

HPLC 法同时测定鸡骨香中 6 个萜类成分

丘茂松, 杨滔, 谭庆龙, 朱锦萍, 杨宝, 曹迪, 周园, 赵钟祥*

广州中医药大学中药学院, 广东 广州 510006

摘要: 目的 建立同时测定鸡骨香 *Croton crassifolius* 中 6 个萜类成分 (chettaphanin I、山藿香定、crassifolin B、cyperenoic acid、crassifolin A、cyperenol) 的 HPLC 方法。方法 采用 Kromasil 100-5 C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 以乙腈 (A) -0.02% 三氟乙酸水 (B) 梯度洗脱: 0~35 min, 35% A; 35~55 min, 35%~60% A; 55~80 min, 60% A。体积流量为 1.0 mL/min; 检测波长为 210 nm; 柱温为 25 ℃。结果 6 个萜类化合物均有良好的分离度, 线性关系良好 ($r>0.999\ 7$), chettaphanin I、山藿香定、crassifolin B、cyperenoic acid、crassifolin A、cyperenol 的加样回收率分别为 100.2%、99.13%、98.48%、99.22%、101.1%、102.5%, RSD 分别为 0.48%、0.48%、0.96%、1.10%、1.35%、0.95%。结论 该方法简单准确, 具有良好的重复性和稳定性, 可为鸡骨香质量控制提供科学依据。

关键词: 高效液相色谱; 鸡骨香; 萜类; 定量测定; chettaphanin I; 山藿香定; crassifolin B; cyperenoic acid; crassifolin A; cyperenol
中图分类号: R286.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2016)21-3901-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.21.025

Simultaneous determination of six terpenoids in *Crotonis Crassifolii Radix* by HPLC

QIU Mao-song, YANG Tao, TAN Qing-long, ZHU Jin-ping, YANG Bao, CAO Di, ZHOU Yuan,
ZHAO Zhong-xiang

School of Chinese Materia Medica, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China

Abstract: Objective To establish an HPLC method for simultaneous determination of chettaphanin I, teuvidin, crassifolin B, cyperenoic acid, crassifolin A, and cyperenol in *Crotonis Crassifolii Radix*. **Methods** The separation was performed on a Kromasil 100-5 C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) with acetonitrile (A)-0.02% trifluoroacetic acid water (B) as the mobile phase in a gradient elution (0—35 min, 35% A; 35—55 min, 35%—60% A; 55—80 min, 60% A) at a flow rate of 1.0 mL/min. The detective wavelength was set at 210 nm, and the column temperature was set at 25 ℃. **Results** The six terpenoids all have good separating degree and good linearity ($r > 0.999\ 7$). The sample recoveries of compounds 1—6 were 100.2% (RSD = 0.48%), 99.13% (RSD = 0.48%), 98.48% (RSD = 0.96%), 99.22% (RSD = 1.10%), 101.1% (RSD = 1.35%), and 102.5% (RSD = 0.95%), respectively. **Conclusion** The established method is rapid and accurate, and has high repeatability, which could provide the scientific evidence for the quality control of *Crotonis Crassifolii Radix*.

Key words: HPLC; *Croton crassifolius* Geisel; terpenoid; content determination; chettaphanin I; teuvidin; crassifolin B; cyperenoic acid; crassifolin A; cyperenol

鸡骨香 *Crotonis Crassifolii Radix* 为大戟科 (Euphorbiaceae) 巴豆属 *Croton* L. 植物鸡骨香 *Croton crassifolius* Geisel 的根, 具有行气止痛、祛风消肿的功效, 可用于风湿痹痛、跌打肿痛等, 主要分布于我国海南、广东、广西、福建等地, 同时, 越南、老挝、泰国也有分布^[1-2]。文献报道该植物有抗癌活性^[3]。化学成分研究表明, 鸡骨香主含萜类、甾体等化合物, 萜类化合物最常见, 二萜类化合物为其主要活性成分^[4-9]。有关鸡骨香成分的定量测定研究鲜有报道^[10-11], 且测定成分单一, 难以全面反

