

# RP-HPLC法测定狼毒中狼毒乙素和岩大戟内酯 B 的含量<sup>\*</sup>

王灿坚<sup>1,2</sup>, 江英桥<sup>2\*</sup>, 毕福钧<sup>2</sup>, 林彤<sup>2</sup>, 严小红<sup>2</sup>, 刘东辉<sup>1</sup>

(1. 广州中医药大学, 广州 510405; 2 广州市药品检验所, 广州 510160)

**摘要** 目的: 建立同时测定狼毒药材中狼毒乙素和岩大戟内酯 B 的 HPLC 定量分析方法。方法: 采用 Lichrospher C<sub>18</sub> (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱, 以乙腈 (A) - 水 (B) 为流动相梯度洗脱 (0~5 min, 40% A; 5~10 min, 40% A → 50% A; 10~30 min, 50% A → 55% A; 30~40 min, 55% A → 60% A; 40~45 min, 60% A → 70% A), 流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>; 检测波长 226 nm, 柱温 30 ℃。结果: 狼毒乙素线性范围为 0.005~0.863 μg ( $r = 0.9999$ ), 平均回收率为 96.4% (RSD = 1.4%,  $n = 6$ ); 岩大戟内酯 B 线性范围为 0.003~0.496 μg ( $r = 0.9999$ ), 平均回收率为 96.0% (RSD = 2.1%,  $n = 6$ )。结论: 本方法专属性强, 结果准确, 简便可行, 可用于狼毒药材的质量控制。

**关键词:** 狼毒; 狼毒乙素; 岩大戟内酯 B; 高效液相色谱法; 含量测定

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2011)05-0839-04

## RP-HPLC determination of 2, 4-dihydroxy-6-methoxy-3-methylacetophenone and jolkinolide B in *Euphorbia Ebracteolatae Radix*<sup>\*</sup>

WANG Can-jian<sup>1,2</sup>, JIANG Ying-qiao<sup>2\*</sup>, BI Fu-jun<sup>2</sup>,

LI N Tong<sup>2</sup>, YAN Xiao-hong<sup>2</sup>, LIU Dong-hui<sup>1</sup>

(1. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China

2 Guangzhou Institute for Drug Control, Guangzhou 510160, China)

**Abstract Objective** To develop an HPLC method for the determination of 2, 4-dihydroxy-6-methoxy-3-methylacetophenone and jolkinolide B in *Euphorbia Ebracteolatae Radix*. **Methods** A Lichrospher C<sub>18</sub> (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) column was adopted. The mobile phase consisted of acetonitrile and water with gradient elution (0~5 min, 40% A; 5~10 min, 40% A → 50% A; 10~30 min, 50% A → 55% A; 30~40 min, 55% A → 60% A; 40~45 min, 60% A → 70% A), at the flow rate of 1.0 mL·min<sup>-1</sup>. The detection wavelength was set at 226 nm and column temperature was 30 ℃. **Results** The linear range of 2, 4-dihydroxy-6-methoxy-3-methylacetophenone was 0.005~0.863 μg ( $r = 0.9999$ ), the mean recovery was 96.4% (RSD = 1.4%,  $n = 6$ ); the linear range of jolkinolide B was 0.003~0.496 μg ( $r = 0.9999$ ), the mean recovery was 96.0% (RSD = 2.1%,  $n = 6$ ). **Conclusion** The method is specific, accurate and convenient, and can be used for the quality control of *Euphorbia Ebracteolatae Radix*.

