

RP-HPLC法测定重楼中四种甾体皂苷的含量

徐丽丽¹,赵亮¹,夏晖²,张国庆¹ (1. 第二军医大学东方肝胆外科医院药材科,上海 200438; 2 第二军医大学药理学系 2004级本科实习生,上海 200433)

摘要 目的:建立反相高效液相色谱法同时测定重楼中重楼皂苷、*重楼皂苷*、*重楼皂苷*、*重楼皂苷* 4种皂苷的含量测定方法,考察重楼中 4种皂苷的含量。方法:采用色谱柱:Agilent SB C₁₈柱(4.6 mm ×150 mm, 5 μm);流动相:乙腈-水,梯度洗脱,流速 0.8 mL/min;紫外检测器,检测波长:210 nm。结果:4种重楼皂苷的标准曲线线性良好($r > 0.9998$, $n = 5$),回收率 98.12% ~ 104.3%,最低检测限 11.8 ~ 21.0 ng,最低定量限 38.4 ~ 75.0 ng。不同产地的重楼中 4种甾体皂苷的含量差异较大。结论:该方法准确、简捷,可用于重楼中 4种皂苷的定量分析。

关键词 重楼;皂苷;反相高效液相色谱法;含量测定

中图分类号:R284 文献标识码:A 文章编号:1006-0111(2009)03-0201-04

Simultaneous determination of four steroidal saponins compounds in *Paris polyphylla* by RP-HPLC method

XU Li-li¹, ZHAO Liang¹, XIA Hui², ZHANG Guo-qing¹ (1. Department of Pharmacy, Eastern Hepatobiliary Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438, China; 2. School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

ABSTRACT Objective: To establish a simultaneous determination method of steroidal saponin *重楼皂苷*, *重楼皂苷*, *重楼皂苷*, *重楼皂苷* in *Paris polyphylla* by RP-HPLC. **Methods:** The column was Agilent SB C₁₈ (4.6 mm ×150 mm, 5 μm). The mobile phase was acetonitrile-water with gradient elution at a flow rate of 0.8 mL/min. The UV detection was performed at 210 nm. **Results:** The calibration curves showed good linearity ($r > 0.9998$, $n = 5$). The recoveries of the four steroidal saponins were from 98.12% to 104.3%. The limits of detection (LOD) ranged from 11.8 to 21.0 ng and limits of quantification (LOQ) ranged from 38.4 to 75.0 ng for all the reference standards, respectively. The results showed that the contents of the four steroidal saponins in *Paris polyphylla* vary from different producing area. **Conclusion:** The method is accurate, convenient, and suitable for the quantitative analysis of four saponins from *Paris polyphylla*.

KEY WORDS *Paris polyphylla*; saponin; RP-HPLC; determination

重楼为百合科植物云南重楼 *Paris polyphylla* Smith var *yunnanensis* (Franch.) Hand-Mazz 或七叶一枝花 *Paris polyphylla* Smith var *chinensis* (Franch.) Hara 的干燥根茎^[1], 又称蚤休。该属植物主要分布于我国的云南、四川、贵州等地, 具有清热解毒、消肿止痛的功效, 主要用于咽喉肿痛、毒蛇咬伤等症, 是云南白药、宫血宁胶囊等的主要组成药物。甾体皂苷是其主要活性成分, 主要苷元为异螺甾烷醇类的薯蓣皂苷元和偏诺皂苷元, 本研究中重楼皂苷、*重楼皂苷*、*重楼皂苷* 属于薯蓣皂苷, *重楼皂苷*、*重楼皂苷* 属于偏诺皂苷, 文献多采用重楼皂苷、*重楼皂苷* 作为重楼的质量控制标准^[1,2], 为了更全面地了解重楼中甾体皂苷的成分与含量, 本文建立了重楼的前处理条件, 并通过 RP-

