

RP-HPLC 同时测定穿山龙药材中原薯蓣皂苷、 甲基原薯蓣皂苷和伪原薯蓣皂苷的含量

于书仪¹, 刘颖², 刘树民^{2*}

(1. 佳木斯大学附属第一医院, 黑龙江 佳木斯 154002; 2. 黑龙江护理高等专科学校, 哈尔滨 150040)

[摘要] **目的:**建立测定产地黑龙江大兴安岭穿山龙供试品中水溶性皂苷含量的方法。**方法:**采用 RP-HPLC, Diamonsil (钻石) C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈-水梯度洗脱, 检测波长 203 nm, 柱温 30 ℃。**结果:**原薯蓣皂苷浓度在 50 ~ 500 mg·L⁻¹、甲基原薯蓣皂苷在 35 ~ 350 mg·L⁻¹、伪原薯蓣皂苷质量浓度在 15 ~ 150 mg·L⁻¹与峰面积呈良好的线性关系, $r = 0.999\ 9$ ($n = 6$)。方法学考察中各项实验结果的 RSD 均 < 3%。**结论:**方法重复性好, 具有良好的回收率, 稳定性佳, 为穿山龙药材的质量控制提供了参考。

[关键词] 穿山龙; 原薯蓣皂苷; 甲基原薯蓣皂苷; 伪原薯蓣皂苷; 反相高效液相色谱法

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903 (2012) 09-0096-03

Simultaneous Determination the Contents of Protodioscin, Methylprotodioscin, Pseudoprotodiosc in Rhizoma Dioscoreae Nipponicae with RP-HPLC

YU Shu-yi¹, LIU Ying², LIU Shu-min^{2*}

(1. First Affiliated Hospital Jiamusi University Jiamusi Municipality of Heilongjiang province, Jiamusi 154002, China;
2. Institute of Traditional Chinese Medicine Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China)

[Abstract] **Objective:** Establish a method for determining the content of water soluble saponins of Rhizoma Dioscoreae Nipponicae which grow in Daxinganling area of Heilongjiang Province. **Method:** RP HPLC was used on an Diamonsil C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) with acetomitrile-water as mobile phase by gradient elution for the separation and determination of saponins of Rhizoma Dioscoreae Nipponicae, the detection wavelength was at 203 nm, column temperature 30 ℃. **Result:** The linear ranges were 50-500 mg · L⁻¹ for protodioscin concentration, 35-350 mg · L⁻¹ for methyl protodioscin concentration, 15-150 mg · L⁻¹ for pseudoprotodioscin concentration, the calibration curve of each solvent had good linear relationship within the range with a correlation coefficient of 0.999 9 ($n = 6$). On the basis of methodology of the test results show RSD < 3%. **Conclusion:** All the results show that the method has good reproducibility, recovery rate and stability. This has provided a basis for Rhizoma Dioscoreae Nipponicae quality control.

[Key words] Rhizoma Dioscoreae nipponicae; protodioscin; methyl protodioscin; pseudoprotodioscin; RP HPLC

穿龙薯蓣为薯蓣科植物, 根茎入药俗称穿山龙, 也称作地龙骨、野山药 (东北)、土黄连、黄姜 (安

徽)、山常山 (山东)、土龙骨 (山西)、龙草薺 (浙江) 等^[1]。具有祛风湿、止痛、舒筋活血、止咳平喘祛痰等功效^[2]。民间多用于治疗闪腰岔气、腰腿疼痛、筋骨麻木、大骨节病等症。近年来研究发现穿山龙水溶性皂苷能增加小鼠的心肌营养性血流量^[3], 还有报道原薯蓣皂苷能够抑制癌细胞^[4], 甲基原薯蓣皂苷能够抑制九大瘤系 60 种肿瘤细胞的细胞毒活性^[5]。因此控制穿山龙水溶性皂苷的含量对相应

[收稿日期] 20110623 (013)
[第一作者] 于书仪, 主管药师, Tel: 15604549030, E-mail: yushuyi888@126.com
[通讯作者] * 刘树民, 教授, 博士生导师, 从事中药临床疗效物质基础研究及中药药性理论研究, Tel: 0451-82196181, E-mail: lsm@hljucm.net

