

DOI:10.16781/j.0258-879x.2016.04.0517

• 短篇论著 •

高效液相色谱法测定白狼毒中月腺大戟素 A 的含量

李云青, 赵亮, 王新霞, 钱跣, 李盛建, 张凤, 吕磊, 张国庆*

第二军医大学东方肝胆外科医院药材科, 上海 200438

[摘要] **目的** 建立白狼毒药材中月腺大戟素 A 的含量测定方法。**方法** 采用高效液相色谱法, 色谱柱为 Agilent Zorbax SB-C₁₈ (4.6 mm×150 mm, 5 μm), 流动相为乙腈: 0.1% 甲酸水溶液 = 55: 45, 等度洗脱, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长为 290 nm, 柱温 25℃, 进样量 20 μL, 运行时间为 20 min。**结果** 月腺大戟素 A 与周围干扰峰达到基线分离, 线性范围为 4.545~227.3 μg·mL⁻¹, 相关系数 $r=0.9999$; 日内、日间精密密度均小于 2%; 平均回收率为 (99.1±3.4)% ($n=6$), 狼毒大戟 2 个批次药材及月腺大戟对照药材中月腺大戟素 A 含量分别为 (56.73±1.09)、(18.98±2.11) 及 (235.2±2.4) μg/g ($n=6$)。

结论 该法简便快捷、测定结果准确, 重复性好, 可用于白狼毒药材中月腺大戟素 A 的含量测定。

[关键词] 白狼毒; 月腺大戟; 狼毒大戟; 月腺大戟素 A; 高压液相色谱法

[中图分类号] R 931.71 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2016)04-0517-04

An HPLC method for determination of ebracteolatin A content in the root of *Euphorbia fischeriana* Steud and *Euphorbia ebracteolata* Hayata

LI Yun-qing, ZHAO Liang, WANG Xin-xia, QIAN Xian, LI Sheng-jian, ZHANG Feng, LÜ Lei, ZHANG Guo-qing*

Department of Pharmacy, Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438, China

[Abstract] **Objective** To establish a method for determination of ebracteolatin A content in the root of traditional Chinese medicine white *Langdu*, including *Euphorbia fischeriana* Steud and *Euphorbia ebracteolata* Hayata. **Methods** An HPLC-DAD method was created for determination at the following condition: the column was Agilent Zorbax SB-C₁₈ (4.6 mm×150 mm, 5 μm); mobile phase was acetonitrile: 0.1% formic acid in water = 55: 45 (V: V), isocratic elution, the flow rate was 1.0 mL·min⁻¹, the temperature of column was 25℃, the detection wavelength was set at 290 nm, the injection volume was 20 μL, and the running time was 20 min. **Results** Ebracteolatin A was separated from the interference in the baseline, and the linear range was 4.545-227.3 μg·mL⁻¹, with the linear correlation being 0.9999 for ebracteolatin A. The result of intra-day and inter-day precisions were both within 2% ($n=3$), and the average recovery was (99.14±3.4)% ($n=6$). The content of ebracteolatin A in two batches of *Euphorbia fischeriana* Steud and *Euphorbia ebracteolata* Hayata were (56.73±1.09) μg/g, (18.98±2.11) μg/g and (235.2±2.4) μg/g ($n=6$), respectively. **Conclusion** The present method is simple, rapid, accurate and convenient for determination of ebracteolatin A in the root of traditional Chinese medicine white *Langdu*.

[Key words] white *Langdu*; *Euphorbia fischeriana* Steud; *Euphorbia ebracteolata* Hayata; ebracteolatin A; high pressure liquid chromatography

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2016, 37(4): 517-520]

中药白狼毒为大戟科植物月腺大戟 (*Euphorbia ebracteolata* Hayata) 和狼毒大戟 (*Euphorbia fischeriana* Steud) 的根^[1]。狼毒大戟主要分布在黑龙江、内蒙古、吉林、辽宁、河北等地, 其味苦、辛, 性平, 有毒, 入肺、肝、脾, 具有泄水逐饮、破疾杀虫之功效^[1-6]。月腺大戟主产于河南、山东、江苏、安徽、