映药材品质。本实验在前期化学成分研究基础上, 建立了同时测定鸡骨香 6 个萜类化合物的方法, 可较全面地反映鸡骨香品质, 为其质量控制和临床应用提供基础研究资料。

1 仪器与材料

LC-20AT 高效液相色谱仪、SIL-20A 自动进样器、LC solution 色谱工作站 (日本岛津); KQ3200B 超声波清洗机 (昆山市超声仪器有限公司); AEG-220 型电子分析天平 (日本岛津)。色谱乙腈 (瑞典 Oceanpak 色谱溶剂); 甲醇 (天津市致远化学

收稿日期: 2016-03-16

基金项目: 广东省优秀青年教师培养计划 (Yq2013045)

作者简介: 丘茂松 (1991—), 男, 硕士研究生在读, 研究方向为中药化学成分及其活性研究。E-mail: qmsfly@outlook.com

*通信作者 赵钟祥 (1979—), 男, 教授。Tel: (020)39358072 E-mail: zzx37@163.com

试剂有限公司), 水为超纯水; 其他试剂均为分析纯。鸡骨香药材 *Crotonis Crassifolii Radix* 购买自广东药房, 由广州中医药大学赵钟祥教授鉴定为大戟科巴豆属植物鸡骨香 *Croton crassifolius* Geisel 干燥的根。10 批药材 S1~S10 的批号依次为 YPA4D0007、040610、070504、14061372190、100311、100527、20120506、20110924、110917P228、120624P319, 均产自广东。对照品由本实验室自制, 质量分数均在 99.0% 以上。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Kromasil 100-5 C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 柱温 25 °C; 流动相为乙腈 (A) -0.02% 三氟乙酸水 (B), 梯度洗脱 (0~35 min, 35% A; 35~55 min, 35%~60% A; 55~80 min, 60% A); 体积流量 1 mL/min; 检测波长 210 nm。样品与混合对照品的 HPLC 色谱图见图 1。

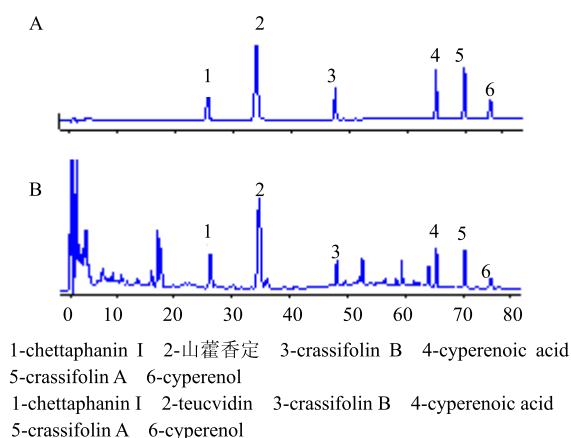


图 1 混合对照品 (A) 与样品 (B) 的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC of mixed reference substances (A) and sample (B)

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液制备 分别精密称取上述 6 个对照品适量, 用色谱甲醇溶解, 配成 chettaphanin I、山藿香定、crassifolin B、cyperenoic acid、crassifolin A、cyperenol 质量浓度分别为 0.10、0.20、0.04、0.20、

0.06、0.06 mg/mL 的混合对照品储备液。

2.2.2 供试品溶液的制备 取药材粉末 (过 4 号筛) 约 1.0 g, 精密称定, 置 100 mL 具塞锥形瓶中, 精密加入 50 mL 甲醇, 称定质量, 密塞超声提取 40 min, 放冷, 再称定质量, 用甲醇补足差量, 摇匀, 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 作为供试品溶液。

2.3 线性关系考察

在“2.1”项色谱条件下, 分别精密吸取 6 个萜类化合物混合对照品溶液 2、5、10、15、20、25、30 μL 进样测定, 以对照品质量 (X) 对峰面积 (Y) 作图, 求得回归方程, 见表 1。结果表明各化合物在各自质量浓度范围内线性关系良好。

