

HPLC法测定月腺大戟根中狼毒甲素及狼毒乙素的含量

中国药科大学(南京210009) 赵奎君* 徐国钧 金蓉鸾 徐珞珊 丛晓东

摘要 用反相HPLC法测定了月腺大戟根中抗结核活性成分狼毒甲素,狼毒乙素的含量。实验采用ODS柱,以甲醇-水-10%乙酸(45:55:2)(10%氨水调pH至5.4)为流动相,延胡索乙素为内标,280nm为检测波长,可在30min内完成测定。本法快速,简便,灵敏性好,可用于原药材的质量控制。

关键词 狼毒 月腺大戟 高效液相色谱法 狼毒甲素 狼毒乙素

大戟科植物月腺大戟 *Euphorbia ebracteolata* Hayata 为中药狼毒的原植物之一,以其根入药,具有散结杀虫的功效。据报道〔张涵庆,等.植物学报,1987,9(4):429〕从月腺大戟根中分得7个结晶性成分,其中狼毒甲素〔双(5-甲酰基-糠基)-醚,(I)〕,狼毒乙素〔2,4-二羟基-6-甲氧基-3-甲基-1-苯乙酮(II)〕及三萜酸对结核杆菌具有明显的抑制作用,临床上已将该药的制剂用于肺结核的治疗。为了对原药材进行质量评价,以确保其制剂的疗效,我们对月腺大戟根中的 I、II 两种成分的含量做了测定,结果如下:

1 仪器与试剂

1.1 仪器:日本岛津 LC-6A 高效液相色谱仪;SPD-6AUV 可调波长紫外检测器;SCL-6A 系统控制器;岛津 C-R3A 色谱处理机;RHEODYNE 7125 进样阀;层析柱:4.6 × 250mm, ODS-5 填料;预柱填充剂: ODS-5。

1.2 对照品:对照品 I、II 由江苏植物研究所惠赠,内标物延胡索乙素由本校生药教研室制备。上述对照品及内标物均经光谱鉴定。

1.3 试剂均为分析纯,重蒸水。

1.4 实验材料:本实验所用材料均系作者采集并经过分类学鉴定。

2 方法与结果

2.1 仪器参数:紫外检测波长280nm;灵敏度0.05AUFS;流速0.8ml/min;纸速 mm/min;温度20°C ± 1°C。

2.2 流动相选择:选用甲醇-水-10%乙酸(45:55:2)(用10%氨水调pH至5.4)。

通过计算上述流动相在不同配比情况下所测各组分的容量因子的大小,最后确定了上述配比分离效果较好。标准品分离情况见图中A。

2.3 提取方法:样品0.2g,加硅胶20g,置自制的小柱中,用乙醚100ml冲洗脱脂,再用丙酮100ml冲洗,回收丙酮液至干,用甲醇溶解,进样。

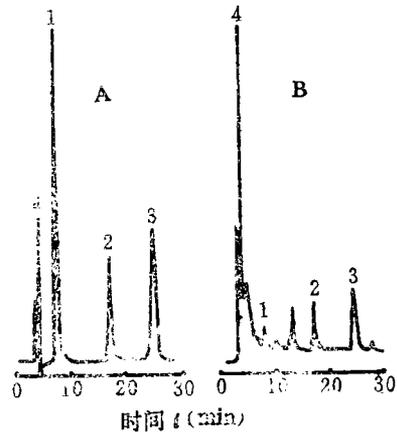


图 HPLC分析图

A-对照品 B-样品 1-狼毒甲素
2-狼毒乙素 3-延胡索乙素 4-溶剂

*Address: Zhao Kuijun, China Pharmaceutical University, Nanjing
现在解放军北京医学高等专科学校

经考察,此法能排除杂质对组分 I 的干扰,较其它方法为好。样品分离情况见图 B。

2.4 系统适应性试验

2.4.1 分离度:在本实验条件下,组分 I、II 及内标物 is 的保留时间分别为 7.99, 17.90, 26.08 min。分离度为: I - II 5.02, II - is 2.70。

2.4.2 进样精密性试验:取 I、II 及 is 混合溶液按同样量重复进样 8 次,按上述方法测定,结果各组分的峰面积平均值、标准差及变异系数分别为: I 为 174937 ± 1045 (0.6%), II 为 75783 ± 948 (1.25%), is 为 161350 ± 1345 (0.83%)。