湖北、湖南、浙江、福建等地, 味辛, 性平, 有大毒, 具有散结杀虫的功效, 民间常用作驱虫、治疗肺结核和癌症^[7-8]。近年来白狼毒引起越来越多学者的注意, 尤其是其中萜类和苯乙酮类^[9]的特有成分, 表现出了显著的抗结核、抗癌、细胞毒等生物活性^[10-12], 但这些成分同时存在着一定毒性, 制约着其使用。因此,

[收稿日期] 2016-02-04 **[接受日期]** 2016-03-28

[基金项目] 国家自然科学基金青年项目(81303300)。Supported by Youth Program of National Natural Science Foundation of China (81303300)。

[作者简介] 李云青, 硕士生。E-mail: melody0770@163.com

* 通信作者 (Corresponding author)。Tel: 021-81875571, E-mail: gqzhang@smmu.edu.cn

进一步明确其生物活性与毒性的物质基础,以及它们之间的相互关系非常重要。

前期研究经植化分离提取得到化合物月腺大戟素 A,初步的实验证明其对肝癌细胞具有一定的细胞毒作用,为白狼毒中具有抗肿瘤作用的活性物质。本研究采用高效液相色谱法(HPLC)建立该物质的含量测定方法,对狼毒大戟与月腺大戟中共有化合物月腺大戟素 A 的含量进行测定,为提高白狼毒有效部位提取纯化效率提供支持。

1 仪器和试剂

1.1 仪器 Agilent 1100 系列高效液相色谱仪(美国安捷伦公司),包括 G1379A 型真空脱气机、G1311A 型四元泵、G1367A 型高性能自动进样器、G1316A 型柱温箱、G1315A 型二极管阵列检测器(DAD);AE240 型十万分之一电子天平(梅特勒-托利多瑞士有限公司);XW-80A 型漩涡混合器(上海医科大学仪器厂);DJ-04 粉碎机(上海定久仪器设备有限公司);PW-型超纯水系统(香港力康公司);KQ-250DE 型医用数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);HH·S1-2 电热恒温水浴锅(上海跃进医疗器械厂)。

1.2 药品与试剂 狼毒大戟 2 个批次药材购自安徽(产地山东,批号:20140805、20141007),经第二军医大学药学院生药学教研室的孙莲娜教授鉴定为狼毒大戟的根;月腺大戟对照药材购自中国药品生物制品鉴定所,批号 120961-200303。月腺大戟素 A 对照品(纯度>98%)购自上海诗丹德生物技术有限

公司。乙腈为色谱纯(美国费希尔公司),乙醇为分析纯(江苏强盛功能化学股份有限公司),水为超纯水。

2 方法和结果

2.1 色谱条件 色谱柱 Agilent Zorbax SB-C₁₈ (4.6 mm×150 mm,5 μm),流动相:乙腈:0.1%甲酸水溶液=55:45,流速为 1.0 mL·min⁻¹,柱温为 25℃,紫外检测波长为 290 nm,进样量为 20 μL,运行时间为 20 min。

2.2 供试品溶液制备 取药材适量,置粉碎机中打碎,过 100 目筛,取粉末约 5.0 g,精密称定,置于 100 mL 锥形瓶中,加入 40 mL 无水乙醇,超声提取 15 min,过滤,收集滤液;残渣同法再提取 1 次,合并 2 次滤液,置蒸发皿中,水浴(90℃)浓缩至 3 mL,再转移至 5 mL 容量瓶中,用无水乙醇定容,经 0.45 μm 有机滤膜过滤,取续滤液待测。

2.3 对照品储备液的配制 精密称取月腺大戟素 A 对照品 22.73 mg,置 25 mL 量瓶中,用甲醇溶解并定容,得浓度为 0.909 mg·mL⁻¹的对照品储备液,置冰箱 4℃ 保存。

2.4 方法学的考察

2.4.1 系统适用性实验 分别取月腺大戟素 A 对照品、供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件进行分析,记录色谱图,见图 1。结果表明月腺大戟素 A 的保留时间约为 15.2 min,所得色谱峰与周围干扰峰的分度均大于 1.5,理论塔板数均大于 9 000,拖尾因子 0.964。

