

# 藏药桃儿七与小叶莲 HPLC 分析及其毒性差异研究

叶耀辉\*, 马越兴, 张恩慧, 应亚宾, 王婷  
(江西中医药大学, 南昌 330004)

**[摘要]** **目的:**比较桃儿七、小叶莲化学成分的异同,分析桃儿七、小叶莲的化学成分与毒性的关系,为建立鬼臼毒素类藏药的指纹图谱提供依据。**方法:**利用 HPLC 分析方法,分析桃儿七、小叶莲化学成分的差异,结合急性毒性实验方法测定桃儿七和小叶莲的 LD<sub>50</sub>值,比较两药毒性差异,分析桃儿七、小叶莲鬼臼成分与毒性的关系,为桃儿七、小叶莲的质量标准提供依据。**结果:**标定了桃儿七与小叶莲的 14 个共有峰;桃儿七药材中鬼臼毒素、4'-去甲鬼臼毒素含量明显高于小叶莲,桃儿七、小叶莲 LD<sub>50</sub>分别为 0.088 7, 0.909 8 g·mL<sup>-1</sup>。**结论:**桃儿七、小叶莲化学成分基本相同,但化学成分含量差异较大。桃儿七鬼臼毒素含量更高,毒性更强,在制定药材质量标准时应严格控制鬼臼毒性成分的含量。

**[关键词]** 桃儿七; 小叶莲; 高效液相色谱; 毒性

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)18-0080-05

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2014180080

## Study on Toxic Medicine Radix Podophylli and Fructus Podophylli by HPLC Fingerprint, Compare Their Toxicity

YE Yao-hui\*, MA Yue-xing, ZHANG En-hui, YING Ya-bin, WANG Ting  
(Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China)

**[Abstract]** **Objective:** The aim of this study was to compare the chemical constituents of Radix Podophylli and Fructus Podophylli, and analyze the relationship between chemical constituents and the toxicity, as well as to provide the basis for establishment of the fingerprint. **Method:** HPLC fingerprint was used to study the chemical composition of Radix Podophylli and Fructus Podophylli. The relationship between chemical composition and toxicity was analyzed through acute toxicity test. **Result:** There were 14 common chromatographic peaks for Radix Podophylli and Fructus Podophylli, the contents of Podophyllotoxin and 4'-demethylpodophyllotoxin in Radix Podophylli were higher than in Fructus Podophylli. Median lethal dose for Radix Podophylli and Fructus Podophylli was 0.088 7, 0.909 8 g·mL<sup>-1</sup>, respectively. **Conclusion:** Radix Podophylli and Fructus Podophylli have the same

**[收稿日期]** 20131222(008)

**[基金项目]** 江西省自然科学基金项目(20132BAB205080);江西省卫生计生厅项目(No.2012A035);江西中医学院课题项目(JZYC12B12)

**[通讯作者]** \*叶耀辉, 硕士, 副教授, 从事中药学研究, Tel:0791-87118716, E-mail:55925368@qq.com

- [3] 舒尊鹏, 胡书法, 翟亚东, 等. 中药枳壳化学成分及药理作用研究[J]. 科技创新与应用, 2012(17):8.
- [4] 孙国禄, 赵强, 董晓宁, 等. 槐花化学成分及药理作用研究[J]. 中兽医医药杂志, 2009(6):24.
- [5] 林宗涛, 陈世忠, 王弘. HPLC 法测定枳壳中 6 个二氢黄酮类成分的含量[J]. 药物分析杂志, 2013, 33(2):201.
- [6] 景佳麟, 高慧敏, 李尧尧, 等. 关于完善《中国药典》2010 年版炒槐花质量标准的研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(7):88.
- [7] 莫少红, 唐弟光, 陈晓军, 等. 化痔片质量标准研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(4):150.
- [8] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社, 2010:229.

[责任编辑 顾雪竹]

chemical composition. But there is a great difference in content. Radix Podophylli has stronger toxicity than Fructus Podophylli. The content of toxic components Podophyllum should be strictly controlled in the formulation of medicine quality standard.

