

基于 UPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS 和 UPLC-QqQ-MS 的不同产地八角莲化学成分定性与定量分析

臧世丹¹, 贾春雪¹, 解嘉琪¹, 刘传鑫^{2*}, 黄建梅^{1*}

1. 北京中医药大学 中药学院, 北京 102488

2. 河南科技大学临床医学院, 河南科技大学第一附属医院内分泌代谢中心, 河南省罕见病重点实验室, 洛阳市临床多组学与转化医学重点实验室, 河南 洛阳 471003

摘要: **目的** 建立不同产地八角莲中 6 种有效成分(鬼臼毒素、4'-去甲基鬼臼毒素、去氧鬼臼毒素、去氢鬼臼毒素、鬼臼毒酮、山荷叶素)的定性与化学计量学方法确定的 3 种差异成分(鬼臼毒素、山荷叶素、去氢鬼臼毒素)和鬼臼毒酮的定量分析方法。**方法** 以 0.1% 甲酸水溶液-乙腈为流动相, 梯度洗脱, Waters BEH C₁₈ 柱进行色谱分离, 使用 Q Exactive Orbitrap MS 和电喷雾离子源(ESI)进行正、负离子模式下的质谱扫描分析, 根据标准品质谱数据, 对不同产地八角莲化学成分进行鉴定; 结合主成分分析(PCA)和正交偏最小二乘法-判别分析(OPLS-DA)确定差异性特征成分; 使用 Waters BEH C₁₈ 色谱柱, 以 0.1% 甲酸水-乙腈为流动相进行梯度洗脱, 应用 QqQ MS, 在正离子模式下, 以 MRM 配对离子方式, 同时对不同产地八角莲中有显著性差异的 3 个化学成分以及鬼臼毒酮进行定量测定。**结果** 结合标准品质谱信息, 确定收集自四川产地的八角莲样品不含鬼臼毒酮, 其余 6 个产地的八角莲样品中均鉴定到 6 种有效成分(鬼臼毒素、4'-去甲基鬼臼毒素、去氧鬼臼毒素、去氢鬼臼毒素、鬼臼毒酮、山荷叶素)。PCA 表明, 不同产地的八角莲样品间存在差异。通过 OPLS-DA 项下的变量重要性投影(VIP)分析筛选出鬼臼毒素、山荷叶素、去氢鬼臼毒素可能是影响不同产地八角莲质量差异的标志物。定量结果表明, 4 种化学成分均在 4 min 内出峰且分离良好, 鬼臼毒素、山荷叶素、去氢鬼臼毒素、鬼臼毒酮分别在 1~200、10~1 000、1~1 000、1~1 000 ng·mL⁻¹ 线性关系良好($r>0.996$), 平均加样回收率为 97.3%~102.8%, RSD 均小于 8.3%。7 个产地的 4 种差异成分中, 河南产地的鬼臼毒素含量明显高于其他产地($P<0.01$), 湖南产地的山荷叶素含量明显高于其他产地($P<0.01$), 4'-去甲基鬼臼毒素与去氧鬼臼毒素在各产地中的含量差别较小。**结论** 结合化学计量学建立的快速、准确、灵敏的多指标成分定量方法可有效区分不同产地的八角莲, 为八角莲药材的质量评价与控制提供参考。

关键词: 八角莲; UPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS; UPLC-QqQ-MS; 鬼臼毒素; 去氧鬼臼毒素; 去氢鬼臼毒素; 4'-去甲基鬼臼毒素; 鬼臼毒酮; 山荷叶素

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2025)04-0910-09

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2025.04.012

Identification and quantitative analysis of chemical constituents in *Dysosma versipellis* from different habitats based on UPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS and UPLC-QqQ-MS

ZANG Shidan¹, JIA Chunxue¹, XIE Jiaqi¹, LIU Chuanxin², HUANG Jianmei¹

1. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China

2. Luoyang Key Laboratory of Clinical Multiomics and Translational Medicine, Henan Key Laboratory of Rare Diseases, Endocrinology and Metabolism Center, The First Affiliated Hospital, and College of Clinical Medicine of Henan University of Science and Technology, Luoyang 471003 China

Abstract: Objective To establish a qualitative and quantitative analysis method for six active components (podophyllotoxin 4'-demethylpodophyllotoxin, deoxypodophyllotoxin, dehydropodophyllotoxin, podophyllotoxin, and diphyllin) in *Dysosma versipellis*

收稿日期: 2024-09-02

基金项目: 国家自然科学基金项目青年科学基金项目(82204938); 河南省医学科技攻关计划联合共建项目(LHGJ20240427)

作者简介: 臧世丹, 女, 硕士研究生, 主要从事药物分析和神经药理学研究。E-mail: zangshidan0313@163.com

*通信作者: 刘传鑫, 男, 博士, 主管药师, 硕士生导师, 主要从事体质毒理学与个体化药学监护研究。E-mail: 15222003775@163.com

黄建梅, 女, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事中药有效成分和体内过程分析研究。E-mail: huangjm@bucm.edu.cn

