

# UFLC法测定母丁香中丁香酚和 2-羟基-4,6-二甲氧基-5-甲基苯乙酮的含量\*

刘淑娟<sup>1</sup>, 罗世恒<sup>2</sup>, 王弘<sup>1</sup>, 陈世忠<sup>1\*\*</sup>

(1. 北京大学药学院, 北京 100191; 2. 陕西中医学院, 咸阳 712046)

**摘要** 目的: 建立母丁香中丁香酚和 2-羟基-4,6-二甲氧基-5-甲基苯乙酮的超快速液相色谱(UFLC)含量测定方法, 完善母丁香药材的质量标准。方法: 采用 Shim-pack XR-ODS II (3.0 mm × 75 mm, 2.2 μm), 柱温 50℃, 流动相为甲醇-0.5% 磷酸水溶液(60:40), 流速 0.8 mL·min<sup>-1</sup>, 检测波长 280 nm。结果: 丁香酚和 2-羟基-4,6-二甲氧基-5-甲基苯乙酮进样量分别在 9.98~79.84 μg 和 17.08~136.64 μg 范围内与峰面积呈良好的线性关系( $r=0.9999$ ), 平均加样回收率( $n=5$ )分别为 99.57% 和 98.68%。结论: 母丁香药材的 UFLC 含量测定法快速、准确、简便、可靠, 是一种值得推广的中药质量评价方法。

**关键词:** 母丁香; 丁香酚; 2-羟基-4,6-二甲氧基-5-甲基苯乙酮; 含量测定; 超快速液相色谱

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2011)01-0039-04

## UFLC determination of eugenol and 2-hydroxy-4,6-dimethoxy-5-methylacetophenone in *Eugenia caryophyllata* Thunb.\*

LIU Shu-juan<sup>1</sup>, LUO Shi-heng<sup>2</sup>, WANG Hong<sup>1</sup>, CHEN Shi-zhong<sup>1\*\*</sup>

(1. School of Pharmaceutical Sciences, Peking University Health Science Center, Beijing 100191, China

2. Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712046, China)

**Abstract Objective** To a ultra-fast liquid chromatography(UFLC) method for the determination of eugenol and 2-hydroxy-4,6-dimethoxy-5-methylacetophenone in *Eugenia caryophyllata*. **Methods** Shim-pack XR-ODS II (3.0mm × 75 mm, 2.2 μm) column was adopted with methanol-0.5% phosphoric acid water solution(60:40) as the mobile phase at a flow rate of 0.8 mL·min<sup>-1</sup>; The detection wavelength was 280 nm and column temperature was 50℃. **Results** Both eugenol and 2-hydroxy-4,6-dimethoxy-5-methylacetophenone showed a good linear relationship with peak area within the range of 9.98-79.84 μg( $r=0.9999$ ) and 17.08-136.64 μg( $r=0.9999$ ), respectively. The average recoveries( $n=5$ ) were 99.57% and 98.68%. **Conclusion** The UFLC method that is used to quantify eugenol and 2-hydroxy-4,6-dimethoxy-5-methylacetophenone is simple, rapid, accurate, and good reproducibility, so it can be used to evaluate the quality of *Eugenia caryophyllata*; UFLC method can save analysis time and solvent consumption, thus it can be worthy of promotion to quality the traditional Chinese medicine.

**Key words** *Eugenia caryophyllata* Thunb; eugenol; 2-hydroxy-4,6-dimethoxy-5-methylacetophenone; assay; UFLC

母丁香为桃金娘科植物丁香 *Eugenia caryophyllata* Thunb 的干燥近成熟果实。主产于坦桑尼亚、马达加斯加、斯里兰卡、印度尼西亚西等地, 我国海南、广东、广西等省亦有栽培, 是著名的香料和药品。母丁香性辛、温, 具有温中降逆、补肾助阳的功效, 用于

脾胃虚寒、食少吐血、心腹冷痛、肾虚阳痿等病症<sup>[1]</sup>。研究发现 2-羟基-4,6-二甲氧基-5-甲基苯乙酮(2-hydroxy-4,6-dimethoxy-5-methylacetophenone)是母丁香药材中的主要成分<sup>[2]</sup>, 前人对此研究报道很少, 而有关母丁香药材中 2-羟基