HPLC法采用梯度洗脱的方式同时对重楼皂苷、*重楼皂苷*、*重楼皂苷*、*重楼皂苷* 进行了分离及含量测定, 方法准确、简捷, 为重楼进一步的质量评价及合理利用提供了依据。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 Agilent 1100 高效液相色谱仪 (美国安捷伦公司), 包括低压四元梯度泵、在线脱气机、自动进样器、柱温箱、VWD 检测器、ChemStation 色谱工作站; 淀久 DJ-04 粉碎机 (上海淀久中药机械制造有限公司); METTLER AE240 型电子天平 (德国梅特勒托利多公司); KUDOS SK2200H 型超声仪 (上海科导超声仪器公司)。

1.2 试剂 乙腈为色谱纯, 水为纯化水。重楼对照药材 (云南, 批号 121157-200402)、重楼皂苷、*重楼皂苷*、*重楼皂苷*、*重楼皂苷* 对照品 (批号分别是 111590-200402、111591-200301、111592-200402、111593-200402) 均购自中国药品生物制品检定所。编号为 2 的重楼饮片 2005

作者简介:徐丽丽, (1977-), 女, 在职研究生, 主管药师。Tel: (021) 81875580, E-mail: xfn2005@126.com.

通讯作者:张国庆。Tel: (021) 81875571, E-mail: guoqing_zhang91@126.com.

年购自北京德威治药房,产地云南;其他产地的重楼饮片均于2008年4月购自上海荣庆堂药店。上述样品经第二军医大学药学院生药学教研室张汉明教授鉴定为中药重楼饮片。详细样品信息见表1。

表1 重楼样品和产地

编号	样品	产地
1	对照药材	云南
2	重楼饮片	云南
3	重楼饮片	云南
4	重楼饮片	贵州
5	重楼饮片	广西

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱: Agilent SB C₁₈柱(4.6 mm ×150 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-水, 梯度洗脱程序见表2; 流速: 0.8 mL/min; 进样量 10 μL。进样前流动相梯度初始条件平衡 10 min。检测波长: 210 nm。柱温: 25℃。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 分别精密称定重楼皂苷 10.25 mg、重楼皂苷 2.80 mg、重楼皂苷 1.57 mg、重楼皂苷 2.03 mg 置 10 mL 容量瓶中, 加

入甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得对照品溶液(1)。精密量取对照品溶液(1) 3.00 mL 置 5 mL 容量瓶中, 加入甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得对照品溶液(2); 精密量取对照品溶液(2) 2.50 mL 置 5 mL 容量瓶中, 加入甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得对照品溶液(3); 精密量取对照品溶液(3) 2.50 mL 置 5 mL 容量瓶中, 加入甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得对照品溶液(4); 精密量取对照品溶液(4) 2.50 mL 置 10 mL 容量瓶中, 加入甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得对照品溶液(5)。

表2 梯度洗脱程序表

时间 (min)	乙腈 (v/v%)	水 (v/v%)
0	20	80
10	34	66
20	38	62
25	40	60
45	60	40

2.2.2 供试品溶液的制备 取重楼饮片粉末(过60目筛)约0.4 g, 精密称定, 置 25 mL 具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 10 mL, 超声处理 30 min, 放冷至室温, 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 取续滤液作为供试品溶液, 备用。

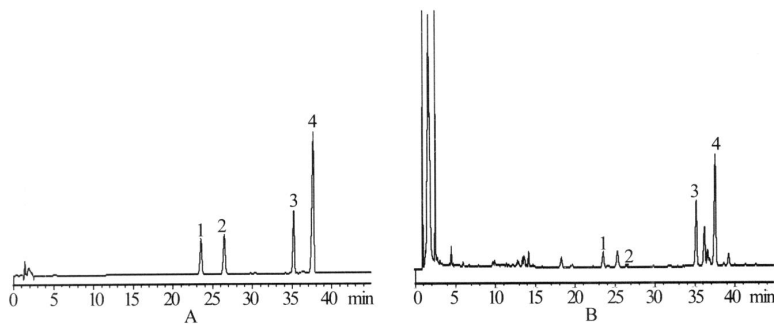


图1 重楼皂苷对照品(A)和样品(B)色谱图
1重楼皂苷 ; 2重楼皂苷 ; 3重楼皂苷 ; 4重楼皂苷

2.3 线性关系 精密吸取以上混合对照品溶液(1)~(5)由低浓度至高浓度各 20 μL 依次注入高效液相色谱仪。以进样量(μg)为横坐标, 以峰面积为纵坐标分别绘制标准曲线。计算线性回归方程、