2.4 精密度试验

在“2.1”项色谱条件下对混合对照品溶液重复进样 6 次, 每次 10 μL, 记录峰面积, 计算 6 个化合物峰面积的 RSD 值分别为 0.33%、0.25%、0.95%、0.41%、0.33%、0.73%。

2.5 稳定性试验

精密称定鸡骨香药材粉末 1.0 g, 按供试品溶液制备方法制备供试品溶液, 按“2.1”项色谱条件操作, 分别在室温下放置 0、2、4、8、12、24 h 后进样分析, 测定 chettaphanin I、山藿香定、crassifolin B、cyperenoic acid、crassifolin A、cyperenol 的峰面积。按峰面积计算各化合物的 RSD 分别为 0.48%、0.47%、0.56%、0.66%、0.48%、0.55%, 表明供试品在 24 h 内稳定。

2.6 重复性试验

精密称取 S1 供试品药材 1.0 g, 按供试品溶液制备方法平行制备 6 份供试品溶液, 在“2.1”项色谱条件下测定 6 个化合物的色谱峰面积, 计算 chettaphanin I、山藿香定、crassifolin B、cyperenoic acid、crassifolin A、cyperenol 的质量分数分别为 3.68、7.35、0.51、7.75、1.36、3.23 mg/g, RSD 分别为 0.28%、0.44%、0.84%、0.90%、0.86%、0.56%。

表 1 6 个萜类化合物的线性关系考察结果

Table 1 Linear relationship of six terpenoids

化合物	回归方程	<i>r</i>	线性范围/μg
chettaphanin I	$Y=1\ 159\ 797\ X+22\ 277$	0.999 9	0.20~3.00
山藿香定	$Y=1\ 798\ 380\ X+62\ 993$	0.999 9	0.40~6.00
crassifolin B	$Y=4\ 408\ 607\ X-61\ 927$	0.999 7	0.08~1.20
cyperenoic acid	$Y=414\ 130\ X+23\ 680$	0.999 9	0.40~6.00
crassifolin A	$Y=1\ 866\ 372\ X+35\ 125$	0.999 9	0.12~1.80
cyperenol	$Y=354\ 186\ X-6\ 667$	0.999 9	0.12~1.80

2.7 加样回收率试验

取已测定的 S1 粉末 6 份, 每份 0.5 g, 精密称定。加入等同于 S1 样品量的 6 种对照品。按供试品溶液制备方法制备, 按“2.1”项色谱条件下进行测定, 计算 chettaphanin I、山藿香定、crassifolin B、cyperenoic acid、crassifolin A、cyperenol 的加样平均回收率分别为 100.2%、99.13%、98.48%、99.22%、

101.1%、102.5%, RSD 分别为 0.48%、0.48%、0.96%、1.10%、1.35%、0.95%。

2.8 样品测定

取 10 批鸡骨香药材, 精密称定 1.0 g, 按“2.2.2”项下方法操作, 每个批号药材平行制备 3 份, 再按“2.1”项下色谱条件进行测定, 并计算样品中 6 种成分的质量分数, 结果见表 2。

表 2 鸡骨香药材中 6 个萜类化合物的测定结果 ($n=3$)

Table 2 Determination of six terpenoids in *Crotonis Crassifolii Radix* ($n=3$)

批号	质量分数/(mg·g ⁻¹)						总量
	chettaphanin I	山藿香定	crassifolin B	cyperenoic acid	crassifolin A	cyperenol	
S1	4.96	8.01	0.77	9.16	2.29	5.01	30.13
S2	4.24	8.45	0.61	8.61	2.12	4.48	28.39
S3	3.85	8.21	0.57	7.68	1.92	3.65	25.81
S4	3.31	3.35	0.55	8.93	1.14	4.67	21.91
S5	2.44	2.43	0.56	8.41	1.11	4.29	19.18
S6	2.74	5.38	0.66	8.75	1.84	4.81	24.13
S7	3.02	5.67	0.71	9.51	2.00	5.33	26.31
S8	5.37	7.43	0.75	12.4	2.06	6.14	34.07
S9	3.69	7.37	0.51	7.69	1.37	3.25	23.87
S10	2.65	2.48	0.47	7.66	0.87	3.09	17.17

