

HPLC-ELSD 测定甘遂及其制剂控涎丸中大戟二烯醇的含量

修彦凤^{1,2*}, 施贝¹, 朱程¹

(1. 上海中医药大学中药学院, 上海 201203;

2. 南京中医药大学江苏省中药炮制重点实验室, 南京 210029)

[摘要] 目的: 建立甘遂及其制剂控涎丸中大戟二烯醇的含量测定方法。方法: 色谱柱为 Dikma Diamonsil C₁₈ 柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相甲醇-水 (99:1), 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测器蒸发光散射检测器, 柱温 35 °C。结果: 大戟二烯醇在进样量为 1.04 ~ 20.80 μg ($r = 0.9996$), 进样量的常用对数值与峰面积的常用对数值呈良好的线性关系, 平均回收率 97.53%, RSD 2.56%, 另外对 10 批甘遂饮片和 5 批控涎丸进行了测定。结论: 所建立的方法简单、准确、重复性好, 可用于测定甘遂及其制剂控涎丸中大戟二烯醇的含量。

[关键词] 高效液相色谱-蒸发光散射; 大戟二烯醇; 甘遂饮片; 控涎丸; 含量测定

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2010)11-0061-03

Determination of Euphol in Slices of *Euphorbia kansui* and Kongxian Pills by HPLC-ELSD

XIU Yan-feng^{1,2*}, SHI Bei¹, ZHU Cheng¹

(1. College of Traditional Chinese Materia Medica, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China;

2. Key Laboratory of Processing Traditional Chinese Material Media Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a HPLC method for the content determination of euphol in slices of *E. kansui* and its preparation Kongxian Pills. **Method:** HPLC-ELSD was carried out on a Dikma Diamonsil C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) with methanol-water (99:1) as the mobile phase, the flow rate was 1.0 mL·min⁻¹, and the detector was evaporative light-scattering detector (ELSD). The column temperature was set at 35 °C. **Result:** The calibration curve was linear in the range of 1.04-20.80 μg ($r = 0.9996$), the average recovery was 97.53% with RSD of 2.56%. The content of euphol in ten batches of slices of *E. kansui* and five batches of Kongxian Pills were determined. **Conclusion:** The method is simple, accurate and reproducible, and it can be used to determine the content of euphol in slices of *E. kansui* and Kongxian Pills.

[Key words] HPLC-ELSD; euphol; slices of *Euphorbia kansui*; Kongxian Pills; content determination

甘遂在临床上多用于肝硬化腹水、胸腔积液、水

肿及二便不利等症。生品仅限外用,内服必须炮制。以甘遂作为主药的常用方剂有控涎丸、十枣汤、甘遂散和甘遂半夏汤等。其代表性制剂控涎丸,收载于 2005 年版《中国药典》,由甘遂(醋制)、红大戟、白芥子组成。功效为涤痰逐饮。用于痰涎水饮停于胸膈,胸肋隐痛,咳喘痛甚,痰不易出,瘰疬,痰核。《中国药典》中对甘遂和控涎丸的质量控制主要是显微鉴别,近年来对于甘遂和控涎丸的质量控制方面的

[收稿日期] 20100423(001)

[基金项目] 上海市教委重点学科资助 (J50302); 江苏省中药炮制重点实验室开放课题资助 (ZYPZ003)

[通讯作者] * 修彦凤, 博士, 副教授, 主要从事中药炮制及制剂研究, Tel: 021-51322197, E-mail: xiuyf@ yahoo.com.cn

研究报告较少,只见有学者采用 HPLC-UV 的方法测定了甘遂药材中大戟二烯醇和表大戟二烯醇的含量^[1]。目前对于以甘遂为主药的制剂工艺的研究几乎停滞不前,其关键问题在于甘遂没有明确的质量控制指标。课题组前期研究表明大戟二烯醇在甘遂中含量较高^[2],能显著的抑制 12-O-十四(烷)酰大戟二萜醇-13-乙酸酯诱导的小鼠皮肤致癌作用^[3]。大戟二烯醇为三萜类化合物,结构中含有 2 个孤立的双键,在紫外波长下只有末端吸收,故本文采用蒸发光散射检测器对其进行检测,为甘遂及以甘遂为主药的制剂进行开发研究奠定基础。

1 材料

Agilent 1100 高效液相色谱仪; Alltech ELSD 3300 型蒸发光散射器。

甲醇为分析纯和色谱纯;水为重蒸水;10 批甘遂饮片为市场购买,生甘遂用 S 表示,经上海中医药大学李惠讲师鉴定为大戟科植物甘遂 *Euphorbia kansui* T. N. Liou ex T. P. Wang 的干燥块根;制甘遂用 Z 表示,具体来源见表 1。5 批控涎丸为按照 2005 年版《中国药典》自制^[4],用 K 表示;大戟二烯醇(自制,纯度 >98%)^[2]。