相关系数、最低检测限、线性范围见表3。结果表明在各自的线性范围内, 4种皂苷的进样量与峰面积值之间呈良好的线性关系。

表3 4种重楼皂苷线性实验结果

皂苷	回归方程	r	检测限 (ng)	定量限 (ng)	线性范围 (μg)
	$y = 125.35x + 5.0281$	0.9999	12.8	38.4	0.7688 ~ 20.50
	$y = 161.28x + 0.1491$	0.9999	21.0	75.0	0.2100 ~ 5.600
	$y = 227.88x - 2.4734$	0.9999	11.8	42.1	0.0841 ~ 3.140
	$y = 148.28x + 1.4189$	0.9998	15.2	54.4	0.1523 ~ 4.060

2.4 精密度试验 取对照品溶液(3)连续进样5次,将该溶液放置5 d,每天进样1次,进样量为10 μ L,记录峰面积,分别进行日内精密度和日间精密度考察。结果重楼皂苷、、的日内精密度峰面积RSD分别为1.140%、1.257%、1.274%、1.300% ($n=5$),日间精密度峰面积RSD分别为3.632%、3.878%、4.476%、3.997% ($n=5$),表明4种皂苷日内精密度、日间精密度良好。

2.5 稳定性试验 取对照品溶液(3)于0、2、4、8、12、22、48、72 h分别进样10 μ L,分别记录4种皂苷的峰面积,结果重楼皂苷、、峰面积RSD分别为3.632%、3.673%、3.747%、4.273% ($n=8$),表明4种重楼皂苷在72 h内稳定性良好。

2.6 重复性试验 精密称取2号重楼饮片粉末0.4 g,按“2.2.2项”方法制备,依上述色谱条件,连续进样6次测定,进样量10 μ L,结果重楼皂苷、

、峰面积RSD分别为0.1864%、0.2264%、2.457%、1.848% ($n=6$),表明方法重复性良好。

2.7 加样回收率试验 取重楼皂苷、、含量分别为2.260%、0.9548%、0.02326%、0.2782%的2号重楼饮片粉末6份,每份约0.4 g,精密称定,分别精密加入重楼对照品溶液(1)1 mL,按“2.2.2项”方法制备,测定4种皂苷的含量,计算RSD,进行加样回收率考察,结果重楼皂苷、、加样回收率依次为98.80%、98.95%、104.3%、98.12%,RSD依次为1.630%、1.068%、0.8108%、1.143% ($n=6$)。

2.8 样品含量测定 取各产地重楼饮片粉末各约0.4 g,精密称定,分别按“2.2.2项”方法制备,测定重楼皂苷、、的含量,每个产地样品重复进样3次,进样量10 μ L,分别计算含量及RSD,结果见表4。

表4 不同产地重楼中4种皂苷的含量测定结果 ($n=3, \text{mg/g}$)

	对照药材	云南(2)	云南(3)	贵州	广西
重楼皂苷	19.28 \pm 0.068 60	22.60 \pm 0.008 970	12.73 \pm 0.024 70	37.39 \pm 0.143 0	15.05 \pm 0.029 90
RSD%	0.356 0	0.039 80	0.194 5	0.381 1	0.198 8
重楼皂苷	6.359 \pm 0.020 90	9.547 \pm 0.020 60	0.537 3 \pm 0.009 350	3.434 \pm 0.037 10	1.116 \pm 0.020 60
RSD%	0.329 3	0.216 5	1.738	1.801	1.845
重楼皂苷	未检测到	0.232 6 \pm 0.001 100	0.365 6 \pm 0.008 270	1.882 \pm 0.040 10	1.823 \pm 0.013 10
RSD%	0.472 5	2.271	2.134	0.718 1	
重楼皂苷	0.972 2 \pm 0.018 10	2.782 \pm 0.056 50	1.484 \pm 0.019 80	4.453 \pm 0.020 40	3.474 \pm 0.021 50
RSD%	1.861	2.028	1.331	0.457 1	0.618 4

