

草豆蔻药材质量控制方法研究

李元圆^{1,2,3}, 俞桂新^{2,3}, 杨莉², 王峥涛^{2,3*}

(1. 浙江省医学高等专科学校, 浙江 杭州 310053

2. 上海中医药大学 教育部中药标准化重点实验室, 上海 201203

3. 上海中药标准化研究中心, 上海 201203)

[摘要] 目的: 建立草豆蔻药材的定性鉴别和定量检测方法。方法: 运用薄层色谱法和高效液相色谱法对草豆蔻药材中山姜素 (alpinetin)、乔松素 (pinocembrin)、小豆蔻明 (cardamonin) 和桉木酮 (ahustone) 进行定性鉴别和含量测定。以 Ultimate XB-C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 为固定相, 甲醇-水为流动相, 梯度洗脱, 检测波长 300 nm, 柱温 30 °C。结果: 草豆蔻药材中山姜素、乔松素、小豆蔻明和桉木酮的薄层色谱鉴别特征明显, 专属性强; 4 个指标成分在进样量 25.5~509 (r=0.999 9), 24.9~498 (r=0.999 9), 26.1~521 (r=0.999 9), 50.2~1003 ng (r=0.999 9) 与峰面积线性关系良好; 平均加样回收率 (n=9) 分别为 97.95%, 97.36%, 97.56%, 98.02%, RSD 均小于 1.9%。结论: 通过对 9 批不同来源的草豆蔻药材的薄层鉴别和含量测定, 证明该方法简单灵敏, 专属性强, 准确可靠, 重复性好, 为全面评价草豆蔻药材质量提供了参考。

[关键词] 草豆蔻; 山姜素; 乔松素; 小豆蔻明; 桉木酮; 薄层色谱法; 质量标准

草豆蔻为姜科植物草豆蔻 *Alpinia katsumadai* Hayata 的干燥近成熟种子, 为常用中药^[1]。草豆蔻主要含有黄酮、双苯庚烷、二苯乙烯及萜类等化合物^[2-6]。前期研究表明山姜素、乔松素、小豆蔻明和桉木酮在草豆蔻中含量最高, 是其治疗胃溃疡、促进胃肠功能、镇吐和抑菌的主要活性成分^[7-9]。《中国药典》(2005 年版一部) 草豆蔻药材的质量标准记载了以小豆蔻明、山姜素为指标成分的薄层色谱鉴别和总挥发油含量测定^[1]。文献报道也仅有草豆蔻药材中山姜素和小豆蔻明的 HPLC 含量测定研究^[10-12]。本文以山姜素、乔松素、小豆蔻明和桉木酮为指标成分, 建立了草豆蔻药材的薄层色谱鉴别和高效液相色谱含量测定方法。

1 仪器与试剂

Waters 600 系列高效液相色谱仪 (Waters 600 controller 717 plus Autosampler, 996 PDA 检测器, HT-220A 柱温箱); 瑞士 Camag 薄层色谱仪 (Automatic TLC sampler 4 Reprostar 3)。

山姜素、乔松素、小豆蔻明和桉木酮对照品由上海中药标准化研究中心提供, 纯度 ≥98%; 甲醇为色谱纯, 水为重蒸水, 其余溶剂为分析纯。

[稿件编号] 20100129004

[基金项目] 《中国药典》2010 版一部标准研究 (YD-013)

[通信作者] * 王峥涛, Tel (021) 51322507, E-mail wangzht@hotmail.com

草豆蔻药材分别购于海南、广东、河北、河南、安徽、陕西等省, 经上海中药标准化研究中心吴立宏教授鉴定为草豆蔻 *A. katsumadai*, 凭证标本存于上海中药标准化研究中心。

2 方法与结果

2.1 山姜素、乔松素、小豆蔻明和桉木酮的薄层色谱鉴别

2.1.1 TLC 色谱条件 10 cm × 20 cm 硅胶 MN HGF254 薄层板, 展开剂为甲苯-乙酸乙酯-甲醇-丙酮 (18:1:0.7:0.3); CAMAG Automatic TLC sampler 4 自动点样仪; 点样量对照品 3 μL, 供试品 3 μL; 带宽 6 mm, 间距 10 mm。

