

HPLC 法同时测定没药中 3 个倍半萜类成分的含量

陈露¹, 吉腾飞³, 吴西², 曾顺², 邹传生², 周国平^{2*}, 袁铭铭^{2*}

(1. 南昌大学, 南昌 330006; 2. 江西省药品检验检测研究院, 江西省药品与医疗器械质量工程技术研究中心, 南昌 330029;

3. 中国医学科学院北京协和医学院药物研究所, 北京 100050)

摘要 目的: 建立同时测定没药中相对-1*S*, 2*S*-环氧-4*R*-呋喃大根香叶-10(15)-烯-6-酮(化合物 I)、(1(10)*E*, 2*R*, 4*R*)-2-甲氧基-8, 12-环氧大根香叶-1(10), 7, 11-三烯-6-酮(化合物 II)和莪术酮(化合物 III) 3 个倍半萜类成分含量的高效液相色谱法。**方法:** 采用 CAPCELL PAK C₁₈ 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 以乙腈(A)-0.1% 磷酸水溶液(B)为流动相, 梯度洗脱, 流速 1.0 mL · min⁻¹, 检测波长 210 nm, 柱温 30 °C。**结果:** 化合物 I、II 和 III 进样量分别在 0.018 4~0.46 μg (*r*=1.000 0)、0.029~0.725 μg (*r*=1.000 0) 和 0.025 8~0.645 μg (*r*=1.000 0) 范围内与峰面积呈现良好的线性关系, 精密度(RSD<0.4%)、稳定性(RSD<0.7%)良好, 平均回收率(*n*=6)分别为 98.9%(RSD=0.48%)、98.6%(RSD=0.79%)、98.3%(RSD=0.60%); 6 批样品中化合物 I、II 和 III 含量范围分别为 0.448~2.004、1.399~11.919 和 1.050~3.922 mg · g⁻¹。**结论:** 该方法可用于没药中化合物 I、II 和 III 的含量测定。

关键词: 没药; 树脂; 倍半萜类; 含量测定; 高效液相色谱法

中图分类号: R 917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793(2019)07-1244-05

doi: 10.16155/j.0254-1793.2019.07.11

Simultaneous determination of three sesquiterpenes in *Commiphora myrrha* by HPLC

CHEN Lu¹, JI Teng-fei³, WU Xi², ZENG Shun², ZOU Chuan-sheng²,
ZHOU Guo-ping^{2*}, YUAN Ming-ming^{2*}

(1. Nanchang University, Nanchang 330006, China; 2. Jiangxi Institute for Drug Control, Jiangxi Provincial Engineering

Research Center for Drug and Medical Device Quality, Nanchang 330029, China; 3. Institute of Materia Medica,

Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

Abstract Objective: To establish an HPLC method for the simultaneous determination of three sesquiterpenes in *Commiphora myrrha*, namely, rel-1*S*, 2*S*-epoxy-4*R*-furan-ogerma-10(15)-en-6-one (compound I), (1(10)*E*, 2*R*, 4*R*)-2-methoxy-8, 12-epoxygermacra-1(10), 7, 11-trien-6-one (compound II) and curzerenone [6, 7-dihydro-5 β-isopropenyl-3, 6 β-dimethyl-6-vin-ylbenzofuran-4(5*H*)-one] (compound III).

* 通信作者 周国平 Tel: 13870868633; E-mail: 13870868633@139.com

袁铭铭 Tel: 13426688499; E-mail: 972988606@qq.com

第一作者 Tel: 18870039683; E-mail: 1591094809@qq.com

Methods: The CAPCELL PAK C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) was used, the mobile phase was acetonitrile (A)–0.1% phosphate (B) with gradient elution at a flow rate of 1.0 mL · min⁻¹. The detection wavelength was 210 nm and the column temperature was 30 °C. **Results:** The linear ranges of compound I, compound II and compound III were 0.0184–0.46 μg (*r*=1.000 0), 0.029–0.725 μg (*r*=1.000 0) and 0.0258–0.645 μg (*r*=1.000 0), respectively. The values of precision (RSD<0.4%) and stability (RSD<0.7%) tests were good. The average recoveries (*n*=6) were 98.9% (RSD=0.48%), 98.6% (RSD=0.79%) and 98.3% (RSD=0.60%), respectively. The contents of compound I, compound II and compound III in six batches of samples were 0.448–2.004, 1.399–11.919 and 1.050–3.922 mg · g⁻¹, respectively. **Conclusion:** The method can be used to determine compound I, compound II and compound III in *Commiphora myrrha*.