[ **Key words** ] Radix podophylli; Ructus podophylli; HPLC fingerprint; Acute toxicity test

藏鬼臼为我国传统藏药,在中医药中广泛应用。据《晶珠本草》记载,桃儿七是其主要植物来源,常用其根及根茎入药<sup>[1]</sup>,《证类本草》载主杀蛊毒,鬼疰精物,具有祛风除湿、活血化瘀、化痰止咳、解百毒等功效,藏医常外用治疗疾病。小叶莲为该植物干燥成熟的果实,具有调血活经的作用,常用于闭经血瘀,难产,死胎,胎盘不下等<sup>[2]</sup>,藏医常用于内服。由于不合理的开发使用桃儿七,该物种数量锐减,现已被《中国植物红皮书》收录,属于国家三级保护植物。目前西藏等地有人工栽培品,常出口国外用于抗癌前体物质鬼臼毒素的提取使用。

桃儿七植物学名使用比较混乱,植物分类学上的同种异名较多,有 *Sinopodophyllum hexandrum* (Royle) Ying, *S. emodi* (Wall.) Ying, *Podophyllum hexandrum* Royle, *P. emodi* Wall, *P. sikkimensis* R. Chatterjee et Mukerjee 等<sup>[3]</sup>。应俊生<sup>[4]</sup>在 1979 年将该植物定名到小檗科桃儿七属(新属)。国内书籍杂志常使用 *S. hexandrum* (Royle) Ying, 国外常使用 *P. hexandrum* (Royle)。根据 2005 年版《中国药典》记载的小叶莲药材中的描述,小檗科桃儿七的植物学名为 *P. hexandrum* Royle。

该植物的根及果实中,均含有鬼臼毒素及其衍生物,鬼臼毒素类物质既是它们的有效成分,又是毒性来源<sup>[5-6]</sup>。据文献报道<sup>[7-8]</sup>鬼臼毒素类物质有数十种,其中鬼臼毒素,4'-去甲鬼臼毒素是主要的毒性物质,鬼臼毒苷,4'-去甲鬼臼毒苷毒性略小。

本实验研究结合中药材的分析特点,选择适宜的色谱条件进行 HPLC 分析,并对主要色谱峰进行鉴定,通过对桃儿七和小叶莲进行毒性实验研究,以急性毒性实验为指标对两药材的毒性进行比较,以探寻桃儿七和小叶莲的毒性与化学成分的关系,为建立鬼臼毒素类藏药的质量标准提供依据。

## 1 材料

**1.1 药物** 桃儿七购于西藏圣迪康商贸有限公司,经西藏藏医学院格桑顿珠教授鉴定为 *S. hexandrum* (Royle) Ying 的根;小叶莲采自西藏,经西藏藏医学院格桑顿珠教授鉴定为 *S. hexandrum* (Royle) Ying 的果实。

**1.2 动物** KM 小鼠[江西中医学院实验动物中

心,合格证号 SCXK(赣)2011-0001],雌雄各半,5~6 周龄,体质量(18±2)g,SPF 级。

**1.3 仪器及试剂** Agilent1260 系列高效液相色谱仪(包括 G1311C 四元泵、G1316A 柱温箱、G1365 检测器、Agilent Chem 工作站),BS224S 型 CP225D 型电子天平(Satorius)。4'-去甲鬼臼毒素(批号 MUST-12121501)、鬼臼毒素(批号 MUST-10032803)对照品均购自成都曼思特生物科技有限公司,杭州娃哈哈纯净水。

## 2 方法

### 2.1 HPLC 含量分析

**2.1.1 色谱条件** 安捷伦 ZORBAX SB C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈(A)-0.02% 甲酸水溶液(B),梯度洗脱(0~5 min, 10%~15% A, 5~30 min, 15%~35% A, 30~50 min, 35%~50% A, 50~70 min, 50%~70% A),流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>,柱温 25 ℃,检测器波长 254 nm,进样量 20 μL,分析时间 70 min。在此条件下各成分分离情况良好。

