

RP-HPLC法测定千金子中 3种千金二萜醇酯的含量

孙洪峰¹, 刘桂英¹, 孙婷¹, 魏巍¹, 周洪玉¹, 李绪文¹, 马双成², 金永日^{1*}

(1. 吉林大学化学学院, 长春 130021; 2. 中国药品生物制品检定所, 北京 100050)

摘要 目的: 对千金子中千金子素 L₁(化合物 I)、千金子素 L₂(化合物 II)和千金子素 L₃(化合物 III) 3种千金二萜醇酯进行含量测定。**方法:** 采用反相高效液相色谱法, 使用 Prevail- C₁₈柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-水 (75:25), 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 280 nm, 柱温 25℃。结果: 化合物 I、II、III 进样量均在 0.1~4.0 μg 范围内有良好的线性关系; 相关系数 *r* 分别为 0.9998、0.9999、0.9996, 平均回收率 (*n* = 6) 分别为 97.9% (RSD 为 1.5%), 100.9% (RSD 为 1.5%), 99.6% (RSD 为 1.2%)。结论: 本方法能够准确测定千金子中化合物 I、II、III 3种千金二萜醇酯的含量。

关键词: 千金子; 千金二萜醇酯; 千金子素; 反相高效液相色谱; 含量测定

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2009)06-0909-03

RP-HPLC determination of three diterpenoids in seeds of *Euphorbia lathyris* L.

SUN Hong-feng¹, LIU Gui-ying¹, SUN Ting¹, WEI Wei¹, ZHOU Hong-yu¹,
LI Xu-wen¹, MA Shuang-cheng², JIN Yong-ri^{1*}

(1. Chemistry College of Jilin University, Changchun 130021, China)

2. National Institute for the Control of Pharmaceutical and Biological Products, Beijing 100050, China)

Abstract Objective To determine three diterpenoids euphorbia factor L₁ (compound I), euphorbia factor L₂ (compound II) and euphorbia factor L₃ (compound III) in seeds of *Euphorbia lathyris* L. **Methods** Separation was carried out on Prevail- C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm). The mobile phase was methanol-water (75:25). The flow rate was 1.0 mL·min⁻¹ at 25℃, and the detection wavelength was set at 280 nm. **Results** The linearity was in the range of 0.1~4.0 μg for compounds I, II, III, and the correlation coefficients were 0.9998, 0.9999 and 0.9996 respectively. The average recoveries (*n* = 6) for compounds I, II, III were 97.9% (RSD = 1.5%), 100.9% (RSD = 1.5%), 99.6% (RSD = 1.2%), respectively. **Conclusion** This method is accurate, reliable and sensitive for determination of three diterpenoid in seeds of *Euphorbia lathyris*.

Key words seeds of *Euphorbia lathyris* L.; diterpenoid euphorbia factor; RP-HPLC; determination

千金子为大戟科植物续随子 (*Euphorbia lathyris* L.) 的干燥成熟种子, 分布于我国河南、浙江等地, 用于水肿、痰饮、二便不通、血瘀经闭, 外用治顽癣、赘疣及虫蛇咬伤^[1], 最近研究表明其治疗白血病、食管癌、皮肤癌等疾病方面有很大功效^[2]。现代研究证实千金子除含有大量脂肪油外, 还含有甾类^[3]、香豆素类^[4]、二萜醇酯类^[5]等化学成分。二萜醇酯类成分中千金子素 L₁ 具有致泻作用^[6]、千金子素 L₃ 具有祛斑美白^[7]等功效。目前已有千金子中七叶树苷^[8]、七叶树内酯^[9]和秦皮乙素^[10]含量测

定的文献报道, 但尚未见二萜醇酯含量测定的文献报道。我们从千金子中分离得到 3 个含量很高的二萜醇酯, 经理化性质和波谱学数据分析鉴定其分别为 L₁(化合物 I)、千金子素 L₂(化合物 II) 和千金子素 L₃(化合物 III), 它们的化学名称分别是 6,20-环氧千金二萜醇-5,15-二乙酸-3-苯乙酸酯、7-羟基-千金二萜醇-5,15-二乙酸-3,7-二苯甲酸酯和千金二萜醇-5,15-二乙酸-3-苯甲酸酯。本文采用 RP-HPLC 法测定了千金子中这 3 种主要二萜醇酯类化合物含量, 为千金子药材质量标准的

* 通讯作者 Tel/Fax (0431) 85628012 E-mail: jiny@jlu.edu.cn

建立提供了新的含量测定指标。

1 仪器与材料

Agilent 1100型高效液相色谱仪, VWD 检测器, Agilent 1100工作站。甲醇为色谱纯, 水为重蒸水。

本实验所用的原料购自长春市吉林大药房, 经长春中医药大学邓明鲁教授鉴定为千金子。

化合物 I、II、III 的对照品均为自制, 系从千金子提取物中分离得到, 并经 $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ 、MS、IR 和 UV 等光谱法鉴定其结构; 按本方法色谱条件, 归一化法测得它们的纯度分别为 98.5%, 98.2%, 99.5%。

