

HPLC法测定贵州产八角莲属药材中鬼臼毒素的含量^{*}

张丽艳, 万明香, 何顺志^{**}, 杨玉琴, 李健

(贵阳中医学院药理学系, 贵阳 550002)

摘要 目的: 对贵州产不同种属、不同产地八角莲属植物中鬼臼毒素含量进行对比研究, 为八角莲属药材合理利用提供理论依据。方法: 色谱柱: Diamonsil C₁₈ (4.6 mm × 150 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-水 (55: 45); 流速: 1 mL · min⁻¹; 检测波长: 207 nm。结果: 鬼臼毒素的线性范围为 0.32~1.61 μg ($r=0.9999$), 平均回收率 ($n=6$) 为 102.1%, RSD 为 0.8%。结论: 不同种属、不同产地的八角莲属植物中鬼臼毒素含量有显著差异。

关键词: 高效液相色谱法; 八角莲属药材; 鬼臼毒素

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2009)02-0202-03

HPLC determination of podophyllotoxin in *Dysosma* genus from Guizhou province^{*}

ZHANG Li-yan, WAN Ming-xiang, HE Shun-zhi^{**}, YANG Yu-qin, LI Jian

(Pharmaceutical Department, Guiyang College of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550002, China)

Abstract Objective To study podophyllotoxin in *Dysosma* genus that come from different species or different areas of Guizhou province, which provide the basis of rational use of *Dysosma* genus. **Method** RP-HPLC method, Diamonsil C₁₈ (4.6 mm × 150 mm, 5 μm) column was adopted, the mobile phase consisted of methanol-water (55: 45) with flow rate of 1 mL · min⁻¹, and the detector wavelength was 207 nm. **Result** The calibration curve was linear relationship in the range of 0.32~1.61 μg ($r=0.9999$). The average recovery rate ($n=6$) was 102.1%, RSD was 0.8%. **Conclusion** The podophyllotoxin in *Dysosma* genus of different species or different areas has significant difference.

Key words RP-HPLC; *Dysosma* genus; podophyllotoxin

植物小檗科 Berberidaceae 八角莲属 *Dysosma*, 为我国特有属。经对贵州省八角莲属药用植物资源进行实地调查, 发现贵州主要分布有 4 种八角莲, 即八角莲、贵州八角莲、小八角莲、川八角莲。其中八角莲为广布种, 其次为小八角莲、贵州八角莲 (仅在龙里有分布)。分布域最狭窄的为川八角莲 (仅在赫章有分布)。另据文献报道^[1]: 鬼臼毒素 (podophyllotoxin) 为八角莲属植物的主要有效成分之一, 主要用于人工合成鬼臼乙叉苷 (VP-16)、鬼臼噻吩苷 (VM-26) 等抗癌药, 此类药物主要用于尖锐湿疣的治疗。本文对贵州产八角莲属药用植物不同种属、不同产地的鬼臼毒素进行了对比研究, 能为合理利用八角莲属药材提供一定技术依据。

1 仪器与样品、试剂

Agilent-1100 系列: 二元泵, 全自动进样器, 二极管阵列检测器, Agilent-1100 化学工作站; 电子天平 (METTLER AB204-S)。

鬼臼毒素对照品 (EC NO-2082504 SIGMA 公司), 甲醇为色谱纯, 水为娃哈哈纯净水, 其余试剂均为分析纯。

药材样品均采自贵州境内, 经贵阳中医学院何顺志教授鉴定: 为八角莲属植物八角莲 *Dysosma versipellis* (Hance) M. Cheng ex Ying, 贵州八角莲 *D. majorensis* (Gagnep.) Ying, 小八角莲 *D. difformis* (Hensl. et Wils.) T. H. Wang, 川八角莲 *D. veitchii* (Hensl. et Wils.) Fu ex Ying 的干燥根茎。

* 国家中医药管理局科技项目 (编号: 04-05ZP59)

** 通讯作者 Tel: (0851) 5653025 E-mail: hes8899@126.com

2 方法与结果

2.1 溶液制备

2.1.1 对照品溶液 取鬼臼毒素对照品适量,精密称定,加甲醇制成每 1 mL 含 161 μg 的对照品溶液。

2.1.2 供试品溶液 取八角莲属药材粉末(过 3 号筛)约 1 g 精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入 80% 甲醇 25 mL,称定重量,超声处理(功率 250 W,频率 40 kHz) 60 min 放冷,再称定重量,用甲醇补足减失的重量,摇匀,滤过,取续滤液用微孔滤膜(0.45 μm)滤过,即得。

