

HPLC 比较醇提重楼及其颗粒中重楼皂苷 I, II 的含量

陈清¹, 夏亚飞², 阎姝^{3*}

(1. 天津中医药大学研究生院, 天津 300100; 3. 南开医院, 天津 300100)

[摘要] 目的: 建立一种测定重楼皂苷 I, II 的含量测定方法, 用于比较重楼乙醇提物与重楼配方颗粒中皂苷的含量。方法: 采用 C₁₈ 色谱柱, 以乙腈-水 (42:58) 为流动相, 检测波长 210 nm, 流速 1 mL·min⁻¹, 柱温室温。结果: 在 0.043 5 ~ 0.870 0 g·L⁻¹, 重楼皂苷 I 的峰面积与浓度有良好的线性, $r=0.999\ 1$; 在 0.038 ~ 0.760 0 g·L⁻¹, 重楼皂苷 II 的峰面积与浓度有良好的线性, $r=0.999\ 7$, 重楼皂苷 I, II 的平均回收率为 99.90%, 100.2%, RSD 分别为 1.7%, 1.7%。醇提物与配方颗粒中皂苷 I, II 的总含量分别为 34.7%, 3.1%。结论: 该法操作简单, 出峰时间短, 两峰分离度好, 测得的醇提物中皂苷 I, II 含量明显高于重楼配方颗粒。

[关键词] 高效液相色谱法; 重楼皂苷 I; 重楼皂苷 II; 含量测定

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)06-0078-03

Comparative on Content of Paridis Saponins I, II between Ethanol-Extraction and Granule of Rhizoma Paridis by HPLC

CHEN Qing¹, XIA Ya-fei², YAN Shu^{3*}

(1. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Graduate School, Tianjin 300100, China; 2. Nankai Hospital, Tianjin 300100, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a determination method of the paridis saponins I and II for the content comparison of ethanol-extraction and granule of paridis. **Method:** Kromasil C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) was used. Acetonitrile-water (42:58) was used as a mobile phase. Flow rate was 1 mL·min⁻¹. Detection wavelength was at 210 nm, column temperature was in room temperature. **Result:** The Paridis saponins I concentration and peak area was showed good linear relationship between 0.0435-0.87 g·L⁻¹ ($r=0.999\ 1$). Paridis saponins II concentration and peak area was showed good linear relationship between 0.038-0.76 g·L⁻¹ ($r=0.999\ 7$). recovery of Paridis saponins I and saponins II was 99.90% and 100.2% separately. RSD is 1.6% and 1.34%, the content of paridis saponin I and II in ethanol-extraction and granule is 34.7% and 3.1% respectively. **Conclusion:** This method is simple with short retention time and well separation, the content of saponin I and II in ethanol-extraction were significantly higher than that of granule.

[Key words] HPLC; paridis saponins I; paridis saponins II; content determination

重楼为百合科植物,传统医学用于清热解毒、消肿止痛、凉肝定惊、疔疮痈肿、咽喉肿痛、毒蛇咬伤、

跌扑伤痛、惊风抽搐等症,现代医学研究表明重楼皂苷具有抗肿瘤、消炎、止血、抗氧化、促进子宫收缩和保护血管内皮细胞等药理作用^[1]。重楼植物所含的重楼皂苷 I, II 是重楼的重要活性成分^[2]。目前有市售的重楼配方颗粒,是用符合炮制规范的传统中药饮片作为原料,经现代制药技术提取、浓缩、分离、干燥、制粒、包装精制而成。它保证了原中药饮片的全部特征,能够满足医师进行辨证论治,随证加减,药性强、药效高、携带保存方便等许多优点^[3]。但是有关重楼配方颗粒中重楼皂苷 I, II 含量的报

[收稿日期] 20111109(022)

[基金项目] 天津市科委项目(10JCYBJC15100)

[第一作者] 陈清, 硕士, 从事药理学研究, Tel: 13820149013, E-mail: xiaoyehuangyang@163.com

[通讯作者] * 阎姝, 博士, 主任药师, 从事中药药理学研究, Tel: 022-27435249, E-mail: yjsktnkyy@126.com

道较少。本实验采用 HPLC 测定重楼醇提物与重楼配方颗粒中皂苷 I, II 的含量,比较了不同流动相配比出峰的影响,弥补了文献报道中皂苷 I, II 保留时间长的不足。

1 仪器、试药

Waters 515 型高效液相色谱仪, Waters 2487 型 DAD 紫外检测器, Chromstation 数据处理系统, DT-100 1/万天平(北京光学仪器厂), KQ-3200 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司), 重楼皂苷 I 对照品(中国药品生物制品检定所, 20 mg, 批号 111590-200402), 重楼皂苷 II 对照品(中国药品生物制品检定所, 20 mg, 批号 111591-200402), 乙腈为色谱纯, 甲醇为色谱纯, 水为去离子水, 重楼生药(产自广西, 批号 1007017 南开医院主任药师阎姝主任药师鉴定)。重楼颗粒(江阴天江药业有限公司, 1 g/袋, 相当于饮片 10 g, 批号 0902112)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Waters 515 高效液相色谱仪, 色谱柱 Inertex C₁₈(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈-水(42:58), 柱温室温, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 210 nm, 进样量 20 μL, 检测器 Waters 2487 Dualλ 紫外检测器。

