

高效液相色谱法分析六角莲中的鬼臼毒素

浙江医学研究院 李文钧 席玉莲 郑永兴

浙江省测试中心 庄向平 何彩英

摘要 本文应用高效液相色谱法,对浙江部分地区的六角莲[Dysosma pleiantha (Hance) Woods]中的鬼臼毒素进行了分离测定。实验使用 Zorbax ODS 反相柱,甲醇:水(45:55)为流动相,检测波长 280nm。结果表明鬼臼毒素在34.28分钟呈单一吸收峰,临安、金华和建德六角莲分别含鬼臼毒素0.18、0.95和0.17%。

鬼臼毒素(Podophyllotoxin)为鬼臼类植物的活性成分之一^[1],当前主要用于人工合成鬼臼乙叉甙(VP16, etoposide)和鬼臼噻吩甙(VM26, teniposide)等抗癌新药。因而有关鬼臼类植物的资源分布和成分分析的研究,具有一定应用价值。我们使用高效液相色谱法,对鬼臼毒素的测定方法及其在浙江部分地区的六角莲中的含量作了初步分析。

一、仪器与样品

1. 仪器 岛津 LC-4A 型高效液相色谱仪, SPD-2AS 型分光检测器, C-R2AX 型数据处理机。

2. 试剂 提取用乙醇为药用规格,测定用甲醇和水按 HPLC 常规精制脱气。

3. 植物样品 六角莲,俗称八角金盘,分别于85年9、10和11月采自浙江临安、金华和建德山区,由我院生药室协助采集,并鉴定为小檗科八角莲属六角莲 *Dysosma pleiantha* (Hance) Woods。

4. 测定样品 取各地六角莲根茎200克,烘干粉碎,95%乙醇回流提取至无色(约8小时),提取液减压回收乙醇,浓缩残渣加水后析出沉淀,过滤得黄棕色树脂,烘干称重,得六角莲中的树脂含量。配制树脂的甲醇溶液,约10mg/ml,临用前稀释20倍,即为测定样品,供 HPLC 分析。每份样品重

复3次。

5. 标准样品 精制鬼臼毒素,中科院上海药物所赠给。精密称量,配成约2mg/ml 甲醇液,临用前稀释20倍,得100 μ g/ml 标准溶液。

二、测定方法

1. 色谱条件 色谱柱 Zorbax ODS, 5 μ m, ϕ 4.6mm(i. d) $\times$ 250mm, 流动相为甲醇:水(45:55), 检出浓度 280nm, 灵敏度 0.01AUFs, 流速1ml/min, 柱温37 $^{\circ}$ C, 积分仪纸速2mm/min, 衰减1, 进样一般不超过10 μ l。

2. 标准曲线 取上述标准溶液,系列稀释,使进样浓度约为5—100 μ g/ml,相当于进样量50—100ng,按峰面积 A(μ V $\cdot$ S) — 进样浓度 C(μ g/ml) 绘制标准曲线。

3. 含量测定 含量测定用外标法进行。根据标准样品迭加和保留时间鉴别峰形,样品溶液经 HPLC 分离后,记录分离图谱和峰面积。根据峰面积而计算树脂测定溶液中的鬼臼毒素浓度,再由六角莲中的树脂含量,便可算得各地六角莲根茎中的鬼臼毒素含量。

三、结果与讨论

1. 标准溶液

标准溶液的 HPLC 分离结果表明,精制

鬼臼毒素为单一吸收峰，保留时间 34.28 分 (图略)。

每份标准样品重复测定 5 次，求平均值及变异系数。所得标准曲线式如图 1，结果

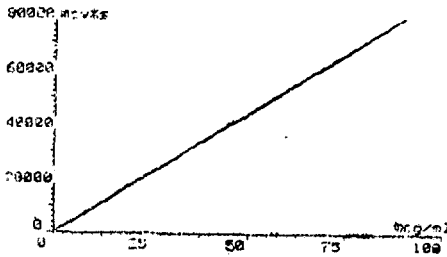


图 1 鬼臼毒素的标准曲线

表 1 标准溶液的测定结果

加样浓度 (μg/ml)	8.9	17.8	35.6	53.4	71.2	89.0
加样量 (ng)	89	178	356	534	712	890
峰面积 (μV·S)	7396	16212	32452	47783	60825	78415
	7983	15197	33441	48458	63917	76391
	7770	15383	30897	49133	64669	74168
	7502	15400	31733	46421	64346	77734
	7869	16368	31007	47090	60518	77844
平均值 (x̄±SD)	7704	15712	31906	47777	62855	76910
	±247.5	±536.5	±1062	±1074	±2014	±1703
变异系数 CV(%)	3.07	3.41	3.33	2.24	3.20	2.21

