

HPLC法测定绿芜菁中斑蝥素的含量^Δ

王腾蛟^{1*}, 赵成坚², 谷颖乐², 徐永莉², 李力^{2#}(1.广西师范学院化学与材料科学学院, 南宁 530001; 2.广西壮族自治区药用植物园, 南宁 530023)

中图分类号 R284.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)07-0930-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.07.16

摘要 目的:建立绿芜菁中斑蝥素的含量测定方法,并将测定结果用于筛选提取斑蝥素来源药材的依据。方法:以丙酮为溶剂,采用超声提取法提取绿芜菁中斑蝥素;采用高效液相色谱法测定斑蝥素的含量;色谱柱为C₁₈,流动相为甲醇-水(23:77),检测波长为230 nm,流速为1.0 mL/min,柱温为35 ℃,进样量为10 μL;检测绿芜菁中斑蝥素的含量并与采用《中国药典》方法(以氯仿为提取溶剂)测定含量的结果进行比较。结果:斑蝥素检测质量浓度线性范围为0.2~1.0 mg/mL($r=0.998\ 8$),平均方法回收率为101.1%(RSD为1.7%, $n=6$);绿芜菁中斑蝥素的平均含量为0.932%($n=3$),采用《中国药典》方法测得的含量为0.793%($n=3$),均高于《中国药典》项下斑蝥素来源药材中斑蝥素含量需大于0.35%的要求。结论:建立的绿芜菁中斑蝥素的含量测定方法准确可靠;绿芜菁中斑蝥素的含量达到《中国药典》的要求,可用作提取斑蝥素的来源药材。

关键词 绿芜菁;斑蝥素;高效液相色谱法;丙酮提取;含量测定

Content Determination of Cantharidin in *Lytta caraganae* by HPLC

WANG Tengjiao¹, ZHAO Chengjian², GU Yingle², XU Yongli², LI Li² (1.College of Chemistry and Materials Science, Guangxi Teachers Education University, Nanning 530001, China; 2.Guangxi Zhuang Autonomous Region Botanical Garden of Medicinal Plant, Nanning 530023, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the method for content determination of cantharidin in *Lytta caraganae*, and to use the result as the extract screening evidence of *L. caraganae* source material. METHODS: Ultrasonic extraction method was used to extract cantharidin from *L. caraganae* using acetone as solvent. HPLC method was adopted to determine the content of cantharidin. The determination was performed on C₁₈ column with mobile phase consisted of methanol-water (23:77) at flow rate of 1.0 mL/min. The detection wavelength was set 230 nm, the column temperature was set at 35 ℃, and sample size was 10 μL. The content of cantharidin in *L. caraganae* was determined and compared with the results of content determination by the method stated in *Chinese Pharmacopeia* (using chloroform as extraction solvent). RESULTS: The liner range of cantharidin were 0.2-1.0 mg/mL ($r=0.998\ 8$) with average methodology recovery rates of 101.1% (RSD=1.7%, $n=6$). The average content of cantharidin in *L. caraganae* was 0.932% ($n=3$), while the content of cantharidin was 0.793% ($n=3$) determined by the method stated in *Chinese Pharmacopeia*. Both were higher than the requirement of *Chinese Pharmacopeia* that the content of cantharidin in source material of cantharidin was higher than 0.35%. CONCLUSIONS: Established method is accurate and reliable for the content determination cantharidin in *L. caraganae*. The content of cantharidin is up to the standard of *Chinese Pharmacopeia*, and can be used as source material for exacting cantharidin.

KEYWORDS *Lytta caraganae*; Cantharidin; HPLC; Acetone extraction; Content determination

芜菁为鞘翅目(Coleoptera)芜菁科(Meloidae)昆虫的通称,是多食亚目的一个重要类群,又名斑蝥或地胆、葛上亭长。斑蝥入药始载于《神农本草经》,其具有破血逐瘀、散结消癥、攻毒蚀疮的功效^[1],用于治疗癥瘕、经闭、顽癣、瘰疬、赘疣、痈疽不溃、恶疮死肌等症。现代临床医学将斑蝥中主要成分斑蝥素(Cantharidin, CTD, C₁₀H₁₂O₄)用于治疗神经性皮炎、颜面神经麻痹、斑秃、顽癣、过敏性鼻炎等症^[2],该成分还主要具有抗肿瘤活性。

^Δ 基金项目:广西科学研究与技术开发计划项目(No.桂科能1598025-19)

