分有 2 种: 一种为圆形肉豆蔻, 别名肉果、玉果。另一种为长形肉豆蔻, 又名长壳玉果, 为同属植物长形肉豆蔻 *M. argentea* Warb. 的带皮果实。为了肉豆蔻的研究更加深入, 我们对长形肉豆蔻的化学成分进行分析, 分离出 9 个非挥发性成分, 本文对长形肉豆蔻的 2 个含量较大的木脂素类成分 (化合物 1) 内消旋二氢愈创木酸, (化合物 2) erythro-1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-4-(3,4-methylenedioxy phenyl)-2,3-dimethylbutane 进行含量测定, 为提高长形肉豆蔻的

[收稿日期] 20100509(002)

[第一作者] 李峰, 研究生, 研究方向中药炮制学; Tel: 0411-87586116

[通讯作者] * 贾天柱, 教授, 博士生导师, 主要从事中药炮制原理研究, Tel: 0411-87586499, E-mail: jiatz@lnutcm.edu.cn

质量提供依据。

1 仪器与试药

1.1 仪器 安捷伦 1100-series 高效液相色谱仪, (G1314A 紫外检测器)。METTLER AE-240 型 1/10 万分析天平(瑞士 METTLER); KQ-250DB 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); FA1004B 电子天平(上海精密科学仪器有限公司)。

1.2 试剂 乙腈(天津市科密欧化学试剂有限公司), 甲醇为色谱纯(天津市大茂化学试剂厂), 水为重蒸水, 磷酸(天津市大茂化学试剂厂), 三乙胺均为分析纯(沈阳市新西试剂厂)。

1.3 药材 长形肉豆蔻药材购于安徽亳州药材市场, 经辽宁中医药大学翟延君教授鉴定为肉豆蔻植物长形肉豆蔻 *M. argentea* Warb. 的干燥成熟种仁。

1.4 对照品 化合物 1 和化合物 2 对照品为自行分离精制(经高效液相色谱法面积归一化法测定, 纯度 > 98.0%)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱 TC-C₁₈ (4.6 mm × 150 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-磷酸三乙胺(55:45); 流速为 1 mL·min⁻¹; 柱温为 40 °C; 检测波长为 270 nm。理论塔板数按内消旋二氢愈创木酸, erythro-1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-4-(3,4-methylenedioxyphenyl)-2,3-dimethylbutane 计算不低于 3 000 (图 1)。

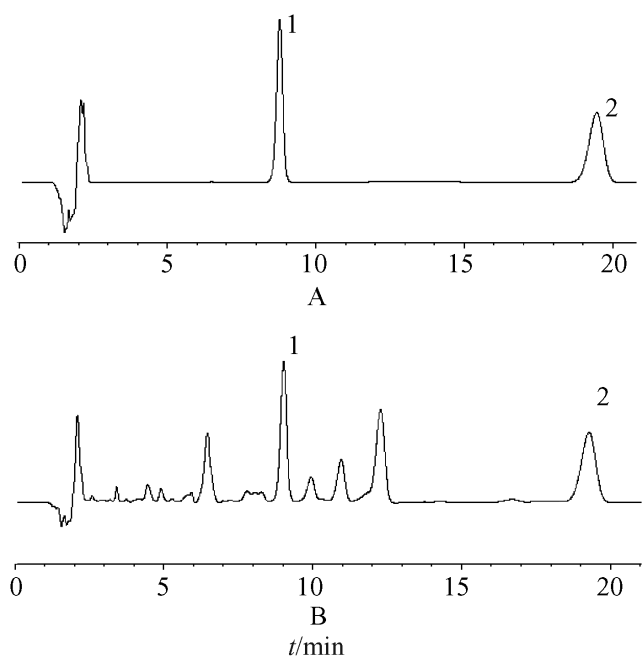


图 1 混合对照品(A) 样品(B) HPLC 色谱

1. 内消旋二氢愈创木酸; 2. erythro-1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-4-(3,4-methylenedioxyphenyl)-2,3-dimethylbutane

2.2 混合对照品溶液的制备 精密称取化合物 1 对照品 1.43 mg, 化合物 2 对照品 1.60 mg, 置 10 mL

量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀。制成 0.143 g·L⁻¹ 的化合物 1 和 0.160 g·L⁻¹ 的化合物 2 的混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备 称取长形肉豆蔻药材(过 20 目筛) 0.5 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 加入 25 mL 甲醇, 称定质量, 超声处理(功率 250 W, 频率 40 kHz) 30 min, 取出, 放冷, 再称定质量, 用甲醇补足减少的质量, 摇匀, 用 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 取续滤液, 即得。

2.4 线性关系考察 分别精密吸取混合对照品溶液 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10.0, 12.0 μL 按上述色谱条件测定峰面积。以对照品峰面积为纵坐标, 以对照品进样量为横坐标, 绘制标准曲线, 进行线性回归, 得回归方程化合物 1 $Y = 257.23X + 336.71$, $r = 0.9998$, 线性范围 0.2860 ~ 1.7160 μg; 化合物 2 $Y = 273.77X - 40.297$, $r = 0.9998$, 线性范围 0.320 ~ 1.920 μg, 结果表明线性关系良好。

