

RP-HPLC 法同时测定沙地柏中 3 种鬼臼毒素类化合物的含量

陈 艳^{1,2}, 李广泽^{1*}, 曹雪峰^{1,2}, 陈存根², 张 兴^{1,3}

(1. 西北农林科技大学 无公害农药研究服务中心, 陕西 杨陵 712100; 2. 西北农林科技大学 资源与环境学院, 陕西 杨陵 712100;
3. 陕西省生物农药工程技术研究中心, 陕西 杨陵 712100)

摘 要:用 RP-HPLC 法同时测定了沙地柏 3 种鬼臼类化合物(鬼臼毒素、脱氧鬼臼毒素和苦鬼臼毒素)的含量。采用 YMC C₁₈ 反相柱, 甲醇: 水(55: 45)为流动相, 紫外检测波长为 290 nm, 鬼臼毒素和脱氧鬼臼毒素在 62.50~1 000.00 $\mu\text{g/mL}$ 范围内的线性方程分别为: $Y=(3.5024+252.1221X)\times 10^{-6}$, $Y=(3.5805+621.0468X)\times 10^{-6}$; 相关系数为 $r=0.9999$ 和 0.9992 ; 回收率分别为 100.932% ($RSD=1.388\%$) 和 98.968% ($RSD=1.108\%$); 苦鬼臼毒素在 6.25~100.00 $\mu\text{g/mL}$ 范围内的线性方程为: $Y=(4.7818+6369.7680X)\times 10^{-6}$, 相关系数 $r=0.9996$, 回收率为 100.110% ($RSD=1.344\%$)。沙地柏叶中的鬼臼毒素、脱氧鬼臼毒素和苦鬼臼毒素含量分别为 3.894、3.345、0.427 mg/g, 茎中的含量分别为 2.225、1.829、0.241 mg/g; 超临界流体萃取沙地柏叶中的 3 种化合物含量分别为 2.327、2.116、0.191 mg/g, 茎中的含量分别为 1.784、1.446、0.108 mg/g。该方法步骤简便, 结果准确, 分析速度快。

关键词:沙地柏; 鬼臼毒素; 脱氧鬼臼毒素; 苦鬼臼毒素; RP-HPLC

中图分类号:S791.440.8 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-7461(2007)02-0127-04

Quantitative Determination of the Podophyllotoxin Analogues in *Sabina vulgaris* by RP-HPLC

CHEN Yan^{1,2}, LI Guang-ze^{1*}, CAO Xue-feng^{1,2}, CHEN Cun-gen², ZHANG Xing^{1,3}

(1. Bioratonal Pesticides Research and Development Center; 2. College of Resource and Environmental Science, Northwest A & F University; 3. Shaanxi Research Center of Biopesticide Engineering and Technology, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: A RP-HPLC method was developed for the simultaneous determination of podophyllotoxin, deoxypodophyllotoxin and picropodophyllotoxin in *Sabina vulgaris*. The chromatographic system consisted of ODS column and mobile phase of methanol-water(55: 45); flow rate: 1 mL/min; detection wavelength: 290 nm linear ranges of podophyllotoxin and deoxypodophyllotoxin were 62.50~1 000.00 $\mu\text{g/mL}$, the regression equation were $Y=(3.502496+252.1221X)\times 10^{-6}$ and $Y=(3.580590+621.0468X)\times 10^{-6}$ respectively; r were 0.9999 and 0.9992; the recovery rate were 100.932% ($RSD=1.388\%$) and 98.986% ($RSD=1.108\%$) respectively. The linear range of picropodophyllotoxin was 6.25~100.00 $\mu\text{g/mL}$, the regression equation was $Y=(4.781883+6369.768X)\times 10^{-6}$, $r=0.9996$, recovery rate was 100.110% ($RSD=1.344\%$). The contents of three compounds were 3.894 mg/g, 3.345 mg/g and 0.427 mg/g respectively in extracts with Soxhlet extraction from the leaves, and 2.225 mg/g, 1.829 mg/g and 0.241 mg/g respectively from the stems. In extracts with SFE-CO₂, the content of three compounds were 2.327 mg/g, 2.116 mg/g, 0.191 mg/g respectively from the leaves, and 1.784 mg/g, 1.446 mg/g and 0.108 mg/g respectively from the stems. The method developed is simple, accurate, and rapid.