2.4.3 线性范围考察:精密称取 I、II 各 1 mg, is 1.5 mg, 分别置 1 ml 容量瓶中,用甲醇定容,配成标准液。分别精密吸取标准液 I 3、10、30、50、70、90 μ l, 标准液 II 10、20、40、60、80、100 μ l, 置 1 ml 容量瓶中,再分别加入 30 μ l 内标液用甲醇调至刻度。进样 10 μ l, 测定,计算 A_s 、 A_i 、 M_s 、 M_i (A_s : 对照品峰面积; A_i : 内标准品峰面积; M_s : 对照品重量; M_i : 内标物重量), 以 A_s/A_i 对 M_s/M_i 作图, 得两条直线。其回归方程: I: $Y = 0.97X + 0.04$ ($r = 0.9993$); II: $Y = 2.9X + 0.13$ ($r = 0.9993$)。式中 $Y = M_s/M_i$, $X = A_s/A_i$ 。线性范围: I: $0.028 \sim 0.84 \mu$ g; II: $0.11 \sim 1.1 \mu$ g。

2.4.4 提取率考察:按前述方法提取,洗脱液依次接收 100、30、20 ml, 将后 2 份洗脱液浓缩,进样,未检出待测成分,说明已提取完全。

2.4.5 回收率试验:精密称取月腺大戟粉末(80目)0.2 g, 6 份,其中 5 份加入一定量的对照品,按前述方法进行提取测定,计算含量及回收率。结果, I $\bar{x} \pm SD$ 为 $100.1 \pm 3.60\%$, CV 为 3.6%; II $\bar{x} \pm SD$ 为 $99.93 \pm 2.69\%$, CV 为 2.2%。

2.5 样品测定:按前述提取方法得样品丙酮提取液,浓缩至干,用甲醇溶解,转移至 2 ml 容量瓶中,加入内标液 80 μ l, 用甲醇调至刻度,进样,或根据情况适当调整待测成分至线性范围,测定,计算含量。

对两个产地的标准药材及 12 件商品药材做了含量测定,结果见表 1、2。

表 1 不同产地标准药材测定结果(n=5)

产地	采集时间	狼毒甲素(%)	狼毒乙素(%)
南京燕子矶	1987.6	0.0066	0.061
南京燕子矶	1988.3	0.0072	0.49
安徽琅琊山	1987.5	0.0030	1.1

表 2 商品药材含量测定结果(n=5)

商品来源	产地	狼毒甲素(%)	狼毒乙素(%)
山东青岛	山东	0.0085	0.062
山西太原	山西	0.0043	0.062
山东济南	山东	*	0.16
安徽合肥	安徽	0.0027	1.9
浙江杭州	浙江	*	0.040
安徽亳州	安徽	-	0.022
浙江嘉兴	浙江	0.0034	0.15
江苏南京	江苏	0.0033	0.71
福建龙岩	不详	0.0076	0.069
安徽颍上	安徽	-	0.062
江苏如皋	江苏	0.0039	0.10
四川乐孜	不详	0.0032	0.10

注: -, 未检出; *, 痕量

2.6 同属其它 8 种(变种)狼毒的分析:对同属其它 8 种(变种)狼毒(狼毒大戟 *Euphorbia fischeriana* Steud., 大狼毒 *E. nematocypha* Hand.-Mazz., 毛大狼毒 *E. nematocypha* Hand.-Mazz. var. *induta* Hand.-Mazz., 鸡肠狼毒 *E. prolifera* Buch Ham., 土瓜狼毒 *E. pinus* Levl., 柴胡状大戟 *E. bupleuroides* Diels, 硕苞大戟 *E. wallichii* Hook. f. 刮金板 *E. chrysocoma* Levl. et Van.) 的根按上述方法做了 HPLC 分析,结果未检出 I、II 组分。

3 讨论

(下转第 75 页)

2.1.2 将鸦胆子油乳颗粒剂放于恒温40、60、80℃条件下，0~10d，分别取样测含量，并观察外观变化，结果见表4。

2.1.3 将样品于40℃、相对湿度为75%，恒温放置3个月，每月按规定项目检测一次，结果见表5。

通过恒温、恒湿加速试验考察结果，从表中看出颗粒剂中主要成分（油酸）含量应在本品规定的标示量85±15%的范围内，初步认为本品比较稳定，估计在2年保质期内含量变化不会超过标示量范围。

另外，本品在留样3个月后的样品加水冲溶后，分散均匀；在显微镜下观察（150×40倍）油滴仍在5μm以下，10μm以上的粒子不超过5粒，故服用仍具乳剂作用。

2.1.4 取80℃恒温样品层析鉴定：取标准品油酸、鸦胆子油，0、4、8、10d80℃下恒温样品，用石油醚提取，硅胶GC板层析，展开剂：石油醚-醋酸乙酯（85：15），如图2。

表5 鸦胆子油乳颗粒剂于40℃，相对湿度为75%下恒温3个月结果

	外观	溶化性	含量(%)	结果(%) (与原始含量比)
0	奶白色	均匀分散	0.127	100
30	奶白色	均匀分散	0.120	94.49
60	奶白色	均匀分散	0.112	88.18
90	奶白色	均匀分散	0.108	85.03