* 硕士研究生。研究方向:有机化学。E-mail:1214534964@qq.com

通信作者:研究员,博士。研究方向:药用动物资源开发利用。E-mail:liboshi1963@vip.163.com

2015年版《中国药典》(一部)所载药用斑蝥有2种,即南方大斑蝥(大斑芜菁, *Mylabris phalerata* Pallas)和黄黑小斑蝥(眼斑芜菁, *Mylabris cichorii* Linnaeus)^[3]。据相关文献报道,南方大斑蝥中斑蝥素含量一般为1.0%~1.2%,黄黑小斑蝥中斑蝥素含量为1.0%左右,但亦有达1.3%者。另一种含斑蝥素的芜菁科昆虫贵州短翅豆芜菁中斑蝥素含量为2.7%^[4-6]。《中国药典》规定药材中斑蝥素含量不得少于0.35%^[3]。随着对斑蝥素研究的不断深入,其来源药材大斑芜菁和眼斑芜菁的数量急剧下降,故开发新的含有斑蝥素的昆虫资源已经迫在眉睫。绿芜菁属于鞘翅目芜菁科绿芜菁属(*Lytta*),又名青娘子,主要分布于北京、浙江、河北等省市以及东北三省、内蒙古和新疆等自治区。绿芜菁成虫和幼虫中均含有

斑蝥素,且这种野生昆虫数量巨大,并已经实现人工饲养^[7-8]。已有利用贵州短翅豆芫菁等提取斑蝥素并测定其含量的报道^[5],但目前尚未见对绿芫菁中斑蝥素含量进行研究的报道。因此,本研究采用高效液相色谱(HPLC)法测定绿芫菁中斑蝥素的含量,通过其含量的高低确定是否可将绿芫菁作为提取斑蝥素的来源药材。

1 材料

1.1 仪器

2695 HPLC 仪、2489 紫外检测器(美国 Waters 公司);KQ-700DV 台式数控超声波清洗器(昆山舒美超声仪器有限公司);XS205 DualRange 分析天平(瑞士梅特勒-托利多仪器有限公司);Himac CR22G 高速冷冻离心机(日本日立公司);RV10 旋转蒸发器(德国 IKA 公司)。

1.2 药材与试剂

绿芫菁购自河北安国中药材市场,由广西药用植物园主任技师谢保令鉴定为正品(2017年9月);斑蝥素对照品(上海柏卡化学技术有限公司,cas号:56-25-7,批号: MUST17022706,纯度: >98%);甲醇、乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的制备

精密称取斑蝥素对照品 100.00 mg,加入乙腈使其溶解,稀释并定容至 100 mL 量瓶中,摇匀,制备成 1 mg/mL 的对照品贮备溶液,并储存在冰箱中。使用时,用乙腈稀释成所需质量浓度的对照品溶液。

2.2 供试品溶液的制备

将绿芫菁成体进行前处理。60 °C 烘干,粉碎,过筛。称取粉末约 1 g,精密称定,置于具塞锥形瓶中;加入丙酮超声处理(功率:400 W,频率:40 kHz)3次(每次 100 mL、50 min),合并丙酮溶液,过滤,用少量丙酮淋洗沉淀^[8]。将提取出的斑蝥素混合液进行纯化,先经过无水碳酸钠柱除油,再经过无水硫酸钠柱除水,并用少量丙酮淋洗柱子。将过柱液在具塞锥形瓶中用旋转蒸发器旋转浓缩致干(转速 80 r/min、温度 55 °C),残渣加入 2 mL 乙腈,摇匀,并用 0.45 μm 的一次性针筒过滤器过滤后,滤液保存备用。

2.3 绿芫菁中斑蝥素的含量测定

2.3.1 色谱条件 色谱柱为安捷伦公司的 C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5.0 μm);流动相为甲醇-水(23:77, V/V);流速为 1.0 mL/min;检测波长为 230 nm;柱温为 35 °C;进样量为 10 μL。取“2.2”项下溶液在 220~400 nm 波长下扫描,紫外吸收光谱见图 1;取“2.1”“2.2”项下溶液进色谱仪分析,理论板数按斑蝥素峰计应不低于 3 000。色谱图见图 2。

2.3.2 线性关系考察 精密制备 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mg/mL 系列质量浓度的斑蝥素对照品溶液,进样分析。以色谱峰面积为纵坐标(y)、斑蝥素质量浓度为横坐标