Key words: *Sabina vulgaris*; podophyllotoxin; deoxypodophyllotoxin; picropodophyllotoxin; RP-HPLC

收稿日期: 2006-05-31 修回日期: 2006-07-13

基金项目: 国家科技攻关计划“西部开发”重大项目(2004BA901A14)、国家“863”计划项目(2001AA246016)

作者简介: 陈艳(1981-), 女, 山东淄博人, 硕士, 主要研究方向为森林生态学。E-mail: yanzichen6460@163.com

* 通讯作者: 李广泽。Tel: 13720556618 E-mail: liguangze@126.com.

沙地柏(*Sabina vulgaris*) 属柏科圆柏属常绿匍匐灌木,少数为乔木,又称叉子圆柏、新疆圆柏、爬地柏等^[1]。该植物为一味传统中草药,对其化学成分研究表明,沙地柏中含有木脂素类、萜类、香豆素等类物质,其中鬼臼毒素类化合物是其重要药用成分^[2,3]。对鬼臼毒素类化合物的化学和药理研究已有 100 余年历史,并且成功开发出 etoposide(VP16)、teniposide(VM26)和 etopophos 等多个临床应用的抗癌药物,因而受到人们的极大关注^[4]。张兴^[5]等首次报道了沙地柏的杀虫作用,并进一步证实鬼臼毒素类化合物是其重要杀虫活性成分^[6]。由于鬼臼类人工半合成药物需求量的大幅增加,其主要供源植物鬼臼属植物已成为濒危物种^[7]。因此,开发包括沙地柏这种体内富含鬼臼类化合物的植物具有重要的意义,而对其体内鬼臼毒素类化合物的定量分析方法亟待建立。

鬼臼毒素的定量分析方法有变色酸法^[8]、羟胺—三氯化铁法^[9]、薄层扫描法^[10]等,目前以高效液相色谱法(HPLC)为主。程俊侠^[11]、王继栋^[12]等采用了 HPLC 法分别对沙地柏中鬼臼毒素和脱氧鬼臼毒素的含量进行了定量分析。本研究建立了一种同时测定沙地柏中鬼臼毒素、脱氧鬼臼毒素和苦鬼臼毒素 3 种鬼臼毒素类化合物含量的 RP-HPLC 法,并用此法对沙地柏茎和叶的超临界流体和索氏提取法提取产物进行了定量分析。

1 材料与方法

1.1 材料

沙地柏植物样品于 2005 年 5 月采集于陕西榆林大保当臭柏自然保护区。鬼臼毒素(podophyllotoxin)、脱氧鬼臼毒素(deoxypodophyllotoxin)、苦鬼臼毒素(picropodophyllotoxin)标准品(纯度大于 95%,由西北农林科技大学无公害农药研究服务中心从沙地柏中分离提纯得到,并经兰州大学田暄教授确认其化学结构。

仪器:高效液相色谱系统:WatersTM600 型高效液相色谱,采用 WatersTM996 型二极管阵列紫外检测器,并配有 Waters 公司的工作站软件系统。

超临界流体萃取系统:ISCOTM2-10 萃取仪,260D 柱塞泵及泵控仪,2 mL/min 同轴加热限流管及其控制仪。

1.2 方法

1.2.1 对照品溶液的制备 分别称取一定量的鬼

臼毒素、脱氧鬼臼毒素、苦鬼臼毒素标准品,加甲醇定容于 10 mL 容量瓶中,配制成浓度分别为 62.50、125.00、250.00、500.00、1 000.00 mg/L 的鬼臼毒素、脱氧鬼臼毒素的标准溶液,苦鬼臼毒素标准溶液的浓度分别为 6.25、12.50、25.00、50.00、100.00 mg/L。

1.2.2 样品溶液的提取制备 将沙地柏样品于 60℃烘箱中烘干,粉碎,过 30 目筛,分别按以下 2 种方法提取:(1)索氏法提取:称取沙地柏叶样品 5.0 g,用滤纸包好后置索氏提取器中,加入氯仿适量,热回流提取至无色,减压浓缩至浸膏状,用甲醇定容于 50 mL 容量瓶中。(2)超临界 CO₂ 萃取:上样量 1.0 g,萃取压力 41.37 MPa,萃取温度 45℃,静态萃取 15 min,然后动态萃取,CO₂ 用量 30 mL,氯仿接收,并用甲醇定容于 10 mL 容量瓶中。

1.2.3 液相色谱条件 色谱柱:YMC-C₁₈反相柱(4.6 mm×250 mm,5 μm);流动相为甲醇:水=55:45(V/V);流速 1.0 mL/min;检测波长为 290 nm;进样量 5 μL。