**2.1.2 对照品溶液制备** 精密称取对照品 4'-去甲鬼臼毒素、鬼臼毒素适量,加 70% 甲醇分别制成 18.425, 268.50 mg·L<sup>-1</sup> 的溶液,备用。

**2.1.3 供试品溶液制备** 分别取供试样品桃儿七、小叶莲粉末(过 5 号筛)0.2 g,精密称定,置 50 mL 锥形瓶中,精密加入 70% 甲醇 20 mL,称定质量,超声提取 30 min,放冷,用 70% 甲醇补足质量,摇匀,0.22 μm 微孔滤膜滤过,即得。

**2.1.4 精密度试验** 分别取桃儿七、小叶莲制备的供试品溶液,连续进样 6 次,测定,结果表明,色谱峰保留时间和峰面积的 RSD 均 < 3%,表明该方法精密度良好。

**2.1.5 重复性试验** 分别取桃儿七、小叶莲供试品溶液 6 份,进行测定,结果显示各共有峰的相对保留时间和峰面积的 RSD 均 < 5%,表明该方法的重复性较好。

**2.1.6 稳定性试验** 分别取桃儿七、小叶莲供试品溶液,在 0, 5, 10, 15, 24, 48 h 进样,考察各共有峰的相对保留时间及相对峰面积比值的一致性,结果显示各共有峰的相对保留时间和峰面积 RSD 均 < 5%,表明该方法稳定性良好。

**2.1.7 线性关系考察** 分别精密吸取对照品溶液(4'-去甲鬼臼毒素  $18.425 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , 鬼臼毒素  $268.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 2, 5, 8, 10, 16, 20  $\mu\text{L}$ , 注入液相色谱仪, 以进样量( $\mu\text{g}$ )为横坐标, 峰面积为纵坐标, 绘制标准曲线。得到 4'-去甲鬼臼毒素、鬼臼毒素的回归方程分别是  $Y = 172.4X - 130.2 (r = 0.9989)$ ,  $Y = 91.25X - 76.53 (r = 0.9989)$ , 两种成分分别在 0.147 4 ~ 1.474 0, 0.537 0 ~ 5.370 0  $\mu\text{g}$  呈良好的线性关系。

**2.1.8 加样回收试验** 分别取已知含量的桃儿七、

小叶莲药材粉末(过 5 号筛), 精密称定 0.1 g, 平行 6 份分别置于 20 mL 量瓶中, 再分别加入 4'-去甲鬼臼毒素对照品储备液 5, 6 mL 和鬼臼毒素对照品储备液 8, 2 mL, 加 70% 甲醇稀释至近刻度处, 超声处理 30 min 后定容。按照 2.1.1 项下的条件进样测定, 结果测得桃儿七、小叶莲中两成分的平均加样回收率为 4'-去甲鬼臼毒素 102.89%, 102.39%; 鬼臼毒素 101.41%, 101.67%, RSD 均 < 3%, 表明该方法准确度良好, 见表 1, 2。

表 1 藏药桃儿七与小叶莲 4'-去甲鬼臼毒素加样回收率

样品名	No.	取样量/g	样品中量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均值/%	RSD/%
桃儿七	1	0.101 0	0.272 3	0.258 0	0.545 4	102.85	102.89	1.19
	2	0.101 5	0.273 7	0.258 0	0.542 1	101.97		
	3	0.100 3	0.270 4	0.258 0	0.534 3	101.12		
	4	0.102 1	0.275 3	0.258 0	0.552 5	103.61		
	5	0.102 6	0.276 7	0.258 0	0.559 2	104.60		
	6	0.101 6	0.274 0	0.258 0	0.548 9	103.20		
小叶莲	1	0.102 5	0.094 0	0.091 3	0.193 6	104.49	102.39	2.48
	2	0.102 1	0.093 7	0.091 3	0.189 1	102.27		
	3	0.101 9	0.093 5	0.091 3	0.192 3	104.10		
	4	0.101 2	0.092 8	0.091 3	0.187 6	101.91		
	5	0.101 8	0.093 4	0.091 3	0.180 3	97.65		
	6	0.100 9	0.092 6	0.091 3	0.191 0	103.91		

