

HPLC 同时测定京大戟生品和炮制品中 3 种三萜类成分含量

曾颜¹, 侯朋艺², 马冰洁², 周增慧², 毕开顺², 陈晓辉^{2*}

(1. 沈阳药科大学中药学院, 沈阳 110016; 2. 沈阳药科大学药学院, 沈阳 110016)

[摘要] 目的: 建立同时测定京大戟生品和炮制品中甘遂甾醇、大戟二烯醇和 24-亚甲基环阿尔廷醇含量的方法。方法: 采用 HPLC, Agilent XDB C₈ 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm), 流动相乙腈-水(90:10), 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 35 °C, 检测波长 205 nm。结果: 甘遂甾醇、大戟二烯醇、24-亚甲基环阿尔廷醇分别在 0.506 ~ 5.06 μg ($r = 1.000\ 0$), 1.052 ~ 10.52 μg ($r = 0.999\ 9$) 和 1.124 ~ 11.24 μg ($r = 0.999\ 8$) 线性关系良好。平均加样回收率分别为 99.7% (RSD 0.9%), 99.4% (RSD 1.0%), 99.4% (RSD 1.3%)。结论: 方法简便、快速、灵敏度高、专属性好, 为京大戟药材及其炮制品质量控制提供依据。

[关键词] 京大戟; 炮制品; 三萜; 高效液相色谱法

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)22-0141-04

[doi] 10.11653/syjf2013220141

HPLC Simultaneous Determination of Three Triterpenes in Euphorbiae Pekinensis Radix and its Processed Products

ZENG Yan¹, HOU Peng-yi², MA Bing-jie², ZHOU Zeng-hui², BI Kai-shun², CHEN Xiao-hui^{2*}

(1. School of Traditional Chinese Materia Medica, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China;

2. School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a method for the determination of tirucallol, euphol and 24-methylene cycloartanol in Euphorbiae Pekinensis Radix and its processed products. **Method:** An HPLC method had been developed for detecting. The separation was performed on an Agilent XDB C₈ column (4.6 mm × 150 mm, 5 μm) at 35 °C with acetonitrile-H₂O (90:10) as the mobile phase. The flow rate was 1.0 mL·min⁻¹, and the detection wavelength was set at 205 nm. **Result:** The linear response range was 0.506-5.06 μg ($r = 1.000\ 0$) for tirucallol, 1.05-10.5 μg ($r = 0.999\ 9$) for euphol and 1.12-11.2 μg ($r = 0.999\ 8$) for 24-methylene cycloartanol. The average recoveries of these components were 99.7% (RSD 0.9%), 99.4% (RSD 1.0%) and 99.4% (RSD 1.3%) respectively. **Conclusion:** The method is simple, accurate and reproducible for quality control of Euphorbiae Pekinensis Radix and its processed products.

[Key words] Euphorbiae Pekinensis Radix; processed products; triterpenes; HPLC

京大戟为大戟科大戟属植物大戟的干燥根, 味

苦, 性寒, 有毒, 具有泻水逐饮、消肿散结的功效^[1], 利尿降压、抗炎抗痛^[2-3]。京大戟的主要药理成分是三萜类化合物^[4], 其中甘遂甾醇具有局部抗炎作用^[5]; 其同分异构体大戟二烯醇有降压^[6]、抗肿瘤^[7]和镇痛作用; 24-亚甲基环阿尔廷醇有体外对抗恶性疟原虫和抗炎作用^[8]。《中国药典》2010 年版增补版中仅对京大戟中大戟二烯醇的含量有限度要求^[9], 不能全面控制药材的质量。

本文以京大戟中分离出的 3 种主要三萜类成分

[收稿日期] 20130312(015)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81373367)

[第一作者] 曾颜, 硕士研究生, 从事中药质量标准研究, Tel: 13898174024, E-mail: zengyan66@yahoo.com.cn

[通讯作者] * 陈晓辉, 教授, 博士生导师, 从事中药药效物质基础及药物质量控制分析方法的研究, Tel: 024-23986259, E-mail: cxh_syphu@yahoo.com.cn

作为指标性成分,建立了高效液相色谱法同时测定 3 种三萜的含量,以期为京大戟生品及炮制品制定合理的质量标准提供依据。

1 材料

岛津 LC-10T 高效液相色谱仪 (SPD-10A 型紫外检测器,LC-10AD 型高效液相输液泵,CLASS-VP 工作站),AB135-S 型 (1/10 万)天平 (瑞士 METTLER TOLEDO 公司),BP 210S 型电子天平 (德国 Sartorius 公司),甲醇 (色谱纯,山东禹王实业有限公司)、乙酸乙酯 (色谱纯,山东禹王实业有限公司)、乙腈 (色谱纯,J&K SCIENTIFIC LTD.)、纯净水 (杭州娃哈哈集团有限公司)。