Keywords: *Commiphora myrrha*; resins; sesquiterpenes; assay; HPLC

没药为橄榄科 (Burseraceae) 没药属 (*Commiphora*) 植物地丁树 *Commiphora myrrha* Egnl. 或哈地丁树 *Commiphora molmol* Egnl. 的干燥树脂, 分为天然没药和胶质没药, 主产于索马里与埃塞俄比亚^[1], 其质量标准收载于《中华人民共和国药典》2015年版一部^[2]。没药药性辛、苦, 平, 归心、肝、脾经, 有特异的香气, 在中国以及印度等地具有悠久的用药历史, 具有活血、消肿、止痛的功效, 主治瘀血心腹诸痛、跌扑伤痛等^[3]。没药为常用中药, 主要成分为倍半萜和三萜^[4], 有关没药质量标准方面研究较少, 主要集中于总挥发油成分以及 HPLC 法测 2-甲氧基-5-乙酰氧基-咪喃大根香叶-1(10)-烯-6-酮和 2-甲氧基-咪喃大根香叶-1(10)-烯-6-酮的含量^[5-8]。本课题组前期从没药中分离得到相对-1S, 2S-环氧-4R-咪喃大根香叶-10(15)-烯-6-酮(化合物 I)、(1(10)*E*, 2*R*, 4*R*)-2-甲氧基-8, 12-环氧大根香叶-1(10), 7, 11-三烯-6-酮(化合物 II) 和莪术酮(化合物 III) 等倍半萜类化合物。化合物 I 具有神经保护, 对乳腺癌细胞株 MCF-7 有细胞毒的活性^[9-10]; 化合物 II 抑制前列腺癌细胞的增殖, 用于抗菌药物预防和治疗人类免疫缺陷病毒及其他传染病, 抗真菌, 抑制肿瘤细胞增殖^[11-14]等活性; 化合物 III 有刺激潜能, 镇痛等活性^[15-16]。目前尚未有文献报道采用 HPLC 同时测定上述没药中 3 个主要成分的含量测定方法。因此, 本实验建立了采用 RP-HPLC 同时测定没药中化合物 I、II 和 III 3 个倍半萜类化合物含量的测定方法, 考察了 6 批没药药材中 3 个成分的含量差异, 为进一步完善没药药材的质量评价方法提供参考依据。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 安捷伦公司 Agilent 1260 型高效液相

色谱仪, 包括 G1311C 四元泵、在线脱气机、G1315D DAD、G1329B 自动进样器、LC1260 色谱工作站、G1316A 柱温箱; 赛多利斯公司 Sartorius BT25S 电子天平(十万分之一)、Sartorius BSA124S-CW 电子天平(万分之一); 昆山市超声仪器公司 KQ-500DE 型数控超声波清洗器。

1.2 试剂 化合物 I、II 和 III 的对照品均为本课题组自制, 通过 ¹H-NMR、¹³C-NMR、MS 等手段确证了其结构, 纯度经 HPLC 法检测均 >98% (面积归一法)。乙腈 (Sigma 公司) 为色谱纯, 水为 Milli-Q 超纯水, 甲醇及乙醇 (国药集团化学试剂有限公司)、磷酸 (西陇科学股份有限公司) 为分析纯。6 批没药药材均购自于药材市场, 由周国平主任药师鉴定为地丁树 *Commiphora myrrha* Engl. 的干燥树脂。