2.2 供试品及对照品溶液的制备

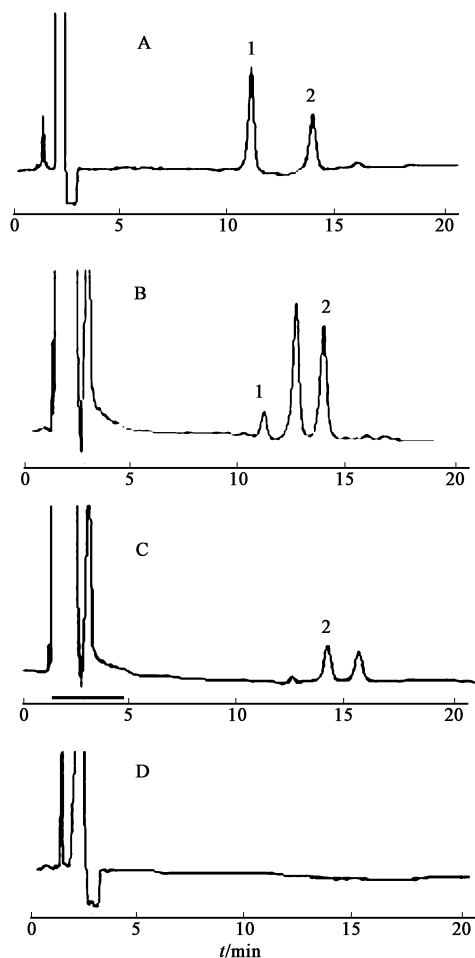
2.2.1 供试品溶液 ①醇提供试液:取 50 g 重楼生药于 8 倍量 75% 乙醇溶液回流 2 h, 重复 3 次合并滤液, 浓缩蒸干成干燥粉末。称取 20 mg 粉末置于 10 mL 量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀, 用微孔滤膜(0.22 μm)滤过, 取续滤液, 作为醇提供试品溶液。②配方颗粒供试液:称取 30 mg 重楼颗粒置于 10 mL 量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 于超声仪中使其充分溶解, 摇匀, 用微孔滤膜过滤, 取续滤液, 作为水提物供试液。

2.2.2 对照品溶液 精密称取重楼皂苷 I, II 对照品各 8 mg, 分别置于 10 mL 量瓶中, 加甲醇制成 800 mg·L⁻¹ 的重楼皂苷 I 和重楼皂苷 II 溶液, 作为母液; 精密量取各母液 5 mL, 置于 10 mL 量瓶, 加甲醇溶解并稀释制成每 400 mg·L⁻¹ 的重楼皂苷 I 和重楼皂苷 II 溶液作为对照品溶液。

2.2.3 阴性对照液 空白溶剂为阴性对照液。

2.3 专属性试验 在上述色谱条件下, 分别精密吸取对照品溶液、供试品溶液、阴性对照溶液各 20 μL, 注入液相色谱仪, 测定, 得到重楼皂苷对照品溶液、供试品溶液与阴性对照溶液的色谱图见图 1。重楼皂苷 I 与相近峰分离度 > 2.0。理论板数以重

楼皂苷 I 峰计算不低于 3 500。



A. 对照品; B. 醇提供供试品; C. 配方颗粒供试品;
D. 阴性对照; 1. 重楼皂苷 II; 2. 重楼皂苷 I

图 1 重楼皂苷 I, II HPLC

2.4 线性关系考察 精密吸取重楼皂苷 I 和重楼皂苷 II 对照品溶液适量, 分别配成重楼皂苷 I 0.043 5, 0.108 8, 0.217 5, 0.326 2, 0.435 0, 0.870 0 g·L⁻¹ 的溶液和重楼皂苷 II 0.038 0, 0.095, 0.190 0, 0.285 0, 0.380 0, 0.760 0 g·L⁻¹ 的溶液摇匀, 进样 20 μL, 记录色谱峰面积, 以质量浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 进行线性回归, 回归方程为 $Y = 3.42 \times 10^4 X - 3.09 \times 10^5$ ($r = 0.999 1$)。表明重楼皂苷 I 在 0.043 5 ~ 0.870 0 g·L⁻¹ 有良好的线性关系。重楼皂苷 II 溶液按如上操作, 回归方程为 $Y = 5.78 \times 10^4 X + 4.14 \times 10^5$ ($r = 0.999 7$), 重楼皂苷 II 在 0.038 ~ 0.760 0 g·L⁻¹ 线性良好。

2.5 精密度试验 取同一质量浓度的对照品溶液连续进样 6 次, 分别测定重楼皂苷 I, II 峰面积, 结果 RSD 分别为 1.6%, 1.4%, 表明仪器的精密度良好。