2.2 色谱条件 Diamonsil C_{18} 色谱柱(4.6 mm $\times$ 150 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-水(55:45); 流速为 1 mL $\cdot$ min⁻¹; 检测波长为 207 nm; 柱温为 25 $^{\circ}\text{C}$ 。在上述色谱条件下,鬼臼毒素与其他峰呈良好分离,见图 1。理论塔板数按鬼臼毒素峰计不低于 3000。

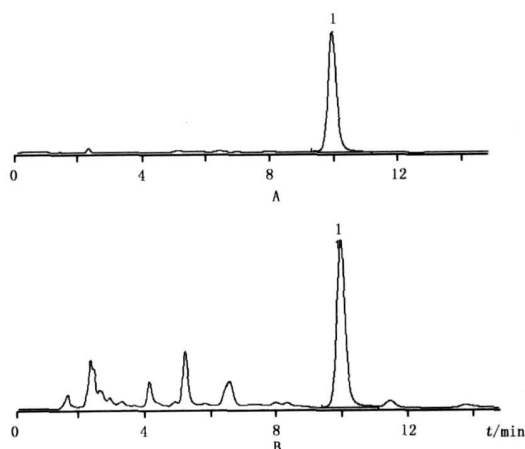


图 1 对照品(A)及三都产八角莲(B)HPLC 色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms of reference substance(A) and *Dysosma* genus from Sandu(B)

1. 鬼臼毒素 (podophyllotoxin)

2.3 线性关系考察 精密吸取浓度为 161 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液 2.4.6.8.10 mL 分别于 10 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,各进样 10 μL ,按上述色谱条件测定色谱峰的峰面积,以峰面积为纵坐标,对照品的进样量(μg)为横坐标,绘制标准曲线,得回归方程:

$$Y = 1.119 \times 10^4 X + 75.03 \quad r = 0.9999$$

线性范围为 0.32~1.61 μg

2.4 精密度试验 精密吸取浓度为 161 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液 5 μL ,注入液相色谱仪,重复进样 5 次,峰面积积分值的 RSD 为 0.65%,表明本方法进样精密度良好。

2.5 重复性试验 取同一八角莲药材(产地:贵州三都)粉末样品(过 3 号筛),照“2.1.2”项下方法制

备供试品溶液 5 份,进行测定,八角莲药材中鬼臼毒素的平均含量($n=5$)为 0.70%,RSD 为 0.57%,表明该法重复性良好。

2.6 稳定性试验 精密吸取同一供试品溶液,每隔 3 h 进样 1 次,共测 5 次,记录峰面积,其 RSD 为 0.33%,表明供试品溶液 12 h 内基本稳定。

2.7 回收率试验 称取已知含量的贵州三都产八角莲药材粉末约 0.5 g(鬼臼毒素含量为 0.70%)共 6 份,精密称定,分别精密加入对照品溶液 5 mL(鬼臼毒素浓度 0.644 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$),按“2.1.2”项下方法进行操作,进样 10 μL ,记录色谱峰,计算回收率,结果平均回收率($n=6$)102.1%,RSD 为 0.8%。

2.8 样品含量测定 取不同产地、不同种属的八角莲属药材根粉末约 1 g 精密称定,按“2.1.2”项下方法进行操作。分别精密吸取浓度为 161 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液与供试液溶液各 10 μL ,注入液相色谱仪,按上述色谱条件测定,记录色谱图,按外标法计算样品中鬼臼毒素的含量,见表 1。

表 1 贵州产八角莲属药材中鬼臼毒素的含量($n=3$)