2 色谱条件

Prevail- C_{18} 柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-水 (75: 25), 流速 1.0 mL $\cdot$ min $^{-1}$, 检测波长 280 nm, 柱温 25 $^{\circ}\text{C}$, 进样量 20 μL 。

3 方法学考察

3.1 线性关系考察 精密称取化合物 I、II、III 的对照品适量, 以甲醇溶解并配制成浓度均为 0.005、0.0125、0.025、0.05、0.10、0.20 mg $\cdot$ mL $^{-1}$ 的混合对照品溶液。分别取上述混合对照品溶液各 20 μL , 注入液相色谱仪, 结果表明化合物 I、II、III 的进样量 (X , μg) 均在 0.1~4.0 μg 范围内, 与峰面积 (Y) 呈现良好的线性关系。回归方程分别为:

$$Y = 4.859 \times 10^3 X + 13.40 \quad r = 0.9998$$

$$Y = 3.815 \times 10^3 X + 10.79 \quad r = 0.9999$$

$$Y = 7.655 \times 10^3 X + 14.30 \quad r = 0.9996$$

3.2 检测限 精密称取化合物 I、II、III 的对照品适量, 以甲醇配成 0.01 mg $\cdot$ mL $^{-1}$ 的混合对照品溶液, 用甲醇逐级稀释, 进样, 按 3 倍信噪比计算化合物 I、II、III 的最低检测限分别为 0.4、0.8、0.8 ng。

3.3 精密度试验 取化合物 I、II、III 的对照品适量, 制成浓度均为 0.025 mg $\cdot$ mL $^{-1}$ 的混合对照品甲醇溶液, 连续进样 6 次, 测定峰面积, 计算化合物 I、II、III 峰面积的 RSD ($n = 6$) 分别为 1.2%, 1.3%, 1.2%。

3.4 重复性试验 取千金子 6 份, 按“供试品溶液制备”方法操作, 制得 6 份溶液, 分别注入色谱仪测定含量。测定结果显示, 化合物 I、II、III 含量的平均值 ($n = 6$) 分别为 0.374%, 0.215%, 0.408%; RSD 分别为 1.4%, 1.9%, 1.0%。

3.5 加样回收率试验 取已知含量 (化合物 I、II、III 含量分别为 0.381%, 0.204%, 0.399%) 的千金子 6 份, 每份 0.5 g 分别加入含化合物 I 1.6 mg、化合物 II 0.8 mg、化合物 III 1.7 mg 的对照品混

合溶液, 按“供试品溶液制备”方法操作, 制得 6 份加样溶液。将加样溶液分别注入色谱仪测定含量, 计算回收率。结果化合物 I、II、III 平均回收率 ($n = 6$) 分别为 97.9% (RSD 为 1.5%), 100.9% (RSD 为 1.5%), 99.6% (RSD 为 1.2%)。

3.6 稳定性试验 取供试品溶液, 在 0~12 h 内每隔 2 h 进样 1 次, 分别计算化合物 I、II、III 峰面积的 RSD ($n = 7$) 分别为 1.6%, 1.4%, 1.4%。

4 含量测定

4.1 对照品溶液制备 取化合物 I 7.5 mg、化合物 II 4.4 mg、化合物 III 8.1 mg 精密称定, 置于同一 100 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得。

4.2 供试品溶液制备 取千金子约 5 g 研磨, 混合均匀, 精密称取 3 份, 每份 1.0 g 用甲醇水浴 (68 $^{\circ}\text{C}$) 回流提取 3 次, 每次加甲醇 15 mL, 回流时间分别为 2、1.5、1 h, 合并提取液, 蒸干溶剂后加甲醇溶解并定容至 50 mL, 以 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 取续滤液作为供试品溶液。

4.3 样品的测定 分别取上述对照品溶液和供试品溶液各 20 μL , 注入高效液相色谱仪, 记录色谱图 (图 1), 按外标法以峰面积计算含量。结果 3 批样品中化合物 I 的含量分别为 0.381%, 0.378%, 0.371%; 化合物 II 的含量分别为 0.204%, 0.203%, 0.197%; 化合物 III 的含量分别为 0.399%, 0.404%, 0.396%。