**Key words** *Euphorbia Ebracteolatae Radix*; 2, 4-dihydroxy-6-methoxy-3-methylacetophenone; jolkinolide B; HPLC; assay

狼毒为大戟科植物月腺大戟 *Euphorbia ebracteolata* Hayata 或狼毒大戟 *Euphorbia fischeriana* Steud 的干燥根<sup>[1]</sup>, 具有散结、逐水、止痛、杀虫的功能。狼毒主要含萜类、苯乙酮类、鞣质类和甾醇类等化学成分<sup>[2]</sup>, 而月腺大戟和狼毒大戟含有的具体成分有所不同, 其中苯乙酮类成分中的狼毒乙素和萜类成

分中的岩大戟内酯 B 等为其共有成分, 狼毒乙素对结核菌有抑菌作用<sup>[3]</sup>, 岩大戟内酯 B 具有抗肿瘤作用<sup>[4]</sup>。狼毒乙素或岩大戟内酯 B 的含量测定方法已有文献报道<sup>[5,6]</sup>, 但同时测定狼毒药材中狼毒乙素和岩大戟内酯 B 的方法尚未见报道, 也没有对除中国药典收载品种外的狼毒地方习用品瑞香狼毒

\* 国家科技支撑计划项目“药品安全关键技术研究”课题一常见与重要药品安全标准研究 (2006BA114B01)

\*\* 通讯作者 Tel: (020) 26282045 E-mail: jiangyq@gzfdca.gov.cn

*Stellera chamaejasme* L (系瑞香科瑞香狼毒属植物) 和海芋 *Alocasia macrorrhiza* (L.) Schott(系天南星科海芋属植物, 又名广东狼毒)<sup>[7]</sup> 中上述 2 种成分进行考察的报道。为了更全面地控制狼毒药材质量, 本文建立了狼毒乙素和岩大戟内酯 B 的含量测定方法, 对狼毒药材及地方习用品的含量进行了考察。

## 1 仪器、试剂与药材

日本岛津 LC-10Avp 型高效液相色谱仪 (SPD-M 10Avp 二极管阵列检测器, LC-10ADvp 泵, 岛津 CLASS-VP 工作站); Agilent 1200 高效液相色谱仪 (紫外检测器, 脱气机, 四元梯度泵, 化学工作站)。水为超纯水, 乙腈为色谱纯, 乙醇为分析纯。狼毒乙素和岩大戟内酯 B 由月腺大戟中提取分离得到, 其结构经核磁共振光谱鉴定, 纯度经 HPLC 检测分别为 98.5% 和 98.7%。狼毒药材及地方习用品均由广州市药品检验所侯惠婵和刘伯英主任中药师鉴定。

## 2 方法与结果

**2.1 对照品溶液的制备** 取对照品狼毒乙素、岩大戟内酯 B 适量, 精密称定, 加乙醇制成每 1 mL 含狼毒乙素 6  $\mu\text{g}$  岩大戟内酯 B 4  $\mu\text{g}$  的混合溶液, 即得。

**2.2 供试品溶液的制备** 取药材粉末 (过 4 号筛) 约 1 g 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入乙醇 50 mL, 密塞, 称定重量, 超声处理 (功率 400 W, 频率 37 kHz) 50 min, 取出, 放冷, 再称定重量, 用乙醇补足减失的重量, 摇匀, 取上清液, 用微孔滤膜过滤 (0.45  $\mu\text{m}$ ), 取续滤液, 即得。

**2.3 色谱条件与系统适用性试验** 色谱柱: 汉邦科技 Lichrospher C<sub>18</sub> (250 mm  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) 色谱柱; 流动相: 以乙腈 (A) - 水 (B) 梯度洗脱 (0~5 min, 40% A; 5~10 min, 40% A  $\rightarrow$  50% A; 10~30 min, 50% A  $\rightarrow$  55% A; 30~40 min, 55% A  $\rightarrow$  60% A; 40~45 min, 60% A  $\rightarrow$  70% A); 流速: 1.0 mL  $\cdot$  min<sup>-1</sup>; 检测波长: 226 nm; 柱温: 30  $^{\circ}\text{C}$ ; 进样量: 10  $\mu\text{L}$ 。理论板数按岩大戟内酯 B 峰计算应不低于 4000, 分离度大于 1.5。色谱图见图 1。