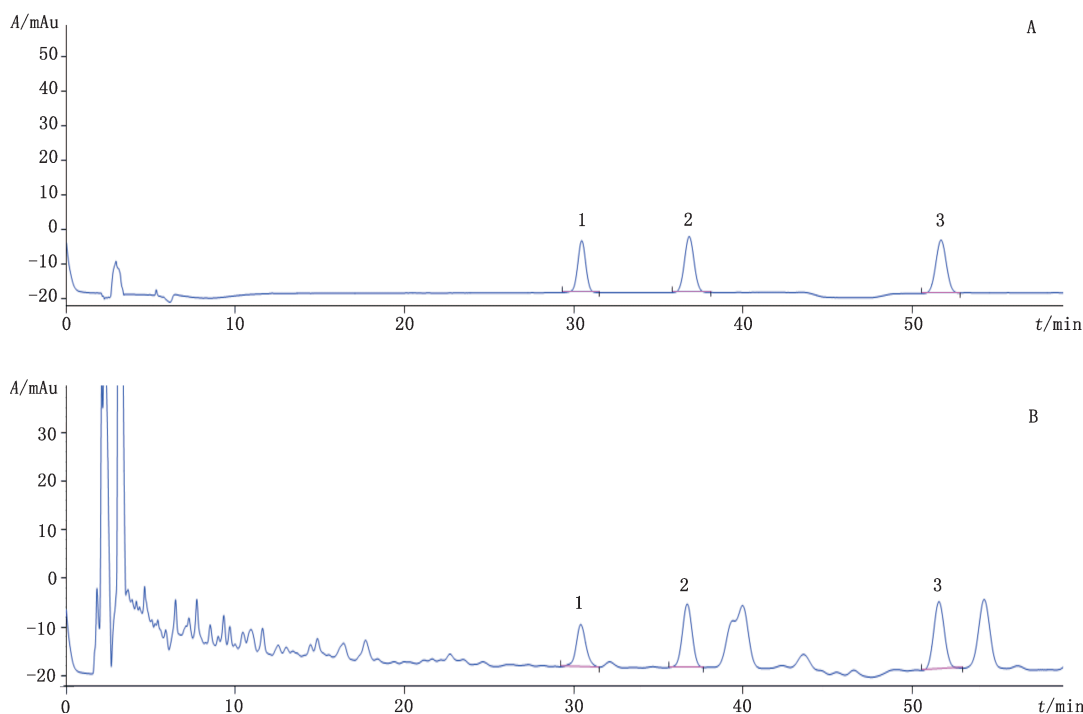
2 溶液的制备

2.1 混合对照品溶液 精密称取化合物 I、II 和 III 的对照品适量, 加甲醇制得质量浓度分别为 0.018 4、0.029 0 和 0.025 8 mg · mL⁻¹ 的混合溶液, 即得。

2.2 供试品溶液 取没药药材粉末 (过 3 号筛) 约 0.2 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 25 mL, 密塞, 称量, 超声 (功率 500 W, 频率 40 kHz) 处理 0.5 h, 放冷, 再称量, 用甲醇补足减失的量, 摇匀, 过 0.45 μm 微孔滤膜, 即得。

3 色谱条件

采用资生堂 CAPCELL PAK C₁₈ 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 柱温 30 °C, 以乙腈 (A)–0.1% 磷酸水溶液 (B) 为流动相, 梯度洗脱 (0~40 min, 41%B; 41~60 min, 44%B), 流速 1.0 mL · min⁻¹, 检测波长 210 nm, 进样量 10 μL; 在上述色谱条件下, 样品色谱中与各对照品对应的吸收峰的理论板数均不低于 3 000, 色谱图见图 1。



1. 化合物 I (compound I) 2. 化合物 II (compound II) 3. 化合物 (compound III)

图 1 混合对照品(A)、没药药材(B)HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of mixed reference substances (A) and *Commiphora myrrha* (B)

4 方法学考察

4.1 线性关系考察 精密吸取“2.1”项下混合对照品溶液 1、2、5、10、15、25, 分别按“3”项下色谱条件进样分析, 以进样量 X (μg) 为横坐标, 峰面积 Y 为纵坐标, 绘制标准曲线并进行回归计算, 得 3 个成分的线性回归方程, 结果见表 1。

