

芫花中抗肿瘤活性成分瑞香烷型二萜的含量测定研究

陈少茹¹ 张诚光¹ 陈雪婷^{1,2} 詹利之³

(1 广东省第二中医院/广东省中医药工程技术研究院, 广州, 510095; 2 广东省中医药研究开发重点实验室, 广州, 510095; 3 广州中医药大学热带医学研究所, 广州, 510405)

摘要 目的: 建立 HPLC 法同时测定不同产地芫花药材中 7 个具有抗肿瘤活性的瑞香烷型二萜[yuanhuadine(1), yuanhuafine(2), genkwadaphnine(3), yuanhuacine(2), yuanhuahine(5), yuanhualine(6), isoyuanhuadine(7)] 的含量。方法: 芫花以 75% 乙醇水溶液提取; 色谱柱为 ZorbaxEclipse SB-C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相: 乙睛-0.1% 冰醋酸水, 检测波长: 230 nm, 柱温: 40 ℃, 流速: 0.8 mL/min, 进样量: 10 μL, 洗脱梯度: 采用二元梯度洗脱系统, 溶剂 A(乙睛), B(水-0.1% 冰醋酸)。结果: 上述 7 个瑞香烷型二萜的线性关系良好($r \geq 0.9941$), 平均加样回收率为 98.1%~104.5%。不同生长环境的芫花中的 7 个成分各自含量有所差别。结论: 该方法可用于中药芫花中瑞香烷型二萜的含量测定研究。

关键词 芫花; 瑞香烷型二萜; HPLC; 含量测定

Simultaneous Determination of Antitumor Activity Daphne-Type Diterpene in Daphne Genkwa Using a HPLC Method

Chen Shaoru¹, Zhang Chengguang¹, Chen Xueting^{1,2}, Zhan Lizhi³

(1 Guangdong Second Traditional Chinese Medicine Hospital, Guangdong Research Institute of TCM Manufacturing Technology, Guangzhou 510095, China; 2 Guangdong Provincial Key Laboratory of Research and Development in TCM, Guangzhou 510095, China; 3 Institute of Tropical Medicine, Guangzhou University of Chinese medicine, Guangzhou 510405, China)

Abstract Objective: To simultaneous determinate 7 antitumor activity Daphne-type diterpene in Daphne genkwa using a HPLC method (yuanhuadine (1), yuanhuafine (2), genkwadaphnine (3), yuanhuacine (2), yuanhuahine (5), yuanhualine (6), isoyuanhuadine (7)). **Methods:** Daphne genkwa was extracted with 75% ethanol solution; the selection of column was ZorbaxEclipse SB-C18 (250 mm × 4.6 mm, 5 m); mobile phase was acetonitrile-0.1% acetic acid water; detection wavelength was 230 nm; column temperature was 40 degrees centigrade; the flow rate was 0.8 mL/min; sample volume was 10 μL; elution gradient was gradient elution system using solvent A (acetonitrile), B (water, 0.1% acetic acid). **Results:** All of the 7 calibration curves mentioned above showed good linearity ($r \geq 0.9941$), the average recovery rate was 98.1%-104.5%. The contents of 7 components in Daphne Genkwa indifferent growing environments were different. **Conclusion:** This method can be used for the determination of Daphne-type diterpene in Daphne genkwa.

Key Words Daphne genkwa; Daphne-type diterpene; HPLC; Determination

中图分类号: R284.1 文献标识码: A doi: 10.3969/j.issn.1673-7202.2018.12.058

芫花 (*Daphne genkwa* Sieb. et Zucc) 为瑞香科 (*Thymelaeaceae*) 瑞香属 (*Daphne* L.) 植物, 又名杜芫, 老鼠花, 棉花条, 头痛花, 药鱼草 (河北), 黄阳花 (陕西), 野丁香花 (山东), 山麻皮 (浙江)^[1]。芫花功能与主治为泻水逐饮, 解毒杀虫, 用于水肿胀满, 胸腹积水, 痰饮积聚, 气逆喘咳, 二便不利, 外治疥癣秃疮, 冻疮^[2-3], 富含二萜类化合物, 主要为瑞香烷型二萜, 同时富含黄酮及双黄酮类化合物, 还有香豆素类、木脂素类, 绿原酸类等多种化学成分。芫花的主要活性成分具有利尿泻下和抗生育作用^[4-5], 其中抗肿瘤作用为目前研究芫花的热点, 而瑞香烷型二萜正是发挥其抗肿瘤作用的主要物质基础^[6-8]。现在关于瑞香烷型二萜的报道, 多集中于分离和抗肿瘤

