

HPLC 比较不同产地生药八角莲中鬼臼类成分含量

肖昌钱¹, 杨淑贞², 单文³, 周长新^{1*} (1.浙江大学药学院现代中药研究所, 杭州 310058; 2.浙江天目山自然保护区管理局科研所, 杭州 311311; 3.江西省庐山植物园, 江西 九江 332900)

摘要: 目的 比较不同产地的八角莲中鬼臼毒素和4'-去甲鬼臼毒素含量。方法 采用 RP-HPLC, 色谱柱 C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-0.1 mol·L⁻¹ K₂HPO₄ (50 : 50), 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 207 nm, 柱温 25 °C。结果 鬼臼毒素的线性范围 20~400 ng, $r=0.999\ 9$, 回收率 100.4%, RSD=1.2%; 4'-去甲鬼臼毒素的线性范围 2~20 ng, $r=0.999\ 8$, 回收率 101.6%, RSD=2.5%。结论 该方法准确、可靠、简便, 不同地域的生药八角莲中鬼臼类成分含量差异明显。

关键词: 八角莲; 鬼臼毒素; 4'-去甲鬼臼毒素; 高效液相色谱法; 含量测定

中图分类号: R284.1; R917.101 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2009)08-0659-03

Comparison of Podophyllotoxin and 4'-Demethylpodophyllotoxin Contents in Rhizoma et Radix *Dysosmae* from Different Areas by HPLC

XIAO Changqian¹, YANG Shuzhen², SHAN Wen³, ZHOU Changxin^{1*} (1. Institute of Modern Chinese Medicine, College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China; 2. Institute of Scientific Research, Administration Bureau of National Natural Protection Area of Zhejiang Tianmu Mountain, Hangzhou 311311, China; 3. Jiangxi Lushan Mountain Botanical Garden, Jiujiang 332900, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To compare the contents of podophyllotoxin and 4'-demethylpodophyllotoxin in Rhizoma et Radix *Dysosmae* of different areas. **METHODS** The assay was performed on phenomenex C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm). The mobile phase was MeOH-0.1 mol·L⁻¹ K₂HPO₄ (50:50). Flow rate was 1.0 mL·min⁻¹. Wavelength was 207 nm, and the temperature of column was 25 °C. **RESULTS** The calibration curve was linear in the range of 20-400 ng for podophyllotoxin ($r=0.999\ 9$). The average recovery was 100.4% (RSD=1.2%). And the liner range of demethylpodophyllotoxin was 2-20 ng ($r=0.999\ 8$). The recovery was 101.6% (RSD=2.5%). **CONCLUSION** The method is accurate, reliable and simple, the apparent differences of contents among samples was found.

作者简介: 肖昌钱, 男, 硕士 *通信作者: 周长新, 男, 副教授 Tel: (0571)88208547 E-mail: zhoucxl0@163.com

KEY WORDS: *Dysosma*; podophyllotoxin; 4'-demethylpodophyllotoxin; HPLC; determination

八角莲为小檗科(Berberidaceae)八角莲属(*Dysosma*)植物八角莲 *Dysosma versipellis* (Hance) M.Cheng、小八角莲 *Dysosma difformis* (Hemsl.et Wils) Woods 或六角莲 *Dysosma pleiantha* (Hance) Woods 等多种植物的根茎,是我国特有的常用中药材,分布于湖南、湖北、浙江、江西及安徽等地^[1-2]。八角莲具有清热解毒、祛痰散结的功效,临床用于治疗流行性血热、乙型脑炎、毒蛇咬伤等^[2]。八角莲的主要成分为鬼臼毒素等芳基四氢萜类木脂素,具有抗肿瘤、抗病毒等多种生理活性,是合成 VP-16、VM-26 等抗癌药物的原料^[3]。