2.1.2 对照品溶液的制备 取山姜素、乔松素、小豆蔻明和桉木酮对照品, 加甲醇制成每 1 mL 各含 1 mg 的混合溶液, 作为对照品溶液。

2.1.3 供试品溶液的制备 取草豆蔻药材粉末 1 g 加甲醇 5 mL, 超声提取 5 min (功率 250 W, 频率 40 kHz), 滤过, 滤液作为供试品溶液。

2.1.4 展开与显色 取甲苯-乙酸乙酯-甲醇-丙酮 (18:1:0.7:0.3) 约 15 mL 置双槽展开缸中, 预平衡 15 min 展开, 取出, 晾干, 展距 8 cm, 均匀喷以 1% 香草醛硫酸溶液, 在 105 °C 加热至斑点显色清晰, 在日光及紫外光灯 366 nm 下检视。

2.2 山姜素、乔松素、小豆蔻明和桉木酮的 HPLC 含量测定

2.2.1 色谱条件与系统适用性试验 以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂;以水为 A 相,以甲醇为 B 相,梯度洗脱。0~20 min 60% B; 20~21 min, 60%~74% B; 21~31 min, 74% B; 31~32 min, 74%~80% B; 32~42 min, 80% B; 柱温 30℃; 检测波长 300 nm。理论塔板数按小豆蔻明色谱峰计算不低于 5 000。

2.2.2 对照品溶液的制备 精密称取山姜素、乔松素、小豆蔻明和桉木酮对照品适量,加甲醇制成每 1 mL 含山姜素、乔松素、小豆蔻明和桉木酮分别为 0.04 0.04 0.04 0.080 mg 的对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液的制备 取本品粉末(3号筛)0.5 g 精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇 50 mL,称重,超声提取(功率 250 W,频率 40 kHz)30 min,放冷,再称重,用甲醇补足失重,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.2.4 检测限与定量限 以信噪比为 3:1 确定山姜素、乔松素、小豆蔻明、桉木酮的检测限为 0.499, 0.51, 0.509, 1.015 g·mL⁻¹。以信噪比为 10:1 确定山姜素、乔松素、小豆蔻明、桉木酮的定量限为 3.10, 3.463, 2.626, 4.692 g·mL⁻¹, RSD 分别为 1.8%, 1.1%, 1.8%, 1.7%。

2.2.5 线性关系 精密称取山姜素、乔松素、小豆蔻明、桉木酮对照品 5.09, 4.98, 5.21, 10.03 mg 置 50 mL 量瓶中,以甲醇稀释并定容至刻度,摇匀。得到质量浓度分别为 101.8, 99.6, 104.2, 200.6 g·mL⁻¹ 的混合对照品溶液。精密吸取该溶液配成系列浓度的对照品溶液。准确吸取上述对照品溶液 5 μL,按上述确定的色谱条件进行测定,以每个对照品的进样量(ng)为横坐标,峰面积为纵坐标,绘制标准曲线,得到 4 个成分的线性回归方程及线性范围,见表 1。

2.2.6 精密度试验 日内精密度(n=5)准确吸取同一供试品溶液 5 μL,连续进样 5 次,求得山姜素、乔松素、小豆蔻明、桉木酮峰面积的 RSD 分别为 0.94%, 1.3%, 1.1%, 0.79%。

日间精密度(n=15)上述供试品分别测定 3 d 每天测定 5 次,求得山姜素、乔松素、小豆蔻明、桉木酮峰面积的 RSD 分别为 1.7%, 2.1%, 2.4%, 3.0%。

2.2.7 重复性试验 取同一样品(河北安国)6 份,精密称定,按“供试品溶液制备”项下操作,在上

表 1 山姜素、乔松素、小豆蔻明、桉木酮的线性回归方程及线性范围

化合物	线性回归方程	线性范围 /ng
山姜素	$Y = 1\,987.6X + 3.908 \times 10^3$	25.5~509
乔松素	$Y = 2\,513.1X - 2.929 \times 10^3$	24.9~498
小豆蔻明	$Y = 2\,854.2X + 6.791 \times 10^3$	26.1~521
桉木酮	$Y = 4\,429.5X + 2.117 \times 10^4$	50.2~1\,003