**2.4 线性关系考察** 精密称取对照品狼毒乙素和岩大戟内酯 B 适量, 加乙醇配制成浓度分别为 0.108 mg  $\cdot$  mL<sup>-1</sup> 和 0.062 mg  $\cdot$  mL<sup>-1</sup> 的混合对照品溶液①, 精密量取混合对照品溶液① 3.0 mL 置 50 mL 量瓶中, 加乙醇稀释至刻度, 摇匀, 得混合对照品溶液②。分别精密吸取混合对照品溶液② 2  $\mu\text{L}$ 、12  $\mu\text{L}$  和混合对照品溶液① 1  $\mu\text{L}$ 、2  $\mu\text{L}$ 、4  $\mu\text{L}$ 、8  $\mu\text{L}$  进样分析, 测定峰面积。以进样量  $X$  ( $\mu\text{g}$ ) 为横坐标,

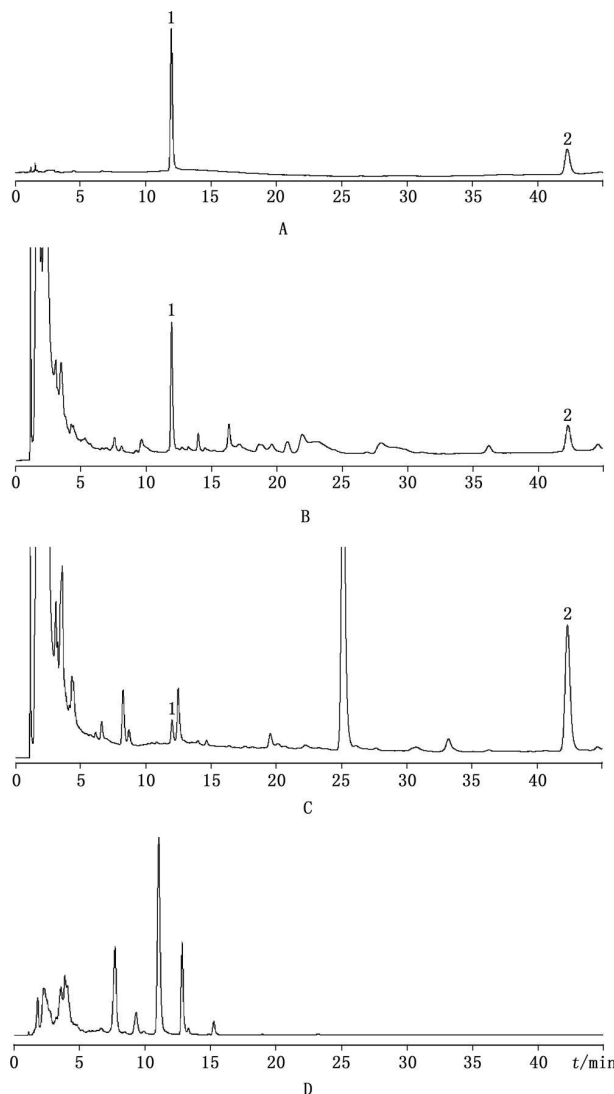


图 1 对照品 (A)、月腺大戟 (1 号样品) (B)、狼毒大戟 (5 号样品) (C)、瑞香狼毒 (D)、海芋 (广东狼毒) (E) 的 HPLC 色谱图

Fig 1 Chromatograms of reference substances (A), *Euphorbia ebraeicola* (No. 1) (B), *Euphorbia fischeriana* (No. 5) (C), *Stellera chamaejasme* (D), and *Alocasia macrorrhiza* (E)

1. 狼毒乙素 (2,4-dihydroxy-6-methoxy-3-methylacetophenone) 2. 岩大戟内酯 B (jolk inolide B)