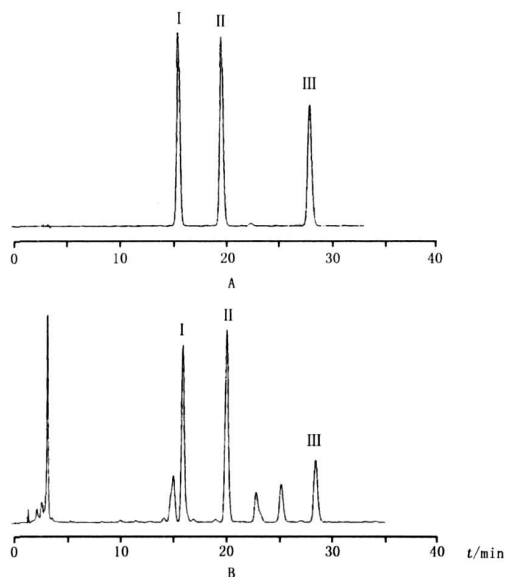


图 1 对照品 (A) 及样品 (B) 色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms of reference substances (A) and sample (B)

I. 化合物 I (compound I) II. 化合物 II (compound II) III. 化合物 III (compound III)

5 讨论

5.1 测定波长的选择 紫外光谱图显示化合物 I、II、III 皆在 280 nm 附近有最大吸收, 故选定 280 nm 为测定波长。

5.2 流动相选择 考察了甲醇-水和乙腈-水按不同比例混合作为流动相, 发现在甲醇-水 (75:25) 就能达到很好的基线分离, 对照品和样品分离的色谱图见图 1。

5.3 提取溶剂的选择 本文考察了提取溶剂, 比较了乙醇、甲醇和乙酸乙酯, 发现 3 种溶剂的提取率几乎相同, 但甲醇提取物溶解性好, 易于溶解及定容, 故选择甲醇作为提取溶剂。通过比较甲醇室温冷浸 24 h、回流提取 2 h (68℃)、超声提取 0.5 h 发现回流提取率最高, 回流提取 3 次与 4 次的提取率基本一致, 因此选择回流提取 3 次; 通过不同固液比的提取率的比较, 发现结果差别不大, 考虑节约试剂, 每次加入甲醇量为 15 mL; 3 次回流时间分别选择 2、1.5、1 h 的依据是首次提取需要浸润的时间长, 而后含量相对减少, 所以后 2 次提取时间依次递减。经试验发现, 按上述时间回流提取与 3 次均按 2 h 回流提取的提取率基本一致, 因此确定 3 次回流时间分别为 2、1.5、1 h。

5.4 小结 本测定方法可以准确、灵敏地测定千金子中 3 种二萜醇酯的含量, 化合物 I、II、III 能达到基线分离, 重复性及回收率较好, 结果可靠, 为千金子质量标准的建立提供了依据。

参考文献

- 1 ChP(中国药典). 2005. Vol I (一部): 12
- 2 HUANG Xiao-miao(黄晓桃), HUANG Guang-ying(黄光英),

- XUE Cun-kuan(薛存宽), et al Study on the anti-tumor effect of number I from *Euphorbia lathyris* L. in vitro and in vivo(千金子 I 号体内外抗肿瘤药理作用的实验研究). *Chin Pharmacol Bull*(中国药理学通报), 2004, 20(1): 79
- 3 Leonetto C, Carbo B, Umberto A, et al Characterization of extractables from two Sardinian euphorbiae *Chim Ind (Milan)*, 1983, 65(2): 753
- 4 Dutta HK, Banerjee D, Dutta NL Euphorbetin: a new biscoumarin from *Euphorbia lathyris* *Tetrahedron Lett* 1972, 13(7): 601
- 5 Itokawa H, Ichihara Y, Yahagi M, et al Lathyrane diterpenes from *Euphorbia lathyris* *Phytochemistry*, 1990, 29(5): 2025
- 6 Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences (中国医学科学院药物研究所). *The Chinese Materia Medica*(中药志). 2nd Ed (第二版). Beijing (北京). People's Medical Publishing House(人民卫生出版社), 1984. 160
- 7 FANG Zi-ting(房子婷), FU Jian-ming(付建明), LIANG Xiao-jun(梁晓军). Preparation and clinical observation of whitening and removing blemish cream of *Euphorbia lathyris* (千金子美白祛痘霜的制备及疗效观察). *Med World* (医药世界), 2007, 2(2): 105
- 8 LI Zhen-guo(李振国), SUN Xin-gong(孙信公), ZHOU Ke-fan(周可范), et al Determination of esculetin in seeds of *Euphorbia lathyris* L. by TLC and comparison of the quality of this drug from different geological areas (薄层扫描法测定千金子中七叶树内酯的含量及不同产地的质量比较). *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 1993, 18(8): 459
- 9 LI Qun(李群), LU Wei(卢伟), WANG Wen-lan(王文兰), et al Determination of aesculetin in processed product of Semen *Euphorbiae* (千金子炮制品中秦皮乙素含量的测定). *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 2000, 22(2): 138
- 10 LI Qun(李群), WANG Qi(王琦), LI Tao(李涛). RP-HPLC determination of esculin in seeds of *Euphorbia lathyris* L. (高效液相色谱法测定千金子中七叶树苷的含量). *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 1994, 19(7): 403

(本文于 2008 年 5 月 26 日收到)