from different habitats, and to determine three differential components (podophyllotoxin, hyperin and dehydropodophyllotoxin) and podophyllotoxin by chemometrics. **Methods** The qualitative analysis of the chemical components of *D. versipellis* from different habitats was performed using Q Exactive Orbitrap MS and electrospray ionization (ESI) in positive and negative ion modes, and components were identified based on the standard mass spectrometry data. Principal component analysis (PCA) and orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA) were combined to determine the differential characteristic components. Quantitative analysis of three chemical components with significant differences and podophyllotoxin in *D. versipellis* from different habitats was performed using QqQ MS in the positive ion mode with MRM paired ion mode. **Results** Combined with the standard mass spectrometry, it was determined that the samples from Sichuan did not contain podophyllotoxin, and six kinds of pharmacodynamic components were identified in the samples of other six habitats. PCA showed that there were differences among the samples of *D. versipellis* from different habitats. Through the VIP analysis the OPLS-DA, it was screened out that podophyllotoxin, diphyltin, and dehydropodophyllotoxin might be the markers affecting the quality difference of *D. versipellis* from different habitats. The quantitative results showed that the four components eluted within 4 min and were well separated. Podophyllotoxin, diphyltin, dehydropodophyllotoxin, and podophyllxin had a good linear relationship in the range of 1–200, 10–1 000, 1–1 000, and 1–1 000 ng·mL⁻¹, respectively ($r > 0.996$), and the average spiking recovery rate was 97.3%–102.8%, and RSD was less than 8.3%. Among the four differential components in the seven habitats, the content of podophyllotoxin in the samples from Henan was significantly higher than that in other habitats ($P < 0.01$), and the content of diphyltin in the samples from Hunan was significantly higher than that in other habitats ($P < 0.01$). The content differences of 4'-demethylpodophyllotoxin and deoxypodophyllotoxin in each producing area were small. **Conclusion** The rapid, accurate, and sensitive multi-index component quantification method established by combining stoichiometry can effectively distinguish the *D. versipellis* from different habitats and provides a reference for the quality evaluation and control of the *D. versipellis* medicinal materials.

Key words: *Dysosma versipellis*; UPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS; UPLC-QqQ-MS; podophyllotoxin; deoxypodophyllotoxin; dehydropodophyllotoxin; 4'-demethylpodophyllotoxin; podophyllotoxin; diphyltin

八角莲 *Dysosma versipellis* 为小檗科 Berberidaceae 鬼臼属植物, 别名金魁莲、旱八角、叶下花、马眼莲、独叶一枝花、八角盘、独脚莲、八角金盘等, 为我国特有的药用植物^[1-2]。八角莲在《神农本草经》《本草纲目》等中均有记载, 根和根茎入药, 具有祛痰、解毒、祛瘀、祛疔等功效, 主要治疗咳嗽、喉咙痛、瘰癧、无名肿胀毒液、蛇咬伤、跌倒伤和风湿性关节痛^[3]。其分布在海拔 300~1 550 m 山区, 于湖北、湖南、河北、四川、江西、安徽、浙江、广东、广西、云南、贵州、山西、河南诸省均有分布。

据文献报道, 小檗科鬼臼属的主要化学成分为鬼臼毒素等芳基四氢萘类、木脂素类、黄酮类、醌类和氨基酸等^[4-6]。八角莲性凉, 味甘、微苦, 有小毒。具有清热解毒、活血散瘀的功能^[7]。现代药理研究表明, 鬼臼毒素等芳基四氢萘类木脂素, 具有抗肿瘤、抗病毒、抗菌抗炎等药理作用^[8-14], 是合成依托泊苷、长春新碱等抗癌药物的原料。鬼臼毒素类化合物的作用靶标为 α -微管蛋白, 作用位点与秋水仙碱相同, 通过抑制微管蛋白聚合, 影响纺锤体的形成, 从而使细胞的有丝分裂停止^[15-17]。然而, 鬼臼毒素对正常细胞的微管蛋白亦有毒性, 因此这

类化合物具有强烈的不良反应, 如恶心、呕吐、腹泻及对肝脏和神经系统损伤等^[18-19]。

中药不良事件的发生源于多因致毒, 综合来说, 因素有二: 其一是未辨识机体因素, 用药过程忽视体质禁忌和病证禁忌, 易导致患者误用滥用, 进而导致严重不良反应; 其二是中药固有因素, 即中药本身固有复杂性的复杂性^[3, 20-28]及用药不当, 包括未经炮制减毒和配伍减毒、过量用药、长期用药等^[29]都会使患者暴露在较高的毒性风险之下。虽然八角莲在抗肿瘤、抗病毒、抗菌等方面作用显著, 但由于其毒性较强, 限制了其在临床中的广泛应用, 在实际使用过程中, 应尽量避免因其毒性给人体带来的不良反应。

本研究建立浙江、安徽、湖南、云南、四川、湖北及河南 7 个产地的八角莲中 6 种化学成分 (鬼臼毒素、4'-去甲基鬼臼毒素、去氧鬼臼毒素、去氢鬼臼毒素、鬼臼毒酮、山荷叶素) 的定性分析与其中 4 种差异性化合物 (鬼臼苦素、山荷叶素、去氢鬼臼毒素、鬼臼毒酮) 的定量分析方法, 为准确测定八角莲中的化学成分提供科学依据, 为进一步探索八角莲的药效或毒性成分的药动力学、毒理学等研究奠定基础。

1 仪器与材料

1.1 仪器

UPLC-Q-Exactive-Orbitrap/MS 液质联用仪器、Vanquish 超高效液相色谱系统, 美国赛默飞世尔科技有限公司; UPLC-Xevo TQ-S micro 型三重四极杆液质联用液相色谱仪、Masslynx 4.1 质谱工作站, 美国 Waters 公司; TGL-16aR 型超高速低温冷冻离心机, 上海安亭科学仪器厂; HH-S4A 型电热恒温水浴锅, 北京科伟永兴仪器有限公司; ME155DU 型电子天平, 上海梅特勒-托利多仪器有限公司; KQ-300DB 型数控超声波清洗器, 昆山市超声仪器有限公司; M375-XH-T 型自动涡旋振荡器, 北京东方化玻科技有限公司; 移液器, 德国 Eppendorf 公司。

1.2 材料

实验用 7 个产地每个产地 6 份八角莲药材, 均采购于亳州市秒善堂药业有限公司。产地安徽, 批号 20230906; 产地河南, 批号 20230918; 产地湖北, 批号 20221102; 产地湖南, 批号 20221104; 产地四川, 批号 20231027; 产地云南, 批号 20230825; 产地浙江, 批号 20221010。药材经北京中医药大学杨瑶珺教授鉴定为小檗科植物八角莲 *D. versipellis* (Hance) M. cheng 的根状茎。