注: $R^2 = 0.9999$

述色谱条件下进行进样测定,山姜素、乔松素、小豆蔻明和桉木酮含量的 RSD 分别为 1.7%, 1.4%, 1.2%, 1.1%。

2.2.8 稳定性试验 准确吸取同一供试品溶液 5 μL,分别在 0, 1, 2, 4, 8, 12, 24, 36, 48, 72 h 进行测定,山姜素、乔松素、小豆蔻明、桉木酮峰面积的 RSD 分别为 2.9%, 3.0%, 3.5%, 2.6%。表明,样品在 72 h 内稳定。

2.2.9 加样回收率试验 取已知山姜素、乔松素、小豆蔻明、桉木酮含量的草豆蔻药材粉末 0.25 g 精密称定 9 份,分别加入高、中、低 3 个浓度(分别为已知含量的 80%, 100%, 120%)的山姜素、乔松素、小豆蔻明和桉木酮对照品混合液,每个浓度 3 份,按供试品溶液制备项下方法操作,测定,见表 2。

表 2 4 个被测成分加样回收率(n=9)

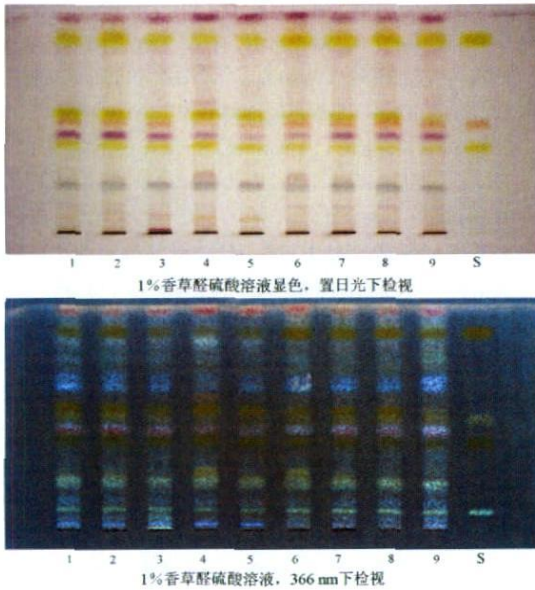
化合物	样品中量		加入量		测得量		回收率	平均回收率	RSD
	/mg		/mg		/mg		%	%	%
山姜素	1.325 2	1.108 8	2.415 3	98.32	97.95	1.8			
			2.678 8	97.73					
			2.953 1	97.81					
乔松素	1.389 6	1.157 1	2.508 7	96.73	97.36	1.5			
			2.793 4	97.13					
			3.095 8	98.23					
小豆蔻明	1.005 3	0.857 6	1.845 3	97.96	97.50	1.8			
			2.043 6	96.93					
			2.261 6	97.60					
桉木酮	2.328 7	1.896 6	4.192 6	98.28	98.02	1.4			
			4.644 5	97.76					
			5.119 3	98.02					

3 样品测定

3.1 薄层色谱鉴别

9 批草豆蔻药材样品按 2.1 项下方法,制备溶液、点样、展开显色。供试品色谱中,在与小豆蔻明对照品、桉木酮对照品色谱相应的位置上,显相同的

黄色斑点,在与乔松素对照品色谱相应的位置上,显相同的红色斑点。置紫外光灯 366 nm 下检视,供试品色谱中,在与山姜素对照品相应的位置上显相同的蓝色荧光斑点,见图 1。



1. 河北安国; 2. 海南海口; 3. 安徽亳州 1; 4. 河南郑州 1; 5. 河南郑州 2 6. 安徽亳州 2 7. 广东广州 1; 8. 广东广州 2 9. 陕西西安; S. 对照品 (由下至上依次为山姜素、小豆蔻明、乔松素和桉木酮)。

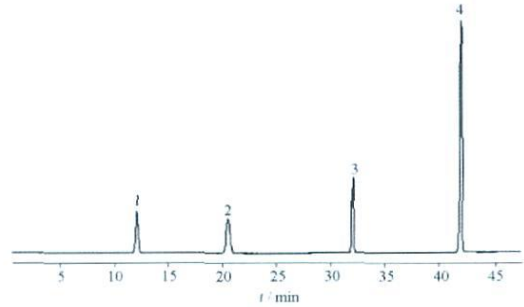
图 1 草豆蔻药材和对照品 TLC 图

3.2 含量测定

按照本方法的测定条件,分别测定 9 批草豆蔻药材样品,每个批次平行 2 份,每份样品平行进样 2 针,以外标法计算样品中山姜素、乔松素、小豆蔻明和桉木酮的含量,结果见表 3。阴性对照色谱图、对照品色谱图和样品色谱图见图 2~3。

