

· 中药工业 ·

双波长 HPLC 同时测定八角莲中 4'-去甲基鬼臼毒素 鬼臼毒素 槲皮素 山柰素的含量

钟水生*, 顾炳仁, 周坚, 张华锋, 王亚琼, 郝刚

(苏州市药品检验检测研究中心, 江苏 苏州 215100)

[摘要] 目的: 建立同时测定八角莲中木脂素类成分 4'-去甲基鬼臼毒素、鬼臼毒素和黄酮类成分槲皮素、山柰素含量的方法。方法: 采用 Dikma C₁₈ plus (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱; 流动相为甲醇-0.1% 磷酸水溶液 (50:50); 流速为 1 mL·min⁻¹; 检测波长分别为 290、360 nm。结果: 4'-去甲基鬼臼毒素、鬼臼毒素、槲皮素、山柰素分别在进样量 0.294 4 ~ 3.680、0.961 6 ~ 12.020、0.086 3 ~ 1.079 3、0.102 3 ~ 1.279 μg 与峰面积呈现良好的线性关系; 4 个成分各个水平的方法回收率 (n=9) 均在 97.1 ~ 102.1%。结论: 该方法简便、准确, 重复性良好, 适用于八角莲中 4'-去甲基鬼臼毒素、鬼臼毒素、槲皮素、山柰素 4 种成分的同时测定, 能为八角莲药材和饮片的质量控制和临床应用提供依据。

[关键词] 八角莲; 鬼臼毒素; 4'-去甲基鬼臼毒素; 槲皮素; 山柰素; 双波长 HPLC

Simultaneous Determination of 4'-Demethylpodophyotoxin, Podophyllotoxin, Quercetin and Kaempferide in *Dysosma Pleianthae Radix et Rhizoma* by Dual-wavelength HPLC

ZHONG Shui-sheng*, GU Bing-ren, ZHOU Jian, ZHANG Hua-feng, WANG Ya-qiong, HAO gang

(Suzhou Institute for Drug Control, Suzhou Jiangsu 215100, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a dual-wavelength HPLC method for simultaneous determination of 4'-demethylpodophyotoxin, odophyllotoxin, quercetin and kaempferide in *Dysosma Pleianthae Radix et Rhizoma*. **Methods:** A Dikma C₁₈ plus column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) was adopted, the mobile phase was a mixture of methanol and 0.1% phosphate acid solution (50:50) at a flow rate of 1 mL·min⁻¹. **Result:** Good linearities were observed within the scope of 0.294 4 ~ 3.68 μg for 4'-demethylpodophyotoxin, 0.961 6 ~ 12.02 μg for podophyllotoxin, 0.086 34 ~ 1.079 3 μg for quercetin and 0.102 3 ~ 1.279 μg for kaempferide, respectively. The recoveries for the four components at each level were all in the range between 97.1 ~ 102.1%. **Conclusion:** The method was validated to be simple, accurate and robust, and applicable for the simultaneous measurement of the four components, thus provide basis for the quality control of *Dysosma Pleianthae Radix et Rhizoma*.

[Keywords] *Dysosma Pleianthae Radix et Rhizoma*; podophyllotoxin; 4'-demethylpodophyotoxin; quercetin; kaempferide; dual-wavelength HPLC

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.20180624002

八角莲为小檗科植物八角莲 *Dysosma versipellis* (Hance) M. Cheng ex Ying 或六角莲 *Dysosma pleiantha* (Hance) Woods. 等八角莲属多种植物的根或根茎, 别名鬼臼, 是我国传统的民间常用药之一, 其已被多个地方中药材标准所收载, 其中江苏省中药材标准 (2016 年版) 收载的八角莲为植物六角莲 *Dysosma pleiantha* (Hance) Woods 的干燥根及根茎。具有清热解毒、化痰散结、祛瘀消肿等功能。常用于痈肿

