

## HPLC 测定不同采收期滇重楼中薯蓣皂苷元的含量

周浓<sup>\*</sup>, 郭吉芬, 杨丽云, 徐萍, 姜北  
(大理学院药学院, 云南 大理 671000)

[摘要] 目的: 通过测定不同采收期滇重楼中薯蓣皂苷元的含量, 为确定滇重楼的采收期提供参考依据。方法: 采用高效液相色谱法, 色谱柱为 Agilent Zorbax SB-C<sub>18</sub> (4.6 mm × 150 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-水 (90:10), 流速为 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 检测波长 203 nm, 柱温 35℃。结果: 不同采收期滇重楼中薯蓣皂苷元含量发生明显变化。该成分在 4-6 月含量逐渐升高, 5-6 月含量最高, 6-7 月含量骤降且降幅较大, 7-10 月含量基本上一致。结论: 滇重楼不同采收期薯蓣皂苷元的含量是不同, 在实际应用时根据不同需要适时采收。

[关键词] 滇重楼; 薯蓣皂苷元; 高效液相色谱; 不同采收期; 含量测定

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2010)18-0054-03

## Determination of Diosgenin in *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* at Different Collecting Time by HPLC

ZHOU Nong<sup>\*</sup>, GUO Ji-fen, YANG Li-yun, XU Ping, JIANG Bei  
(College of Pharmacy, Dali University, Dali 671000, China)

[Abstract] **Objective:** To determine diosgenin in *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* at different collecting time. **Method:** Diosgenin was separated on a Zorbax SB-C<sub>18</sub> (4.6 mm × 150 mm, 5 μm) column and detected at 203 nm at the flow rate of 1.0 mL·min<sup>-1</sup> using acetonitrile-water (90:10) as the mobile phase. Column temperature was at 35℃. **Result:** There were differences in the contents of diosgenin in *P. polyphylla* var. *yunnanensis* at different collecting time. The contents of diosgenin increased from April to June and reached the highest level in May and June. However, it decreased sharply in June and July. The contents maintained the same level from July to October. **Conclusion:** The contents of diosgenin in *P. polyphylla* var. *yunnanensis* varied with the collecting seasons.

[Key words] *Paris polyphylla* var. *yunnanensis*; diosgenin; HPLC; different collecting time; determination

滇重楼系百合科植物云南重楼 *Paris polyphylla* Smith var. *yunnanensis* (Franch.) Hara 的干燥根茎<sup>[1]</sup>, 为《中国药典》收载的常用中药材, 具有抗癌、止血、镇痛、镇静等生物活性, 应用广泛<sup>[2]</sup>。在云南, 重楼又是一些著名中成药如云南白药、宫血宁胶囊、楼莲胶囊等的主要原料之一, 每年仅云南省的用量

就达数百吨, 市场需求量较大。由于长期掠夺式的采挖, 资源日益减少, 重楼的工业药用原料严重紧缺, 现已列为云南省 30 种稀缺濒危天然药物之一<sup>[3]</sup>。

滇重楼的主要活性成分为甾体皂苷, 其苷元主要为异螺甾烷醇类的薯蓣皂苷元和偏诺皂苷元<sup>[4]</sup>。有资料报道薯蓣皂苷元具有溶血、降血脂、抗菌、抗炎、抗肿瘤等作用<sup>[5]</sup>, 为滇重楼的活性成分和衡量药材质量的重要指标之一。本试验拟采用 HPLC 法对 7 个不同采收期滇重楼中的薯蓣皂苷元进行含量分析, 为滇重楼药材的质量控制、最佳采收期的确定、资源的合理利用、规范化种植与采收提供参考依据。

[收稿日期] 20100630(007)

[基金项目] 云南省教育厅科研项目(09Y0361); 大理市科技局项目(2009SF08); 大理学院青年教师科研基金项目(2008X60)

[通讯作者] \*周浓, 讲师, 从事药用植物栽培与质量控制, Tel: 0872-2257411, E-mail: erhaizn@126.com

## 1 材料

**1.1 仪器** 1100 LC 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司,真空在线脱气机,四元泵,自动进样器,柱温箱,DAD 检测器,Agilent chemstation 化学工作站);KQ-250B 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);RE-2000 型旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂);SHZ- 循环水式真空泵(巩义市予华仪器有限责任公司);AE240 天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司];FZ102 型微型植物试样粉碎机(北京中兴伟业仪器有限公司)。

**1.2 试药** 薯蓣皂苷元对照品(成都曼思特生物科技有限公司,批号 A0124,经 HPLC 检测含量 98%);乙腈为色谱纯(美国 Tedia 试剂公司),水为娃哈哈纯净水,其他试剂均为国产分析纯。

滇重楼 7 份样品于 2009 年 4 - 10 月期间采自云南省云龙县关坪乡种植基地(表 2),并经作者鉴定为百合科植物云南重楼 *P. polyphylla* var. *yunnanensis* 的干燥根茎。

## 2 方法与结果

**2.1 色谱条件与系统适用性试验** Agilent zorbax SB-C<sub>18</sub> 柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm);流动相乙腈-水(90:10);检测波长 203 nm;柱温 35 °C;流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>;进样量 20 μL。理论板数按薯蓣皂苷元峰计算不低于 5 000,与其他峰的分离度均大于 1.5。对照品和滇重楼样品分离的色谱图见图 1。