(x)绘制标准曲线,计算得回归方程为 $y=103.5x-7.9$ ($r=0.9988$)。表明斑蝥素检测质量浓度线性范围为 0.2~1.0 mg/mL。

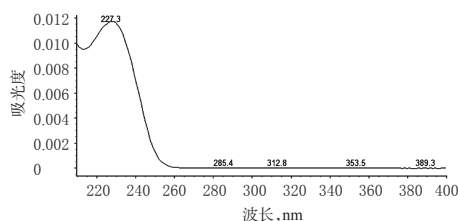


图1 紫外吸收光谱图

Fig 1 UV absorption spectra

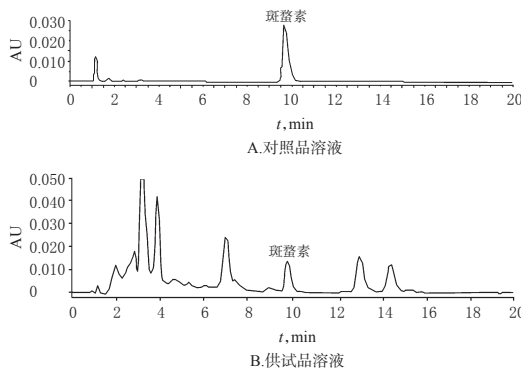


图2 高效液相色谱图

Fig 2 HPLC chromatograms

2.3.3 精密度试验 精密吸取 0.4 mg/mL 斑蝥素对照品溶液,连续进样 5 次,每次 10 μL,测定峰面积并计算 RSD。结果,峰面积的 RSD 为 0.4% ($n=5$),表明仪器精密度良好。

2.3.4 重复性试验 称取同一批干燥绿芫菁粉末,共 4 份,分别按“2.2”项下方法制备供试品溶液,进样测定并计算 RSD。结果,峰面积的 RSD 为 0.8% ($n=4$),表明本方法重复性好。

2.3.5 稳定性试验 取同一供试品溶液,分别于制备后 0、2、4、8、12 h 注入液相色谱仪,记录色谱图。结果,峰面积的 RSD 为 1.6% ($n=5$),表明供试品溶液在放置 12 h 内稳定。

2.3.6 油脂及水的干扰试验 取 0.2 mg/mL 斑蝥素对照品溶液,精密吸取 2.0 mL,分别置于 10 个离心管中,编号为 1~10,均加入 10 μL 无水丙酮。将前 5 个离心管中的混合液分别过无水碳酸钠柱和无水硫酸钠柱,后 5 个离心管不过柱。取各管液进样测定,计算其中斑蝥素的含量。

结果,编号 1~5 各管样品中斑蝥素的平均含量为 204.248 μg/L (RSD=0.7%, $n=5$),测量值与真实值偏差为 2%;编号 6~10 各管样品中的斑蝥素平均含量为 167.900 μg/L (RSD=3.0%, $n=5$),测量值与真实值偏差为 16%,表明油脂及水对试验结果的干扰较大。因此,去除油脂及水后能显著提高试验结果的准确度。

2.3.7 准确度试验 分别精密称定已知含量的绿芫菁

粉末 1.0 g,共 6 份,各加入相同量的绿芜菁对照品,按“2.2”项下方法制备供试品溶液,进样测定,计算回收率。结果,斑蝥素的平均回收率为 101.1% (RSD=1.7%, n=6),详见表 1。

表 1 回收率试验结果 (n=6)

Tab 1 Results of recovery tests (n=6)

序号	样品含量,mg	加入对照品量,mg	测得量,mg	回收率,%	平均回收率,%	RSD,%
1	3.404	1.00	4.412	101.9	101.1	1.7
2	3.396	1.00	4.395	99.7		
3	3.399	1.00	4.396	99.2		
4	3.435	1.00	4.439	100.9		
5	3.413	1.00	4.432	104.6		
6	3.395	1.00	4.394	100.5		

2.3.8 样品含量测定 取样品 3 份,按照“2.2”项下方法制备成供试品溶液,按“2.3.1”项下色谱条件,每份供试品连续进样 3 次,每次进样 10 μ L,记录峰面积,计算绿芜菁中斑蝥素含量。结果,3 份样品药材中斑蝥素含量分别为 0.927%、1.000%、0.869%,平均值为 0.932%,即每 100 g 药材中含斑蝥素 0.932 g,远高于药典中对斑蝥素来源药材的斑蝥素的含量要求。

2.3.9 《中国药典》含量测定方法结果 在《中国药典》^[2]中,供试品溶液制备时采用氯仿超声提取法提取药材中斑蝥素,按照此法提取并测定绿芜菁中斑蝥素含量。结果,3 份样品药材中斑蝥素平均含量为 0.793%。表明采用本文建立的提取方法,且以丙酮作为提取试剂,能更多地提取出绿芜菁中的斑蝥素,提取率更高。