活性研究, 在质量控制方面的研究较为薄弱, 缺乏系统评价质量的成分研究。

本实验对芫花中主要的活性成分瑞香烷型二萜: yuanhuadine(1), yuanhuafine(2), genkwadaphnine(3), yuanhuacine(2), yuanhuahine(5), yuanhualine(6), isoyuanhuadine(7) 进行含量测定研究, 建立有效的 HPLC 方法, 同时测定 7 个具有抗肿瘤活性的二萜, 并对采摘自 6 个不同地区的芫花中的 7 个二萜进行含量测定分析, 为以后芫花中瑞香烷型二萜的质量控制提供参考依据。分子式见图 1。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 Gilent 1200 型高效液相色谱仪 (四元泵、ALS、TCC、VWD 和 Chemstation 工作站), 色谱

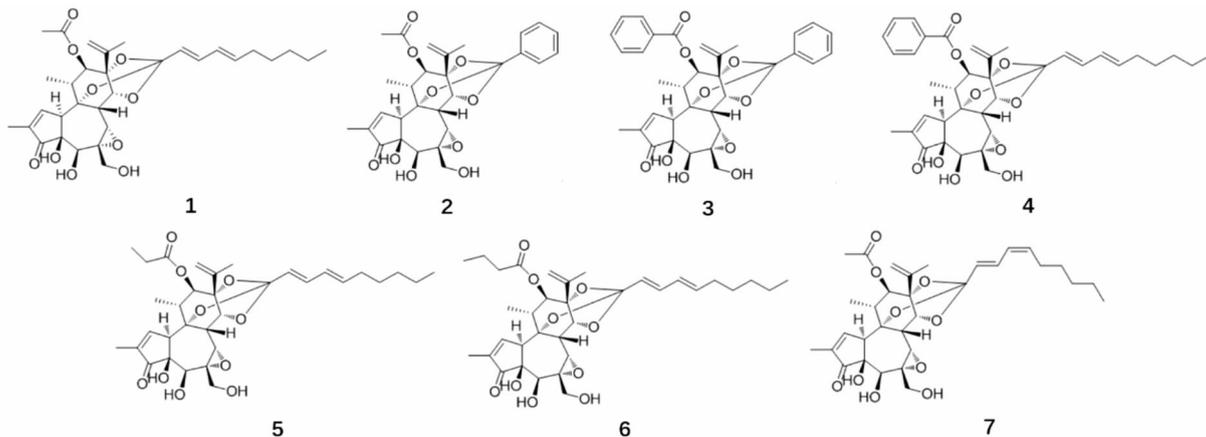


图1 芫花中7个瑞香烷型二萜

柱: ZorbaxEclipse SB-C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), SartoiuSCP-225D 型电子分析天平 (Sartoius 有限公司), BUCHI 旋转蒸发仪 (瑞士), 金利牌超声波清洗器 (浙江象山县石浦海天电子仪器厂), ALC-1100 型电子分析天平 (北京 Sartoius 科学仪器有限公司)。

1.2 试剂 Yuanhuacine (2) 对照品, 批号 ASD-00032031, 纯度 95.7%, 购自上海迈瑞尔化学技术有限公司, yuanhuadine (1), genkwadaphnine (3), yuanhuacine (4), yuanhuahine (5), yuanhualine (6), isoyuanhuadine (7), 对照品 (1, 3-7) 为实验室通过对芫花分离得到, 其纯度分别为 94.2% (1), 98.1% (3), 92.9% (4), 94.1% (5), 93.7% (6), 93.9% (7), 无水乙醇、磷酸均为分析纯, 甲醇、乙腈为色谱纯 (山东禹王实业有限公司禹城化工厂)。

1.3 分析样品 采集 6 批芫花药材 (河北、山西、陕西、甘肃、山东、江苏), 经广州中医药大学中药学院中药鉴定教研室李小翠副教授鉴定为瑞香科瑞香属芫花 *Daphne genkwa*。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱: ZorbaxEclipse SB-C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相: 乙腈-0.1% 冰醋酸水, 检测波长 230 nm, 进样量 10 μL, 流速 0.8 mL/min, 柱温 40 °C, 采用二元梯度洗脱系统, 溶剂 A (乙腈), B (水、0.1% 冰醋酸) 梯度洗脱。见表 1。