对照品鬼臼毒素 (批号 DST210413-032)、去氧鬼臼毒素 (批号 DST231225-665)、4'-去甲基鬼臼毒素 (批号 DSTDQ007701)、去氢鬼臼毒素 (批号 DSTDQ042901)、内标依托泊苷 (批号 DST200522-226) 质量分数均 $\geq 98\%$, 均购自成都乐美天医药科技有限公司; 鬼臼毒酮 (批号 RDD-GO3802210018)、山荷叶素 (批号 RDD-S11502206013) 质量分数均 $\geq 98\%$, 均购自成都瑞芬思德丹生物科技有限公司; 实验用水为屈臣氏蒸馏水, 广州屈臣氏食品饮料有限公司; 甲醇、乙腈、甲酸为质谱级, 赛默飞世尔科技有限公司。

2 方法与结果

2.1 定性分析

2.1.1 分析条件

(1) 色谱条件: 采用 Waters ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 色谱柱 (100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.7 μ m); 流动相: 0.1% 甲酸水溶液 (A) - 乙腈溶液 (B), 梯度洗脱: 0~4 min, 2%~9% B; 4~9 min, 9%~32% B; 9~10 min, 32%~89% B; 10~18 min, 89%~100%

B; 18~19 min, 100%~2% B; 19~20 min, 2% B。柱温 35 $^{\circ}$ C, 进样量 5 μ L, 体积流量 0.3 mL $\cdot$ min⁻¹。

(2) 质谱条件: 采用电喷雾离子源 (ESI), 在正、负离子电离模式下进行质谱检测分析, 扫描模式为全扫描, 扫描范围为 m/z 100~1 200。毛细管温度为 350 $^{\circ}$ C, 正、负离子模式喷雾电压分别为 3 800、3 200 V, 鞘气体积流量 35 arb, 辅助气体体积流量 15 arb, 正、负离子模式碰撞能梯度均为 30、40、50 eV, 包括 1 次分辨率为 70 000 FWHM 的一级全扫描和 1 次分辨率为 17 500 FWHM 的数据依赖的二级扫描, 以此全面、精准获取质谱数据。

2.1.2 溶液的制备

(1) 对照品溶液的制备: 精密称取 6 种对照品各约 5 mg, 用 50% 乙醇配制出 1 mg $\cdot$ mL⁻¹ 对照品储备溶液。精密吸取 6 种对照品储备溶液, 混合稀释, 配制成质量浓度分别为 1 000 ng $\cdot$ mL⁻¹ 的混合对照品溶液。

(2) 供试品溶液的制备: 称取八角莲粉末 30 g, 加入 10 倍量的 50% 乙醇煎煮 1.5 h, 滤过, 残渣再用 8 倍量 50% 乙醇煎煮 1.5 h, 滤过, 合并滤液, 减压浓缩, 再水浴浓缩为八角莲浸膏。用 50% 乙醇将浸膏稀释成质量浓度为 0.1 mg $\cdot$ mL⁻¹ 的供试品溶液备用。

2.1.3 化学成分鉴定 称取 7 个产地的八角莲样品, 按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1.1”项下条件采集数据, 将得到的准分子离子峰、碎片离子、保留时间等关键信息与对照品信息进行分析 and 鉴定。6 种成分的混合对照品在正离子模式下的总离子流图 (TIC) 如图 1 所示。结果表明, 四川产地的八角莲不含鬼臼毒酮, 其他产地药材均包含上述 6 种化学成分, 鉴定结果见表 2。

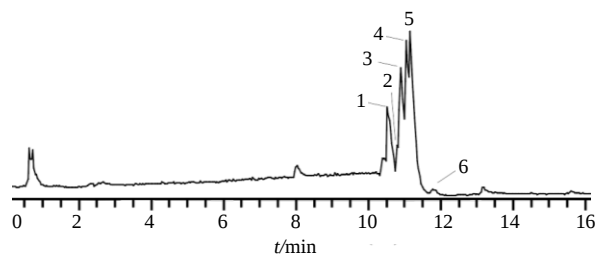


图 1 ESI⁺模式下 6 种混合对照品的总离子流色谱图

Fig. 1 Total ion chromatogram of six mixed controls in ESI⁺ mode

表 2 不同产地八角莲中 6 种化学成分鉴定结果

Table 2 Identification results of six chemical constituents in <i>D.versipellis</i> from different habitats							
编号	化合物名称	离子模式	<i>m/z</i>	碎片离子(<i>m/z</i>)	分子式	<i>t</i> /min	产地
1	4'-甲基鬼臼毒素	[M+H] ⁺	401.123 1	400.113 6、229.049 6	C ₂₁ H ₂₀ O ₈	10.63	1、2、3、4、5、6、7
2	鬼臼毒素	[M+H] ⁺	415.138 7	298.083 3、185.059 7	C ₂₂ H ₂₂ O ₈	10.96	1、2、3、4、5、6、7
3	山荷叶素	[M+H] ⁺	381.096 9	4 351.086 1、181.359 0	C ₂₁ H ₁₆ O ₇	11.09	1、2、3、4、5、6、7
4	去氢鬼臼毒素	[M+H] ⁺	411.107 4	396.083 9、115.054 2	C ₂₂ H ₁₈ O ₈	11.12	1、2、3、4、5、6、7
5	去氧鬼臼毒素	[M+Na] ⁺	421.125 8	381.096 9、181.464 2	C ₂₂ H ₂₂ O ₇	11.22	1、2、3、4、5、6、7
6	鬼臼毒酮	[M+H] ⁺	413.123 1	173.078 4、115.050 3	C ₂₂ H ₂₂ O ₇	11.94	1、2、3、4、6、7

1-安徽; 2-河南; 3-湖北; 4-湖南; 5-四川; 6-云南; 7-浙江。
1-Anhui; 2- Henan; 3-Hubei; 4- Hunan; 5-Sichuan; 6- Yunnan; 7-Zhejiang.