2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适用性试验 Dikma Diamonsil C₁₈柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm);蒸发光散射检测器;蒸发温度 110 °C,雾化温度 80 °C,气体流速 1.5 L·min⁻¹;柱温 35 °C;进样量 20 μL;流动相 甲醇-水(99:1);流速 1.0 mL·min⁻¹;理论塔板数按大戟二烯醇计算不低于 5 000。

2.2 对照品溶液的制备 取大戟二烯醇对照品适量,精密称定,加甲醇溶解,制备 1.04 g·L⁻¹的大戟二烯醇对照品溶液,即得。

2.3 供试品溶液的制备 将各批甘遂饮片和控涎丸粉碎,称取甘遂细粉约 2 g、控涎丸细粉约 6 g,精密称定,置磨口具塞锥形瓶中,加入甲醇,超声 2 次(25, 25 mL),每次 15 min,滤过,合并滤液,回收溶剂后,残渣加甲醇定容至 10 mL,即得。每个样品平行制备 3 份供试液。

2.4 方法学考察

2.4.1 线性关系考察 精密移取大戟二烯醇对照品溶液,加甲醇稀释,配制质量浓度分别为 0.052, 0.104, 0.312, 0.624, 0.832, 1.04 g·L⁻¹的对照品溶液,进样 20 μL,进行高效液相分析。以进样量的常

用对数值(X)为横坐标,峰面积的常用对数值(Y)为纵坐标绘制标准曲线,回归方程为 $Y = 1.471 0X + 2.084 3$, $r = 0.999 6$,大戟二烯醇在进样量为 1.04 ~ 20.80 μg 进样量的常用对数值与峰面积的常用对数值呈良好的线性关系。

2.4.2 精密度试验 取同一浓度的大戟二烯醇溶液,按照 2.1 项下色谱条件连续测定 5 次,色谱峰面积的 RSD 1.88%,表明精密度良好。

2.4.3 稳定性试验 取控涎丸样品 K1 供试品溶液,分别于 0, 2, 4, 8, 12 和 24 h 进样分析,记录峰面积, RSD 2.71%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.4.4 重复性试验 称取控涎丸样品 K1 5 份,精密称定,按照 2.3 项下方法制备供试品溶液进样分析,记录峰面积,采用随行标准曲线的对数回归方程计算大戟二烯醇的含量,平均含量为 0.871 2 mg·g⁻¹, RSD 2.21%,表明重复性良好。

2.4.5 加样回收率试验 称取已知大戟二烯醇含量的控涎丸样品 K1 5 份,各约 2 g,精密称定,分别加入对照品 1.8 mg,按照 2.3 项下方法制备供试品溶液进行分析,记录峰面积,采用随行标准曲线的对数回归方程计算大戟二烯醇的含量,测得平均回收率为 97.53%, RSD 为 2.56%。

2.5 样品含量测定 取 2.3 项下供试品溶液,经 0.45 μm 的微孔滤膜滤过,滤液注入液相色谱仪,按照 2.1 项下色谱条件测定峰面积,色谱图见图 1。采用随行标准曲线的对数回归方程计算大戟二烯醇的含量,结果见表 1。

表 1 大戟二烯醇的含量测定(n=3) mg·g⁻¹

No.	来源	含量
S1	上海	2.798 8
S2	安徽亳州	2.848 6
S3	河北安国	1.517 4
S4	四川	4.700 8
S5	河北安国	2.548 3
Z1	上海	4.507 5
Z2	北京	1.656 1
Z3	江苏南京	2.380 6
Z4	山东济南	4.304 1
Z5	河北安国	1.495 2
K1	自制	0.871 2
K2	自制	0.911 7
K3	自制	0.911 1
K4	自制	0.975 6
K5	自制	1.006 1