表 1 3 个成分的线性关系

Tab. 1 Linearity of 3 components

成分 (component)	回归方程 (regression equation)	r	线性范围 (linear range) μg
化合物 I (compound I)	$Y=5\ 535.185\ 8X-0.793\ 3$	1.000 0	0.018 4~0.460 0
化合物 II (compound II)	$Y=4\ 533.425\ 3X-2.758\ 5$	1.000 0	0.029 0~0.725 0
化合物 III (compound III)	$Y=5\ 263.177\ 7X-1.203\ 2$	1.000 0	0.025 8~0.645 0

4.2 精密度试验 精密吸取混合对照品溶液 5 μL , 按“3”项下色谱条件连续进样 6 次, 依次测定峰面积, 结果化合物 I、II 和 III 峰面积的 RSD ($n=6$) 分别

为 0.35%、0.17%、0.11%, 表明仪器精密度良好。

4.3 稳定性试验 精密吸取供试品溶液 10 μL , 按“3”项下色谱条件, 于 0、1、2、4、8、12、24 h 分别进样测定, 结果化合物 I、II 和 III 峰面积的 RSD ($n=7$) 分别为 0.62%、0.70%、0.69%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

4.4 重复性试验 取同一批没药药材粉末(过 3 号筛)6 份, 各约 0.2 g, 精密称定, 按“2.2”项下方法制备供试品溶液, 并按“3”项下色谱条件进样测定, 化合物 I、II 和 III 的平均含量 ($n=6$) 分别为 0.791、1.430、1.471 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, RSD 分别为 0.91%、1.1%、0.76%。

4.5 回收率试验 精密称取“4.4”项下已测知含量的没药药材粉末(过 3 号筛)6 份, 每份约 0.1 g, 精密称定。每份分别精密加入含 3.06 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 化合物 I、5.80 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 化合物 II、5.68 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 化合物 III 的混合对照品溶液 25 mL, 按“2.2”项下方法制备供试溶液, 并按“3”项下色谱条件进样测定, 计算平均回收率, 结果见表 2。

表 2 回收率试验结果

Tab. 2 Results of recovery

成分 (component)	原有量 (content)/mg	加入量 (added)/ mg	测得量 (measured)/mg	回收率 (recovery)/ %	平均回收率 (average recovery)/% (n=6)	RSD/ %
化合物 I (compound I)	0.079 1	0.076 5	0.155 1	99.3	98.9	0.48
	0.079 2	0.076 5	0.155 1	99.2		
	0.079 4	0.076 5	0.155 4	99.3		
	0.079 6	0.076 5	0.155 0	98.6		
	0.079 8	0.076 5	0.154 9	98.2		
	0.079 5	0.076 5	0.155 2	99.0		
化合物 II (compound II)	0.142 8	0.145 0	0.284 5	97.7	98.6	0.79
	0.142 2	0.145 0	0.283 8	97.7		
	0.142 3	0.145 0	0.286 9	99.7		
	0.143 6	0.145 0	0.286 8	98.8		
	0.143 0	0.145 0	0.286 5	99.0		
	0.143 8	0.145 0	0.287 0	98.8		
化合物 III (compound III)	0.146 2	0.142 0	0.287 4	99.4	98.3	0.60
	0.148 0	0.142 0	0.287 5	98.2		
	0.148 2	0.142 0	0.287 6	98.2		
	0.149 0	0.142 0	0.288 8	98.5		
	0.148 6	0.142 0	0.287 3	97.7		
	0.148 4	0.142 0	0.287 7	98.1		

4.6 色谱柱耐用性试验 取同一批没药药材粉末(过 3 号筛)约 0.2 g,精密称定,按“2.2”项下方法制备供试品溶液,分别采用资生堂 CAPCELL PAK C₁₈(250 mm × 4.6 mm, 5 μm)、Aglient ZOBAX C₁₈(250 mm × 4.6 mm, 5 μm)、费罗门 Phenomenex Luna C₁₈(250 mm × 4.6 mm, 5 μm)3 种品牌的色谱柱,按“3”