甘遂甾醇、大戟二烯醇、24-亚甲基环阿尔廷醇对照品均为实验室自制 (经核磁和质谱确定结构,采用 HPLC 峰面积归一化法测定其纯度质量分数均 >98%)。

京大戟药材购自于河北安国药材市场,并经沈阳药科大学路金才教授鉴定为大戟科京大戟 *Euphorbia pekinensis* Rupr. 的干燥根。所有批次炮制品均由生品按 2010 年版《中国药典》醋煮法规定,进行规范炮制。

2 方法与结果

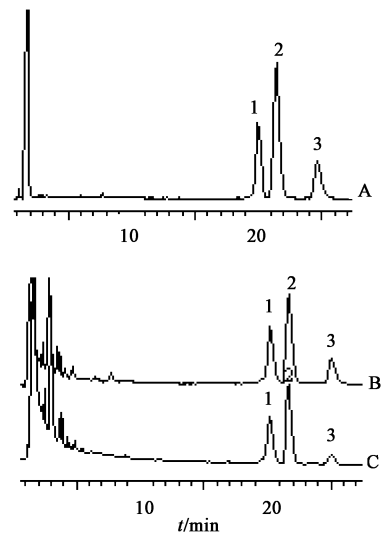
2.1 色谱条件与系统适用性试验 Agilent XDB C₈ 色谱柱 (4.6 mm × 150 mm, 5 μm),流动相乙腈-水 (90:10),流速 1.0 mL·min⁻¹,波长 205 nm,柱温 35 °C,进样量 20 μL。在上述色谱条件下,各色谱峰与相邻色谱峰的分离度均 >1.5,理论塔板数按大戟二烯醇计算不低于 5 000,拖尾因子符合要求,HPLC 图见图 1。

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液的制备 分别取甘遂甾醇、大戟二烯醇和 24-亚甲基环阿尔廷醇对照品适量,精密称定,用甲醇溶解,配制成每 1 mL 含甘遂甾醇 253 μg、大戟二烯醇 526 μg 和 24-亚甲基环阿尔廷醇 562 μg 的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备 取京大戟粉末 (过 40 目筛)约 1 g,精密称定,置 250 mL 具塞锥形瓶中,精密加入乙酸乙酯 40 mL,称定质量,超声 (功率 250 W,频率 50 kHz)提取 30 min,放冷,精密称定,用乙酸乙酯补足失去的质量,摇匀,滤过,精密量取续滤液 5 mL,蒸干,残渣加甲醇溶解并转移至 5 mL 量瓶中,定容至刻度,用 0.22 μm 滤膜过滤,取续滤液作为供试品溶液。

2.3 方法学确证



1. 甘遂甾醇;2. 大戟二烯醇;3. 24-亚甲基环阿尔廷醇
A. 对照品;B. 京大戟;C. 炮制品

图 1 对照品和样品 HPLC

2.3.1 线性关系考察 精密量取混合对照品溶液 0.5,1,2,3,4 mL,分别置于 5 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,作为系列对照品溶液,按 2.1 项下色谱条件测定,以对照品峰面积 (Y) 为纵坐标,对照品质量浓度 ($X, \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 为横坐标,以最小二乘法求得回归方程 ($n = 6$) 和相关系数, $Y_{\text{甘遂甾醇}} = 2.145 \times 10^4 X + 8.956 \times 10^3$ ($r = 1.0000$),线性范围 0.506 ~ 5.06 μg; $Y_{\text{大戟二烯醇}} = 1.934 \times 10^4 X + 6.459 \times 10^4$ ($r = 0.9999$),线性范围 1.05 ~ 10.5 μg; $Y_{\text{24-亚甲基环阿尔廷醇}} = 6.029 \times 10^3 X - 8.890 \times 10^2$ ($r = 0.9998$),线性范围 1.12 ~ 11.2 μg。

2.3.2 精密度试验 取混合对照品溶液,按 2.1 项下色谱条件,重复进样 6 次,测定峰面积。甘遂甾醇、大戟二烯醇和 24-亚甲基环阿尔廷醇峰面积的 RSD 分别为 1.9%,1.7%,2.6%,符合方法学验证要求,表明仪器的精密度良好。