表 1 流动相梯度

时间 (min)	A (%)	B (%)
0	16	84
15	36	64
24	50	50
33	80	20

2.2 对照品溶液的制备 将对照品加适量甲醇溶

解, 并稀释成浓度为 0.632 1, 5.022, 12, 33, 24.66, 80.1 mg/mL, 混合放置于 4 °C 冰箱冷藏保存备用。参照物的选择: Yuanhuacine (2) 为芫花的主要有效成分之一, 且 Yuanhuacine (2) 与其他成分的色谱峰分离度较好, 因此选择 Yuanhuacine (2) 为参照物。

2.3 供试品溶液的制备 将粉碎的芫花过四号筛混匀, 精密称取芫花粉末 0.25 g, 放置于带塞的锥形瓶中, 精密加入 75% 乙醇 30 mL 并称定重量, 超声处理 60 min 后再称定重量, 用 75% 乙醇补足减失的重量, 滤过并取续滤液约 6 mL, 过 C₁₈ 固相萃取小柱, 弃去约 2 mL 滤液, 其余滤液用 0.45 μm 的滤膜滤过即得。

2.4 提取溶剂的筛选 提取溶剂的选择: 采用超声提取法, 分别用水、90% 乙醇、75% 乙醇、50% 乙醇和同样浓度的甲醇进行提取, 结果 75% 甲醇和 75% 乙醇在上述色谱条件下, 进样检测并记录色谱图, 所含峰数较多, 分离度良好, 而且 75% 甲醇和 75% 乙醇提取的效率无明显差异, 考虑到甲醇具有毒性, 因此选用 75% 乙醇作为芫花的提取溶剂。

2.5 线性关系考察 取“2.4”项下各对照品储备液适量, 以甲醇依次稀释成系列对照品溶液, 分别吸取 10 μL 注入 Gilent 1200 型高效液相色谱仪进行检测, 以各成分峰面积与对照品的进样量 (μg) 进行线性回归, 得到各对照品的回归方程和线性范围, 具体见表 2。

2.6 中间精密度试验 取同一供试品溶液 (河北采集样品) 10 μL, 连续进样 5 次, 结果 yuanhuadine (1), Yuanhuacine (2), genkwadaphnine (3), yuanhuacine (4), yuanhuahine (5), yuanhualine (6), isoyuanhuadine (7) 峰面积的 RSD 分别为 2.51%、3.84%、2.77%、2.12%、3.31%、1.35% 和 3.14% 表明本法日内精密度良好; 取同一供试品溶液连续 3 d 每天

进样3次,结果 yuanhuadine (1), Yuanhuacine (2), genkwadaphnine (3), yuanhuacine (4), yuanhuahine (5), yuanhualine (6), isoyuanhuadine (7) 峰面积的 RSD 分别为 2.65%、3.91%、4.11%、2.57%、1.78%、4.07% 和 2.46%,表明本法日间精密度良好。

2.7 供试品溶液稳定性试验 取供试品溶液,分别于 24 h、12 h、8 h、4 h、2 h 和 0 h 进样 10 μL 进行检测, yuanhuadine (1), Yuanhuacine (2), genkwadaphnine (3), yuanhuacine (4), yuanhuahine (5), yuanhualine (6), isoyuanhuadine (7) 峰面积的 RSD 分别为 3.11%、2.58%、2.19%、2.14%、2.81%、3.45% 和 2.11%,结果显示供试品溶液在制备后 24 h 内保持稳定。

2.8 重复性试验 取芫花样品(河北采集样品)5份,精密称定并按“2.4”项下方法制备供试品溶液,

按“2.2”项下条件进样检测,结果测得 yuanhuadine (1), Yuanhuacine (2), genkwadaphnine (3), yuanhuacine (4), yuanhuahine (5), yuanhualine (6), isoyuanhuadine (7) 的平均含量分别为 4.64、8.16、23.94、12.44、4.12、9.12 和 2.14 mg/g, RSD 分别为 0.5%、0.7%、0.6%、2.2% 和 0.5%,表明该方法重复性良好。

2.9 回收率试验 精密称取已知含量的芫花样品(河北采集样品)5份,每份 0.25 g,精密加入各自对照溶液适量,按“2.4”项下方法制备供试溶液,按“2.2”项下条件进样测定并计算加样回收率,结果见表 2。

2.10 样品测定结果 取 6 批不同产地的芫花样品,按“2.4”项下方法制备供试品溶液,精密吸取 10 μL 进样测定,采用外标法计算芫花样品含量,具体结果见表 3,色谱图见图 2。

表 2 7 个二萜的线性、精密度、重复性和稳定性考察 (n=5)