疗疮、凉痈、咽喉肿痛、跌打损伤、毒蛇咬伤等^[1]。现代药理研究表明, 八角莲还具有抗肿瘤、抗菌、抗病毒和抗蛇毒等作用^[2]。现有文献对八角莲中的化学成分进行了研究报道^[3], 八角莲中的化学成分主要为两类, 一类为木脂素类, 其中以鬼臼毒素和 4'-去甲基鬼臼毒素为代表, 另一类成分为黄酮类成分, 以槲皮素和山柰素为代表。药理研究表明, 鬼臼毒素、4'-去甲基鬼臼毒素具有抗肿瘤作用, 并展

* [通信作者] 钟水生, 主管中药师, 研究方向: 仪器分析及药品质量控制; Tel: (0512) 68223525, E-mail: cpu-zhongshuisheng@163.com

现出较强的抑制 P388 淋巴白血病细胞的作用^[4], 而黄酮类成分槲皮素也被报道具有抗肿瘤、抗氧化、抗血栓、抗糖尿病及保护心血管和止泻等方面的药理作用^[5]。

当前, 对八角莲中木脂素类成分或黄酮类成分的测定均有报道^[6-14], 但大多局限于单一类别有效成分的测定^[6-9]。徐怡等^[11]测定了八角莲中槲皮素、山柰素和鬼臼毒素的含量, 但其采用的检测波长为鬼臼毒素的最大吸收波长 290 nm, 这一定程度上限制了八角莲中低含量的黄酮类成分的检测灵敏度。相关研究^[12-14]分别采用高效液相色谱-二极管阵列-电化学联用技术或超高效液相色谱-串联质谱法(UPLC-MS/MS)测定了八角莲中活性成分含量, 相较于高效液相色谱-紫外检测法(HPLC-UV), 该法并不适用于在众多实验室的普及。为增加灵敏度, 并改善八角莲中多组分质量控制方法的普及性, 本实验以植物六角莲来源的八角莲药材为研究对象, 探索了采用 HPLC 双波长法, 对八角莲中木脂素类代表成分鬼臼毒素、4'-去甲基鬼臼毒素和黄酮类代表成分山柰素、槲皮素进行同时测定。经验证, 该方法简便、灵敏度高、重复性良好, 适用于八角莲中活性成分的同时测定, 从而为完善八角莲的质量标准及临床应用提供参考。

1 仪器和试剂

1.1 仪器

Waters 2698 型高效液相色谱仪, 包括四元梯度泵、自动进样器、柱温箱、PDA 紫外检测器及 Empower 工作站。

1.2 试剂

对照品鬼臼毒素(批号: 200602, 纯度 100%)、4'-去甲基鬼臼毒素(批号: 200901, 纯度: 100%)、槲皮素(批号: 201310, 纯度: 93.2%)、山柰素(批号: 201408, 纯度: 99.1%)均购自中国食品药品检定研究院; 甲醇为色谱纯; 水为超纯水; 其他试剂均为分析纯。

八角莲由苏州市药品检验检测研究中心中药室张华锋主任鉴定为六角莲 *Dysosma pleiantha* (Hance) Woods 的干燥根及根茎。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

DIKMA C₁₈ Plus 色谱柱(250 mm × 4.6 mm,

5 μm); 流动相为甲醇-0.1% 磷酸(50:50); 检测波长为 290 nm(鬼臼毒素、4'-去甲基鬼臼毒素)和 360 nm(槲皮素、山柰素); 柱温为 35 °C; 流速为 1 mL·min⁻¹。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 分别取 4'-去甲基鬼臼毒素、鬼臼毒素、槲皮素、山柰素对照品适量, 精密称定, 加甲醇制成每 1 mL 各含 0.5、0.5、0.05、0.05 mg 的混合溶液, 即得。

2.2.2 供试品溶液的制备 取八角莲粉末 0.5 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 40% 乙醇 25 mL, 密塞, 称定重量, 水浴回流 1 h, 放冷, 再称定重量, 以 40% 乙醇补足减失的重量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.3 专属性