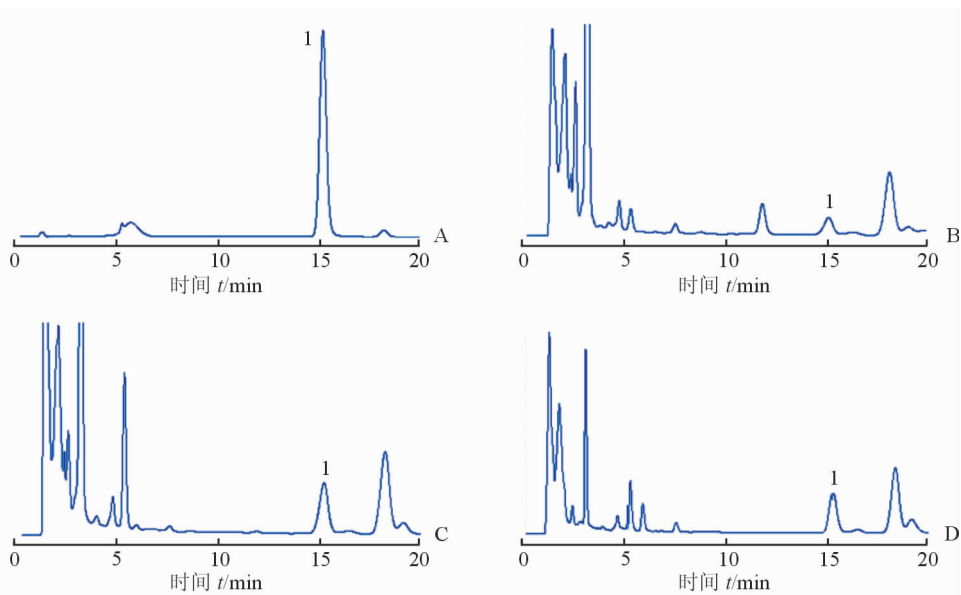


图 1 月腺大戟素 A 对照品及供试品色谱图

A: 对照品; B: 狼毒大戟药材(批号 20140805); C: 狼毒大戟药材(批号 20141007); D: 月腺大戟对照药材. 1: 月腺大戟素 A

2.4.2 标准曲线的制备 按逐级稀释法,精密量取月腺大戟素 A 对照品储备液适量,置于 10 mL 量瓶中,加入甲醇定容至刻度,得浓度分别为 227.3、90.90、45.45、22.73、9.090、4.545 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的系列对照品溶液,按 2.1 项下色谱条件进样分析,以浓度为横坐标(X)、色谱峰面积为纵坐标(Y)进行线性回归,得月腺大戟素 A 回归方程为: $Y=73.08 X-116.86$, $r=0.9999$,线性范围为 4.545~227.3 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.4.3 定量限与检测限 取月腺大戟素 A 的对照品溶液倍数稀释后进行分析,以信噪比为 10:1 确定其最低定量限为 0.227 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$;以信噪比为 3:1 确定其最低检测限为 0.113 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.4.4 精密度实验 取月腺大戟素 A 低(9.090 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)、中(45.45 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)、高(227.3 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 3 个浓度的对照品溶液,按 2.1 项下色谱条件进样分析,在 1 d 内分别进样 3 次,以及连续 3 d 每天进样 1 次,考察日内、日间精密度。月腺大戟素 A 低、中、高浓度的日内精密度分别为 0.65%、0.41%及 0.56%,日间精密度分别为 1.26%、1.70%及 0.83%,均小于 2%,表明方法精密度良好。

2.4.5 重复性实验 取狼毒大戟药材(批号 20141007)粉碎后过 100 目筛,取粉末约 5.0 g,精密称定,按 2.2 项下方法制备供试品溶液,平行操作 6 份,按 2.1 项下色谱条件进样分析。计算得月腺大戟素 A 的含量为 54.94 $\mu\text{g}/\text{g}$,相对标准偏差(RSD, $n=6$)为 1.35%,表明该方法重复性好。