八角莲中 4'-去甲鬼臼毒素含量测定尚未见文献报道。本试验应用 HPLC 测定湖南、江西、安徽及浙江 4 个产地的八角莲中鬼臼毒素与 4'-去甲鬼臼毒素的含量。

1 仪器与试药

Waters 高效液相色谱仪(沃特世科技有限公司)。FA2004 型电子天平(杭州大铭仪器有限公司)。甲醇为色谱纯,水为重蒸馏水,其他试剂为分析纯。对照品鬼臼毒素,4'-去甲鬼臼毒素由天然药物化学研究室提供,经 HPLC 检测均为单峰,面积归一化法测定其含量,分别为 98.5%,99%。经 UV、¹H-NMR、¹³C-NMR 测定,鉴定为鬼臼毒素,4'-去甲鬼臼毒素。

八角莲药材均采自产地,经浙江大学药学院任刚博士鉴定为八角莲 *D.versipellis*(Hance) M.Cheng、小八角莲 *D.difformis*(Hemsl.et Wils) Woods 与六角莲 *D.pleiantha*(Hance) Woods。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的制备

分别精密称取鬼臼毒素和 4'-去甲鬼臼毒素对照品 10.0 mg,加甲醇溶解并稀释成浓度为 20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的鬼臼毒素对照品溶液和浓度为 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 4'-去甲鬼臼毒素对照品溶液。

2.2 供试品溶液的制备

称取经干燥粉碎的六角莲粉末 300 mg,用 95%乙醇 50 mL 回流 2 次,每次 2 h,合并提取液,减压浓缩至干,加甲醇溶解,置 25 mL 量瓶中定容。精密吸取上述溶液 2 mL,离心,取上清液 1 mL 置 10 mL 量瓶中加甲醇定容,即为供试品溶液,备用。

2.3 色谱条件

色谱柱:phenomenex C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:甲醇-0.1 mol·L⁻¹ 磷酸氢二钾溶液(50:50);流速:1 mL·min⁻¹;检测波长:207 nm;柱温:25 $^{\circ}\text{C}$ 。

2.4 线性关系考察

精密吸取鬼臼毒素对照品溶液 1, 2, 5, 10, 15, 20 μL 分别进样测定,以进样量(X)为横坐标,以峰面积(Y)为纵坐标计算回归方程为 $Y=8\,218.8X-42\,386$, $r=0.999\,6$;另精密吸取 4'-去甲鬼臼毒素对照品溶液 2, 5, 8, 10, 12, 15, 20 μL 分别进样测定,以进样量(X)为横坐标,以峰面积(Y)为纵坐标计算回归方程为 $Y=11\,746X+455.77$, $r=0.999\,9$ 。对照品鬼臼毒素与 4'-去甲鬼臼毒素为单一吸收峰,见图 1。

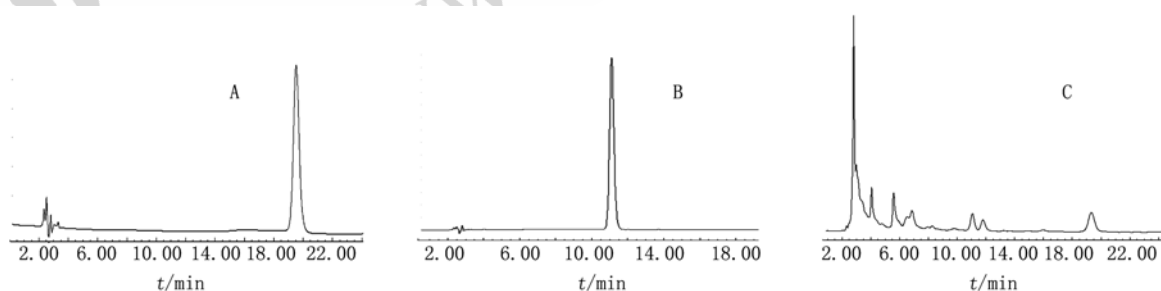


图 1 高效液相色谱图

A-鬼臼毒素对照品; B-4'-去甲鬼臼毒素对照品; C-六角莲供试品

Fig 1 Chromatograms of HPLC

A-control of podophyllotoxin; B- control of 4'-demethyl podophyllotoxin; C-sample of *Dysosma pleiantha*