2.2 化学计量分析

利用 abf Converter 1.3 软件, 将 7 个产地八角莲样本的原始质谱数据转换为 abf 格式, 将 abf 格式文件导入 Msdiag Console 3.0 软件, 基于建立的对照品质谱数据库, 得到 7 个产地八角莲药材中的 5 个化学成分(鬼臼毒素、4'-去甲基鬼臼毒素、去氧鬼臼毒素、去氢鬼臼毒素、山荷叶素)的峰面积。

2.2.1 主成分分析 7 个产地八角莲药材的 5 个共有峰面积导入 SIMCA-P 14.1 软件进行 PCA (图 2)。同一产地的 6 个样本点紧密聚集, 表明实验重复性较好, 不同产地间大致可以分成 3 类。河南和湖南产八角莲各自聚为一类, 其余产地八角莲聚为一类。

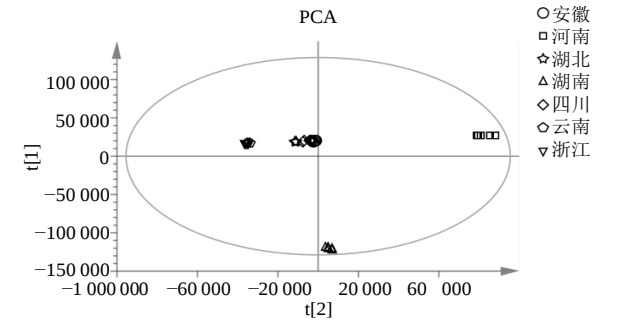


图 2 不同产地八角莲药材的 PCA 得分图
Fig. 2 PCA score plot of *D.versipellis* from different habitats

2.2.2 正交偏最小二乘-判别分析(OPLS-DA) 以峰面积为变量, 采用 SIMCA-P 14.1 软件对八角莲药材进行 OPLS-DA, 得分图见图 3, 与 PCA 相比, 7 个产地的八角莲药材在 OPLS-DA 模型中分类聚集明显。OPLS-DA 是一种有监督的判别分析统计方法, 在该模型中, 模型 R^2_Y (表示 OPLS-DA 模型拟合程度) 达到 0.77, Q^2 (表示该模型预测能力)

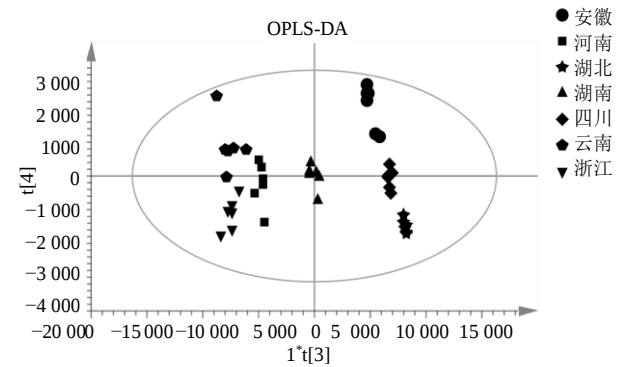


图 3 不同产地八角莲药材的 OPLS-DA 得分图
Fig. 3 OPLS-DA scores of *D.versipellis* from different habitats

达到 0.715。为了进一步验证所建模型的稳定性, 采用置换试验对所建模型进行验证。假设检验在 $n=200$ 时进行, 结果如图 4 所示。该模型具有较好的可预测性, 无过拟合现象结果可靠, 可用于标志物的筛选。

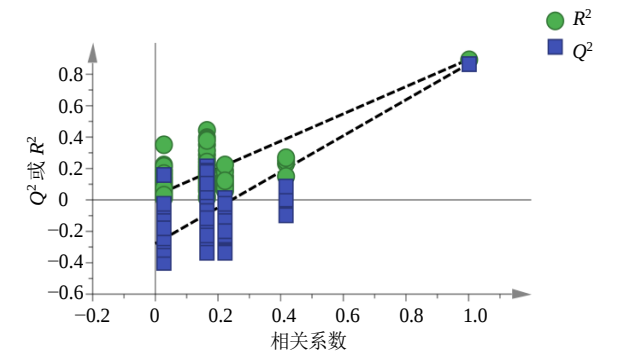


图 4 OPLS-DA 模型置换检验结果
Fig. 4 Permutation test of OPLS-DA model

变量重要性投影(VIP)值是筛选质量差异标志物的重要指标, 对 OPLS-DA 模型中 5 个峰面积进行 VIP 分析, 结果见图 5。对区分 7 个产地八角莲药材的 5 个化学成分的 VIP 值大小进行排列, 以

VIP 值>1 为筛分阈值,共筛选出鬼臼毒素(VIP 值 1.257 2)、山荷叶素(VIP 值 1.044 2)和去氢鬼臼毒素(VIP 值 1.033 3) 3 个差异物,说明以上 3 个化学成分对不同产地八角莲样品分类有显著影响,而 4'-去甲基鬼臼毒素与去氧鬼臼毒素则对八角莲产地的区分影响较小。

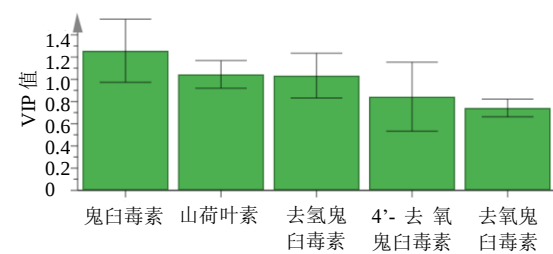


图 5 不同产地八角莲药材 5 个成分的 VIP
Fig. 5 VIP values of 5 common peaks of *D.versipellis* from different habitats

采用 SPSS 20 软件对 3 种差异化合物的峰面积进行两两比较,结果见表 3,在各产地的对比中,若后者与前者的峰面积比值大于 1,即为上调,用↑表示。据此,能直观明晰不同产地中 3 个差异化合物峰面积的大小关系。而由于 4'-去甲基鬼臼毒素和去氧鬼臼毒素不是不同产地八角莲样品分类的显著影响成分,故未对其进行分析。

2.3 定量分析

2.3.1 分析条件

(1) 色谱条件:采用 Waters Acquity UPLC BEH C₁₈ 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm);流动相:0.1%甲酸水(A)-乙腈(B),梯度洗脱:0~1 min, 65%~40% A; 1~3 min, 40%~45% A; 3.0~3.5 min, 45%~65% A; 3.5~4.0 min, 65% A; 体积流量 0.3 mL·min⁻¹,柱温 40 ℃;进样量 5 μL。