表 3 各批次草豆蔻药材中 4 个指标成分质量分数 ($n=2$)

来源样品	山姜素	乔松素	小豆蔻明	桉木酮
河北安国	0.464	0.814	0.536	0.551
海南海口	0.637	0.658	0.428	1.087
安徽亳州 1	0.525	0.878	0.545	0.751
河南郑州 1	0.345	0.469	0.391	10.304
河南郑州 2	0.891	0.738	0.419	0.856
安徽亳州 2	0.725	1.025	0.256	0.857
广东广州 1	0.328	0.178	0.857	0.216
广东广州 2	0.352	0.245	0.666	0.276
陕西西安	0.834	0.862	0.180	0.690



1. 山姜素 2. 乔松素 3. 小豆蔻明 4. 桉木酮。

图 2 对照品 HPLC 图

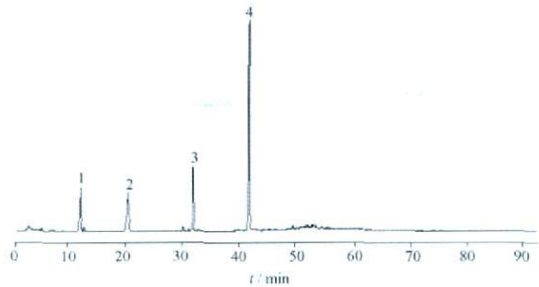


图 3 草豆蔻样品 HPLC 图

4 讨论

在薄层色谱鉴别实验中,参考《中国药典》2005 年版草豆蔻项下展开剂条件,分别比较了甲苯-乙酸乙酯-甲醇 (14: 1: 0.5)、甲苯-乙酸乙酯-甲酸 (10: 1: 1)、甲苯-乙酸乙酯-甲醇-丙酮 (18: 1: 0.7: 0.3), 结果表明,以甲苯-乙酸乙酯-甲醇-丙酮 (18: 1: 0.7: 0.3) 为展开剂,4 个指标成分斑点与干扰成分分离较好, R 值较合适, 故选该条件为展开剂。此外还考察了硅胶板、温度、湿度对薄层鉴别的影响, 结果表明,不同品牌的 HGF254 板均能符合要求, 其中 MN HGF254 板的效果最佳, 温度在室温 (20~ 25 ℃) 及低温 (4~ 10 ℃)、相对湿度在 40% ~ 70% 时 4 个指标成分均能得到较好的分离。

HPLC 供试品溶液制备中, 分别考察了不同提取溶剂 (甲醇、乙酸乙酯、二氯甲烷)、提取方法 (超声法、回流法和浸渍法)、提取时间 (30 60 120 min)、提取次数 (1 次、2 次和 3 次)、提取溶剂用量 (50 100 200 倍) 对各指标成分的色谱峰面积的影响, 确定了上述供试品溶液制备方法。

HPLC 含量测定中, 山姜素、乔松素、小豆蔻明和桉木酮的最大吸收波长分别为 288 296 350 326 nm。在 300 nm 处, 4 个指标成分均有较强的紫外吸

收,且测定结果与在最大吸收波长处测得结果相同,因此选定 300 nm 作为含量测定波长,使方法更为简单,提高了普适性。

在 HPLC 条件耐受性实验中,分别考察了不同色谱柱、不同流速、不同柱温等条件,结果表明,色谱条件的微小变化对测定结果影响不大(RSD 均小于 2%),说明本方法的耐用性好。

山姜素、乔松素、小豆蔻明和桉木酮 4 个成分在草豆蔻药材中含量最高,是其主要活性成分。9 批药材测定结果显示,4 个指标成分在不同批次药材间含量差异较大,为了能较全面的反映出草豆蔻药材质量的优劣,本文以各批次药材中黄酮含量加合和桉木酮含量来评价药材质量,以黄酮含量加合和桉木酮含量平均值下浮 20%,暂定草豆蔻药材中,山姜素、乔松素、小豆蔻明的含量加合和桉木酮的含量应分别不得少于 1.36%, 0.50%。

本文建立的草豆蔻药材 HPLC 含量测定法操作简便,耐用性好,测定结果已通过海南省药品检验所的复核。因此,此法具有较好的适用性与可靠性。可以用于草豆蔻药材的质量评价。

[参考文献]

[1] 中国药典.一部[S].2005 165.
 [2] Ngo K S, Brown G D. Stilbenes, monoterpenes, diarylheptanoids, labdanes and chakones from *Alpinia katsumadai* [J].