2.5 精密度试验 精密吸上述混合对照品溶液各 10 μL, 注入高效液相色谱仪, 连续进样 6 次, 测定化合物 1 和化合物 2 的色谱峰面积, RSD 分别为 1.62%, 1.49% ($n=6$), 结果表明, 精密度良好。

2.6 重复性试验 精密称取同一批样品各 6 份, 按照供试品溶液制备的方法制备, 精密称取各供试品溶液 10 μL, 分别注入高效液相色谱仪, 进行测定, 结果供试品溶液中化合物 1 和化合物 2 的 RSD 分别为 1.61%, 1.49% ($n=6$), 表明方法重复性良好。

2.7 稳定性试验 精密吸取同一供试品溶液, 在 0, 2, 4, 6, 8 h 分别进样, 测定化合物 1 和化合物 2 的色谱峰面积, RSD 分别是 1.32%, 1.71%。结果表明, 供试品溶液至少在 8 h 内保持稳定。

2.8 回收率试验 取已知含量的长形肉豆蔻药材粉末(过 20 目) 0.25 g 各 5 份, 分别精密称定, 加入化合物 1、化合物 2 对照品适量, 按照供试品溶液项下方法操作, 测定, 结果化合物 1 回收率在 97.4% ~ 101.2% 之间, RSD 1.39%。化合物 2 回收率在 97.83% ~ 100.6% 之间, RSD 1.02%, 见表 1, 2。本方法回收率好, 准确度高。

2.9 样品含量测定 5 批样品, 按供试品溶液制备方法制备; 按上述色谱条件测定精密吸取供试品溶液和混合对照品溶液各 10 μL, 外标法计算生品长形肉豆蔻中化合物 1 和化合物 2 的百分含量, 结果如表 3。

表 1 化合物 1 加样回收率

取样量 /g	样品中的量 /mg	加入量 /mg	测出的量 /mg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
0.237 8	0.198 3	0.208 4	0.417 6	97.40		
0.248 9	0.207 5	0.208 4	0.416 6	99.84		
0.245 8	0.204 9	0.208 4	0.416 6	99.20	99.49	1.39
0.253 1	0.211 0	0.208 4	0.414 4	101.2		
0.243 5	0.203 0	0.208 4	0.412 2	99.81		

表 2 化合物 2 加样回收率

取样量 /g	样品中的量 /mg	加入量 /mg	测出的量 /mg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
0.237 8	0.136 1	0.143 1	0.285 4	97.83		
0.248 9	0.142 5	0.143 1	0.286 1	99.84		
0.245 8	0.140 7	0.143 1	0.285 9	99.26	99.37	1.02
0.253 1	0.144 9	0.143 1	0.286 3	100.6		
0.243 5	0.139 4	0.143 1	0.284 4	99.32		

表 3 样品含量 mg·g⁻¹

样品	化合物 1	化合物 2
生品 1	0.856 0	0.562 6
生品 2	0.792 2	0.564 3
生品 3	0.828 0	0.576 2
生品 4	0.809 8	0.547 4
生品 5	0.882 6	0.611 5
平均含量	0.833 7	0.572 4

3 讨论

曾用乙醇, 乙酸乙酯, 甲醇提取, 结果发现, 乙醇提取效果不好, 乙酸乙酯提取杂质多损伤色谱柱, 最后用甲醇作为提取溶剂超声提取 30 min, 对照品的提取效果好, 方法简便, 可行。

实验中对甲醇-磷酸系统, 甲醇-磷酸三乙胺, 乙腈-磷酸三乙胺多种比例进行考察, 最后选定乙腈-磷酸三乙胺(55:45)作为流动相, 在此系统下, 得到较满意的分离度, 保留时间适宜。

本实验只对内消旋二氢愈创木酸, erythro-1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-4-(3,4-methylenedioxyphenyl)-2,3-dimethylbutane 2 种木脂素类化合物进

行含量测定, 分离出的另外 7 种化合物紫外吸收不明显, 因此没有作为重点考察。

有研究表明, 长形肉豆蔻中木脂素类成分具有抗增殖、抗芳香酶、抗 17 β -羟基类固醇脱氢酶和抗氧化性等作用^[2-5], 测定长形肉豆蔻中木脂素成分的含量, 对评价长形肉豆蔻的质量及临床应用提供依据。

[参考文献]

- [1] 中国药典[S]. 一部. 2010: 126.
- [2] 袁子民. 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.
- [3] 谭锐. 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] 王莹, 杨秀伟. 肉豆蔻中新木脂素类化合物的定量分析[J]. 中国现代中药, 2008, 10(2): 10.
- [5] Filleur. Antiproliferative, anti-aromatase, anti-17 β -HSD and antioxidant activities of lignans isolated from *Myristica argentea*[J]. *Planta Medica*, 2001, 67(8): 700.

[责任编辑 顾雪竹]