(2) 质谱条件:电喷雾离子源(ESI);毛细管电离电压 3.9 kV;离子源温度 150 ℃;脱溶剂气温度为 350 ℃;喷雾气为 650 L·h⁻¹ 的氮气;碰撞气为 0.16 mL·min⁻¹ 氩气;扫描方式为多反应正离子监测模式,质谱参数设定见表 4。

2.3.2 溶液的制备

(1) 对照品溶液以及内标溶液的制备:精密称取 4 种对照品各约 3 mg,用 50%乙醇配制成质量浓度为 1 mg·mL⁻¹ 对照品储备溶液。精密吸取 4 种对照品溶液,混合稀释,配制成质量浓度分别为 1、2、5、10、20、50、100、200、500、800、1 000 ng·mL⁻¹

表 3 差异化合物峰面积比

Table 3 Identification results of differential compounds			
差异化合物	产地	变化趋势	峰面积比
鬼臼毒素	安徽vs河南	↓**	0.374
	安徽vs湖北	↑**	1.199
	安徽vs四川	↑**	1.066
	安徽vs云南	↑**	2.424
	安徽vs浙江	↑**	2.545
	河南vs湖北	↑**	3.205
	河南vs湖南	↑**	3.001
	河南vs四川	↑**	2.849
	河南vs云南	↑**	6.480
	河南vs浙江	↑**	6.802
	湖北vs四川	↓**	0.878
	湖北vs云南	↑**	2.021
	湖北vs浙江	↑**	2.122
	四川vs云南	↑**	2.274
	四川vs浙江	↑**	2.388
山荷叶素	安徽vs湖南	↓**	0.003
	河南vs湖南	↓**	0.005
	湖北vs湖南	↓**	0.004
	湖南vs四川	↑**	324.712
	湖南vs云南	↑**	442.478
去氢鬼臼毒素	湖南vs浙江	↑**	1 495.992
	安徽vs四川	↓***	0.542
	云南vs浙江	↑**	1.338

P<0.01 *P<0.001.

表 4 4 种待测化合物质谱信息

Table 4 Conditions for determination of four compounds by mass spectrometry			
化合物	离子对(m/z)	锥孔电压/V	碰撞电压/V
鬼臼毒素	415.23/246.90	35	10
去氢鬼臼毒素	411.13/362.06	84	24
鬼臼毒酮	413.34/169.08	25	8
山荷叶素	381.10/333.08	65	21
依托泊苷	589.19/247.06	24	16

的混合对照品溶液。精密称定内标依泊托苷约 5 mg,溶于甲醇溶液制成 1 mg·mL⁻¹ 的内标储备液,用 50%乙醇溶液稀释到 1 000 ng·mL⁻¹,作为内标工作液。

(2) 供试品溶液的制备:方法同“2.1.2 (2)”。

2.3.3 专属性考察 取“2.3.2 (1)”项下混合对照品溶液,将 S4 样品,按“2.3.2 (2)”项下方法制备供试品溶液,按“2.3.1”项下方法进样测定,结果见图 6,表明该方法专属性良好。

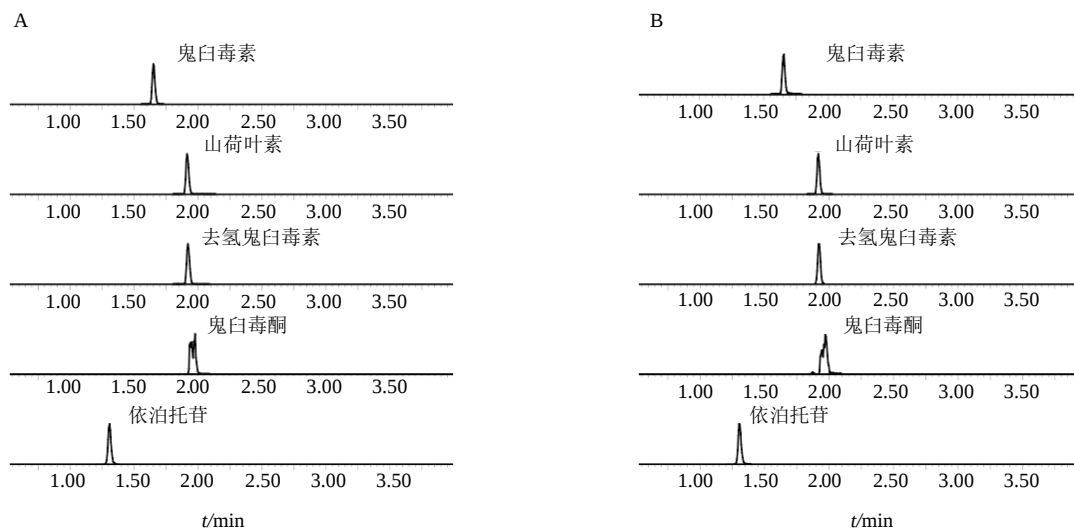


图 6 混合对照品 (A) 和供试品溶液 (B) MRM 色谱图
Fig. 6 MRM chromatogram of reference substance (A) and test solution (B)

2.3.4 线性关系、检测限与定量限考察 取“2.3.2 (1)”项下制备的混合对照品溶液,按照“2.3.1”项下的条件下测定。以对照品质量浓度为横坐标(X),对照品和内标的峰面积比为纵坐标(Y)进行回归分析,绘制标准曲线(≥ 6 个质量浓度点),以信噪比 $S/N=3$ 和 $S/N=10$ 分别计算检测限和定量限。结果见表 5,表明该方法线性关系良好且检测灵敏度高,能够较为精准地对相关化学成分进行