取 2.2.1、2.2.2 项下的溶液适量, 按 2.1 项下色谱条件进行测定, 结果如图 1。各色谱峰之间分离良好, 相互之间不存在干扰。

2.4 线性关系考察

取 4'-去甲基鬼臼毒素、鬼臼毒素、槲皮素和山柰素对照品适量, 精密称定, 加甲醇制成质量浓度分别为 147.20、480.80、43.17、51.14 μg·mL⁻¹ 的混合对照品溶液。分别精密吸取对照品溶液 2、5、8、10、15、20、25 μL, 注入液相色谱仪, 按 2.1 项下色谱条件进行测定, 以各对照品进样量为横坐标(X , μg), 峰面积为纵坐标(Y), 绘制标准曲线并进行回归计算, 得回归方程, 4'-去甲基鬼臼毒素: $Y = 6.4646 \times 10^5 X - 250.5$, $r = 0.9994$; 鬼臼毒素: $Y = 5.9987 \times 10^5 X - 509.6$, $r = 0.9993$; 槲皮素: $Y = 4.0123 \times 10^6 X - 526.3$, $r = 0.9993$; 山柰素: $Y = 4.2531 \times 10^6 X - 624.5$, $r = 0.9992$ 。

结果表明, 4'-去甲基鬼臼毒素、鬼臼毒素、槲皮素、山柰素分别在进样量 0.2944 ~ 3.68、0.9616 ~ 12.02、0.0863 ~ 1.0793、0.1023 ~ 1.279 μg 与峰面积呈现良好的线性关系。

2.5 精密度试验

精密吸取 2.2.1 项下的混合对照品溶液 10 μL, 按 2.1 项下色谱条件进行实验, 连续进样 6 次, 结果 4 个组分的 RSD 在 0.5 ~ 0.7%, 均小于 2%, 表明精密度良好。

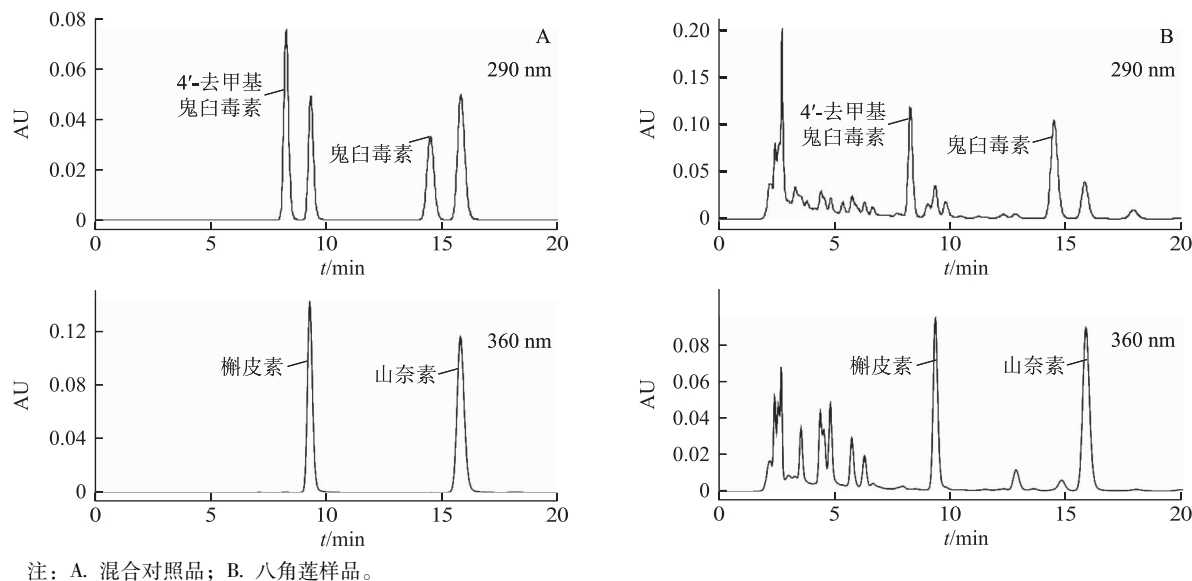


图 1 混合对照品和八角莲样品分别在 290 nm 和 360 nm 下的色谱图

2.6 重复性试验

取批号为 20150817 的八角莲样品 6 份，按 2.2.2 项下操作制得供试品溶液，并进行 HPLC 分析，计算所测 4 个组分的各自含量及 RSD，结果所测组分的 RSD 分别为 1.4%、0.9%、1.5%、1.6%。