2.4.6 加样回收率实验 取狼毒大戟药材(批号 20141007)粉末约 2.5 g,精密称定,置于 50 mL 锥形瓶中,再加入精确浓度为 909 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的月腺大戟素 A 对照品储备液 0.15 mL,按 2.2 项下方法制备供试品溶液,平行操作 6 份,按 2.1 项下色谱条件进样分析。结果月腺大戟素 A 的平均加样回收率为(99.1±3.4)%($n=6$)。

2.4.7 稳定性实验 取狼毒大戟药材(批号:20141007)粉末约 5.0 g,精密称定,按 2.2 项下条件制备供试品溶液,分别于放置 0、2、4、6、8、12 h 时按 2.1 项下色谱条件进样分析。计算月腺大戟素 A 的 RSD 为 1.4%,表明样品在 12 h 内稳定性良好。

2.5 含量测定 分别取狼毒大戟的 2 个不同批次

药材及月腺大戟对照药材粉末各约 5.0 g,精密称定,按 2.2 项下条件制备供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件进样分析,计算月腺大戟素 A 的含量。狼毒大戟(批号 20141007)平均含量为(56.73±1.09) $\mu\text{g}/\text{g}$ ($n=6$),狼毒大戟(批号 20140805)平均含量为(18.98±2.11) $\mu\text{g}/\text{g}$ ($n=6$),月腺大戟对照药材平均含量为(235.2±2.4) $\mu\text{g}/\text{g}$ ($n=6$)。

2.6 实验条件优化

2.6.1 样品前处理方法的优化 采用正交设计法对影响超声提取结果的提取溶剂、倍数、时间及次数等 4 个因素进行优化,参考 $L_9(3^4)$ 正交设计表,各因素水平设置见表 1。取狼毒大戟药材(批号:201410007)适量,置粉碎机中打碎,过 100 目筛,取粉末约 5.0 g,精密称定,置于 100 mL 的容量瓶中;按表 1 中设定的实验参数进行提取,过滤,滤液置水浴锅中浓缩,最后定容至 5 mL 容量瓶中,经 0.45 μm 有机滤膜过滤,取续滤液按 2.1 项下色谱条件进样分析,计算每个样品中月腺大戟素 A 的含量。以各样品中月腺大戟素 A 的含量作为衡量标准分别计算各实验结果的综合平均值 K_1 、 K_2 和 K_3 及其极差 R ,结果见表 1。

表 1 正交试验结果

试验号	提取溶剂(A)	溶剂体积 V/mL(B)	提取时间 t/min(C)	提取次数(D)	月腺大戟素 A 含量 $\rho_B/(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$
1	50%乙醇	30	15	1	22.53
2	50%乙醇	40	30	2	46.06
3	50%乙醇	50	60	3	44.28
4	75%乙醇	30	30	3	41.99
5	75%乙醇	40	60	1	39.96
6	75%乙醇	50	15	2	54.96
7	100%乙醇	30	60	2	46.79
8	100%乙醇	40	15	3	57.08
9	100%乙醇	50	30	1	40.12
K_1	37.62	37.10	44.86	34.20	
K_2	45.64	47.70	42.72	49.27	
K_3	48.00	46.45	43.68	47.78	
R	10.37	10.60	2.13	15.07	

K_1 、 K_2 、 K_3 为水平均值, R 为极值。由表 1 可以看出,对于因素 A, $K_3 > K_2 > K_1$;对于因素 B, $K_2 > K_3 > K_1$;对于因素 C, $K_1 > K_3 > K_2$;对于因素

$D, K_2 > K_3 > K_1$; 最优组合应为 $A_3 B_2 C_1 D_2$ 。由 R 值可知,各因素对提取结果影响程度依次为:提取次数 $>$ 溶剂体积 $>$ 提取溶剂 $>$ 提取时间。最终确定供试品溶液最优制备方法为 2.2 项下方法。