测定。

2.3.5 精密度考察 取“2.3.2 (1)”中的混合对照品溶液,按“2.3.1”项下方法连续测定 6 次,计算 4 种化学成分峰面积与内标物峰面积之比的相对标准偏差(RSD)值,鬼臼毒素、山荷叶素、去氢鬼臼毒素、鬼臼毒酮与依泊托昔峰面积比的 RSD 值分别是 1.02%、3.64%、1.63%和 7.07%,表明仪器精密度良好。

表 5 4 种化合物的线性关系考察结果

Table 5 Linear relationships of four compounds results

化合物	回归方程	线性范围/(ng·mL ⁻¹)	R ²	检测限/(ng·mL ⁻¹)	定量限/(ng·mL ⁻¹)
鬼臼毒素	$Y=7.0573X+4.0831$	1~200	0.9997	0.00013	0.00043
山荷叶素	$Y=0.1017X+0.9186$	10~1000	0.9997	0.00800	0.02000
去氢鬼臼毒素	$Y=3.6679X-20.8450$	1~1000	0.9969	0.00023	0.00077
鬼臼毒酮	$Y=1.5559X-18.0300$	1~1000	0.9936	0.00080	0.00268

2.3.6 重复性考察 平行称取按“2.3.2 (2)”项下方法制备的浙江产地的八角莲浸膏 6 份,每份 0.500 0 g,并制备供试品溶液,按“2.3.1”项下方法进样测定,计算得到鬼臼毒素、山荷叶素、去氢鬼臼毒素、鬼臼毒酮的平均质量分数分别为 30.844、0.013、0.904、2.052 mg·g⁻¹,RSD 分别为 4.14%、8.24%、1.17%、5.19%,表明该方法重复性良好。

2.3.7 稳定性考察 取浙江产地的八角莲样品粉末,精密称定,按照“2.3.2 (2)”项下方法制备供试品溶液,按照“2.3.1”项下条件分别于 0、2、4、6、8、10 h 进样分析,记录峰面积,计算得到鬼白

毒素、山荷叶素、去氢鬼臼毒素、鬼臼毒酮与依泊托昔峰面积比的 RSD 分别为 5.79%、2.66%、3.01%、5.12%,表明供试品溶液在 10 h 内稳定性良好。

2.3.8 加样回收率考察 平行称取按“2.3.2 (2)”项下方法制备的已知含量的浙江产地的八角莲浸膏 6 份,每份 0.500 0 g,并制备供试品溶液,分别依次精密加入“2.3.2 (1)”中的各对照品储备液适量,按“2.3.1”项下方法测定,鬼臼毒素、山荷叶素、去氢鬼臼毒素、鬼臼毒酮的平均回收率分别为 102.73%、97.32%、99.21%、102.17%,RSD 分别为 0.35%、1.44%、0.69%、2.50%,表明该方法加标回

收良好，准确度高。

2.3.9 测定结果 取 7 个产地的八角莲样品按照“2.3.2 (2)”项下方法制备供试品溶液，按照“2.3.1”

项下方法进样测定，记录峰面积。根据“2.3.4”项下拟合的标准曲线计算供试品溶液中各成分含量，结果见表 6。

表 6 不同产地八角莲中 4 种差异成分含量 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 5 Contents of four different components in *D.versipellis* from different habitats ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

产地	鬼臼毒素/(mg·g ⁻¹)	山荷叶素/(mg·g ⁻¹)	去氢鬼臼毒素/(mg·g ⁻¹)	鬼臼毒酮/(mg·g ⁻¹)
河南	208.153±5.409	0.093±0.007	2.417±0.026	3.051±0.041
安徽	59.055±0.592	0.480±0.118	1.085±0.030	1.680±0.076
湖南	48.941±0.953	453.931±6.750	1.827±0.027	2.341±0.080
云南	13.269±0.995	0.202±0.013	1.079±0.024	1.639±0.068
四川	56.449±2.780	0.157±0.012	1.459±0.030	1.795±0.033
浙江	11.632±0.557	0.088±0.001	0.949±0.015	1.639±0.005
湖北	40.313±2.259	0.078±0.009	0.942±0.032	1.903±0.036

3 讨论

3.1 定性与定量结果

八角莲属植物中木脂素类成分众多，主要有鬼臼毒素、4'-去甲基鬼臼毒素、去氧鬼臼毒素、去氢鬼臼毒素、鬼臼毒酮、山荷叶素等。鬼臼毒素是其代表成分，最早发现于北美的足叶草属植物，后来也从八角莲属、桃儿七属以及山荷叶属植物南方山荷叶中分离得到^[30]。八角莲具有毒性，其成分鬼臼毒素是一种细胞毒性物质，使用不当可导致中毒反应，表现为恶心、呕吐、呼吸急促，严重可导致死亡^[15]。早在 20 世纪 40 年代，国外学者就发现鬼臼毒素对动物移植性肿瘤具有显著抑制活性^[31]，但由于其严重的不良反应，在临床使用上受到了很大的限制。因此，本研究对 7 个产地八角莲的 6 种代表性成分进行了定性分析，并且通过产地的两两对比发现了 4 种显著差异成分，随后对差异成分进行了定量测定，为八角莲质控标准的完善以及生物活性探索提供参考。

定性结果发现，四川产地八角莲不含有鬼臼毒酮，其余 6 个产地八角莲均鉴定到上述 6 种化学成分。定量结果发现，不同产地八角莲之间的成分含量也具有差异，河南的鬼臼毒素含量最高，湖南的山荷叶素含量最高，去氢鬼臼毒素与鬼臼毒酮在 7 个产地的含量差异不大。结果表明不同产地八角莲药材质量差异较大，这可能与药材的生长环境差异和不同采收时期有关，单纯测定 1~2 种成分的含量不能全面反映药材的质量，需要对八角莲的多种成分同时测定，才能全面地反映其内在质量。