的治疗效应具有重大意义。

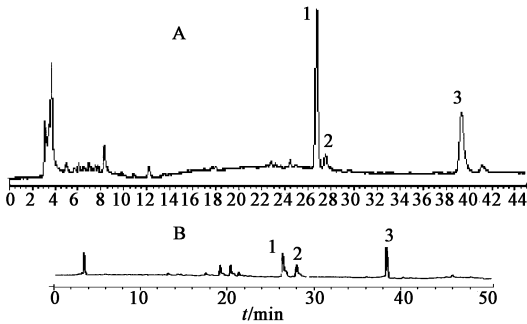
1 材料

1.1 样品的采集 穿山龙试样分别在能够反映穿山龙当前种植水平的主产区黑龙江省大兴安岭实地采取,品种经黑龙江中医药大学王连芝教授完成鉴定为 *Dioscorea nipponica* L.。甲基薯蓣皂苷,伪原薯蓣皂苷,原薯蓣皂苷购自成都康邦生物有限公司,纯度分别为 99.98%,99.95%,99.95%。

1.2 仪器与试剂 Waters 2695 Separation Module HPLC (美国 Waters 公司),Waters 2996 PAD 紫外检测器(美国 Waters 公司)含在线真空脱气机、高压二元梯度泵、恒温自动进样器、柱温箱,Empower 2 色谱管理系统,KQ-500DB 型数控超声清洗仪(江苏昆山超声仪器有限公司),梅特勒 Toledo AG135 电子天平(瑞士 Mettler 公司),GLYZ-0.5B 型冷冻干燥机(上海浦东冷冻干燥设备有限公司)。

2 方法

2.1 色谱条件 Diamonsil (钻石) C₁₈ 柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm),流动相水(B)与乙腈溶液(A);梯度洗脱(0~20 min,5%~30% A,20~60 min,30%~40% A,60~80 min,40%~65% A),流速 0.8 mL·min⁻¹,检测波长 203 nm,柱温 30℃,进样量为 10 μL。色谱图见图 1。



1. 原薯蓣皂苷;2. 甲基原薯蓣皂苷;3. 伪原薯蓣皂苷
A. 穿山龙药材;B. 混合对照品

图 1 穿山龙色谱

2.2 样品的制备 穿山龙饮片约 1.3 g,粉碎成细粉,30%乙醇超声提取(功率 200 W,频率 40 kHz) 30 min,离心 15 min,提取液过滤后蒸干,残渣加水溶解,用乙醚萃取 2 次,每次 15 mL,合并水层,加水饱和和正丁醇萃取 2 次,每次 20 mL,收集正丁醇液,回收正丁醇,药液冷冻干燥制成粉末。取粉末置于具塞三角烧瓶中,溶解,定容至 25 mL 的量瓶中。0.45 μm 膜滤过,备用。

2.3 对照品溶液的配制 分别称取原薯蓣皂苷 25.0 mg、甲基原薯蓣皂苷 17.5 mg、伪原薯蓣皂苷 7.5 mg 用甲醇溶于同一个 25 mL 量瓶中,用 0.45 μm 的微孔滤膜过滤,取续滤液,备用。

3 方法学考察

3.1 标准曲线的绘制 精密吸取对照品混和储备液 0.5,1.00,2.00,3.00,4.00,5.00 mL,分别置于 10 mL 的量瓶中,加甲醇稀释到刻度,摇匀,配制系列对照品混和溶液,取上述对照品溶液各 50 μL 进样,在上述色谱条件下进行分析,以对照品溶液浓度(mg·L⁻¹)为横坐标,峰面积为纵坐标,绘制标准曲线。结果表明,原薯蓣皂苷浓度在 50~500 mg·L⁻¹内、甲基原薯蓣皂苷在 35~350 mg·L⁻¹内、伪原薯蓣皂苷浓度在 15~150 mg·L⁻¹内与峰面积呈良好的线性关系,回归方程分别为 $Y=1\,011.091\,8X-1\,346.876\,7$ ($R^2=0.999\,9$), $Y=1\,029.591\,2X-1\,096.567\,1$ ($R^2=0.999\,7$), $Y=1\,892.3X+1\,794.7$ ($R^2=0.999\,9$)。

3.2 精密度试验 称取同一批次黑龙江省大兴安岭穿山龙样品 5 份,精密称定,按 2.2 条方法操作,在上述色谱条件下进行分析,计算原薯蓣皂苷、甲基原薯蓣皂苷和伪原薯蓣皂苷的含量,计算 RSD 分别为 0.61%,0.69%,0.90%。

3.3 重复性试验 取同一穿山龙样品粉末 6 份各 1.0 g,精密称定,按 2.2 条方法操作,在上述色谱条件下进行分析,计算原薯蓣皂苷、甲基原薯蓣皂苷和伪原薯蓣皂苷的含量,计算 RSD 分别为 1.80%,1.10%,2.10%。