二萜	线性			日间精密度 (RSD%)	日内精密度 (RSD%)	再现性 (RSD%)	稳定性 (RSD%)	回收	
	线性范围 (ng/mL)	回归方程式	r 值					平均值 (%)	RSD (%)
1	0.28-2.80	Y = 1.803X + 0.268	0.9941	2.51	2.65	3.67	3.11	104.5	3.56
2	0.30-1.50	Y = 1.312X + 0.11	0.9967	3.84	3.91	4.45	2.58	98.7	3.45
3	0.29-2.97	Y = 1.556X + 0.832	0.9968	2.77	4.11	4.18	2.19	103.4	3.98
4	0.34-1.71	Y = 2.2157 + 0.717	0.9971	2.12	2.57	3.52	2.14	98.2	3.76
5	0.26-2.61	Y = 2.277X + 0.783	0.9952	3.31	1.78	5.71	2.81	98.1	2.97
6	0.20-1.71	Y = 1.0473X + 0.295	0.9967	1.35	4.07	4.34	3.45	103.4	2.13
7	0.31-3.10	Y = 1.3003X + 0.431	0.9971	3.14	2.46	3.14	2.21	102.8	3.67

表 3 不同产地芫花中 7 个瑞香烷型二萜的含量差异

产地	二萜							总含量
	化合物 1	化合物 2	化合物 3	化合物 4	化合物 5	化合物 6	化合物 7	
河北	4.64	8.16	23.94	12.44	4.12	9.12	2.14	64.56
山西	5.51	7.26	22.07	18.96	5.43	11.43	5.35	76.01
陕西	2.42	8.56	18.32	15.46	1.43	19.17	8.22	73.58
甘肃	7.63	25.32	20.90	20.39	11.23	13.70	6.75	105.92
山东	3.65	12.90	22.50	15.12	2.14	7.63	10.87	74.81
江苏	4.21	9.64	7.85	4.32	2.70	4.88	8.41	42.01

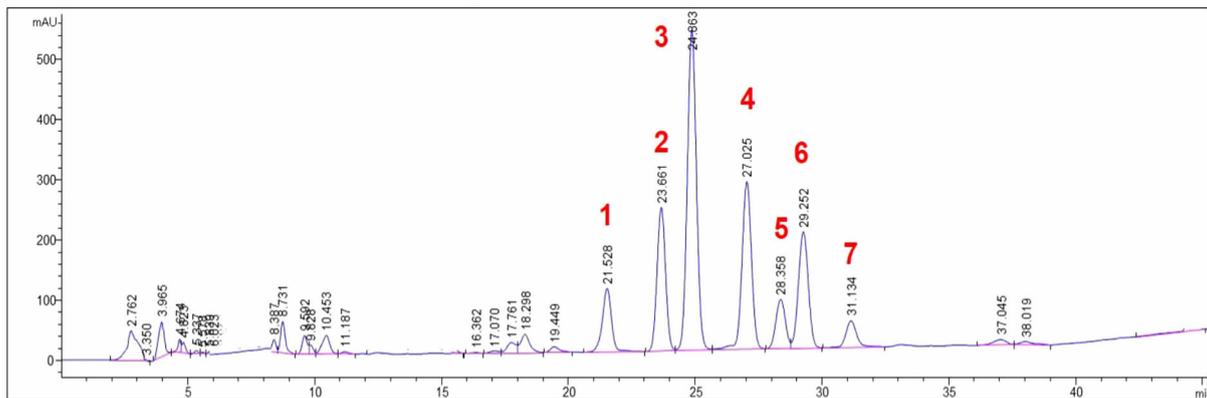


图 2 中药芫花瑞香烷型二萜的 HPLC 图谱

注:1 yuanhuadine (1), 2 Yuanhuacine (2), 3 genkwadaphnine (3), 4 yuanhuacine (4), 5 yuanhuahine (5), 6 yuanhualine (6), 7 isoyuanhuadine (7)

3 讨论

本人在做全波长扫描,考察不同吸收波长的图谱时,重点考察了210 μm 、230 μm 、254 μm 、280 μm 和360 μm 处的图谱特征。在230 μm 处各成分具有较好的紫外吸收,基线平稳,分离度较好。因此,选择230 μm 为芫花中抗肿瘤成分瑞香烷型二萜的检测波长。有研究显示挥发性成分多存在于职务的根、茎、叶中,多数为萜类、芳香族类,其中萜类及其衍生物含有浓度较高的挥发油,查阅大量文献^[9-13]我们发现目前关于萜类及其衍生物的提取方法多样,有蒸馏法、超声提纯法、醇提法等,在流动相的选择方面,本人分别选了甲醇-水、甲醇-冰醋酸水作为流动相进行检测,结果发现分离效果不理想,在采用乙腈-水进行检测时,分离效果进一步提高,再尝试加入冰醋酸改善分离效果,结果发现有更好的分离效果,故选择乙腈-0.1%冰醋酸水作为检测芫花的流动相。