表 2 藏药桃儿七与小叶莲鬼臼毒素回收率

样品名	No.	取样量/g	样品中量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均值/%	RSD/%
桃儿七	1	0.101 0	2.451 3	2.148 0	4.690 1	101.97	101.41	0.68
	2	0.101 5	2.463 4	2.148 0	4.621 1	100.21		
	3	0.100 3	2.434 3	2.148 0	4.652 9	101.54		
	4	0.102 1	2.478 0	2.148 0	4.690 4	101.39		
	5	0.102 6	2.490 1	2.148 0	4.692 0	101.16		
	6	0.101 6	2.465 8	2.148 0	4.713 4	102.16		
小叶莲	1	0.102 5	0.431 0	0.537 0	0.996 5	102.94	101.67	1.69
	2	0.102 1	0.429 4	0.537 0	0.982 9	101.71		
	3	0.101 9	0.428 5	0.537 0	0.953 1	98.71		
	4	0.101 2	0.425 6	0.537 0	0.987 5	102.59		
	5	0.101 8	0.428 1	0.537 0	0.972 3	100.75		
	6	0.100 9	0.424 3	0.537 0	0.993 2	103.32		

**2.1.9 含量测定** 取桃儿七和小叶莲样品粉末约 0.2 g, 精密称定, 按供试品溶液制备方法制备。分别吸取对照品溶液与供试品溶液按照 2.1.1 项下色谱条件进行含量测定。

**2.2 毒性试验<sup>[9]</sup>**

**2.2.1 受试药物的制备** 桃儿七、小叶莲分别进行常规煎煮, 每药均煎煮两次, 每次 30 min, 合并两次药液。将药液按生药量计算制成  $1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的浓缩

液,冷藏备用。

**2.2.2 急性毒性预试验** KM 小鼠雌雄各 28 只,按体重随机分成 7 组,每组雌雄各 2 只,其中 1~3 组分别灌胃高、中、低剂量的桃儿七,4~6 组分别灌胃高、中、低剂量的小叶莲,7 组为空白,灌胃纯水。以  $0.02 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$  体质量的容量给药,高、中、低剂量组间给药浓度以 10 倍递减( $1, 0.1, 0.01 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )。在 24 h 内给药 3 次,每次间隔 8 h,给药的 24 h 内多次观察小鼠死亡情况,以后每天观察 1 次,连续观察 3 d。分别得到药物  $\text{LD}_{100}$  值(4/4 死亡率)、 $\text{LD}_0$  值(0/4 死亡率),即得到引起全部死亡的最低给药剂量以及未出现死亡的最高给药剂量,见表 3。

表 3 桃儿七、小叶莲急性毒性预实验动物死亡数目

组别	受试药物	剂量/ $\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	死亡数/只
1	桃儿七	1.00	4
2	桃儿七	0.10	3
3	桃儿七	0.01	0
4	小叶莲	1.00	3
5	小叶莲	0.10	0
6	小叶莲	0.01	0
7	纯水(空白)	-	0

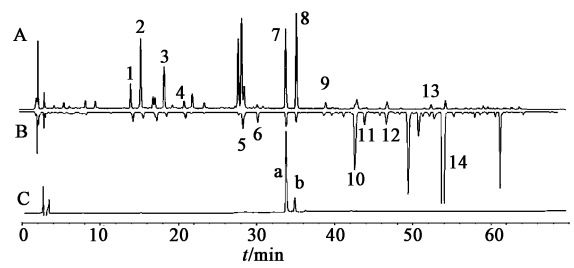
**2.2.3 急性毒性试验** 根据预试验结果,设制每组 10 只 KM 小鼠(雌雄各半)。将桃儿七给药按照  $0.50 \sim 0.01 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$  区间选取 7 个剂量组( $0.500, 0.250, 0.125, 0.100, 0.080, 0.060, 0.030 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ );将小叶莲给药按照  $1 \sim 0.100 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$  区间选取 6 个剂量组( $1.000, 0.750, 0.500, 0.250, 0.125, 0.100 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ );另设空白对照,纯水灌胃。按照 2.2.1 项下预试验给药方法,连续观察 14 d,记录死亡数,计算  $\text{LD}_{50}$  值。