3.4 稳定性试验 取同一穿山龙样品供试液,在上述色谱条件下,分别于 0,2,4,8,12,24,48 h 测定,计算原薯蓣皂苷、甲基原薯蓣皂苷和伪原薯蓣皂苷的含量。结果表明,原薯蓣皂苷、甲基原薯蓣皂苷和伪原薯蓣皂苷的含量在 48 h 内稳定性良好,RSD 分别为 0.51%,0.73%,0.89%。

3.5 回收率试验 取已知含量的穿山龙样品 5 份,精密称定,分别加入一定量浓度的对照品溶液适量,按 2.2 条方法操作,在上述色谱条件下进行分析,计算回收率。结果表明,原薯蓣皂苷、甲基原薯蓣皂苷、伪原薯蓣皂苷平均回收率 99.1%,99.3%,99.5%,RSD 为 0.46%,0.34%,0.16%,见表 1~3。

3.6 样品含量测定 取药材各 1.3 g,精密称定,按 2.2 项方法操作,在上述色谱条件下进行分析,计算原薯蓣皂苷、甲基原薯蓣皂苷和伪原薯蓣皂苷的含量,测定结果见表 4。

表 1 原薯蓣皂苷加样回收率试验					
样品中量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
3.927	1.00	4.924	99.8	99.1	0.46
3.872	1.00	4.861	98.9		
3.906	1.00	4.845	98.9		
3.845	1.00	4.883	98.7		
3.946	1.00	4.940	99.5		
3.954	1.00	4.893	98.7		

表 2 甲基原薯蓣皂苷加样回收率					
样品中量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
3.039	1.00	4.012	99.3	99.3	0.34
3.142	1.00	4.134	99.8		
3.098	1.00	4.059	99.0		
3.195	1.00	4.182	99.6		
3.224	1.00	4.185	99.0		
3.214	1.00	4.175	99.1		

表 3 伪原薯蓣皂苷加样回收率					
样品中量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
0.765	1.00	1.754	99.4	99.5	0.16
0.772	1.00	1.761	99.4		
0.756	1.00	1.745	99.4		
0.765	1.00	1.763	99.8		
0.780	1.00	1.770	99.4		
0.775	1.00	1.767	99.5		

4 讨论

原薯蓣皂苷、甲基原薯蓣皂苷和伪原薯蓣皂苷均为水溶性皂苷类,采用等度洗脱分离度不佳,因此采用梯度洗脱分离度得到改善,达到含量测定的要求,重复性良好。

表 4 含量测定结果				mg·g ⁻¹
样品	原薯蓣皂苷	甲基原薯蓣皂苷	伪原薯蓣皂苷	
1	8.931	6.951	1.879	
2	8.992	6.960	1.740	
3	8.982	6.893	1.827	
4	8.899	6.883	1.832	
5	8.960	6.982	1.928	
平均值	8.939	6.934	1.841	

在提取方法考察时,考察了 30%、60% 乙醇和甲醇超声提取对水溶性皂苷的提取率。结果表明,30% 的乙醇超声提取效果最好,提取率高;考察超声提取 30、60、90 min 时的含量差异,结果表明无明显差异,所以提取时间选用 30 min。

文献通常采用 HPLC 测定酸水解后的薯蓣皂苷元的含量以进行质量控制,不能反映其中主要治疗成分的真实含量。实验证明,作者建立的 RP-HPLC 方法简便、准确、重复性好,可以作为穿山龙药材的质量控制方法之一。

[参考文献]

[1] 徐国钧. 中国药材学(七)[M]. 北京:中国医药科技出版社,1996:668.

[2] 谢宗万,余友苓. 全国中草药名鉴(上)[M]. 北京:人民卫生出版社,1996:226.

[3] 张克义,常天辉,李伯坚,等. 穿龙冠心宁及水溶性皂甙对小白鼠心肌营养性血流量的影响[J]. 中国医科大学学报,1982, 11(3): 11.

[4] 胡柯. 原薯蓣皂苷对 60 种人癌细胞的细胞毒谱[J]. 国外医学. 植物药分册,2002,17(5):203.

[5] Hu K. The cytotoxicity of methyl protoneodioscin(NSC-698791) against human cancer cell lines in vitro. Anticancer research[J]. 2002,22(2A):1001.

[责任编辑 蔡仲德]