从测定结果来看,7个瑞香烷型二萜的含量均很大,而且文献报道这7个测试化合物均具有较好的抗肿瘤活性,说明我们测定的7个化合物具备较强的代表性;从6个不同产地的芫花药材测定结果来看,7个二萜均可以被检测到,且化合物 genkwadaphnine(3)在6个产地的含量均较高,可以为以后深入研究芫花的质量控制提供参考依据;从总含量上看,来自甘肃的芫花药材中7个瑞香烷型二萜含量明显高于其他产地,提示二萜的含量可能和地域有关,并且我们还可以看到在地处平原气候的地区如:河北、山西、陕西、山东产地的药材中瑞香烷型二萜含量较接近,而处于较为南部的江苏省产地的芫花中瑞香烷型二萜则较少,结合文献报道的相关依据,我们可以推测作为次级代谢产物的瑞香烷型二萜的含量是和产地、环境因素有关的^[14-16]。

本文通过色谱条件的探索研究,建立了简单、有效的测定芫花中抗肿瘤活性成分瑞香烷二萜的方法,能够检测出芫花中抗肿瘤活性成分瑞香烷型二萜较高的含量,为后续更好的对这类二萜的质量控

制提供了理论依据。

参考文献

- [1]王成瑞,陈政雄,应百平,等.芫花根有效成分的研究Ⅱ.新的抗生育二萜芫花酯乙的分离与结构[J].化学学报,1981,39(5):421-425.
- [2]王世瑄.芫花酯甲的临床应用[J].实用妇产科杂志,1990,6(6):284-286.
- [3]Xu WC, Shen JG, Jiang JQ. Phytochemical and biological studies of the plants from the genus *Daphne* [J]. Chem Biodivers, 2011, 8(7): 1215-1233.
- [4]L. Z. Li, P. Y. Gao, Y. Peng, L. H. Wang, S. J. Song. A novel Daphne-type diterpen from the flower bud of *Daphne genkwa* [J]. Chemistry of Natural Compounds, 2010, 46(3): 380-382.
- [5]李玲芝.芫花的化学成分及生物活性研究[D].沈阳:沈阳药科大学,2010.
- [6]张薇,柳润辉,张川,等.瑞香属植物化学成分及其药理与临床作用的研究[J].药学进展,2005,29(1):22-27.
- [7]韩伟,徐子芳,宋小妹,等.芫花药材物质基础研究[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(15):46-49.
- [8]鞠秀兰.芫花及其主要有效成分芫花酯甲抗癌活性研究进展[J].科技创新导报,2010,7(15):16-16.
- [9]Fu XC, Wang GP, Shan HL, et al. Predicting blood-brain barrier penetration from molecular weight and number of polar atoms [J]. Eur J Pharm Biopharm, 2008, 70(2): 462-466.
- [10]Youdim KA, Qaiser MZ, Begley DJ, et al. Flavonoid permeability across an in situ model of the blood-brain barrier [J]. Free Radic Biol Med, 2004, 36(5): 592-604.
- [11]黄越燕,周吉芳,徐佳颖.有毒中药抗肿瘤作用的研究进展[J].山东医药,2017,57(2):108-112.
- [12]邵泽艳,商倩,赵娜夏,等.芫花中瑞香烷型二萜原酸酯类化合物及其肿瘤细胞毒性[J].中草药,2013,44(2):128-132.
- [13]王成瑞,黄慧珠,韩玖,等.新二萜原酸酯黄瑞香甲素的分离与结构的确定[J].西北农林科技大学学报:自然科学版,1980,8(3):37-38.
- [14]Jiang HL, Wang R, Li JY, et al. A new highly oxygenated daphnane diterpene esters from the flower buds of *Daphne genkwa* [J]. Nat Prod Res, 2015, 29(20): 1878-1883.
- [15]姚晶萍,倪延群,王莹威,等.芫花根总黄酮抗肿瘤活性的研究[J].首都医药,2011,18(14):19-22.
- [16]魏志文,高晓雯,郑维发.芫花根总黄酮抗肿瘤活性研究[J].解放军药学报,2008,24(2):116-120.

(2018-08-08 收稿 责任编辑:王明)