峰面积积分值  $Y$  为纵坐标, 绘制标准曲线, 得狼毒乙素、岩大戟内酯 B 的回归方程分别为:

$$Y = 3.06 \times 10^3 X + 2.08 \quad r = 0.9999$$

$$Y = 2.28 \times 10^3 X - 0.0856 \quad r = 0.9999$$

结果表明, 狼毒乙素及岩大戟内酯 B 的线性范围分别为 0.005~0.863  $\mu\text{g}$  和 0.003~0.496  $\mu\text{g}$

**2.5 精密度试验** 精密吸取狼毒乙素浓度为 6.47  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  和岩大戟内酯 B 浓度为 3.72  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的混合对照品溶液 10  $\mu\text{L}$ , 连续进样 6 次, 测定峰面积, 计算 RSD 值。结果狼毒乙素及岩大戟内酯 B 的

峰面积平均值 ( $n = 6$ ) 分别为 197.3 和 86.9 RSD 分别为 0.10% 和 0.17%。

**2.6 稳定性试验** 取 1 号样品粉末, 按“2.2”项下方法制备供试品溶液, 分别于 0, 1, 2, 4, 6, 12, 24 h 按上述色谱条件进样分析。结果狼毒乙素及岩大戟内酯 B 的平均含量 ( $n = 7$ ) 分别为 0.025% 和 0.016%, RSD 分别为 0.2% 和 1.6%。表明供试品溶液在 24 h 内测定结果稳定性良好。

**2.7 重复性试验** 取 1 号样品粉末 6 份, 分别按“2.2”项下方法制备供试品溶液, 按上述色谱条件进样测定。结果狼毒乙素及岩大戟内酯 B 平均含量 ( $n = 6$ ) 分别为

0.025% 和 0.016%, RSD 分别为 1.3% 和 1.4%。

**2.8 准确度 (以加样回收率表示)** 取已知含量的 1 号样品粉末 0.5 g 共 6 份, 精密称定, 精密加入狼毒乙素 ( $110.68 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 和岩大戟内酯 B ( $67.82 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 的混合对照品溶液 1 mL, 按“2.2”项下方法制备供试液, 进样测定, 计算回收率。结果狼毒乙素及岩大戟内酯 B 的平均回收率 ( $n = 6$ ) 分别为 96.4% 和 96.0%, RSD 分别为 1.4% 和 2.1%。