102.27±2.91%

鬼臼毒素含量过低的树脂缺乏实用价值，故本文未作低浓度 (<5μg/ml) 鬼臼毒素的标准曲线。但由峰面积与进样量关系的回归方程式，可知本法颇为灵敏。

2. 样品溶液

不同地区的六角莲经乙醇提取，200 克根茎分别可收得树脂：临安，得量 3.38 克，得率 1.69%；金华，得量 13.45 克，得率 6.73%；建德，得量 8.71 克，得率 4.35%。金华六角莲的树脂得率较高。

此三种树脂的 HPLC 分离结果如图 2。可测知其鬼臼毒素含量分别为临安 10.56%，金华 14.14% 和建德 3.96%，仍以金华样品较高。

表明实验范围内线性良好， $A=284.5+877.5C$ ， $r=0.9999$ 。

标准溶液测定结果的重现性可由表 1 所见。以 89μg/ml 的标准溶液为例，其峰面积为 76910±1703，变异系数 2.21% (n=5)。六种浓度的标准溶液 (8.9—89μg/ml) 的变异系数在 2.21—3.41% 之间。

回收试验以标准溶液与样品溶液等量混合后进行。混合溶液中标准与样品的鬼臼毒素峰形迭加成单一峰。11μg/ml 标准液的净峰面积为 10152±567.6，变异系数 5.59% (n=6)，实测浓度 11.25±0.32μg/ml，回收率

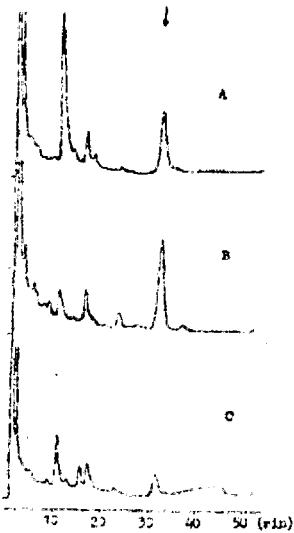


图 2 六角莲中鬼臼毒素的 HPLC 分离

根据树脂得率折算, 可知六角莲根茎内的鬼臼毒素含量分别为: 临安0.18%, 金华0.95%, 建德0.17%。即金华六角莲含鬼臼毒素最高, 而临安与建德则几乎相等。部分结果列于表1。

表1 六角莲中鬼臼毒素的含量(%)

产 地	六角莲中树脂含量	树脂中鬼臼毒素含量	六角莲中鬼臼毒素含量
临 安	1.69	10.56	0.18
金 华	6.73	14.14	0.95
建 德	4.35	3.96	0.17

根据图2和表1可见, 临安、建德两地六角莲的HPLC色谱峰形较为接近(图2A、C), 而金华样品与之有一定差别(图2B); 且临安、建德两地样品鬼臼毒素含量几乎相等(0.18, 0.17%, 而金华样品较高(0.95%)。由于临安、建德同为浙西北山区, 地理环境相近, 而金华山区地处浙西南, 上述结果也就不足为奇。

就树脂含量及树脂中鬼臼毒素含量而言, 也以金华样品含量较高。临安样品树脂含量低于建德, 但树脂中鬼臼毒素含量高于建德, 以致两地的最终实际含量几乎相等。临安样品采于秋季(9月初), 建德样品采于秋末(11月中)除了地理原因以外, 采集季节是否对树脂含量有所影响, 尚属未知。

3. 鬼臼类植物品种复杂, 化学成分不

一^[1], 许多工作尚待深入。但若仅从实用价值考虑, 当前似应以鬼臼毒素的研究为主。以往工作多用柱层层析和薄层析进行分离测定, 近年来已有用高效液相色谱层析法进行成分定性分离^[23]。用HPLC进行鬼臼类植物中鬼臼毒素定量测定尤其是六角莲中鬼臼毒素的分离测定, 尚未见报导。

按Cairens^[2]等的分离条件, 以甲脂: 水(40:60)流经Lichrosorb RP-8柱, 鬼臼毒素和某些成分如 β -peltatin可能部分重迭, 形成双峰。我们曾用MCH-5反相柱进行分析, 结果出峰较快(约2.8分钟), 峰面积很小, 难于分析。本文目前所用的分离条件, 和Lim等的相近^[3], 所得六角莲中的鬼臼毒素含量, 和陈毓享用薄层层析的结果相仿^[1]。

如上所述, 用HPLC法分离测定鬼臼毒素, 方法简便快速, 结果准确, 优于以往常用的柱层和薄层法。采自不同地区的浙产六角莲, 均可在用乙醇提得鬼臼树脂后, 直接进行HPLC分离和测定, 求得其中的鬼臼毒素含量。由于六角莲分布广泛, 以往很少加以利用, 因而对于六角莲作为鬼臼类植物的资源调查和开发利用, 值得进一步研究。

参 考 文 献

- [1] 陈毓亨, 药学报14(2)101, 1979
- [2] Cairens DA等, J. Nat. Prod., 44:34, 1981
- [3] Lim CK等, J. Chromatogr., 255:247, 1983