\* 国家 973 项目——道地药材的药性特征研究, 课题编号: 2006CB504707

\*\* 通讯作者 Tel: (010) 82802723 E-mail: chenshizhong@sina.com

- 4,6-二甲氧基-5-甲基苯乙酮的含量测定方法尚未见报道。鉴于母丁香药材中化学成分组成相对简单,本文采用 UFLC 技术<sup>[3-6]</sup>建立了母丁香药材中丁香酚和 2-羟基-4,6-二甲氧基-5-甲基苯乙酮的快速含量测定方法,并对 12 批市售药材进行了含量测定,为母丁香药材的质量控制提供了科学依据。

## 1 仪器与试剂

岛津 LC-20AD<sub>XR</sub> 液相色谱系统: LC-20AD<sub>XR</sub> 高压泵, SPD-20AV 紫外检测器, CTO-20AC 柱温箱, CBM-20A 系统控制器, SIL-20AC 自动进样器, DGU-20A<sub>5</sub> 自动脱气机, LC solution 工作站。

甲醇(天津赛孚瑞科技有限公司)为色谱纯,无水乙醇(北京化工厂)及磷酸(国药集团化学试剂有限公司)均为分析纯,所用水为超纯水。

对照品丁香酚:中国药品生物制品检定所,批号 0725-9606; 2-羟基-4,6-二甲氧基-5-甲基苯乙酮:自制,纯度为 97.44%。

母丁香药材,市售品,经北京大学药学院天然药物系王弘副教授鉴定为桃金娘科植物丁香 *Eugenia caryophyllata* Thunb 的干燥近成熟果实。

## 2 溶液制备

**2.1 对照品溶液** 精密称取对照品丁香酚和 2-羟基-4,6-二甲氧基-5-甲基苯乙酮适量,分别加甲醇制成每 1 mL 含丁香酚 49.9 μg 和 2-羟基-4,6-二甲氧基-5-甲基苯乙酮 73.7 μg 的单一成分对照品储备液。分别精密吸取对照品储备液各 2 mL,置 10 mL 量瓶中,加甲醇定容,摇匀,滤过,即得到丁香酚和 2-羟基-4,6-二甲氧基-5-甲基苯乙酮的单一对照品溶液。

**2.2 供试品溶液** 取母丁香药材粗粉约 0.30 g 精密称定,置 50 mL 具塞三角瓶中,加无水乙醇 25 mL,称定重量,超声处理(功率 250 W,频率 40 kHz) 30 min,放冷,再称定重量,用无水乙醇补足减失的重量,摇匀,滤过,精密吸取 5 mL,置 25 mL 量瓶中,加无水乙醇定容,摇匀,用 0.22 μm 滤膜滤过,即得。

## 3 色谱条件与系统适用性试验

采用 Shim-pack XR-ODS II (3.0 mm × 75 mm, 2.2 μm) 色谱柱,柱温 50 °C,流动相为甲醇-0.5% 磷酸水溶液 (60:40),流速 0.8 mL·min<sup>-1</sup>,检测波长 280 nm,进样量 1 μL。理论塔板数以丁香酚计不低于 3000,以 2-羟基-4,6-二甲氧基-5-甲基苯乙酮计不低于 5000,分离度与拖尾因子均符合要求,见图 1-A、B、C。