项下色谱条件进行测定,结果无明显差别。

5 样品含量测定

分别取不同产地的没药药材粉末(过 3 号筛)各 2 份,按“2.2”项下方法制备供试品溶液,并按“3”项下色谱条件进行分析,测定峰面积,用外标法计算出化合物 I、II 和 III 的含量,结果见表 3。

表 3 样品含量测定结果(n=2)

Tab. 3 Results of content determination of samples

样品编号 (sample No.)	来源(source)	含量(content)/(mg · g ⁻¹)		
		化合物 I (compound I)	化合物 II (compound II)	化合物 III (compound III)
S1	利民药材行(索马里)[Limin Pharmaceutical Industry(Somalia)]	0.904 9	3.692 2	2.669 4
S2	民生药材行(Minsheng Pharmaceutical Industry)	0.664 8	4.307 2	3.082 3
S3	樟树刘望平(Liuwangping, Zhangshu)	0.448 3	1.491 1	1.050 3
S4	樟树庆仁堂中药饮片厂(埃塞俄比亚) [Zhangshu Qingrentang Traditional Chinese Medicine Pieces Factory(Ethiopia)]	2.004 4	11.919 3	2.256 6
S5	富华药材行(制没药)[Fuhua Pharmaceutical Industry(processed Myrrha)]	0.517 1	2.288 3	3.921 7
S6	樟树富华药材行(Zhangshu Fuhua Pharmaceutical Industry)	0.795 3	1.399 1	1.457 6

6 讨论

6.1 检测波长的选择 应用 DAD 检测器在 190~400 nm 范围内对化合物 I、II 和 III 进行光谱扫描;结果表明,在 210 nm 波长附近 3 个成分吸光系数均最大,干扰少且稳定,故选择 210 nm 作为检测波长。

6.2 供试品溶液制备方法的考察 考察了回流提取法和超声提取法对化合物 I、II 和 III 含量测定的影响,结果显示超声提取法方便且能提取完全,故选择超声提取法。提取溶剂考察了乙腈溶液、甲醇溶液、乙醇溶液,结果显示甲醇溶液提取时化合物 I、II 和 III 含量均较高。提取时间考察了 0.25、0.5、1.0 h,结果显示 0.5 h 可提取完全。提取体积考察了 15、25、50 mL,结果显示无明显差别,故将提取体积定为 25 mL。

6.3 流动相的确定 考察了乙腈-水、乙腈-0.1% 磷酸水溶液、甲醇-0.1% 磷酸水溶液、甲醇-水 4 个溶剂系统,结果显示以乙腈-0.1% 磷酸水溶液为流动相,所得色谱峰峰形较好,分离效果最佳;同时考察了采用 41% 乙腈-0.1% 磷酸水溶液、42% 乙腈-0.1% 磷酸水溶液以及本实验的梯度洗脱,结果以 41% 乙腈-0.1% 磷酸水溶液为流动相时化合物 III 出峰时间太晚,以 42% 乙腈-0.1% 磷酸水溶液为流动相时化合物 I 将杂质峰包进去,故采用本实验的梯度洗脱。

6.4 小结 本实验对 6 批不同产地没药药材中化合物 I、II 和 III 3 个成分的含量进行测定,结果显示不同样品含量差异较大。本文建立了没药中 3 个主要倍半萜成分的 HPLC 含量测定方法,色谱峰分离效果较好,基线较平,重现性较好,简便可靠,可为进一步完善没药药材的质量评价方法提供参考依据。