3 讨论

本实验对鸡骨香药材中 6 个萜类化合物进行了分析。供试品溶液的制备中考察了提取方式、提取溶剂种类、溶剂加入量和提取时间。结果显示, 超声提取与回流提取无显著性差异; 甲醇提取优于 75% 甲醇和 50% 甲醇; 甲醇加入 30、40、50、60 倍量比较, 50、60 倍量提取最充分且无显著性差异; 提取时间 30、40、50 min 比较, 超声提取 40、50 min 时各成分的量较高且无显著性差异。最终确定甲醇 50 倍量, 超声提取 40 min 为最佳供试品溶液制备方法。

在选择波长方面, 上述 6 个萜类成分的紫外扫描图谱显示, crassifolin B、crassifolin A、cyperenol 的最大吸收波长均为 210 nm; chettaphanin I 在 210、248 nm 下有最大吸收; 山藿香定的最大吸收波长为 220 nm; cyperenoic acid 的最大吸收波长为 243 nm; 虽然山藿香定和 cyperenoic acid 的最大吸收波长不为 210 nm, 但是在该波长下也有很强吸收, 而且方法学考察了精密度、重复性、稳定性和加样回收率, 结果都符合要求; 且在 220、243 nm 下, 其他化合物吸收明显减弱, 所以最终选择 210 nm 作为检测

波长。

在选择流动相方面, 分别用乙腈-水、乙腈-0.02% 三氟乙酸水、甲醇-水 3 个不同系统进行分析, 结果显示, 乙腈-0.02% 三氟乙酸水系统对 6 个萜类成分的分度度最好, 所以流动相选择了乙腈-0.02% 三氟乙酸水系统。

在选择柱温方面, 分别考察了 10、20、25、30、40 °C, 结果显示, 柱温为 25 °C 时, 6 个化合物分离度最佳, 所以柱温选择了 25 °C。

实验结果显示, 广东鸡骨香药材中 6 个萜类化合物总量存在明显差异, 各成分量的波动较大, cyperenoic acid 作为质量分数最大的成分, 波动最小, 这可能与药材产地、采收时间、炮制方法和储藏时间有关。本实验建立了 HPLC 法同时测定鸡骨香药材中 6 个萜类成分的量, 该方法简单、有效、准确, 因此可以考虑作为鸡骨香药材的质量控制标准。

参考文献

- [1] 邓世明. 海南常用中草药名录 [M]. 北京: 中国科学技术出版社, 2006.
- [2] Smith A R. Euphorbiaceae (Part 1). In: Polhill RM. *Flora*

- of Tropical East Africa [M]. Rotterdam: A. A. Balkema Publishers, 1987.
- [3] Laddawan B, Che C T, Harry H S F, *et al.* Constituents of *Croton crassifolius* roots [J]. *Planta Med*, 1988, 54(1): 61-63.
- [4] 朱耀魁, 胡 颖, 程 妮, 等. 鸡骨香化学成分研究 [J]. 中草药, 2013, 44(10): 1231-1236.
- [5] Hu Y, Zhang L, Wen X Q, *et al.* Two new diterpenoids from *Croton crassifolius* [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2012: 785-755.
- [6] Wang G C, Li J G, Li G Q, *et al.* Clerodane diterpenoids from *Croton crassifolius* [J]. *J Nat Prod*, 2012, 75: 2188-2192.
- [7] 杨先会, 陈尚文, 邓世明. 鸡骨香植物药的化学成分研究 [J]. 时珍国医国药, 2009, 20(3): 515-517.
- [8] 李甲桂. 鸡骨香化学成分研究 [D]. 广州: 暨南大学, 2013.
- [9] 史海明, 温 晶, 屠鹏飞. 鸡骨草的化学成分研究 [J]. 中草药, 2006, 37(11): 1610-1613.
- [10] 李树华. 鸡骨香化学成分的研究 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2012.
- [11] 王佰灵, 王国才, 梁生旺, 等. 鸡骨香药材的含量测定 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(13): 61-63.