2.3.3 重复性试验 取京大戟药材 (云南 1)6 份,每份约 1.0 g,精密称定,按 2.2.2 项下制成供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件进行测定。结果测得甘遂甾醇、大戟二烯醇和 24-亚甲基环阿尔廷醇的平均质量分数分别为 4.16,8.13,3.75 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$,RSD 分别为 2.5%,2.3%,3.0%,符合方法学验证要求,表明方法的重复性良好。

2.3.4 稳定性试验 取上述供试品溶液,在室温下放置,按 2.1 项下色谱条件,分别在 0,2,4,8,12,24 h 进样,测定峰面积。甘遂甾醇、大戟二烯醇和 24-亚甲基环阿尔廷醇在不同时间点峰面积的 RSD 分别为 2.5%,2.3%,2.7%,符合方法学验证要求,

表明供试品溶液在室温条件下 24 h 内稳定。

2.3.5 回收率试验 取已知含量的京大戟药材(云南 1)共 6 份,每份约 1 g,精密称定,分别加入对照品粉末,按 2.2.2 项方法进行处理,按 2.1 项下色谱条件进行分析。测定甘遂甾醇、大戟二烯醇和 24-亚甲基环阿尔廷醇平均加样回收率分别为

99.7%,99.4%,99.4%,RSD 分别为 0.9%,1.0%,1.3%,符合方法学验证要求,表明该方法准确度良好,测定结果见表 1。

2.3.6 样品测定 取所收集各产地京大戟药材粉末及炮制品药材粉末,按 2.2.2 项下制成供试品溶液,在上述色谱条件下测定,平均含量见表 2。

表 1 京大戟中 3 种成分的加样回收率测定

成分	称样量/g	样品含量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
甘遂甾醇	1.000 6	4.163 0	4.162 5	8.304 5	99.50	99.7	0.9
	1.000 8	4.163 0	4.162 5	8.359 7	100.8		
	1.000 4	4.162 7	4.162 5	8.278 8	98.89		
	1.000 5	4.162 7	4.162 5	8.291 3	99.19		
	1.000 2	4.162 4	4.162 5	8.357 2	100.8		
	1.000 3	4.162 5	4.162 5	8.272 1	98.73		
大戟二烯醇	1.000 6	8.134 0	8.133 5	16.257 1	99.87	99.4	1.0
	1.000 8	8.134 1	8.133 5	16.362 7	101.2		
	1.000 4	8.133 6	8.133 5	16.165 8	98.75		
	1.000 5	8.133 6	8.133 5	16.234 8	99.60		
	1.000 2	8.133 0	8.133 5	16.131 5	98.35		
	1.000 3	8.133 0	8.133 5	16.174 3	98.87		
24-亚甲基环阿尔廷醇	1.000 6	3.752 3	3.752 2	7.571 3	101.8	99.4	1.3
	1.000 8	3.752 3	3.752 2	7.498 2	99.83		
	1.000 4	3.752 2	3.752 2	7.459 9	98.81		
	1.000 5	3.752 2	3.752 2	7.474 2	99.20		
	1.000 2	3.751 9	3.752 2	7.451 4	98.60		
	1.000 3	3.752 2	3.752 2	7.431 6	98.07		

表 2 京大戟生品、炮制品中 3 种成分含量测定($n=3$)

来源	生品			醋制品		
	甘遂甾醇	大戟二烯醇	24-亚甲基环阿尔廷醇	甘遂甾醇	大戟二烯醇	24-亚甲基环阿尔廷醇
河北 1	0.600 6	1.116	0.462 4	0.483 8	1.049	0.398 2
河北 2	0.658 0	1.190	0.402 0	0.558 6	1.059	0.331 1
江苏 1	0.545 6	1.107	0.412 9	0.440 0	0.995 0	0.337 6
江苏 2	0.510 2	1.051	0.393 4	0.426 8	0.870 4	0.297 3
陕西 1	0.331 3	0.710 9	0.590 2	0.251 6	0.608 7	0.466 0
陕西 2	0.386 6	0.776 0	0.579 8	0.308 6	0.681 9	0.435 9
云南 1	0.416 2	0.813 3	0.375 1	0.340 7	0.679 2	0.273 7
云南 2	0.378 2	0.750 8	0.361 7	0.314 4	0.630 2	0.270 2