2.6.2 色谱柱的考察 白狼毒中成分复杂,为达到定量分析要求,月腺大戟素 A 与干扰峰要完全分离。考察不同类型填料色谱柱对月腺大戟素 A 与杂质分离的影响,如 Chromasil- C_{18} 、Waters RP- C_{18} 、Agilent Zorbax SB- C_{18} ,发现在 Agilent Zorbax SB- C_{18} (4.6 mm \times 150 mm, 5.0 μ m) 色谱柱上月腺大戟素 A 色谱峰与其他峰分离良好、保留时间合适、峰形对称,符合实验要求。

2.6.3 流动相的考察 对流动相的组成及不同比例进行了考察,发现使用甲醇-水系统在等度洗脱的条件下月腺大戟素 A 的峰形较差,且与干扰峰不能很好地分离。采用乙腈-水系统能够明显改善峰形,在流动相中加入一定比例的甲酸有助于提高周围干扰峰的分离度;同时考察乙腈与 0.1% 甲酸水溶液的不同比例,由 75 : 25 \rightarrow 65 : 35 \rightarrow 55 : 45,最终确定流动相组成为乙腈 : 0.1% 甲酸水溶液 = 55 : 45 时分离效果最佳。

2.6.4 检测波长的选择 采用 DAD 对月腺大戟素 A 在 200~400 nm 范围内的紫外吸收进行了全扫描,发现月腺大戟素 A 在 230 nm 及 290 nm 均有较好的紫外吸收,290 nm 处有最大吸收,故选择 290 nm 作为检测波长。

3 讨论

本研究建立了 HPLC 测定月腺大戟和狼毒大戟中月腺大戟素 A 含量的方法,通过对不同类型色谱柱、流动相组成的考察,确定了最佳的色谱条件;方法学考察表明本方法能够用于对月腺大戟素 A 含量的测定。该方法前处理条件简便、测定结果准

确可靠、重复性好,实用性强且溶剂消耗少、分析速度快,可用于白狼毒中月腺大戟素 A 的含量测定。

[参考文献]

- [1] 赵明,孙伟健,陈丽杰,李军,王金兰,张树军,等. 狼毒大戟地上部分化学成分研究[J]. 中草药,2014,45:2752-2756.
- [2] 么焕开,张文婷,郑雪晶. 狼毒大戟化学成分及药理作用研究进展[J]. 中成药,2010(08):1404-1407.
- [3] 洪博,李文静,刘树民,刘吉成. 狼毒大戟二萜类成分 HPLC 指纹图谱及聚类分析[J]. 天然产物研究与开发,2015,27:617-620.
- [4] 刘阳熙,卢燕,陈道峰. 中药狼毒及其醋炙饮片的 UPLC 指纹图谱[J]. 中药材,2015(10):2060-2064.
- [5] 李青松,吴起成. 狼毒大戟化学成分的研究[J]. 医药导报,2014,33:1319-1320.
- [6] 蔡珍珍,金铭,温宪春,刘吉成. 狼毒大戟石油醚提取物和乙酸乙酯提取物的半数致死量测定[J]. 中国医学创新,2013,10:158-159.
- [7] 汪兰云. 狼毒(月腺大戟)醋制工艺及质量标准研究[D]. 江苏:南京中医药大学,2012.
- [8] 张宁. 狼毒(月腺大戟)炮制机理研究[D]. 江苏:南京中医药大学,2010.
- [9] 吴起成,尤奋强,丁安伟,唐于平,殷金庠. 白狼毒化学成分和生物活性研究进展[J]. 药学与临床研究,2009,17:125-131.
- [10] 王宏伟,王海香,顾雅静. 狼毒大戟化学成分和药效作用研究进展[J]. 天然产物研究与开发,2012,24:1853-1856.
- [11] 潘丽丽,房平磊. 狼毒大戟的化学成分及生物活性研究进展[J]. 吉林农业:学术版,2011(04):320-321.
- [12] 顾臣贤,朱华荣,王奎龙,管伦兴. 狼毒质量控制研究进展[J]. 中国现代中药,2014(06):497-504.

[本文编辑] 尹茶