Phytochemistry, 1998, 47(6): 1117.
 [3] Huang W Z, Zhang C F, Zhang M, et al. A new biphenylpropenoid from *Alpinia katsumadai* [J]. J Chin Chem Soc, 2007, 54(6): 1553.
 [4] Hua S Z, Wang X B, Luo J G, et al. A pair of unique sesquiterpene chakone conjugates isolated from the seeds of *Alpinia katsumadai* [J]. Tetra Lett, 2008, 49(39): 5658.
 [5] Hua S Z, Luo J G, Wang X B, et al. Two novel monoterpene-chakone conjugates isolated from the seeds of *Alpinia katsumadai* [J]. Biorg Med Chem Lett, 2009, 19(10): 2728.
 [6] Kuroyanagi M, Noro T, Fukushima S, et al. Studies on the constituents of the seeds of *Alpinia katsumadai* Hayata [J]. Chem Pharm Bull, 1983, 31(5): 1544.
 [7] 黄文哲,戴小军,刘延庆,等.草豆蔻中黄酮和双苯庚酮的抑菌活性[J].植物资源与环境学报,2006 15(1): 37.
 [8] Wang Z T, Lau C W, Chan FL, et al. Vasorelaxant effects of cardamonin and alpinetin from *Alpinia henryi* K. Schum [J]. J Cardiovasc Pharmacol, 2001, 37(5): 596.
 [9] 黄文哲,王峙涛,王智民.草豆蔻药效物质基础及质量评价研究[D].南京:中国药科大学,2006 58.
 [10] 饶伟文,林泳德. HPLC 测定草豆蔻中山姜素、豆蔻明的含量[J].中国药学杂志,1998 33(12): 743.
 [11] 谭洁珍,李杰明. HPLC 法测定草豆蔻中豆蔻明[J].中草药,2006 37(1): 133.
 [12] 乔春峰,韩全斌,宋景政. HPLC 法分析山姜属植物中的 8 种活性成分[J].天然产物研究与开发,2008 20(3): 422.

Qualitative and quantitative methods for *Alpiniae Katsumadai Semen*

LI Yuanyuan^{1,2,3}, CHOU Guixin^{2,3}, YANG L², WANG Zhengtao^{2,3*}

(1. Zhejiang Medical College Hangzhou 310053, China

2. MOE Key Laboratory of Standardization of Chinese Medicines, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China

3. Shanghai Research and Development Centre for Standardization of Chinese Medicines, Shanghai 201203, China)

[Abstract] The qualitative and quantitative methods for the quality evaluation of *Alpiniae Katsumadai Semen* were established. Alpinetin, pinocembrin, cardamonin and alnustone in the sample were identified by TLC. The contents of them were determined by HPLC. The separation was performed on a Ultimate XB-C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) at 30 °C using a gradient elution consisting of mobile phase A (water) and mobile phase B (MeOH). The detection wavelength was 300 nm. The TLC method was suitable for the identification of alpinetin, pinocembrin, cardamonin and alnustone. The linear ranges of the four reference compounds were 25.5-509 (r = 0.999 9), 24.9-498 (r = 0.999 9), 26.1-521 (r = 0.999 9), 50.2-1 003 ng (r = 0.999 9), respectively. The average recoveries (n = 9) of the four components were 97.95%, 97.36%, 97.50%, 98.02%, RSD < 1.9%. Nine samples were analyzed by the established methods. The results indicate that the methods are simple, accurate, sensitive and reliable for quality evaluation of *Alpiniae Katsumadai Semen*.

[Key words] *Alpiniae Katsumadai Semen*; alpinetin; pinocembrin; cardamonin; alnustone; TLC; quality standard

doi 10.4268/cjmm20101611

[责任编辑 王亚君]