2.7 稳定性试验

取批号为 20150817 的八角莲样品 3 份，按 2.2.2 项下操作制得供试品溶液，于室温下放置，分别在 0、2、4、8、12、24 h 各进样一次，考察 4 种组分各自峰面积的一致性，结果表明，各组分

的峰面积的相对标准偏差较小，表明样品溶液在 24 h 内稳定。

2.8 加样回收率试验

精密称取已知含量的批号为 20150817 的八角莲样品(含 4'-去甲基鬼臼毒素为 11.26 mg·g⁻¹、鬼臼毒素为 16.9 mg·g⁻¹、槲皮素为 1.76 mg·g⁻¹，山柰素为 2.40 mg·g⁻¹)9 份，每 3 份为一组(高、中、低)，每份 0.25 g，各组中分别精密加入一定量的混合对照品溶液，混匀，挥干，按 2.2.2 项下操作，在 2.1 项下色谱条件进行分析，结果见表 1。

表 1 4 个组分的回收率测定结果(n=9)

组分	称样量/g	药材含量/mg	对照加入量/mg	测得量/mg	回收率 (%)	平均值 (%)	RSD (%)
4'-去甲基鬼臼毒素	0.251 2	2.829 0	2.441 0	5.233 0	98.5	99.3	1.6
	0.248 9	2.803 0	3.051 0	5.799 0	98.2		
	0.248 1	2.794 0	3.661 0	6.495 0	101.1		
鬼臼毒素	0.251 2	4.245 0	3.561 0	7.813 0	100.2	99.5	0.7
	0.248 9	4.206 0	4.451 0	8.609 0	98.9		
	0.248 1	4.193 0	5.341 0	9.497 0	99.3		
槲皮素	0.251 2	0.442 1	0.322 6	0.759 8	98.5	99.9	1.5
	0.248 9	0.438 1	0.403 2	0.840 5	99.8		
	0.248 1	0.436 7	0.483 8	0.927 3	101.4		
山柰素	0.251 2	0.602 9	0.521 0	1.127 0	100.7	99.5	1.2
	0.248 9	0.597 4	0.651 2	1.246 0	99.6		
	0.248 1	0.595 4	0.781 4	1.364 0	98.3		

2.9 样品测定

取4批八角莲样品,按2.2.2项下操作,制备样品溶液,按2.1项下色谱条件进行分析,并采用外标法计算4个组分各自的含量,结果见表2

表2 八角莲样品中4个组分含量的测定结果
mg·g⁻¹

样品	含量			
	4'-去甲鬼臼毒素	鬼臼毒素	槲皮素	山柰素
批次1	12.08	19.70	1.57	2.36
批次2	11.26	16.90	1.76	2.40
批次3	11.21	19.37	1.52	2.18
批次4	5.08	31.53	2.31	2.43