**2.9 样品测定** 分别精密吸取对照品溶液和供试品溶液各 10  $\mu\text{L}$ , 进样测定, 计算样品中狼毒乙素和岩大戟内酯 B 的含量, 结果见表 1。

表 1 药材含量测定结果

Tab 1 Determination results of samples

| 种名<br>(species)                              | 编号<br>(No.) | 来源<br>(source)                                                                                        | 含量 (contents) %                                        |                          |
|----------------------------------------------|-------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|--------------------------|
|                                              |             |                                                                                                       | 狼毒乙素<br>(2,4-dihydroxy-6-methoxy-3-methylacetophenone) | 岩大戟内酯 B<br>(jokiolide B) |
| 月腺大戟<br>( <i>Euphorbia<br/>obtusolata</i> )  | 1           | 辽宁省药品检验所提供 (provided by Liaoning Institute for Drug Control)                                          | 0.025                                                  | 0.016                    |
|                                              | 2           | 江苏省药品检验所提供 (provided by Jiangsu Institute for Drug Control)                                           | 0.026                                                  | 0.008                    |
|                                              | 3           | 河北安国市养生堂药业 (Yangshengtang Pharmaceutical of Anguo City, Hebei Province)                               | 0.028                                                  | 0.010                    |
|                                              | 4           | 安徽省亳州市药材总公司药材公司 (Medicinal Materials Company of Bozhou City, Anhui Province)                          | 0.017                                                  | 0.017                    |
|                                              | 5           | 河北安国市同利中药材有限公司 (Anguo city Tongli Herbal Medicine Co., Ltd. of Hebei Province)                        | 0.023                                                  | 0.009                    |
|                                              | 6           | 亳州百全药业有限公司 (Bozhou Baiquan Pharmaceutical Co., Ltd.)                                                  | 0.014                                                  | 0.010                    |
|                                              | 7           | 安国市京兴药业 (Jingxing Pharmaceutical of Anguo City)                                                       | 0.027                                                  | 0.008                    |
|                                              | 8           | 安国市冷背药材有限公司 (Lengbei Medicinal Materials Co., Ltd. of Anguo City)                                     | 0.028                                                  | 0.012                    |
|                                              | 9           | 亳州市安格药业有限责任公司 (Ange Pharmaceutical Co., Ltd. of Bozhou City)                                          | 0.028                                                  | 0.030                    |
|                                              | 10          | 中国食品药品检定研究院 (产地: 河南) (National Institutes for Food and Drug Control Origin Henan Province)            | 0.010                                                  | 0.010                    |
|                                              | 11          | 中国食品药品检定研究院 (产地: 安国) (National Institutes for Food and Drug Control Origin Anguo City)                | 0.025                                                  | 0.006                    |
|                                              | 12          | 江门市恒健药业有限公司 (Hengjian Pharmaceutical Co., Ltd. of Jiangmen City)                                      | 0.018                                                  | 0.007                    |
|                                              | 13          | 驼腰子镇药材开发中心 (Medicinal Materials Development Centre of Tuoyaozi Town)                                  | 0.029                                                  | 0.010                    |
| 狼毒大戟<br>( <i>Euphorbia<br/>fischeriana</i> ) | 14          | 辽宁康辰药业有限公司 (产地: 辽阳市) (Kangchen Pharmaceutical Co., Ltd. of Liaoning Province Origin Liaoyang City)    | 0.004                                                  | 0.032                    |
|                                              | 15          | 辽宁康辰药业有限公司 (产地: 辽宁) (Kangchen Pharmaceutical Co., Ltd. of Liaoning Province Origin Liaoning Province) | 0.003                                                  | 0.035                    |

续表 1

| 种名<br>( species)                         | 编号<br>( No ) | 来源<br>( source)                                                                       | 含量( contents) %                                               |                             |
|------------------------------------------|--------------|---------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------|-----------------------------|
|                                          |              |                                                                                       | 狼毒乙素<br>( 2, 4- dihydroxy- 6- methoxy- 3- methylacetophenone) | 岩大戟内酯 B<br>( jolkinolide B) |
| 狼毒大戟<br>( <i>Euphorbia fischeriana</i> ) | 16           | 辽阳市弓长岭采集 ( Collected by Gongchangling of Liaoyang City)                               | 0. 004                                                        | 0. 089                      |
|                                          | 17           | 辽宁新宾铁背岭采集 ( Collected by Xinbin in Tiebeiling of Liaoning Province)                   | 0. 021                                                        | 0. 110                      |
|                                          | 18           | 辽宁清原英额门采集 ( Collected by Qingyuan Ying' emen of Liaoning Province)                    | 0. 011                                                        | 0. 155                      |
| 瑞香狼毒<br>( <i>Stellera chamaejasme</i> )  | 19           | 长安中药材有限公司 ( Chang' an Herbal Medicine Co., Ltd )                                      | 未检测到<br>( not detected)                                       | 未检测到<br>( not detected)     |
| 海芋<br>( <i>Alocasia macrorrhiza</i> )    | 20           | 广州市通济堂药店 (产地: 广东) ( Tongjiang Pharmacy of Guangzhou City; Origin: Guangdong Province) | 未检测到<br>( not detected)                                       | 未检测到<br>( not detected)     |

3 讨论

3.1 检测波长选择 狼毒乙素的<sup>1</sup>最大吸收波长分别为 196 nm 和 291 nm, 岩大戟内酯 B 的<sup>2</sup>最大吸收波长为 238 nm, 在 226 nm 波长下 2 个成分均有较强的吸收, 因此选用 226 nm 为检测波长。