### 3 结果与分析

**3.1 HPLC 分析** 根据两样品溶液 HPLC 色谱提供的相关参数,标定桃儿七与小叶莲 14 个共有峰,其中 7、8 号峰分别为 4'-去甲鬼臼毒素、鬼臼毒素,将 8 号峰作为 HPLC 参照峰,见图 1。

**3.2 含量测定** 试验结果鬼臼毒素、4'-去甲鬼臼毒素在桃儿七中为  $24.270, 2.6964 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ;小叶莲中为  $4.2053, 0.9713 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。桃儿七中鬼臼毒素含量远高于小叶莲,4'-去甲鬼臼毒素含量比小叶莲略高。

**3.3 Bliss 法计算半数致死量** 桃儿七  $0.125 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$  剂量组 14 d 内死亡 5 只,灌胃意外死亡 3 只,桃儿七  $0.500 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$  剂量组在 4 d 内全部死亡,



A. 桃儿七样品;B. 小叶莲样品;C. 对照品;  
a. 4'-去甲鬼臼毒素;b. 鬼臼毒素

图 1 桃儿七、小叶莲 HPLC

其余剂量组死亡动物情况见表 4。根据实验结果,按 Bliss 法计算  $\text{LD}_{50}$ , 桃儿七半数致死量  $\text{LD}_{50}$  为  $0.0887 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$  [ $\text{LD}_{50} 95\%$  可信限按 Feiller 校正为  $0.0688 \sim 0.1156 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,  $\text{LD}_5$  为  $0.0327 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,  $\text{LD}_{95}$  为  $0.2409 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 回归方程为  $Y(\text{Probit}) = 8.9905 + 3.7945 \text{ Log}(X)$ ];小叶莲半数致死量  $\text{LD}_{50}$  为  $0.9098 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$  [ $\text{LD}_{50} 95\%$  可信限按 Feiller 校正为  $0.7293 \sim 1.8890 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,  $\text{LD}_5$  为  $0.4438 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,  $\text{LD}_{95}$  为  $1.8651 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 回归方程为  $Y(\text{Probit}) = 5.2167 + 5.2761 \text{ Log}(X)$ ]。

从实验数据可以看出,小叶莲的毒性明显低于桃儿七,按小叶莲与桃儿七  $\text{LD}_{50}$  比值计算,桃儿七毒性约为小叶莲的 10 倍。

表 4 桃儿七小叶莲急性毒性实验正式实验死亡数目

组别	受试药物	剂量/ $\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	对数剂量 (X)	死亡数/动物数 (只/只)	回归机率 (Y)
1	桃儿七	0.500	-0.30103	10/10	8.3786
2	桃儿七	0.250	-0.60206	9/10	6.8344
3	桃儿七	0.125	-0.90309	5/7	5.2902
4	桃儿七	0.100	-1.00000	6/10	4.7931
5	桃儿七	0.080	-1.0969	2/10	4.2960
6	桃儿七	0.060	-1.2218	0/10	3.6551
7	桃儿七	0.030	-1.5229	0/10	2.1109
8	小叶莲	1.000	0	7/10	5.2167
9	小叶莲	0.750	-0.12494	3/10	4.5575
10	小叶莲	0.500	-0.30103	1/10	3.6284
11	小叶莲	0.250	-0.60206	0/10	2.0402
12	小叶莲	0.125	-0.90309	0/10	0.4519
13	小叶莲	0.060	-1.2041	0/10	-1.1363
14	纯水(空白)	-	-	0/10	-

