

# HPLC 同时测定千金子不同部位中 4 种有效成分的含量

孟夏<sup>1</sup>, 王延年<sup>2</sup>, 庄贺飞<sup>1</sup>, 袁杨<sup>1</sup>, 毕开顺<sup>1</sup>, 陈晓辉<sup>1\*</sup>

(1. 沈阳药科大学药学院, 沈阳 110016;

2. 沈阳药科大学 中药学院, 沈阳 110016)

**[摘要]** 目的: 考察不同产地千金子不同药用部位中 4 种有效成分的含量差异, 为千金子药材质量控制提供依据。方法: 采用 HPLC, 色谱柱为 Apollo C<sub>18</sub> 柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈-0.1% 磷酸水溶液, 梯度洗脱, 检测波长 280 nm, 柱温室温。结果: 秦皮乙素、千金子素 L<sub>1</sub>、千金子素 L<sub>2</sub> 和千金子素 L<sub>3</sub> 分别在 3.23 ~ 162 mg·L<sup>-1</sup> (r = 0.999 8), 3.02 ~ 152 mg·L<sup>-1</sup> (r = 1.000 0), 1.84 ~ 91.8 mg·L<sup>-1</sup> (r = 0.999 9) 和 3.64 ~ 182 mg·L<sup>-1</sup> (r = 1.000 0) 线性关系良好; 平均加样回收率分别为 98.2% (RSD 1.9%), 99.8% (RSD 2.3%), 100.9% (RSD 1.9%), 101.9% (RSD 2.5%)。结论: 该方法简便、可靠, 重复性好, 结果准确, 可用于比较不同产地千金子不同药用部位的质量差异。

**[关键词]** 千金子; 高效液相色谱法; 有效成分; 不同部位

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)18-0091-04

## HPLC Simultaneous Determination of Four Effective Components in Different Parts of Seeds of *Euphorbia lathyris*

MENG Xia<sup>1</sup>, WANG Yan-nian<sup>2</sup>, ZHUANG He-fei<sup>1</sup>, YUAN Yang<sup>1</sup>, BI Kai-shun<sup>1</sup>, CHEN Xiao-hui<sup>1\*</sup>

(1. School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China;

2. School of Traditional Chinese Materia Medica, Shenyang Pharmaceutical  
University, Shenyang 110016, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the content differences of four effective components in different parts of seeds of *Euphorbia lathyris* in different areas and to be used for total quality control of seeds of *E. lathyris*. **Method:** An RP-HPLC method had been developed for detecting. The system consisting of an Apollo C<sub>18</sub> column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) and a mixture of acetonitrile and 0.1% phosphate acid as the mobile phase in gradient mode was adopted. The detection wavelength was set at 280 nm and the column temperature was room temperature. **Result:** The linear response range was 3.23-162 mg · L<sup>-1</sup> (r = 0.999 8) for aesculetin, 3.02-152 mg · L<sup>-1</sup> (r = 1.000 0) for Euphorbia factor L<sub>1</sub>, 1.84-91.8 mg · L<sup>-1</sup> (r = 0.999 9) for Euphorbia factor L<sub>2</sub> and 3.64-182 mg · L<sup>-1</sup> (r = 1.000 0) for Euphorbia factor L<sub>3</sub>. The average recoveries of these components were 98.2% (RSD 1.9%), 99.8% (RSD 2.3%), 100.9% (RSD 1.9%) and 101.9% (RSD 2.5%), respectively. **Conclusion:** The method is simple, accurate and reproducible for quality control of seeds of *E. lathyris* and can be used for comparing the four effective components of seeds of *E. lathyris* of different parts in different areas.