3 讨论

3.1 流动相的选择 考察了甲醇-水、乙腈-水两种流动相系统,使用乙腈-水(90:10)为流动相时待测的 3 种成分的色谱峰峰型良好,分离效果好。

3.2 提取方法和溶剂的考察 比较了超声提取和

加热回流提取,2 种方法对待测成分提取效率相差不大,故选择操作简单的超声提取。提取溶剂考察了甲醇、95%乙醇、乙酸乙酯和二氯甲烷,使用乙酸乙酯提取,提取效率高,杂峰干扰少,所以选择乙酸乙酯为提取溶剂。考察了提取溶剂倍量和提取时

藤茶的 HPLC 指纹图谱及化学模式识别研究

苏素娇¹, 李娜¹, 陈亮¹, 林培玲², 丁春花³, 陈诗强¹, 梁一池^{1*}

(1. 福建中医药大学药学院, 福州 350122;

2. 漳州卫生职业学院, 福建漳州 363000; 3. 西岸生物科技有限公司, 福建宁德 355300)

[摘要] 目的:建立藤茶药材 HPLC 指纹图谱,并进行主成分聚类分析,为其质量控制提供依据。方法:采用 UltimateXB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm);流动相乙腈-0.5% 甲酸溶液梯度洗脱,检测波长 365 nm;柱温 40 ℃;应用 SPSS 软件对数据进行统计学分析。结果:建立了藤茶药材 HPLC 指纹图谱共有模式,确定了 11 个共有峰,并指认了 2 个主要共有峰。通过主成分聚类分析,18 个藤茶不同无性系种质可分为 3 类。结论:该方法快速,可较全面的反映藤茶药材中化学成分的信息,为评价藤茶药材提供了科学实验依据。

[关键词] 藤茶; 高效液相色谱指纹图谱; 主成分分析; 聚类分析

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)22-0144-04

[doi] 10.11653/syjf2013220144

[收稿日期] 20130313(004)

[基金项目] 福建省科技厅社发处重大项目(2011Y4005)

[第一作者] 苏素娇,在读硕士,从事质量控制与品质评价研究,Tel:15806024425,E-mail:583071742@qq.com

[通讯作者] *梁一池,博士生导师,教授,从事中药材品质评价与质量标准研究,Tel:13799399596,E-mail:fafulyc@126.com

间,用 40 倍量提取 0.5 h 效率高。

3.3 结果分析 不同产地的生品和炮制品中,大戟二烯醇和甘遂甾醇的含量比值约为 2:1,炮制前后二者变化趋势一致,其中,炮制前后大戟二烯醇的含量均符合药典标准(不少于 0.6%)。历版药典中,以醋制来降低京大戟毒性,缓和其泻下作用。在本研究中,醋京大戟中 3 种三萜成分略有降低,经过统计学分析,与生品未有显著性差异($P > 0.05$)。所以若要应用抗炎、降压、抗肿瘤等功效,可以以炮制品代替生品使用。

[参考文献]

- [1] 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,2010:209.
- [2] 张乐林,孙立立. 京大戟现代研究概述[J]. 中华中医药学刊,2011,29(3):577.
- [3] 严亨波,肖新月,马双成,等. 大戟科 5 种有毒中药材的活性成分及质量标准研究进展[J]. 中国药师,2007,10(6):544.
- [4] 曹小迎. 京大戟三萜成分及生物合成途径中关键酶研究[D]. 徐州:中国矿业大学.

- [5] Loizou S, Paraschos S, Mitakou S, et al. Chiosmastic gum extractand isolated phytosterol tirucallol exhibit anti-inflammatory activity in human aortic endothelial cells[J]. Exp Biol Med (Maywood), 2009, 234(5):553.
- [6] Singh G B, Singh S, Sharma M L, et al. Hypotensive activity of 8, 24-euphadien-3β-ol (euphol) [J]. Planta Med, 1989, 55(6):498.
- [7] Yasukawa K, Akihisa T, Yoshida Z Y, et al. Inhibitory effect of euphol; a triterpene alcohol from the roots of *Euphorbia kansui* on tumourpro-motion by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate in two-stage carcinogenesis in mouse skin [J]. J Pharm Pharmacol, 2000, 52(1):119.
- [8] Era Tavčar, Matej Barbič, Jörg Heilmann, et al. High levels of cycloartenol derivatives from *Euphorbia acanthothamnos* [J]. Biochem Syst, Ecol, 2012, 44:83.
- [9] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 第一增补本[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:106.

[责任编辑 顾雪竹]