3.2 色谱条件和供试品制备方法的考察

在预试验中，流动相的选择考察了水-甲醇、水-乙腈、0.1%甲酸水-甲醇溶液、0.1%甲酸水-乙腈溶液等的洗脱效果，结果发现乙腈的洗脱能力优于甲醇，且基线平稳；在水中加入 0.1%甲酸，可以改善峰形、提高峰分离效果，通过进一步调整流动相的比例和时间，最终确定“2.2.1”和“2.3.1”项下的最佳色谱条件。在制备供试品时考察了提取溶剂 100%乙醇和 50%乙醇水溶液，结果应用 50%乙醇水溶液提取转移率较高，杂质较少。

3.3 不足与局限

第一，不同产地的八角莲只购买了 1 批，虽然通过平行实验能在一定程度上反映该产地的特征，但结果可能会有偏差。第二，不同产地的八角莲浸膏的黏稠程度不同，得到的浸膏量稍有差异。第三，通过文献查阅发现，鬼臼毒素与鬼臼毒酮结构中均存在手性中心，本研究建立的方法未能将其有效分开。

7 个产地的 4 种差异成分中，河南产地的鬼臼毒素含量明显高于其他产地，湖南产地的山荷叶素含量明显高于其他产地，其余 2 种成分在各产地中的含量差别较小。虽然八角莲在抗肿瘤、抗病毒、抗菌等方面作用显著，但由于其毒性较强，限制了其在临床使用，应尽量避免使用过程中其毒性作用给人体带来的不良反应。由于八角莲含多种化学成分，本研究对其有效成分进行更深层次的综合研究，对不同产地八角莲的成分研究的完善具有较大意义。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 熊鹏辉. 石门县土家珍稀赶火败毒药之二 [J]. 中国民族医药杂志, 2013, 19(5): 35-36.
Xiong P H. Rare Tujia people in Shimen County, the second to drive out fire and defeat poison [J]. J Med Pharm Chin Minor, 2013, 19(5): 35-36.
- [2] 徐祥, 酆小平. 八角莲的毒理学研究现状 [J]. 亚太传统医药, 2011, 7(8): 158-160.
Xu X, Li X P. Research status of toxicology of *Dysosma versicolor* [J]. Asia Pac Tradit Med, 2011, 7(8): 158-160.
- [3] Liu C X, Zhang C N, He T, et al. Study on potential toxic material base and mechanisms of hepatotoxicity induced by *Dysosma versipellis* based on toxicological evidence chain (TEC) concept [J]. Ecotoxicol Environ Saf, 2020, 190: 110073.
- [4] 段瑞刚, 李军伟, 邹建华, 等. 八角莲愈伤组织中木脂素类化学成分研究 [J]. 中国药学杂志, 2014, 49(15): 1306-1309.
Duan R G, Li J W, Zou J H, et al. Lignans constituents from callus culture of *Dysosma versipellis* [J]. Chin Pharm J, 2014, 49(15): 1306-1309.
- [5] 李锦辉. 贵州产地八角莲叶挥发性成分分析 [J]. 食品科学, 2015, 36(12): 138-141.
Li J H. Analysis of volatile components in leaves of *Dysosma versipellis* from Guizhou Province [J]. Food Sci, 2015, 36(12): 138-141.
- [6] 张杰. 小八角莲活性成分提取分离、质量控制及药效研究 [D]. 湖南: 中南大学, 2010.
Zhang J. Study on isolation, quality control and pharmacodynamics of active ingredients of *Radix et Rhizoma Dysosmae Difformis* [D]. Hunan: Central South University, 2010.
- [7] 由金文, 林先明, 廖朝林, 等. 八角莲致濒原因及其野生资源保护 [J]. 现代中药研究与实践, 2007, 21(4): 25-27.
You J W, Lin X M, Miao C L, et al. Resource conservation of the wild *Dysosma versipellis* [J]. Res Pract Chin Med, 2007, 21(4): 25-27.
- [8] Xu X Q, Gao X H, Jin L H, et al. Antiproliferation and cell apoptosis inducing bioactivities of constituents from *Dysosma versipellis* in PC3 and Bcap-37 cell lines [J]. Cell Div, 2011, 6(1): 14.
- [9] Li J, Feng J, Luo C, et al. Absolute configuration of podophyllotoxone and its inhibitory activity against human prostate cancer cells [J]. Chin J Nat Med, 2015, 13(1): 59-64.
- [10] Zhang L, Wang J, Liu L, et al. Synthesis and antiproliferative activity of novel all-trans-retinoic acid-podophyllotoxin conjugate towards human gastric cancer cells [J]. Molecules, 2017, 22(4): 628.
- [11] Varghese E, Samuel S M, Abotaleb M, et al. The “Yin and Yang” of natural compounds in anticancer therapy of triple-negative breast cancers [J]. Cancers, 2018, 10(10): 346.
- [12] 姚莉韵, 王丽平. 八角莲水溶性有效成分的分离与抗病毒活性的测定 [J]. 上海第二医科大学学报, 1999, 19(3): 234-237.
Yao L Y, Wang L P. Isolation of effective constituents from the hydrophilic fraction of *Dysosma versipellis* and their antiviral effect on CB1-6V and HSV-1 virus [J]. Acta Univ Med Second Shanghai, 1999, 19(3): 234-237.
- [13] 谭小明, 余丽莹, 周雅琴. 濒危药用植物八角莲内生真菌分离鉴定及抗菌活性研究 [J]. 中国药学杂志, 2014, 49(5): 363-366.
Tan X M, Yu L Y, Zhou Y Q. Isolation, identification and antimicrobial activities of endophytic fungi of *Dysosma versipellis* (hance) M. Cheng [J]. Chin Pharm J, 2014, 49(5): 363-366.
- [14] 谷丽艳, 孙朝渭, 董禹何, 等. 活性氧响应型透明质酸修饰的鬼臼毒素纳米胶束的处方优化与体外评价 [J]. 中草药, 2024, 55(22): 7663-7673.
Gu L Y, Sun Z W, Dong Y H, et al. Optimization of formulation and *in vitro* evaluation of reactive oxygen species-responsive hyaluronic acid-modified podophyllotoxin nano-micelles [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2024, 55(22): 7663-7673.
- [15] 潘琦, 傅承新. 八角莲的植物化学成分和组织培养研究 [J]. 中国医学生物技术应用, 2002(3): 51-54.
Pan Q, Fu C X. Study on phytochemical constituents and tissue culture of *Dysosma versicolor* [J]. Chin Acad Med Mag Org, 2002(3): 51-54.
- [16] 于萍, 陈吉炎, 陈师西, 等. 口服鬼臼类中药中毒 46 例分析 [J]. 医药导报, 2010, 29(11): 1518-1520.
Yu P, Chen J Y, Chen S X, et al. Analysis of 46 cases of poisoning by oral Podophyllum chinese medicine [J]. Her Med, 2010, 29(11): 1518-1520.
- [17] 张峰. 不含有 Michael 受体的新型噻唑烷酮类化合物的合成 [D]. 济南: 山东大学, 2012.
Zhang F. Synthesis of novel thiazolidinone compounds without Michael receptor [D]. Jinan: Shandong University, 2012.
- [18] 蒋向辉, 余朝文. 侗药八角莲药用民族植物学研究 [J]. 中国民族医药杂志, 2011, 17(10): 44-46.
Jiang X H, She C W. Medical ethnobotany study of *Dysosma versipellis* (hance) M [J]. J Med Pharm Chin Minor, 2011, 17(10): 44-46.