2.5 仪器精密度试验

精密吸取六角莲供试品溶液 10 μL ,连续进样 5 次,测得鬼臼毒素峰面积 RSD=1.7%。

2.6 稳定性试验

取“2.2”项下溶液 10 μL ,分别在 0, 4, 8, 16, 20, 24 h 进样,测定鬼臼毒素的峰面积 RSD=0.8%;4'-去甲鬼臼毒素的峰面积 RSD=2.2%,表明样品溶液在 24 h 内稳定。

2.7 重复性试验

取同一批经干燥的六角莲粉末，按“2.2”项下制备 5 份，精密吸取 10 μL 分别进样，测定鬼臼毒素含量为 0.20%，RSD=1.1%；4'-去甲鬼臼毒素含量为 0.066%，RSD=2.6%，表明该方法重复性较好。

2.8 加样回收率试验

精取已知含量样品 6 份，每份 150 mg，分别加入对照品鬼臼毒素与 4'-去甲鬼臼毒素适量，按“2.2”项下方法制备成供试品溶液，测定含量，计算回收率。结果鬼臼毒素的平均回收率为 100.4%($n=6$)，RSD=1.2%；4'-去甲鬼臼毒素的平均回收率为 101.6%($n=6$)，RSD=2.5%。

2.9 样品含量测定

分别称取经干燥的湖南小八角莲、安徽八角莲、江西八角莲及浙江六角莲粉末 300 mg，按“2.2”项下方法制备供试品溶液，按上述色谱条件测定(平行操作 3 次)，结果见表 1。

表 1 八角莲中鬼臼毒素与 4'-去甲鬼臼毒素的含量测定结果($n=3$)

Tab 1 The contents of podophyllotoxin and 4'-demethyl podophyllotoxin in samples($n=3$)

样品名	产地	鬼臼毒素 含量/%	4'-去甲鬼臼毒素 含量/%
六角莲	浙江天目山	0.20	0.066
小八角莲	湖南八大公山	1.90	0.083
八角莲	安徽黄山	0.17	0.123
八角莲	江西庐山	0.38	0.077

3 讨论

流动相曾经采用甲醇-水系统，但分离度很差，且有拖尾现象，因此参考文献[4]，用磷酸氢二钾缓冲液来代替水，在甲醇-0.1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸氢二钾缓冲液 50：50 的流动相条件下，鬼臼毒素与 4'-去甲鬼臼毒素均与其相邻组分完全分离，且保留时间适宜，方法重复性良好。

分析结果表明，湖南产的小八角莲中的鬼臼毒素含量明显高于江西、安徽的八角莲和浙江的六角莲，说明同属不同种之间鬼臼毒素含量有明显差异。而安徽产的八角莲中 4'-去甲鬼臼毒素成分含量较高。本实验首次分析了八角莲中的 4'-去甲鬼臼毒素指标含量。为合理开发利用鬼臼植物资源打下了基础，以便更好地控制药材质量。

REFERENCES

[1] YING J S. Flora Peipublicae Popularis Sinicae(中国植物志)[M].Vol 29. Beijing: Science Press, 2002: 258-260.
[2] FENG Y. Research Progress in *Dysosma versipellis* [J]. J Chin Med Mater(中药材), 2006, 29(3): 110-111.
[3] YE Y H, HUANG H L, LIU H. Research progress of *dysosma* plants, a rare and endangered medicinal plant [J]. J Jiangxi Univ Trad Chin Med(江西中医学院学报), 2005, 17(5): 57-59.
[4] YU P Z, YAO L Y, WANG L P. Separation and determination of podophyllotoxin in *diphyllia sinensis* [J]. Chin J Pham Anal(药物分析杂志), 1999, 19(1): 35-37.

收稿日期: 2007-04-24