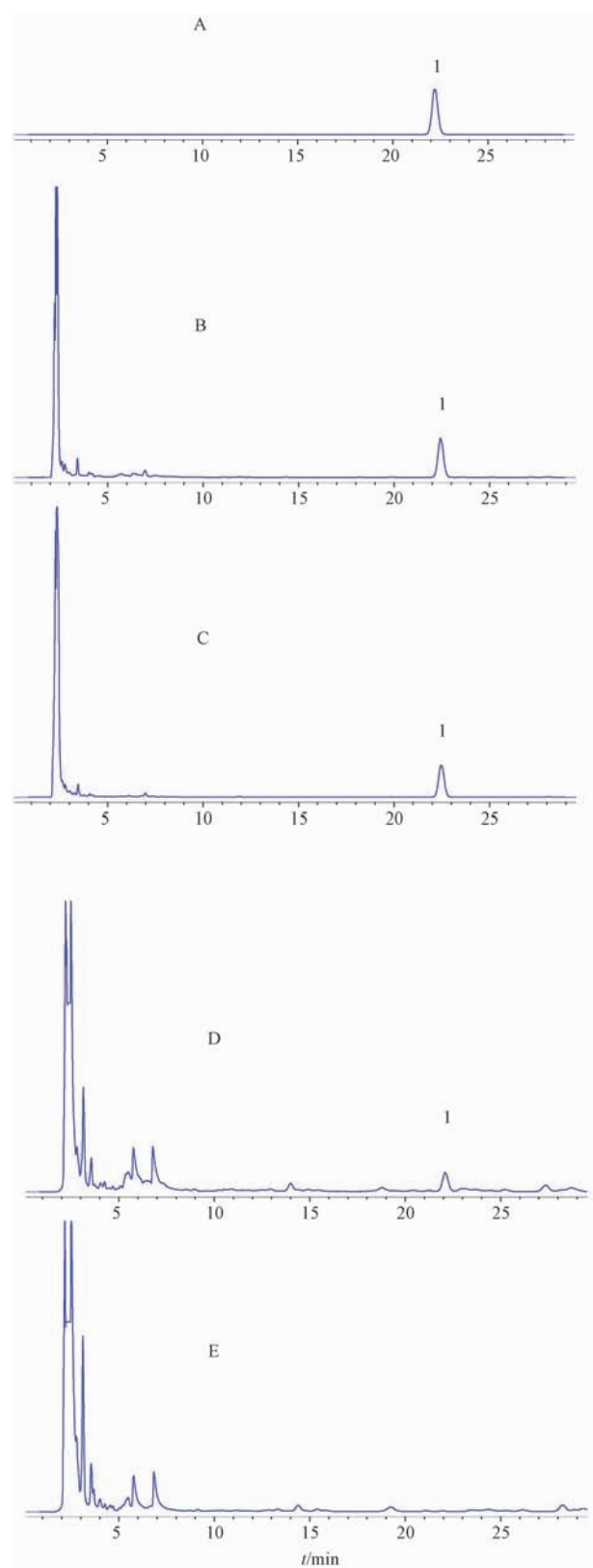


图 1 大戟二烯醇对照品和甘遂及控涎丸的 HPLC
A. 对照品; B. 生甘遂; C. 制甘遂; D. 控涎丸;
E. 阴性对照(控涎丸缺甘遂); 1. 大戟二烯醇

3 讨论

由于缺乏甘遂及其制剂的内在质量控制指标,限制了对甘遂的进一步开发研究。课题组以前期研究分离得到的甘遂中含量较高的大戟二烯醇为指标,建立了甘遂及其制剂控涎丸中大戟二烯醇的含量测定方法,为进一步对甘遂及其制剂开展研究奠定基础。

研究过程中曾比较了超声、回流和冷浸的提取方法,结果表明,以甲醇为溶剂超声和回流提取所得成分含量较高,两者相差不大,超声提取的方法所需时间较短,且操作简单;另对超声次数和时间进行了比较,发现超声 2 次就可以提取 98% 的成分,每次超声时间超过 15 min 所提取的成分含量相差不大,所以供试品溶液是以甲醇为溶剂超声 2 次的方法提取制备的。

通过测定各批甘遂饮片中指标成分大戟二烯醇的含量,发现不同产地的生甘遂和制甘遂中该指标成分的含量差别较大,生甘遂和制甘遂中大戟二烯醇的含量分别在 $1.5174 \sim 4.7008 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 和 $1.4952 \sim 4.5075 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 所以有必要对甘遂饮片的指标成分进行含量控制,以保证为临床提供质量稳定的饮片。

实验过程中对控涎丸与控涎丸中缺甘遂的阴性对照图谱进行了比较,阴性样品无干扰,控涎丸中大戟二烯醇来自于甘遂,本方法可以用于进一步开展控涎丸的开发研究。

[参考文献]

- [1] 程显隆,肖新月,李广华,等. 甘遂中大戟二烯醇和表大戟二烯醇的含量测定[J]. 药物分析杂志,2009,29(9):1444.
- [2] 修彦凤,施贝,王海颖,等. 甘遂炮制前后量变成分的初步研究[J]. 上海中医药大学学报,2009,23(1):67.
- [3] Yasukawa K, Akihisa T, Yoshida Z, et al. Inhibitory effects of euphol, a triterpene alcohol from the roots of *Euphorbia kansui*, on tumor promotion by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate in two-stage carcinogenesis in mouse skin[J]. J Pharm Pharmacol, 2000,52(1):119.
- [4] 中国药典. 一部[S]. 2005:595.

[责任编辑 顾雪竹]