Tab 1 Determination of podophyllotoxin in *Dysosma* genus from Guizhou

样品 (sample)	产地 (origin)	平均含量 (average content) %	RSD %
八角莲 [<i>Dysosma versipellis</i>] (Hance) M. Cheng ex Y. Ling]	施秉 (Shibing)	1.43	0.10
	荔波 (Libo)	0.68	1.03
	遵义 (Zunyi)	1.00	0.07
	三都 (Sandu)	0.69	0.32
	独山 (Dushan)	0.51	0.28
贵州八角莲 [<i>D. majorensis</i>] (Gagnep.) Y. Ling]	龙里 (Longli)	0.27	0.10
小八角莲 [<i>D. difformis</i> (Hesl.) et Wils.) T. H. Wang]	安龙 (Anlong)	0.13	2.97
	贞丰 (Zhenfeng)	0.20	1.15
川八角莲 [<i>D. veitchii</i> (Hemsl.) et Wils.) Fu ex Y. Ling]	赫章 (Hezhang)	0.33	2.87

3 讨论

3.1 据文献报道^[2],以甲醇为溶剂采用超声(功率 250 W,频率 40 kHz)提取测得的鬼臼毒素含量较高。因此,分别比较了以 60% 甲醇、80% 甲醇及甲醇溶液为溶剂的提取效果,结果表明以 80% 的甲醇作为提取溶剂所得的鬼臼毒素含量最高。并对提取时间 30 min、60 min、90 min 进行了考察,结果:超声处理 30 min 所得的鬼臼毒素含量最低,60 min 和 90 min 几无差异,考虑到操作的简便性,选择超声处理 60 min。

3.2 取鬼臼毒素对照品适量,以甲醇作为溶剂,在190~400 nm 波长范围内对鬼臼毒素进行扫描。扫描结果表明,鬼臼毒素在207,290 nm 处有最大吸收,由于207 nm 处灵敏度明显高于290 nm,故选定207 nm 为鬼臼毒素的检测波长。

3.3 鬼臼毒素为八角莲中主要有效成分之一,文献[2]已有相关含量测定的研究报道,但经采用,分离效果不理想。作者经多次实验探索确定了正文所述的流动相,分离效果较为满意。

3.4 本文对贵州不同产地的不同种属的八角莲属植物鬼臼毒素含量进行了对比研究。从结果初步可知,不同种属八角莲药材中鬼臼毒素含量差异较大,其中,以八角莲中鬼臼毒素的含量最高,小八角莲则最低。就八角莲而言,则以施秉产的品质较好,含量最高。

3.5 本试验还对八角莲属植物不同药用部位(根、茎、叶)所含的鬼臼毒素进行了测定,结果发现八角莲属植物茎、叶不含鬼臼毒素。

3.6 曾比较了晒干、烘干、阴干3种不同干燥方式对样品中鬼臼毒素含量的影响。结果:采用65℃烘干样品中鬼臼毒素的含量最高,为产地加工方式提供了一定的参考。

参考文献

- 1 Yoshibiko The biological activities of podophyllotoxin compounds
Chem Pharm Bull 1986 34 3928
- 2 YU Pei-zhong(余培忠), YAO Li-yun(姚莉韵), WANG Li-ping(王丽平). HPLC determination of podophyllotoxin in four Dysosma plants(HPLC法测定4种八角莲中鬼臼毒素的含量). *J Shanghai Med Univ* (上海医科大学学报), 1998, 25(6): 453

(本文于2007年11月7日收到)

“药品安全关键技术研究”项目在北京召开会议

由项目承担单位中国药品生物制品检定所举办的,“十一五”国家科技支撑计划“药品安全关键技术研究”项目“常见与重要药品安全标准研究”研究课题第二次工作会议,于2009年1月9日在北京召开。课题参加单位中国药品生物制品检定所、北京市药品检验所、江西省食品药品检验所、黑龙江省药品检验所、山西省药品检验所、广州市药品检验所、北京大学、天津中医药大学、上海中医药大学、北京同仁堂股份有限公司的18名代表参加了会议。

中国药品生物制品检定所药品检验处处长、课题负责人马双成研究员主持会议。他强调时值课题进展中期,希望通过会议交流,了解课题总体进展情况,工作的成绩和不足,明确下一步工作的目标,以便于更好地完成课题任务。中国药品生物制品检定所中药室副主任、子课题2负责人肖新月主任药师在会上结合总课题任务进展情况,对现在课题进展中出现的问题,提出建议性的意见。各参加单位负责人依次介绍了研究情况,其中江西所的工作已取得阶段性成果。与会代表一致表示将按照课题任务书要求及考核指标推进工作,争取在年底圆满完成课题任务。

会议得到承办单位北京市药品检验所的大力支持。

(中国药品生物制品检定所中药室供稿)