参考文献

- [1] 贾宗才. 赴索马里考察没药简报[J]. 中药通报, 1987, 12(11): 56
JIA ZC. Report on myrrha investigation in Somalia[J]. Bull Chin Mater Med, 1987, 12(11): 56
- [2] 中华人民共和国药典 2015 年版. 一部[S]. 2015: 186
ChP 2015. Vol I [S]. 2015: 186
- [3] 肖培根. 新编中药志. 第三卷[M]. 北京: 化学工业出版社, 2001: 851
XIAO PG. New Traditional Chinese Medicine. Vol 3[M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2001: 851
- [4] 沈涛, 娄红祥. 没药的化学成分及其生物活性[J]. 天然产物研究与开发, 2008, 20(2): 360
SHEN T, LOU HX. Chemical constituents from resin of *Commiphora* species and their biological activities[J]. Nat Prod Res Dev, 2008, 20(2): 360
- [5] 田金改, 石上梅. 进口天然没药与胶质没药挥发油成分的研究[J]. 中国中药杂志, 1996, 21(4): 235
TIAN JG, SHI SM. Studies on the constituents of essential oil of imported myrrh and gum opopanax[J]. China J Chin Mater Med, 1996, 21(4): 235
- [6] ASRES K, TEI A, MOGES G, et al. Terpenoid composition of the wound-induced bark exudate of *Commiphora tenuis* from Ethiopia[J]. Planta Med, 1998, 64(5): 473
- [7] 符继红, 张丽静. 新疆没药挥发油的气相色谱-质谱分析[J]. 质谱学报, 2006, 27(1): 53
FU JH, ZHANG LJ. Analysis of volatile constituents from *Commiphora myrrha* Engl. of Xinjiang by gas chromatography-mass spectrometry[J]. J Chin Mass Spectrom Soc, 2006, 27(1): 53
- [8] 乔春峰, 徐宏喜. 没药中活性倍半萜成分的分析[C]// 第十届全国中药和天然药物学术研讨会论文集. 洛阳: 中国药学会, 2009: 4
QIAO CF, XU HX. Analysis of active sesquiterpenoids in myrrha [C]// Proceedings of The 10th National Conference on Traditional Chinese Medicine and Natural Medicine. Luoyang: Chinese Pharmaceutical Association, 2009: 4
- [9] XU J, GUO YQ, LI YS, et al. Sesquiterpenoids from the resinous exudates of *Commiphora myrrha* and their neuroprotective effects[J]. Planta Med, 2011, 77(18): 2023
- [10] ZHU NQ, KIKUZAKI H, SHENG SQ, et al. Furanosylsesquiterpenoids of *Commiphora myrrha* [J]. J Nat Prod, 2001, 64(11): 1460
- [11] 王小玲. 没药倍半萜化合物抑制前列腺癌细胞增殖的作用机制研究[D]. 济南: 山东大学, 2008
WANG XL. Sesquiterpenes, Isolated from *Commiphora opobalsamum*, Inhibit Cell Growth and Downregulate AR Expression and Function in Prostate Cancer Cells[D]. Jinan: Shangdong University, 2008
- [12] SQUIRES MJ. Antimicrobial Prevention and Treatment of Human Immunodeficiency Virus and Other Infectious Diseases: US, 20060024393A1 [P]. 2006-02-02
- [13] CHITEVA R, YENESEW A, CHIKAMAI B, et al. Phytochemical investigation of resins from Kenyan *Commiphora holtziana* [J]. Int J Curr Res, 2013, 5(7): 1791
- [14] 吉恺, 孔峰, 沈涛, 等. 没药倍半萜成分的分离鉴定及抗肿瘤活性[J]. 山东大学学报(医学版), 2008(4): 344
JI K, KONG F, SHEN T, et al. Separation and identification of myrrh sesquiterpenoids and their anti-proliferation effect on tumor cells[J]. J Shandong Univ (Health Sci), 2008, 46(4): 344
- [15] SAEED MA, SABIR AW. Irritant potential of some constituents from oleo-gum-resin of *Commiphora myrrha* [J]. Fitoterapia, 2004, 75(1): 81
- [16] EL ASHRY ES, RASHED N, SALAMA OM, et al. Components, therapeutic value and uses of myrrh [J]. Pharmazie, 2003, 58(3): 163

(本文于 2018 年 12 月 14 日收到)