2 结果与分析

2.1 色谱条件的选择

分别对不同比例甲醇—水流动相条件下的分离效果进行了考察,当甲醇体积分数大于 55%时,目的组分出峰时间较短,各峰重叠,干扰分析;当甲醇体积分数小于 55%时,尽管各个目的组分能彻底分开,但峰形展宽严重,故选择甲醇:水=55:45(V/V)作为流动相。3 种物质在 217 nm 和 290 nm 均有特征吸收,但此处有吸收的成分比较多,基线也不够平稳,故本研究选用 290 nm 作为检测波长。

2.2 标准曲线的建立

3 种标准品配制的对照品溶液,分别进行 RP-HPLC 分析测定,以峰面积 *Y* 为纵坐标,标准品浓度 *X* 为横坐标进行线性回归(表 1)。3 种化合物的回归方程在线性范围内相关系数均达 0.999 0 以上,线性关系良好。

2.3 稳定性实验

取沙地柏叶的索氏提取样品溶液,每隔 2 h 测定 1 次,计算鬼臼毒素峰面积平均值为 1 373 556 (*RSD*=1.013%),脱氧鬼臼毒素峰面积平均值为 1 222 678 (*RSD*=1.296%),苦鬼臼毒素峰面积平均值为 20 602 (*RSD*=1.212%),供试品溶液在 24 h 内基本稳定。

表 1 3 种化合物的回归方程'

Table 1 Calibration curve of the three compounds

化合物	回归方程	相关系数	线性范围/(mg · L ⁻¹)
鬼臼毒素	$Y=(4.781\ 883+6\ 369.768\ X)\times 10^{-6}$	0.999 6	62.5~1 000
脱氧鬼臼毒素	$Y=(3.502\ 496+252.1221X)\times 10^{-6}$	0.999 9	62.5~1 000
苦鬼臼毒素	$Y=(3.580\ 590+621.046\ 8X)\times 10^{-6}$	0.999 2	6.25~100

2.4 精密度实验

取同一对照品溶液,重复进样 6 次,测定色谱分析方法的精密度(表 2),3 种化合物的精密度均在 2% 以下,表明仪器精密度良好,测得数据准确可靠。

精密称取已测含量的沙地柏样品 3 份,加入一定量的标准品,按照供试液的制备方法进行处理,计算回收率(表 3)。3 种化合物的回收率均达 98% 以上,回收效果良好。

2.5 加样回收实验

表 2 3 种化合物的精密度

Table 2 Precision of the three compounds

化合物	峰面积						标准偏差
	1	2	3	4	5	6	/%
鬼臼毒素	3 527 366	3 664 582	3 626 826	3 574 126	3 621 564	3 581 265	1.341
脱氧鬼臼毒素	3 655 243	3 652 013	3 652 987	3 520 140	3 685 016	3 620 689	1.598
苦鬼臼毒素	482 585	482 365	475 263	486 547	486 987	475 896	1.050

表 3 3 种化合物的加样回收率

Table 3 Recoveries of the three compounds

化合物	含量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	标准偏差/%
鬼臼毒素	3.890	4.012	7.883	99.511	100.932	1.388
	3.921	4.006	7.966	100.995		
	3.887	4.025	8.001	102.289		
脱氧鬼臼毒素	3.415	4.005	7.427	100.205	98.968	1.108
	3.364	4.016	7.316	98.098		
	3.434	4.008	7.394	98.602		
苦鬼臼毒素	0.425	1.003	1.422	98.588	100.110	1.344
	0.463	1.010	1.479	101.296		
	0.448	1.021	1.471	100.446		

2.6 样品含量测定

按 1.2.2 样品制备方法,测定提取液中 3 种鬼臼类化合物的含量(表 4),3 种化合物在沙地柏叶片中的含量均高于茎中的含量,其中鬼臼毒素含量最高,叶中含量为 3.894 mg/g,苦鬼臼毒素含量最低,叶中的含量仅为 0.427 mg/g。2 种提取方法中,索氏提取法的提取率较高。标准品和样品的色谱图见图 1 和图 2。

表 4 沙地柏茎叶样品的 CO₂ 超临界提取物与索氏法提取物中 3 种化合物的含量

Table 4 The contents of the three compounds in extracts with SFE-CO₂ and Soxhlet extraction from the leaves and stems of *S. vulgaris* / (mg · g⁻¹)

提取方法	鬼臼毒素		脱氧鬼臼毒素		苦鬼臼毒素	
	叶	茎	叶	茎	叶	茎
索氏提取	3.894±0.440	2.225±0.354	3.345±0.347	1.829±0.387	0.427±0.0421	0.241±0.0417
超临界提取	2.327±0.124	1.784±0.245	2.116±0.241	1.446±0.165	0.191±0.0224	0.108±0.0254