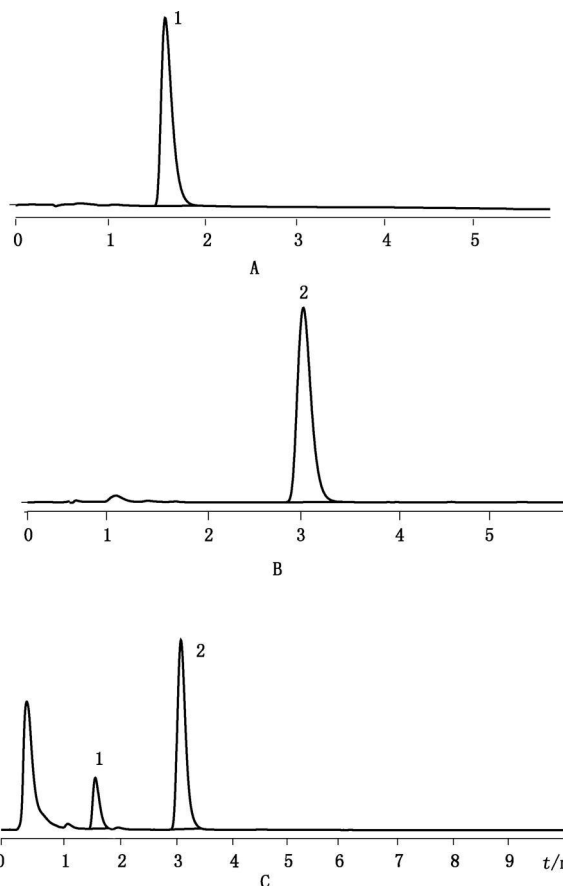


图 1 丁香酚 (A)、2-羟基-4,6-二甲氧基-5-甲基苯乙酮 (B)、2 号样品 (C) 的 UFLC 谱图

Fig 1 UFLC chromatograms of eugenol reference substance (A), 2-hydroxy-4,6-dimethoxy-5-methylacetophenone reference substance (B), and sample No. 2 (C)

1. 丁香酚 (eugenol) 2. 2-羟基-4,6-二甲氧基-5-甲基苯乙酮 (2-hydroxy-4,6-dimethoxy-5-methylacetophenone)

## 4 方法学考察

**4.1 线性关系考察** 取上述对照品溶液,按“3”项下色谱条件进样 1, 2, 3, 6, 8 μL, 记录峰面积。以峰面积为纵坐标,进样量 (μg) 为横坐标,绘制标准曲线,拟合回归方程,丁香酚及 2-羟基-4,6-二甲氧基-5-甲基苯乙酮分别为:

$$Y = 359.7X - 108.1 \quad r = 0.9999$$

$$Y = 1.049 \times 10^3 X - 609.1 \quad r = 0.9999$$

结果表明丁香酚和 2-羟基-4,6-二甲氧基-5-甲基苯乙酮进样量分别在 9.98~79.84 μg 和 17.08~136.64 μg 范围内与峰面积呈良好的线性关系。

**4.2 精密度试验** 取供试品溶液,按“3”项下色谱条件连续进样 6 次,以丁香酚和 2-羟基-4,6-二甲氧基-5-甲基苯乙酮的峰面积计算,其 RSD 分别为 0.24% 和 0.27%,均符合要求,表明仪器精密度良好。

**4.3 重复性试验** 取同一批样品 6 份, 分别按“2.2”项下方法制备供试品溶液, 按“3”项下色谱条件进样测定, 计算丁香酚和 2-羟基-4,6-二甲氧基-5-甲基苯乙酮的含量平均值分别为  $8.772 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$  和  $13.61 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ , RSD 分别为 0.81% 和 0.94%, 均符合要求, 表明重复性良好。

**4.4 稳定性试验** 取供试品溶液, 按“3”项下色谱条件在室温自然光下分别于 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 进样测定, 考察其日内稳定性, 结果样品中丁香酚和 2-羟基-4,6-二甲氧基-5-甲基苯乙酮质量分数的 RSD 分别为 0.15% 和 0.27%; 并连续进样 3 d 每天进样 3 针, 考察其日间稳定性, 结果样品中丁香酚和 2-羟基-4,6-二甲氧基-5-甲基苯乙酮质量分数的 RSD 分别为 0.43% 和 0.25%。表明供试品溶液具有良好的稳定性。

**4.5 加样回收率试验** 分别取已知含量(丁香酚

表 1 12 批市售母丁香中的丁香酚和 2-羟基-4,6-二甲氧基-5-甲基苯乙酮的含量测定 ( $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ )

Tab 1 The contents of eugenol and 2-hydroxy-4,6-dimethoxy-5-methylacetophenone of *Eugenia caryophyllata* Thunb

| 样品编号 (sample No.) | 购买地 (purchase location)       | 丁香酚 (eugenol) | 2-羟基-4,6-二甲氧基-5-甲基苯乙酮<br>(2-hydroxy-4,6-dimethoxy-5-methylacetophenone) |
|-------------------|-------------------------------|---------------|-------------------------------------------------------------------------|
| 1                 | 河北安国 (Anguo, Hebei)           | 0.86          | 4.59                                                                    |
| 2                 | 安徽亳州 (Bozhou, Anhui)          | 8.81          | 12.83                                                                   |
| 3                 | 湖北浠水 (Xishui, Hubei)          | 4.75          | 12.16                                                                   |
| 4                 | 河南周口 (Zhoukou, Henan)         | 12.82         | 15.88                                                                   |
| 5                 | 山西大同 (Datong, Shanxi)         | 8.81          | 9.01                                                                    |
| 6                 | 黑龙江五常 (Wuchang, Heilongjiang) | 11.84         | 18.55                                                                   |
| 7                 | 山东青岛 (Qingdao, Shandong)      | 9.65          | 15.95                                                                   |
| 8                 | 吉林通化 (Tonghua, Jilin)         | 3.90          | 10.68                                                                   |
| 9                 | 陕西西安 (Xi'an, Shaanxi)         | 5.17          | 17.56                                                                   |
| 10                | 山东烟台 (Yantai, Shandong)       | 9.08          | 22.44                                                                   |
| 11                | 吉林通化 (Tonghua, Jilin)         | 8.02          | 12.81                                                                   |
| 12                | 河南郑州 (Zhengzhou, Henan)       | 3.18          | 9.39                                                                    |

## 6 讨论

**6.1** 通过制备液相色谱制备了母丁香药材中的 2-羟基-4,6-二甲氧基-5-甲基苯乙酮, 高分辨 ESI-MS 测定其分子离子峰  $[M+H]^+$  为 211.0970, 分子式为  $C_{11}H_{14}O_4$ , 紫外光谱在 216 nm 和 282 nm 处有最大紫外吸收。经  $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$  及相关谱对其结构归属如下,  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz)  $\delta$  13.44 (1H, s,  $J = 0.97 \text{ Hz}$ , OH), 6.24 (1H, s,  $J = 0.97 \text{ Hz}$ , H-3), 3.85 (3H, s,  $J = 3.02 \text{ Hz}$ , 4-OCH<sub>3</sub>), 3.73 (3H, s,  $J = 3.02 \text{ Hz}$ , 6-OCH<sub>3</sub>), 2.69 (3H, s,  $J = 3.00 \text{ Hz}$ , COCH<sub>3</sub>), 2.06 (3H, s,  $J = 3.06 \text{ Hz}$ , 5-CH<sub>3</sub>);  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz)

$\delta$  203.92 (s, C1-COCH<sub>3</sub>), 164.64 (s, C-2), 164.42 (s, C-4), 160.67 (s, C-6), 111.32 (s, C-5), 108.85 (s, C-1), 95.68 (s, C-3), 61.43 (s, C6-OCH<sub>3</sub>), 55.75 (s, C4-OCH<sub>3</sub>), 31.08 (s, C1-CH<sub>3</sub>), 8.52 (s, C5-CH<sub>3</sub>), 确定化合物结构为 2-羟基-4,6-二甲氧基-5-甲基苯乙酮 (见图 2), 与德国 Huneck S 等的报道<sup>[2]</sup>一致, 由于它是母丁香的特征性成分 (此成分仅在桃金娘科植物母丁香和巴毫属 *Bekhouisia macrophylla*<sup>[7]</sup>中报道), 命名为 2-羟基-4,6-二甲氧基-5-甲基苯乙酮 (2-hydroxy-4,6-dimethoxy-5-methylacetophenone)。