3 结果与讨论

3.1 前处理条件 根据重楼有效成分的性质进行了初步预试验,采用三因素三水平正交实验设计,考察了不同提取溶剂(A:甲醇,乙醇及70%乙醇),提取时间(B:15,30,45 min)及提取溶剂体积(12,15,25 mL)对提取结果的影响。色谱条件同“2.1”,取样量为1.5 g,以所得色谱图中4种重楼皂苷色谱峰面积总和作为提取效率考察指标,最终确定影响重楼中有效化学成分提取的因素依次为:提取体积 > 提取溶剂 > 提取时间。初步确定1.5 g样品溶于25 mL甲醇,提取30 min为前处理条件,为了更进一步选取最优提取体积,在溶剂和提取时间不变的情况下,先按质量体积比等比换算,降低取样量至0.6 g样品加甲醇10 mL提取30 min,再追加0.4 g样品溶于10 mL甲醇和0.3 g样品溶于10 mL甲醇两个实验,结果显示4种重楼皂苷提取效率存在升高的趋势,但是,在0.4 g到0.3 g升高趋势较小,考虑到0.3 g样品溶于10 mL甲醇的实验结果显示重楼皂苷浓度低于定量限,因此,优化前处理条件为0.4 g样品加甲醇10 mL提取30 min。

3.2 色谱条件 实验中考察了Agilent SB C₁₈、XDB C₁₈、XDB C₈、Agilent C₈、RX C₈、Extend C₁₈等不同填料色谱柱,发现4种皂苷在Agilent SB C₁₈和XDB C₁₈柱上都能得到很好的分离效果,而Agilent SB C₁₈柱得到的色谱峰对称性更好,因此选择了Agilent SB C₁₈柱;考察了甲醇-水和乙腈-水两个流动相系统并比较了梯度洗脱和等度洗脱两种分离手段,发现甲醇-水流动相系统在210 nm检测条件下基线不稳,梯度洗脱和等度洗脱都能够分离4种皂苷,等度洗脱中4种皂苷保留时间较梯度洗脱略短,但梯度洗脱能更好地反映药材较为完整的色谱信息,故选择了乙腈-水流动相系统,采用梯度洗脱;考察了15、25、30、35、40、50 5个不同温度,随着温度升高,保留时间相应缩短,但目标色谱峰分离度减小,综合考虑选择25 作为分离柱温;考察了0.5、0.8、1.0、1.2 mL/min等不同流速,随着流速升高,保留时间递减的同时,目标色谱峰对称性变差、分离度减小,最后选择流速为0.8 mL/min。

3.3 含量测定 本研究采用梯度洗脱,对5份重楼样品中的4种皂苷同时进行了含量测定,结果显示:

不同产地的重楼中 4 种皂苷的含量差别较大, 4 种皂苷所占的比例也大不相同, 其中, 以重楼皂苷含量最高, 其次为重楼皂苷, 这与 2005 版药典中规定的以上述两种成分含量之和大于 0.80% 作为重楼的质控条件相吻合, 2005 版中国药典没有对重楼皂苷、的质控作要求, 在实验结果中, 重楼皂苷含量偏低, 云南产的对照药材中没有检测到重楼皂苷, 但在上海荣庆堂药店购买的贵州、广西产的重楼饮片中重楼皂苷的含量达到了 1.8 mg/g 以上, 重楼皂苷的含量在 1~4 mg/g。由于在药理作用方面, 重楼皂苷、具有较强的免疫调节作用^[3], 重楼皂苷、具有抗肿瘤作用^[4], 因此, 根据治疗目的不同, 在用作免疫调节剂的原药材时, 应该重点考虑重楼皂苷、的含量, 在用作抗肿瘤药物的原药材时, 应该重点考虑重楼皂苷、的含量。本研究通过 RP-HPLC 法同时测定重楼中 4 种皂苷的含量, 比文献中的只测定重楼皂苷、含量的方法更能反映不同产地药材的差异性, 更有利于重楼的质量评价及合理利用。