3.2 流动相的选择 考察了甲醇-水、乙腈-水、乙腈-0.05% 醋酸作为流动相时对样品中多成分的洗脱能力, 发现乙腈-水系统比较适合于样品中成分的分离分析, 甲醇-水系统分析时间较长而且峰形不如乙腈-水系统好, 乙腈-0.05% 醋酸系统的基线波动较大, 故选择乙腈-水作为洗脱系统。

3.3 对照品溶液配制溶剂选择 试验研究中发现岩大戟内酯 B 在甲醇溶液中和酸性条件下稳定性较差, 长期放置含量降低, 经考察在不同溶剂中的稳定性, 选择乙醇作为对照品溶液的配制溶剂。

3.4 供试品溶液制备条件选择 在供试品溶液的制备过程中比较了不同溶剂乙醇、丙酮、乙酸乙酯、三氯甲烷和石油醚的提取效果, 结果表明乙醇对狼毒乙素和岩大戟内酯 B 的提取量较高。考察了超声、回流、索氏提取、冷浸等方法, 结果显示乙醇超声提取的方法最佳; 分别比较了 15、30、50、80 mL 乙醇超声提取, 发现 50 mL 乙醇超声提取对狼毒乙素和岩大戟内酯 B 成分已提取完全; 同时考察了超声处理 10、20、30、40、50、60 min 的提取效果, 结果表明超声 50 min 已将狼毒乙素和岩大戟内酯 B 成分提取完全。

3.5 含量测定结果 狼毒大戟和月腺大戟中普遍含有狼毒乙素和岩大戟内酯 B, 2 个成分的含量范

围分别为 0.003% ~ 0.029% 和 0.006% ~ 0.155%。瑞香狼毒和海芋不含有这 2 个成分。

参考文献

1 ChP(中国药典). 2010. Vol II (一部): 269  
2 CAO Xin-wei(曹新伟), FENG Wei-sheng(冯卫生). The latest progress in studies of chemical components of *Euphorbia ebracteolata* Radix(狼毒的化学成分研究进展). *Henan Coll Tradit Chin Med* (河南中医学院学报), 2004, 19(6): 81  
3 ZHANG Han-qing(张涵庆), DING Yun-mei(丁云梅). Studies on the active compound B and C in the root of *Euphorbia bracteolata* Hayata(月腺大戟根中有效成分乙素和丙素的结构研究). *J Plant Resour Environ* (植物资源与环境), 1992, 1(3): 6  
4 LIU Wen-zi(刘文姿), HE Feng-lei(何风雷), RUAN Zi-yong(阮子镛), et al. Studies on *Euphorbia fischeriana* diterpenoid lactones inhibitory effect on human tumor cells in vitro(狼毒大戟二萜内酯对人癌细胞体外抑制作用的研究). *J Chin Med Mater* (中药材), 2000, 23(10): 623  
5 LI Bing(李兵), GOU Huan-juan(郭环娟). HPLC determination of 2, 4- dihydroxy- 6- methoxy- 3- methylacetophenone in *Euphorbia fischeriana* Steud. (HPLC 测定狼毒大戟中狼毒乙素的含量). *Pharm Talay* (今日药学), 2008, 18(1): 46  
6 QIAO Chun-feng(乔春峰), HAN Quan-bin(韩全斌), HE Zhen-dan(贺震旦), et al. HPLC determination of jolkinolide A and jolkinolide B in Chinese herb medicine “Lang-du” (RP-HPLC 法测定狼毒中岩大戟内酯 A 和 B 的含量). *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 2006, 26(9): 1204  
7 Jiangsu New Medical College(江苏新医学院). Dictionary of Chinese Herbal Medicine(中药大辞典). Vol 2(下册). Shanghai(上海): Shanghai People's Publishing House(上海人民出版社), 1977, 1898, 1926

(本文于 2010 年 6 月 28 日收到)