**[Key words]** seeds of *Euphorbia lathyris*; HPLC; effective components; different parts

千金子为大戟科植物续随子的干燥成熟种子, 味辛、性温、有毒, 归大肠、肝、肾经, 具有逐水消肿、

**[收稿日期]** 20120204(011)

**[第一作者]** 孟夏, 硕士研究生, 从事中药质量控制研究, E-mail: mengxia880126@hotmail.com

**[通讯作者]** \* 陈晓辉, 教授, 博士生导师, 从事中药质量控制及体内药物分析研究, Tel: 024-23986259, E-mail: cxh\_syphu@yahoo.com.cn

破血消癥之功效,用于水肿、痰饮、积滞胀满、二便不通、血瘀经闭,外治顽癣、疣赘。千金子药用资源丰富,我国大部分省均有分布<sup>[1]</sup>。《中国药典》2010 年版规定千金子需去皮取仁入药,因此有必要对千金子全种、种仁和种皮 3 个不同部位的成分含量进行研究。目前关于千金子质量控制和不同部位的研究文献中,只见单一成分含量测定,不能全面控制药材的整体质量。千金子素 L<sub>1</sub> 和千金子素 L<sub>2</sub> 是千金子泻下作用的主要成分<sup>[2-3]</sup>;千金子素 L<sub>1</sub> 有体外抗肿瘤活性<sup>[4]</sup>;千金子素 L<sub>3</sub> 具有显著的美白皮肤作用<sup>[5]</sup>;秦皮乙素具有抗菌抗炎和抑制酪氨酸酶活性作用<sup>[6-8]</sup>,因此有必要对其 4 种有效成分进行含量测定。本研究建立了同时测定千金子中千金子素 L<sub>1</sub>、千金子素 L<sub>2</sub>、千金子素 L<sub>3</sub> 和秦皮乙素 4 种有效成分的含量测定方法,用于考察千金子不同产地不同药用部位的质量差异。

### 1 材料

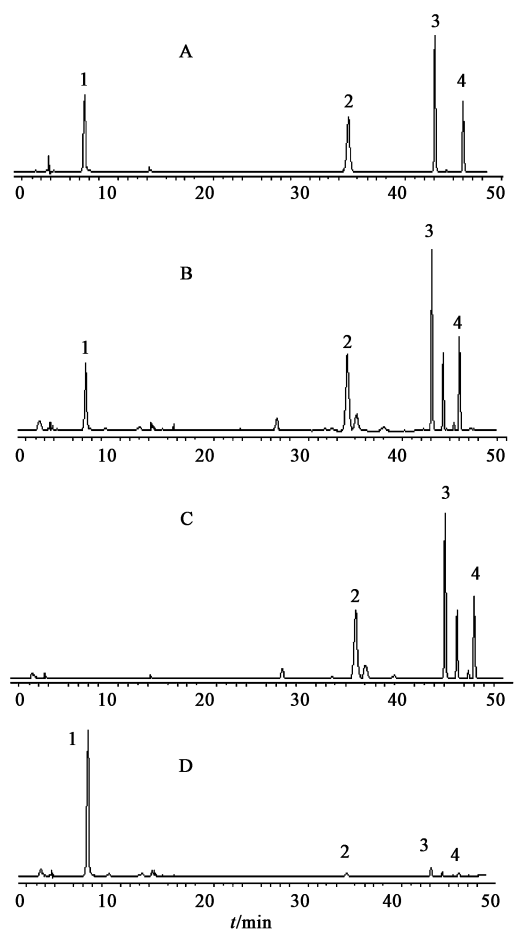
岛津 LC-10T 高效液相色谱仪 (SPD-10A 型紫外检测器,LC-10AD 型高效液相输液泵,CLASS-VP 工作站),AB135-S 1/10 万天平 (瑞士 METTLER TOLEDO 公司),BP 210S 型电子天平 (德国 Sartorius 公司),甲醇 (色谱纯,山东禹王实业有限公司)、乙腈 (色谱纯,J&K SCIENTIFIC LTD.)、磷酸 (分析纯,天津市科密欧化学试剂有限公司)、纯净水 (杭州娃哈哈集团有限公司)。

秦皮乙素 (批号 110741-200506)、千金子素 L<sub>1</sub> (批号 11789-200901)、千金子素 L<sub>2</sub> (批号 111790-200901)、千金子素 L<sub>3</sub> (批号 111791-200901) 对照品均购于中国食品药品检定研究院。

千金子药材购于辽宁沈阳药材市场和安徽亳州药材市场,经沈阳药科大学中药学院袁久志教授鉴定为大戟科植物续随子 *Euphorbia lathyris* L. 的干燥成熟种子。