3 讨论

3.1 检测波长的选择

对4'-去甲鬼臼毒素、鬼臼毒素、槲皮素和山柰素各自的对照品溶液分别进行紫外全扫描分析,结果显示4'-去甲鬼臼毒素、鬼臼毒素的最大吸收波长在290 nm左右,而槲皮素、山柰素的最大吸收波长在360 nm左右。故初选290 nm和360 nm两个波长分别作为木脂素类成分和黄酮类成分的检测波长。取八角莲供试品溶液,按初选波长在甲醇-0.1%磷酸溶液(50:50)流动相条件下进行HPLC分析。结果290 nm的色谱图显示,在槲皮素的色谱峰位置处不光有槲皮素的色谱峰,也有一小未知峰,且未能实现基线分离,呈现肩峰,但在360 nm检测波长时,槲皮素的色谱峰位处的峰形尖锐,未出现肩峰。后期进一步调试流动相比例,以使干扰峰与色谱峰达到分离,但分离后,样品分析时间显著延长,而对分离出的未知峰进行全扫描分析发现,该未知峰在360 nm处并无吸收,说明该未知共有峰在360 nm下并不影响槲皮素的定量,为缩短分析时间,故最终仍选用甲醇-0.1%磷酸溶液(50:50)作为八角莲中4个组分同时测定的流动相,此流动相既保证了未知共有峰不干扰定量的准确性,又缩短了分析时间,增大了分析通量。

3.2 样品制备方法的优化

实验中分别考察了甲醇、乙醇、甲醇水溶液、乙醇水溶液作为提取溶剂,超声处理和回流提取两种提取方式对各组分提取的影响,结果显示,超声处理和

回流提取对木脂素类成分的提取回收率影响不大,简单的超声处理就能使木脂素类物质提取完全。而对于黄酮类成分,采用简单的超声处理难以使它们提取完全,需采用相对剧烈的回流提取方式。经过多次实验,最终发现40%乙醇溶液的回流提取1 h能保证4个成分均能提取完全。故最终确定以40%乙醇为溶剂,回流提取1 h作为八角莲的预处理方法。

参考文献

- [1] 江苏省食品药品监督管理局. 江苏省中药材标准[M]. 江苏:江苏凤凰科学技术出版社,2016.
- [2] 卢军. 八角莲的药理及临床应用[J]. 现代医药卫生, 2009,25(23):3608-3609.
- [3] 姜飞,田海妍,张建龙,等. 八角莲的化学成分研究[J]. 中草药,2011,42(4):634-639.
- [4] 战凤娇,杨尚军,白少岩. 鬼臼毒素及其衍生物的波谱特征及药理活性[J]. 齐鲁药事,2012,31(1):33-36.
- [5] 舒毅,谭刚,张思宇,等. 槲皮素的药理学研究进展[J]. 华西药学杂志,2008,23(6):689-691.
- [6] 陈黎,涂自良,陈吉炎,等. 高效液相色谱法测定八角莲中鬼臼毒素的含量[J]. 时珍国医国药,2007,18(9):2208-2209.
- [7] 张丽艳,万明香,何顺志,等. HPLC法测定贵州产八角莲属药材中鬼臼毒素的含量[J]. 药物分析杂志,2009,29(2):202-204.
- [8] 雷震,杨光义,叶方,等. UPLC法测定八角莲药材中鬼臼毒素的含量[J]. 中国药师,2013,16(4):548-549.
- [9] 马志刚,郑永雯,冯益青,等. 八角莲不同部位鬼臼毒素和4'-去甲鬼臼毒素含量的测定[J]. 云南民族大学学报(自然科学版),2014,23(5):317-319,330.
- [10] 罗君,张丽艳,万明香,等. RP-HPLC法测定八角莲属植物中槲皮素及山柰酚的含量[J]. 中国中药杂志,2010,35(22):3021-3023.
- [11] 徐怡,邱斌,熊永兴,等. HPLC法测定八角莲中3种活性成分含量的研究[J]. 云南中医中药杂志,2017,38(7):65-67.
- [12] 刘晓星,温普红,郑建斌. 高效液相色谱-二极管阵列-电化学联用技术测定八角莲中3种成分的含量[J]. 药物分析杂志,2007,27(5):631-634.
- [13] 张晨宁,杨光义,魏晋宝,等. UPLC-MS/MS法测定南方山荷叶与八角莲中4种木脂素类成分的含量[J]. 中药材,2015,38(12):2550-2553.
- [14] 王林娜,胡培,杨光义. UPLC-MS/MS法同时测定6种鬼臼木脂素浓度及药动学研究[J]. 湖北医药学院学报,2017,36(5):411-417.

(收稿日期 2018-06-24)