注:3 组小鼠意外死亡 3 只。

#### 4 讨论

根据桃儿七、小叶莲急性毒性试验结果,桃儿七毒性明显高于小叶莲。急性毒性试验过程中,桃儿七组中毒小鼠伴有大小便失常、神志不清、精神萎靡、体温下降、四肢无力、不能站立等现象,而小叶莲中毒死亡症状较桃儿七轻。小叶莲与桃儿七虽属同一植物的不同用药部位,但其毒性相差较大,小叶莲毒性小,服用相对安全。

对桃儿七和小叶莲 HPLC 进行比较,结果显示桃儿七小叶莲化学成分基本相同,但是其成分含量差异较大。药物中鬼臼毒素、4'-去甲鬼臼毒素含量存在一定的差异,桃儿七中鬼臼毒素、4'-去甲鬼臼毒素含量均不同程度的高于小叶莲,结合毒性试验研究,同时说明鬼臼毒素类成分是其毒性主要来源。

由于桃儿七药材含有大量的鬼臼毒素类物质,在质量标准制定过程中,应注重鬼臼毒素类物质的含量测定,使其控制在安全范围内,从而有利于提高桃儿七药材在临床使用过程中的安全性。

采用的色谱条件能够分别将桃儿七及小叶莲 HPLC 各成分色谱峰进行有效分离,分离度良好,该色谱条件可以为鬼臼毒素类藏药指纹图谱分析提供参考条件。

实验证实,小叶莲、桃儿七化学组成相似,药物在临床使用过程中,建议外用时可选用含鬼臼毒素类成分较高的桃儿七,可以达到较理想的治疗效果;内服时尽量避免使用桃儿七,可选择安全范围相对较大的小叶莲作为治疗妇科疾病的首选藏药<sup>[10]</sup>。桃儿七含有大量的鬼臼毒素类物质,而鬼臼毒素类物质又是较好的抗癌活性成分<sup>[11]</sup>,可以将桃儿七作为鬼臼毒素类药物合成的原料药,进而批量化生产抗癌新药<sup>[12-13]</sup>。

#### [参考文献]

- [1] 张文雪,黄慧莲,叶耀辉,等. 濒危藏药桃儿七资源短缺的解决途径研究进展[J]. 江西中医学院学报, 2010,22(6):98.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:化学工业出版社,2005:31.
- [3] 应俊生. 小檗科八角莲属和桃儿七属(新属)的研究[J]. 植物分类学报,1979,17(1):23.
- [4] 张东佳,漆燕玲. 药用植物桃儿七的研究进展[J]. 安徽农业科学,2011(18):10802.
- [5] 尚明英,李军,蔡少青,等. 藏药小叶莲的化学成分研究[J]. 中草药,2000,31(8):569.
- [6] 陈有根,张丽芳,刘育澎,等. 桃儿七化学成分和细胞毒性研究[J]. 中草药,2010,41(10):1619.
- [7] 粟晓黎,林瑞超,王兆基,等. 中药鬼臼毒性成分 HPLC/UV 指纹图谱分析方法研究及与威灵仙、龙胆 HPLC 图谱比较[J]. 中成药,2000,22(12):819.
- [8] 陈燕,德吉,刘云华,等. 藏药材桃儿七果实 HPLC 指纹图谱的研究[J]. 中成药,2010,32(5):708.
- [9] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 3版. 北京:人民卫生出版社,2011:109.
- [10] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:43.
- [11] 杨光义,杜士明,黄良永,等. 鬼臼类中药毒理学研究进展[J]. 中国药房,2008,19(36):2872.
- [12] 李国元. 桃儿七根醇提物对人乳腺癌 MCF-7 细胞增殖和凋亡的影响[J]. 中国新药杂志,2006,15(13):1064.
- [13] 袁娅. 中药有效成分鬼臼毒素提制分析及其质量控制新方法研究[D]. 长沙:湖南大学,2011.

[责任编辑 顾雪竹]

欢迎投稿

欢迎订阅