### 2 方法与结果

**2.1 色谱条件与系统适用性试验** Apollo C<sub>18</sub> 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈 (A)-0.1% 磷酸水溶液 (B),梯度洗脱 (0 ~ 8 min, 20% A; 8 ~ 10 min, 20% ~ 35% A; 10 ~ 37 min, 35% A; 37 ~ 40 min, 35% ~ 15% A; 40 ~ 45 min, 15% ~ 10% A; 45 ~ 50 min, 10% ~ 5% A),流速 1.0 mL · min<sup>-1</sup>,波长 280 nm,柱温室温,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度均大于 1.5,理论塔板数按千金子素 L<sub>1</sub> 计算不低于 5000,拖尾因子符合要求,HPLC 图见图 1。



A. 对照品; B. 千金子全种样品;

C. 千金子种仁样品; D. 千金子种皮样品

1. 秦皮乙素; 2. 千金子素 L<sub>1</sub>; 3. 千金子素 L<sub>3</sub>; 4. 千金子素 L<sub>2</sub>

图 1 对照品和样品 HPLC

### 2.2 溶液的制备

**2.2.1 混合对照品溶液的制备** 分别精密称取秦皮乙素、千金子素 L<sub>1</sub>、千金子素 L<sub>2</sub> 和千金子素 L<sub>3</sub> 对照品 5.05, 5.04, 5.10, 5.06 mg 于 4 个 5 mL 量瓶中,用甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,分别制成质量浓度为 1.01, 1.01, 1.02, 1.01 g · L<sup>-1</sup> 的对照品储备液。分别精密量取上述 4 个对照品储备液 1.6, 1.5, 0.9, 1.8 mL 于 10 mL 量瓶中,用甲醇稀释至刻度,摇匀,配制成每 1 mL 含秦皮乙素 161.6 μg、千金子素 L<sub>1</sub> 151.2 μg、千金子素 L<sub>2</sub> 91.8 μg、千金子素 L<sub>3</sub> 182.2 μg 的混合对照品溶液。

**2.2.2 供试品溶液的制备** 精密称取千金子药材粉末约 1.0 g,精密加入甲醇 50 mL,称重,加热回流提取 2 h,放冷,称重,用甲醇补足失去质量,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

**2.3.1 线性关系考察** 精密量取混合对照品溶液

0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 2.5 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( $A$ )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, 秦皮乙素  $Y=2.63 \times 10^4 X - 3.50 \times 10$  ( $r=0.9998$ ); 千金子素  $L_1$   $Y=3.16 \times 10^4 X + 2.32$  ( $r=1.0000$ ); 千金子素  $L_2$   $Y=2.40 \times 10^4 X + 6.50 \times 10^{-2}$  ( $r=0.9999$ ); 千金子素  $L_3$   $Y=3.07 \times 10^4 X - 8.06 \times 10^{-1}$  ( $r=1.0000$ )。表明秦皮乙素、千金子素  $L_1$ 、千金子素  $L_2$  和千金子素  $L_3$  分别在 3.23 ~ 162, 3.02 ~ 152, 1.84 ~ 91.8, 3.64 ~ 182  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  线性关系良好。

**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。秦皮乙素、千金子素  $L_1$ 、千金子素  $L_2$  和千金子素  $L_3$  峰面积的 RSD 分别为 1.7%, 1.4%, 1.6%, 1.3%, 符合方法学验证要求, 表明仪器的精密度良好。

**2.3.3 检测限** 取混合对照品溶液, 用甲醇逐级稀释, 进样。按 3 倍信噪比计算秦皮乙素的检测限为 1.08 ng; 千金子素  $L_1$ 、千金子素  $L_2$  和千金子素  $L_3$  的检测限均为 0.1  $\mu\text{g}$ 。

**2.3.4 定量限** 取混合对照品溶液, 用甲醇逐级稀释, 进样。按 10 倍信噪比计算秦皮乙素的定量限为 3.23 ng; 千金子素  $L_1$ 、千金子素  $L_2$  和千金子素  $L_3$  的定量限均为 0.4  $\mu\text{g}$ 。

**2.3.5 重复性试验** 取千金子(辽宁产)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。秦皮乙素、千金子素  $L_1$ 、千金子素  $L_2$  和千金子素  $L_3$  含量的 RSD 分别为 2.7%, 2.4%, 2.5%, 2.4%, 符合方法学验证要求, 表明方法的重复性良好。

**2.3.6 稳定性试验** 取供试品溶液, 在室温下放置, 按 2.1 项下色谱条件, 分别在 0, 2, 4, 6, 8, 10 h 进样, 测定峰面积。秦皮乙素、千金子素  $L_1$ 、千金子素  $L_2$  和千金子素  $L_3$  在不同时间点峰面积的 RSD 分别为 2.1%, 2.8%, 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 10 h 内稳定。