- [19] 万明香, 张丽艳, 何顺志. 八角莲属(小檗科)药用植物的研究进展 [J]. 贵阳中医学院学报, 2007, 29(1): 51-54.
- Wan M X, Zhang L Y, He S Z. Advances in research on medicinal plants of *Dysosma* (Berberaceae) [J]. J Guizhou univ Tradit Chin Med, 2007, 29(1): 51-54.
- [20] 沈磐, 孙德志, 周维, 等. 中药毒性预测研究进展与思考 [J]. 中国药物警戒, 2023, 20(4): 473-479.
- Shen P, Sun D Z, Zhou W, et al. Research progress in toxicity prediction of traditional Chinese medicines [J]. Chin J Pharmacovigil, 2023, 20(4): 473-479.
- [21] 段金殿, 张伯礼, 范欣生, 等. 中药配伍禁忌研究思路与技术体系框架 [J]. 世界科学技术(中医药现代化), 2012, 14(3): 1537-1546.
- Duan J A, Zhang B L, Fan X S, et al. Research thoughts and technology system framework of traditional Chinese medicine incompatibility [J]. World Sci Technol Mod Tradit Chin Med Mater Med, 2012, 14(3): 1537-1546.
- [22] 崔鹤蓉, 张晓雨, 尤良震, 等. 临床“有毒”中药多元整合证据评价与预测方法的建立 [J]. 中国中药杂志, 2022, 47(8): 2266-2272.
- Cui H R, Zhang X Y, You L Z, et al. Establishment of multiple evidence-integrated evaluation and prediction method for “toxic” Chinese medicines [J]. China J Chin Mater Med, 2022, 47(8): 2266-2272.
- [23] 肖小河, 柏兆方, 王伽伯, 等. 中药安全性评价与药物警戒 [J]. 科学通报, 2021, 66(S1): 407-414.
- Xiao X H, Bai Z F, Wang J B, et al. Safety evaluation and pharmacovigilance of traditional Chinese medicine [J]. Chin Sci Bull, 2021, 66(S1): 407-414.
- [24] 倪莉, 张冰. 基于机体状态的中药毒性理论研究 [J]. 中华中医药杂志, 2009, 24(5): 549-551.
- Ni L, Zhang B. Study on toxicity theory of Chinese materia Medica based on organism state [J]. China J Tradit Chin Med Pharm, 2009, 24(5): 549-551.
- [25] 韩佳寅, 易艳, 梁爱华, 等. 中药生殖毒性研究思路和方法 [J]. 药学报, 2014, 49(11): 1498-1503.
- Han J Y, Yi Y, Liang A H, et al. Thought and method of reproductive toxicity research in traditional Chinese medicine [J]. Acta Pharm Sin, 2014, 49(11): 1498-1503.
- [26] 韩波, 黄维, 谢欣, 等. 有毒乌头类中药的毒效网络整合分析: 思路与方法 [J]. 世界中医药, 2017, 12(11): 2585-2597.
- Han B, Huang W, Xie X, et al. Thought and methodology of toxicity-efficacy network integrated analysis of toxic aconitum [J]. World Chin Med, 2017, 12(11): 2585-2597.
- [27] 刘福梅, 王连心, 谢雁鸣. 中药安全性信号早期发现与风险管控 [J]. 中国中药杂志, 2021, 46(21): 5456-5461.
- Liu F M, Wang L X, Xie Y M. Early detection and risk control of safety signals of Chinese medicine [J]. China J Chin Mater Med, 2021, 46(21): 5456-5461.
- [28] 杨彬, 李遇伯, 张艳军. 基于单细胞转录组学的多基原有毒中药危害识别研究思路及方法 [J]. 中草药, 2021, 52(13): 3783-3789.
- Yang B, Li Y B, Zhang Y J. Research ideas and methods of hazards identification of multi-base source toxic traditional Chinese medicine based on single cell transcriptomics [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2021, 52(13): 3783-3789.
- [29] 刘传鑫, 孔娇. 体质毒理学: 中药安全性评价的新方向 [J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2023, 25(12): 3776-3784.
- Liu C X, Kong J. Constitution-based toxicology: A new perspective of study for assessing the safety of traditional Chinese medicine [J]. Mod Tradit Chin Med Mater Med World Sci Technol, 2023, 25(12): 3776-3784.
- [30] 马君, 江露, 陈虎, 等. 中药八角莲的研究进展 [J]. 湖北医药学院学报, 2020, 39(1): 96-100.
- Ma J, Jiang L, Chen H, et al. Research progress of *Dysosma versipellis* [J]. J Hubei Univ Med, 2020, 39(1): 96-100.
- [31] Liu Y Q, Yang L, Tian X. Podophyllotoxin: Current perspectives [J]. Curr Bioact Compd, 2007, 3(1): 37-66.

[责任编辑 孙英杰]