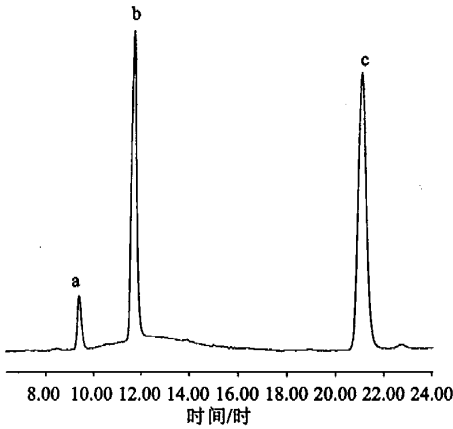


图1 标准品的HPLC图谱
Fig 1 Chromatogram of standards

注:a为苦鬼臼毒素,b为鬼臼毒素,c为脱氧鬼臼毒素,标准品三者混合比例为a:b:c=1:10:10;图2为沙地柏叶超临界萃取物的HPLC图谱。

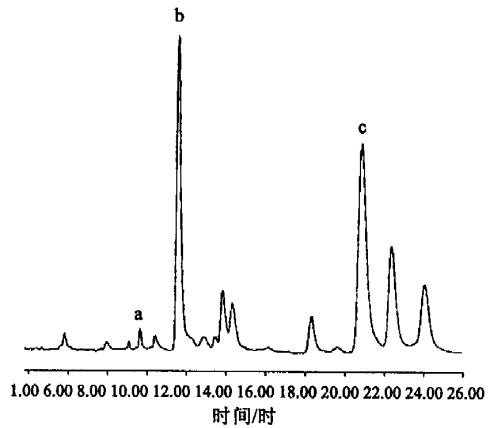


图2 样品的HPLC图谱
Fig 2 Chromatogram of sample

3 结论与讨论

实验发现,超临界萃取法的提取率较经典的索氏提取法的提取率要低,主要原因可能是萃取条件不是最优化条件,压力、温度和 CO_2 用量这3个主要影响因素的组合不是最优组合。可通过设计正交试验,确定最优化组合,还可通过加入夹带剂以提高萃取率。鬼臼毒素、脱氧鬼臼毒素和苦鬼臼毒素在沙地柏中的含量比例不同,鬼臼毒素含量最高,苦鬼臼毒素含量最低;在不同器官中分布也不同,叶中的含量要高于茎中的含量。

实验结果表明,采用本研究建立的RP-HPLC分析测定条件,鬼臼毒素、脱氧鬼臼毒素和苦鬼臼毒素均具有良好的线性关系和分离度,而且样品中的大部分色谱峰均得到有效的分离,可用于检测多种提取方法制备液中的鬼臼毒素、脱氧鬼臼毒素和苦鬼臼毒素含量。

参考文献:

[1] 中国植物志编委会. 中国植物志(第七卷)[M]. 北京:科学出版社,1978.
[2] 张兴,付昌斌,高聪芬. 新杀虫植物砂地柏研究进展[J]. 西北农

业大学学报,1995,23(4):53-57.

[3] 江苏新医学院. 中药大辞典[M]. 上海:上海科学技术出版社,1977.
[4] Lee Schacter. Etoposide phosphate: what, why, where, and how[J]. Seminars in Oncology, 1996,23 (Suppl):1-6.
[5] 张兴,冯俊涛,陈安良,等. 砂地柏杀虫作用研究概况[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版),2002,30(4):130-134.
[6] Gao R, Gao C F. Insecticidal activity of deoxypodophyllotoxin, isolated from *Juniperussabina* L, and related lignans against larvae of *Pieris rapae* L[J]. Pest. Manag. Sci., 2004,60:1131-1136.
[7] 杨显志,邵华,张玲琪,等. 鬼臼毒素资源研究现状[J]. 中草药,2001,32(11):1042-1044.
[8] 王丽平,叶海燕,郁人海. 八角莲注射液的比色测定[J]. 上海第二医科大学学报,1990,10(4):341.
[9] 李广译. 砂地柏化学成分及其杀虫活性研究[D]. 西北农林科技大学博士论文,2006.
[10] 董晓萍,曾莉. 川产八角莲中鬼臼毒素的分离测定及含量测定[J]. 天然产物研究与开发,1994,6(2):17-20.
[11] 程俊侠,苏世平,杨永志,等. 不同生境和年龄砂地柏茎叶中鬼臼毒素含量的SFE-HPLC分析[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版),2005,33(4):57-60.
[12] 王继栋,张兴. 砂地柏中脱氧鬼臼毒素含量与杀虫活性测试[J]. 西北农业大学学报,2000,28(5):14-17.