3 讨论

3.1 提取时间考察

本文的提取方法为超声提取法,超声波可致生物体系发生各种生物效应,其中包括破坏细胞后分离出某些成分。理论上,超声时间越长对药材细胞破坏越有利^[9]。为了确定本品提取时的最优超声时间,笔者测定了供试品在加入 20 mL 丙酮后经不同时间超声(30、40、50 min)后斑蝥素的含量,各试验 3 次。结果表明,超声 30、40、50 min 时的峰面积分别为 97.605、131.810、140.206,以超声 50 min 时的峰面积最大,即提取出的斑蝥素含量最高,故最终选择超声时间为 50 min。

3.2 样品处理中的脱油、脱水操作

笔者在预试验中,取用绿芜菁、大斑芜菁、眼斑芜菁 3 种药材,在未进行脱油脂及脱水的情况下,发现绿芜菁经旋干浓缩后油脂残留较多,多次检测后的结果显示,与大斑芜菁和眼斑芜菁的供试品溶液比较,绿芜菁供试品溶液中有效成分的出峰时间不太稳定,峰面积相对较低。故笔者认为与斑芜菁和眼斑芜菁比较,在绿芜菁药材中油脂和水分较多,且对含量测定影响较大。为了确保试验结果的准确性,清除样品自身所含物质对试验结果的影响,提高斑蝥素提取率,故本次研究时设计了油脂及水的干扰试验。将供试品溶液通过无水硫酸柱和无水碳酸柱的方式进行脱油、脱水,既保证了各峰间

分离度良好,又确保了试验结果的准确性。

3.3 样品提取溶剂的选择

在提取绿芜菁的斑蝥素时,本研究使用的提取溶剂为丙酮,与《中国药典》相关操作中使用的氯仿^[2]相比,以丙酮为提取溶剂的提取率更高且操作性更强,与已有试验结果报道一致^[10-12]。这可能是因为丙酮沸点为 56 $^{\circ}$ C,而氯仿沸点为 61 $^{\circ}$ C,温度高时更易破坏有效成分,所以用丙酮提取时有效成分相对破坏量更少,提取量更高^[13]。二者的对比试验结果也表明,使用丙酮为提取试剂时,绿芜菁中斑蝥素提取率更高。

从本研究的结果可知,绿芜菁体内斑蝥素的含量达到 0.932%,符合《中国药典》中规定的斑蝥素含量不低于 0.35% 的要求^[2],即笔者认为可将绿芜菁作为提取斑蝥素的药材来源。由于近年来对具有抗癌作用的斑蝥素需求量的不断增大,导致大斑芜菁和眼斑芜菁数量急剧下降,而开发新的含有斑蝥素的昆虫资源,可缓解大斑芜菁和眼斑芜菁野生资源减少的压力,促进生态平衡,同时满足日益增长的斑蝥素的市场需求。

参考文献

- [1] 刘亚楠.中药斑蝥研究进展[J].中药与临床,2013,4(1):50-52.
- [2] 涂小云,王光耀,周淑娟.斑蝥类药材斑蝥素含量研究概况[J].中药材,2016,39(1):229-232.
- [3] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:331-332.
- [4] 张贵君.常用中药鉴定大全[M].哈尔滨:黑龙江科学技术出版社,1993:798-799.
- [5] 杨凤轩,钦忠,周建威,等.贵州短翅豆芜菁体内不同部位斑蝥素分布研究[J].江苏农业科学,2016,44(3):310-312.
- [6] 方宇凌,谭娟杰,马文珍,等.芜菁科不同种类成虫体内斑蝥素的含量[J].昆虫学报,2001,44(2):192-196.
- [7] 巴合提古丽·也山.绿芜菁在阿勒泰地区发生规律及防控措施[J].种子科技,2017,35(6):103-104.
- [8] 岳丽红,李岩岩,陈凤岚,等.佳木斯地区绿芜菁生物学特征及其药用价值分析[J].内蒙古农业科技,2012,45(5):45-46.
- [9] 梅清华,励石寒,李华忠.斑蝥素超声波提取工艺研究[J].中国医院药学杂志,2005,25(3):204-206.
- [10] 周祥敏,邹丽.高效液相色谱法测定斑蝥中斑蝥素的含量[J].食品与药品,2006,8(8):54-55.
- [11] 王贤英,杨琼芳,谢香菊.不同提取方法对斑蝥中斑蝥素含量测定的影响[J].中成药,2010,32(5):871-872.
- [12] 李俊,范红燕,王军,等.斑蝥中斑蝥素提取工艺研究[J].苏州大学学报,2011,27(2):86-95.
- [13] 杨清林,李胜荣,王贤英.斑蝥中斑蝥素的提取工艺研究[J].中国药业,2009,18(3):22-23.

(收稿日期:2017-11-16 修回日期:2018-01-24)

(编辑:刘萍)