**2.3.7 回收率试验** 取已知含量的千金子(产地辽宁)9 份, 每份约 0.5 g, 精密称定, 精密加入相当于药材含量 50%, 100%, 150% 的混合对照品溶液, 按 2.2.2 项下制备低、中、高浓度的供试品溶液各 3 份, 按 2.1 项下色谱条件进行分析。结果见表 1~4。

**2.3.8 样品测定** 取千金子药材的全种、种仁和种皮, 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 5。

表 1 秦皮乙素加样回收率试验

样品含量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
1.395	0.707	2.105	100.4		
1.378	0.707	2.077	98.9		
1.400	0.707	2.108	100.1		
1.420	1.414	2.793	97.1		
1.388	1.414	2.781	98.5	98.2	1.9
1.375	1.414	2.782	99.5		
1.385	2.121	3.404	95.2		
1.413	2.121	3.444	95.8		
1.383	2.121	3.461	98.0		

表 2 千金子素  $L_1$  加样回收率试验

样品含量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
1.880	0.955	2.841	100.6		
1.872	0.955	2.852	102.6		
1.903	0.955	2.821	96.1		
1.934	1.910	3.817	98.6		
1.864	1.910	3.747	98.6	99.8	2.3
1.853	1.910	3.801	102.0		
1.868	2.865	4.672	97.9		
1.925	2.865	4.756	98.8		
1.870	2.865	4.811	102.7		

表 3 千金子素  $L_2$  加样回收率试验

样品含量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
1.185	0.605	1.808	103.0		
1.176	0.605	1.798	102.8		
1.204	0.605	1.823	102.3		
1.223	1.210	2.438	100.4		
1.178	1.210	2.383	99.6	100.9	1.9
1.165	1.210	2.413	103.1		
1.186	1.815	2.977	98.7		
1.215	1.815	3.003	98.5		
1.180	1.815	2.997	100.1		

表 4 千金子素  $L_3$  加样回收率试验

样品含量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
2.393	1.215	3.583	97.9		
2.386	1.215	3.656	104.5		
2.406	1.215	3.659	103.1		
2.421	2.430	4.861	100.4		
2.385	2.430	4.805	99.6	101.9	2.5
2.376	2.430	4.921	104.7		
2.391	3.645	6.060	100.7		
2.415	3.645	6.103	101.2		
2.388	3.645	6.197	104.5		

表 5 千金子 4 种成分的含量测定 (n=3) %

产地	部位	秦皮乙素	千金子素 L <sub>1</sub>	千金子素 L <sub>2</sub>	千金子素 L <sub>3</sub>
辽宁	全种	0.28	0.38	0.24	0.48
	种仁	-	0.53	0.33	0.69
	种皮	0.55	0.04	0.01	0.04
河南 1	全种	0.32	0.40	0.25	0.51
	种仁	-	0.59	0.33	0.71
	种皮	0.68	0.03	0.03	0.04
河南 2	全种	0.29	0.39	0.23	0.46
	种仁	-	0.56	0.33	0.70
	种皮	0.65	0.02	0.01	0.02
安徽 1	全种	0.33	0.43	0.26	0.50
	种仁	-	0.61	0.36	0.72
	种皮	0.65	0.02	0.01	0.02
安徽 2	全种	0.31	0.40	0.25	0.50
	种仁	-	0.63	0.37	0.74
	种皮	0.68	0.02	0.01	0.03

注：“-”表示低于定量限。

### 3 讨论

**3.1 检测波长和流动相的选择** 千金子素 L<sub>1</sub>、千金子素 L<sub>2</sub> 和千金子素 L<sub>3</sub> 3 个二萜类成分的最大吸收波长均在 280 nm, 香豆素类成分秦皮乙素的最大吸收波长为 340 nm, 由于秦皮乙素在 280 nm 处吸收也很好, 最终选择 280 nm 为检测波长。考察了甲醇-水、乙腈-水、乙腈-0.1% 乙酸水溶液和乙腈-0.1% 磷酸水溶液四种流动相系统, 使用乙腈-0.1% 磷酸水溶液为流动相时待测的 4 种成分的色谱峰峰型良好, 不拖尾。