## 5 样品测定

取 12 批市售母丁香药材, 每批 2 份, 分别按“2.2”项下方法制备供试品溶液, 按“3”项下色谱条件每份溶液进样测定 3 次, 代入回归方程计算丁香酚和 2-羟基-4,6-二甲氧基-5-甲基苯乙酮的质量分数, 结果见表 1。

**6.2** 根据文献, 用甲醇、95% 乙醇、无水乙醇 3 种溶

剂考察了不同提取时间、不同溶剂量对样品的超声提取效率<sup>[8]</sup>, 结果表明以无水乙醇超声 30 min 的提取效率最高, 因此选择无水乙醇超声提取 30 min 为提取条件。

**6.3** 分别考察了多个流动相 [甲醇 - 水 (70:45): (30:55)] 及不同柱温 (35~70℃) 对分离度及保留时间的影响, 结果表明当甲醇 - 水 (60:40), 柱温 50℃ 时分离度良好, 保留时间适宜, 但色谱峰稍有拖尾, 用甲醇 - 0.5% 磷酸水时峰形良好, 因此本文选用甲醇 - 0.5% 磷酸水溶液 (60:40), 柱温 50℃ 的色谱条件。

**6.4** 中国药典 2005 年版和 2010 年版“母丁香”项下下载了丁香酚的液相色谱含量测定方法, 但未对 2-羟基 - 4,6-二甲氧基 - 5-甲基苯乙酮的含量进行测定, 本文建立了母丁香药材中丁香酚和 2-羟基 - 4,6-二甲氧基 - 5-甲基苯乙酮的 UFLC 含量测定方法, 通过精密度、稳定性、重复性试验和加样回收率试验证明该方法具有快速、简便、准确等特点, 为丰富和完善母丁香药材质量标准提供了科学依据。

**6.5** 12 批母丁香商品药材含量测定的结果表明, 2-羟基 - 4,6-二甲氧基 - 5-甲基苯乙酮的含量为丁香酚的 1.02~5.34 倍, 是母丁香药材的特征性成分和主要成分; 各药材间丁香酚含量相差达 14.95 倍, 2-羟基 - 4,6-二甲氧基 - 5-甲基苯乙酮含量相差 4.04 倍, 说明市售母丁香药材中 2 种成分含量相差很大, 质量参差不齐, 应引起相关部门的重视,

本研究为商品母丁香药材的质量控制提供了科学数据。

#### 参考文献

- 1 ChP(中国药典). 2005. Vol I (一部): 79
- 2 Huneck S, Pflanz IB, Dtsch Berlin AW, et al. 2-hydroxy-4,6-dimethoxy-5-methylacetophenone from oil *Phytochemistry*, 1972 11 (11): 3311
- 3 LI Geng(李耿), XN Wen-feng(辛文峰), DU Jin-hang(杜金行), et al. UPLC simultaneous determination of six constituents in Danshen injections (UPLC 法同时测定丹参注射剂中 6 个成分的含量). *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 2008, 28(12): 2021
- 4 YANG Yi-fang(杨义芳). Application of UPLC/RRLC/UFLC in study on Chinese material medica and its preparation (超高效/高分离度快速/超快速液相色谱在中药及其制剂研究中的应用). *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2009 39(8): 1259
- 5 Yu Jin Xing Ya-xue Hui Shi et al. HPLC and UPLC switch for TCM analysis *World Sci Technol*, 2008 10(1): 80
- 6 CHEN Jia(陈佳), WANG Gang-li(王钢力), YAO Ling-wen(姚令文), et al. Recent applications of ultra performance liquid chromatography (UPLC) in pharmaceutical analysis [超高效液相色谱 (UPLC) 在药物分析领域中的应用]. *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 2008, 28(11): 1976
- 7 Brophy JJ, Goldsack RJ, Fookes CR, et al. Leaf oils of the genus *Backhousia* (Myrtaceae). *J Essent Oil Res*, 1995 7(3): 237
- 8 Guan Wenqiang, Li Shufen, Yan Ruixiang et al. Comparison of essential oils of clove buds extracted with supercritical carbon dioxide and other three traditional extraction methods *Food Chem*, 2007 101(4): 1558

(本文于 2010 年 3 月 23 日收到)