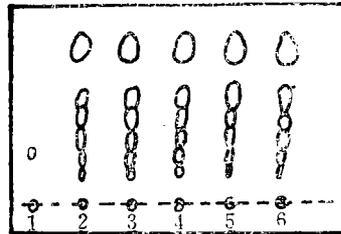


图2 样品层析图

1-油酸 2-鸦胆子油

3、4、5、6分别为0、4、8、10d样品

薄层结果显示，鸦胆子油乳颗粒剂在80℃恒温下10d以内所含成分与鸦胆子油无差别，且依然含有油酸，所以可以肯定同样条件下在40℃、60℃恒温下，样品成分和含量变化不会超过规定范围。

参 考 文 献

- 1 许洪霞，等。辽宁肿瘤防治研究，1983，17：25
- 2 中国科学院林业土壤研究所植物化学组。东北油脂植物及油脂成分测定法。沈阳：辽宁人民出版社，1980，143
- 3 宋永青。食品工业科技，1990，6：53 (1994-01-31收稿)

(上接第67页)

3.1 有关狼毒抗结核活性成分的含量测定至今未报道，本文用反相HPLC法，用甲醇-水-醋酸系统做流动相，对I、II 2种成分做了测定。分析过程在30min左右，方法简便快速灵敏，重现性好，可供该类生药在质量控制及品质评价时参考。

3.2 从测定结果中可知，不同产地的商品药材，上述2种成分的含量有一定的差异；同一产地（燕子矶）的药材，春季（3月）比夏季（6月）含量为高，说明本草文献中关于狼毒春天采收的记载是科学的。

3.3 在所分析的大戟属9种（变种）狼毒中，所测组分只存在于月腺大戟中，可视为本种的特征性成分。

致谢：承江苏植物研究所张涵庆研究员惠赠对照品并给予指导。

(1994-02-19收稿)

ABSTRACTS OF ORIGINAL ARTICLES

Studies on the Chemical Constituents of Yunnan Pholidota

(*Pholidota yunnanensis*)

Ma Xuemei, Li Manfei and Zhang Qingrong

Triterpenoids and a sterol were isolated from *Pholidota yunnanensis* Rolfe for the first time. They were identified as cyclopholidone (I), cyclopholidonol (II), hexacosyl alcohol (III), 25-methylene cycloartanyl p-hydroxy-trans-cinnamate (V) and β -sitosterol on the basis of physical and spectral data. Among them, V is a new compound, and named as pholidotanin.

(Original article on page 59)

Studies on the Chemical Constituents of Common

Macrocarpium (*Cornus officinalis*)

Xu Lizhen, Li Huiying, Tian Lei, et al

Ten compounds isolated from *Cornus officinalis* Sieb. et Zucc. were identified as ursolic acid (I), 5, 5'-di- α -furaldehydic dimethyl ether (II), 5-hydroxymethylfurfural (III), gallic acid (IV), 3, 5-dihydroxybenzoic acid (V), loganin (VI), 7-O-methylmorroniside (VII), 7-dehydrologanin (VIII), β -sitosterol (IX), and dehydromorroniaglycone (X) on the basis of physicochemical constants and spectral analysis. X was found from nature for the first time and named as dehydromorroniaglycone. II, III and VII were also isolated for the first time from *cnruceac*.

(Original article on page 62)

Determination of Bis-(5-formyl-furfuryl)-ether and 2,4-Dihydroxy-6-methoxy-3-methyl-acetophenone in the Root of Yuexiandaji (*Euphorbia ebracteolata*) by HPLC

Zhao Kuijun, Xu Guojun, Jin Rongluan, et al

An HPLC method for the quantitative analysis of bis(5-formyl-furfuryl)-ether and 2, 4-dihydroxy-6-methoxy-3-methyl-acetophenone in Chinese drug, Langduc (*Euphorbia ebracteolata*) was developed. The solvent system used was methanol-water-10% acid (45:55:2) (adjusted to pH 5.4 by 10% ammonia) on ODS column at 280nm. Tetrahydropalmatine was used as an internal standard. The operation can be completed in 30min. This method is sensitive, simple and accurate with good reproducibility. It can be applied to the quality control of the crude drug of *E. ebracteolata*.

(Original article on page 66)

Studies on the Use of "Yangyinshengji" Film as Wound Dressing

Guo Zhi, Meng Gen, Zheng Yongyi

"Yangyinshengji" Film is a modernized wound dressing prepared by incorporating carboxymethyl cellulose into the traditional Chinese powdery prescription for nourishing the "Yin" and promoting tissue regeneration. When used as dressing in dermabrasive wound of