**3.2 提取方法和溶剂的考察** 考察了超声提取和加热回流提取, 超声提取不能将待测成分提取完全, 故选择加热回流提取。考察了提取溶剂倍量和提取时间, 用 50 倍量提取 2 h 效率最高。提取溶剂考察了甲醇、75% 乙醇和 95% 乙醇, 待测化合物含量没有显著性差异, 甲醇提取物溶解性好, 所以选择甲醇为提取溶剂。

**3.3 结果分析** 含量测定结果表明, 不同产地的千金子药材中, 河南和安徽中各成分含量没有显著性差异且均高于辽宁, 品质较好。

不同药用部位中, 香豆素类成分秦皮乙素在种皮中含量很高, 在种仁中检测不到。3 个二萜类成分千金子素 L<sub>1</sub>、L<sub>2</sub> 和 L<sub>3</sub>, 主要存在于种仁中, 种皮中含量很少。原因可能是千金子去皮方法基本上还是传统费时的人工去皮法, 在去皮过程中, 种仁上不可避免的会粘上少量的种皮, 又由于千金子种皮中秦皮乙素含量很大, 所以有文献报道<sup>[11]</sup>, 种仁中也含有少量的秦皮乙素, 本研究在处理种仁时, 更加严格, 尽量避免种皮的混入, 所以秦皮乙素在种仁中没有检测到。

有关药理研究报道, 千金子有泻下、抗肿瘤、美白皮肤和抗菌、抗炎等作用<sup>[9-10]</sup>。《中国药典》2010 年版规定千金子要去皮取仁入药, 对于去皮取仁后应用是否合理, 已有文献报道且结论不尽相同<sup>[11-12]</sup>。本研究中, 对于千金子中二萜类和香豆素类化合物中具有明确药理活性的 4 种成分进行同时含量测定, 结果表明种仁中二萜类成分含量很大而种皮中含量很少, 若要应用千金子泻下、抗肿瘤和美白等功效, 去皮取仁是合理的; 另一类成分——香豆素类, 种皮中含量很大但是种仁中基本检测不到, 若要应用千金子抗菌抗炎功效, 应用千金子种仁显然很难达到目的, 建议使用种皮单独入药或全种入药。

### [参考文献]

[1] 中国药典. 一部[S]. 2010:32.

[2] Adolf W, Heeker E. Further new diterpene esters from the irritant and cocarcinogenic seed oil and latex of the caper spurge [J]. Cell Mol Life Sci, 1972, 27 (12):1393.

[3] 宋卫国, 孙付军, 张敏, 等. 千金子和千金子霜及其主要成分泻下作用研究[J]. 中药药理与临床, 2010, 26 (4):40.

[4] Jian-ye Zhang, Chao Zhang, Hu-biao Chen, et al. Assignments of <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C-NMR signals of *Euphorbia* factor L1 and investigation of its anticancer activity *in vitro*[J]. J Med Plants Res, 2010, 4 (4):335.

[5] 房子婷, 付建明, 梁晓军, 等. 千金子美白祛痘霜的制备及疗效观察[J]. 医药世界, 2007(2):105.

[6] 余霞, 张卫明, 孙力军, 等. 千金子不同极性部位对酪氨酸酶活性的影响[J]. 中国野生植物资源, 2011, 30 (2):50.

[7] 伊力哈木·买买提, 凯赛尔·阿不拉. HPLC 测定清热卡森颗粒中的秦皮乙素含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17 (11):81.

[8] 屈爱桃, 孙超, 刘翔宇, 等. HPLC 测定蒙药清热止痛三味汤散中秦皮乙素的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17 (2):87.

[9] 孙国君, 张付玉, 占扎君, 等. 千金子化学成分和药理活性研究进展[J]. 中药材, 2010, 33 (2):308.

[10] 李群, 王琦, 李军, 等. 高效液相色谱法测定千金子中七叶树甙的含量[J]. 中国中药杂志, 1994, 19 (7):403.

[11] 李英霞, 张士国, 付建明, 等. 毒性中药千金子去种皮净制合理性的探讨[J]. 中药材, 2008, 31 (3):344.

[12] 李群. 千金子净制去皮机理研究[J]. 中国现代中药, 2008, 10 (9):36.

[责任编辑 顾雪竹]