2.6 重复性试验 分别取重楼皂苷醇提物和配方

颗粒各 6 份,按 2.2 项下方法制备供试品溶液,测定重楼皂苷 I 和 II 的含量,其 RSD 分别为 1.7%, 1.8% 和 1.6%, 1.9%, 结果表明方法的重复性良好。

2.7 稳定性试验 取同一份供试品溶液,分别于 0, 2, 4, 8, 12, 18, 24 h 时测定重楼皂苷 I, II 的含量,结果醇提物和配方颗粒中重楼皂苷 I, II 含量的 RSD 分别为 1.6%, 1.9% 和 1.7%, 1.5%, 表明两种样品溶液在 24 h 内稳定。

2.8 加样回收率试验 取含量已知的重楼皂苷醇提粉末(重楼皂苷 I 含量为 298.3 mg·g⁻¹, 重楼皂苷 II 含量为 47.10 mg·g⁻¹) 10 mg 6 份,分别精密加入重楼皂苷 I 和 II 对照品,按 2.2 项下方法制备供试品溶液,按上述色谱条件进行测定,计算加样回收率,结果见表 1。

表 1 醇提物中皂苷 I, II 的加样回收率

成分	No.	取样量	样品含量	加入量	测得量	回收率	平均值	RSD
		/mg	/mg	/mg	/mg	/%	/%	/%
I	1	10.09	3.010	3.48	6.523	100.9	99.90	1.7
	2	10.18	3.037	3.48	6.452	98.13		
	3	9.935	2.964	3.48	6.397	98.65		
	4	9.825	2.931	3.48	6.434	100.7		
	5	10.20	3.043	3.48	6.606	102.4		
	6	10.42	3.108	3.48	6.540	98.6		
II	1	10.09	0.475 3	0.456	0.928 4	99.36	100.2	1.7
	2	10.18	0.479 5	0.456	0.930 2	98.84		
	3	9.935	0.467 9	0.456	0.935 6	102.6		
	4	9.825	0.462 8	0.456	0.927 6	101.9		
	5	10.20	0.480 4	0.456	0.933 9	99.45		
	6	10.42	0.490 8	0.456	0.941 8	98.90		

2.9 样品测定 取重楼皂苷醇提取物和重楼颗粒各 6 份,按 2.2 项下方法制备供试品溶液,测定重楼皂苷 I 和 II 的含量,结果见表 2, 3。

3 讨论

高效液相色谱法是重楼皂苷 I, II 常用的定量分析方法。但文献报道的测定条件大都保留时间较长,或是杂质峰较多。本实验在室温条件下考察了乙腈-水(35:65, 42:58, 60:40)选择乙腈-水(42:58)为最佳流动相,出峰时间短,两峰的分度度较好,也无杂质峰的影响。用此方法测得醇提法所得粉末中皂苷 I, II 的总含量为 34.7%, 而配方颗粒中皂苷 I, II 的总含量为 3.1%, 可见配方颗粒中皂苷 I,

表 2 醇提物中重楼皂苷 I 和 II 的含量

成分	No.	含量	平均值	RSD
		/mg·g ⁻¹	/mg·g ⁻¹	/%
重楼皂苷 I	1	295.3	298.3	1.6
	2	297.6		
	3	304.1		
	4	293.4		
	5	303.5		
	6	295.7		
重楼皂苷 II	1	47.10	47.10	1.7
	2	46.43		
	3	46.92		
	4	48.26		
	5	47.67		
	6	46.21		

表 3 重楼配方颗粒中重楼皂苷 I 和 II 的含量

成分	No.	含量	平均值	RSD
		/mg·g ⁻¹	/mg·g ⁻¹	/%
重楼皂苷 I	1	28.36	27.76	1.9
	2	27.97		
	3	27.71		
	4	26.83		
	5	27.90		
	6	27.81		
重楼皂苷 II	1	3.011	3.083	1.7
	2	3.036		
	3	3.093		
	4	3.127		
	5	3.148		
	6	3.085		

II 含量较低。近年来中药配方颗粒在美国、欧洲、澳大利亚、韩国、日本、台湾、香港等国家和地区发展极快。韩国、日本、台湾、香港除满足本地区外还大量出口。我国的中药现代化发展严重滞后,中药配方颗粒推广极慢^[3]。为了使其得到有效地推广应用,重楼配方颗粒的提取制备工艺还有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] 赵保胜,朱寅荻,马勇,等. 中药重楼研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(11): 267.
- [2] 吴珊,吴卫,郑有良. 反相高效液相色谱法同时测定重楼药材中 4 种皂苷的含量[J]. 时珍国医国药, 2007, 8(18): 1896.
- [3] 刘克敬. 浅谈传统中药汤剂与中药配方颗粒[J]. 中国中医药信息杂志, 2008, 11(15): 106.

[责任编辑 蔡仲德]