另外, 实验中日间精密度和稳定性的 RSD 值有些偏高 (RSD 大于 2% 小于 5%), 且各峰面积均随时间的增加而略微增大, 这可能是由于样品实验期间连续 5 天一直被保存在样品盘中, 甲醇溶剂少许挥发所致。考虑到日内精密度 RSD 均小于 2%, 并且线性、加样回收率、含量测定等实验都是在供试品溶液配制好后的一天内完成进样的, 因此, 能够保证含量测定结果的准确性和可靠性。

参考文献:

- [1] 中国药典. 2005 年版一部 [S]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 183.
- [2] 黄勤安, 乔菲, 鲁静, 等. 重楼皂苷提取分离及含量测定方法的研究 [J]. 中国药事, 2007, 21(8): 591.
- [3] 邓子超, 黄玮, 张文生, 等. 滇重楼研究进展 [J]. 中国医药技术经济与管理, 2007, 1(2): 57.
- [4] 唐炳兰. 中药重楼的研究进展 [J]. 右江民族医学院学报, 2006(6): 1062.

收稿日期: 2008-09-12

(上接第 197 页)

表 3 以 A 药厂非洛地平片为对照的其他各药厂制剂的相似因子

药厂	溶出介质		溶出介质		溶出介质		溶出介质		溶出介质	
	Q	f ₂	Q	f ₂	Q	f ₂	Q	f ₂	Q	f ₂
B	128.42	69.21	957.95	47.95	1364.02	44.14	1031.28	47.16	3.31	96.24
C	8748.46	24.02	7876.12	25.16	9261.65	23.40	8281.15	24.61	8.62	92.06
D	13169.92	19.58	6219.99	27.72	9948.24	22.62	8086.20	24.87	191.33	65.09

3.2 为评价各药厂产品间溶出度差异, 选取在溶出介质 (水) 中溶出曲线最好的 A 药厂产品为对照, 采用 15 min 后溶出时间点的数据进行分析, 这样可消除不同药厂产品因崩解不同带来的影响, 故时间点个数 $n=8$ 。

3.3 在同一溶出介质中, 不同药厂产品溶出情况不同, 采用日本“药品品质再评价”, 2005 方法时, 差异变得更加明显。总体来说, A 药厂生产的非洛地平片在各溶出介质中均具有良好的溶出, B 药厂的非洛地平片溶出相对较好, 而其他产品溶出与 A 药厂的产品相比具有显著性差异。

3.4 在采用日本“药品品质再评价”方法进行溶出时, 各药厂产品溶出情况存在较大差异, 但这种差异是否会导致生物利用度不同, 还需进一步研究。如果生物利用度存在差异, 说明中国药典 2005 年版方法在对非洛地平片进行评价时产生了拉平效应, 建议对药典方法进行修改; 如果生物利用度无差异, 说明在对非洛地平片进行评价时药典方法就已足够, 不需进一步区分。

3.5 制剂在体外溶出和体内吸收好坏, 除和药物本

身性质有关, 还受生产工艺中多种因素的影响。因此, 还需对各药厂生产工艺进行进一步的探讨。本研究的 4 个厂家的溶出度虽然符合药典的规定, 但不同厂家的制剂质量水平有显著性差异, 建议医院在采购药品和临床选用药物时应考虑各厂家药品的不同, 以保证临床用药的疗效。

参考文献:

- [1] 谢沐风. 简介日本“药品品质再评价”工程——溶出度研究系列 [J]. 中国药品标准, 2005, 6(6): 42.
- [2] 財団法人 日本公定書協会編. 医療用医薬品品質情報集 No. 29 (orang book). 日本薬局方外医薬品規格 [S]. 第三部: 156.
- [3] 中国药典 2005 年版 [S]. 二部. 330, 2005.
- [4] 中国药典 2005 年版 [S]. 二部. 附录 C, 第二法.
- [5] 吴琳, 李慧义, 丁丽霞, 等. 国产尼莫地平片的溶出度比较 [J]. 药物分析杂志, 2007, 27(4): 578.
- [6] 財団法人 日本公定書協会編. 医療用医薬品品質情報集 No. 29 (orang book) [S]. 日本薬局方外医薬品規格. 第三部: 247.

收稿日期: 2009-03-19