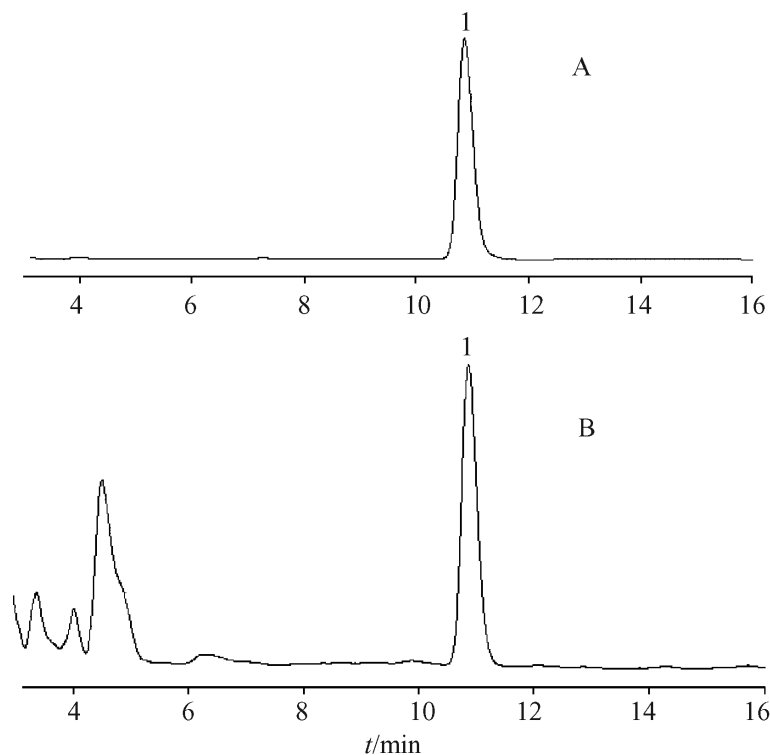


图 1 滇重楼样品的 HPLC

A. 对照品; B. 样品; 1. 薯蓣皂苷元

## 2.2 溶液的配制

**2.2.1 对照品溶液的制备** 精密称取薯蓣皂苷元

对照品适量,加甲醇制成 0.500 g·L<sup>-1</sup> 的薯蓣皂苷元溶液,即得。

**2.2.2 供试品溶液的制备** 取本品粉末(过三号筛)约 0.250 g 精密称定,置 100 mL 具塞锥形瓶中,加入甲醇 20 mL,超声 40 min,静置放冷,滤过,重复操作 1 次,合并提取液,回收甲醇至干,加 2 mol·L<sup>-1</sup> 盐酸 7.5 mL,置沸水浴中水解 2 h,冷却后用石油醚(60 ~ 90 °C)萃取 3 次,每次 30 mL,萃取时间依次为 45, 40, 30 min,合并萃取液水洗至中性,回收石油醚,残渣用甲醇溶解并转移至 10 mL 量瓶中,定容至刻度,摇匀,即得。

**2.3 线性关系考察** 分别精密吸取对照品溶液(含薯蓣皂苷元 0.500 g·L<sup>-1</sup>) 1, 2, 5, 10, 15, 20, 25 μL,注入液相色谱仪,得进样量 *C* (μg) 与峰面积 *A* 的线性方程。结果表明,薯蓣皂苷元进样量在 0.50 ~ 12.50 μg 与峰面积成良好的线性关系,回归方程为  $A = 210.17 C + 1.9906$ ,  $r = 0.9999$  ( $n = 7$ )。

**2.4 精密度试验** 取薯蓣皂苷元对照品溶液(0.500 g·L<sup>-1</sup>),进样量 20 μL,连续测定,进样 6 次,测定薯蓣皂苷元对照品峰面积的 RSD 为 0.27% ( $n = 6$ ),表明仪器精密度良好。

**2.5 重复性试验** 取同一滇重楼样品 6 份(9 月份),按 2.2.2 项下供试品溶液的制备方法制备及 2.1 项下色谱条件测定,测得薯蓣皂苷元的平均含量为 0.6924%,RSD 2.89% ( $n = 6$ ),表明本方法重复性良好。

**2.6 稳定性试验** 取同一供试品溶液(9 月份),室温密闭放置,分别在制备后 0, 4, 8, 12, 16, 24 h 进样,测定薯蓣皂苷元峰面积,RSD 2.41% ( $n = 6$ ),表明样品溶液在 24 h 内稳定。

**2.7 加样回收率试验** 精密称取已知含量的滇重楼药材约 0.125 g(9 月份),共 9 份,分别精密加入一定量的薯蓣皂苷元对照品,按 2.2.2 项下供试品溶液的制备方法制备及 2.1 项下色谱条件测定,结果见表 1。结果表明,其平均回收率为 98.47%,RSD 1.38%,符合分析要求。

**2.8 样品含量测定** 分别按 2.2.2 项下供试品溶液制备方法制备,平行 3 份,按 2.1 项下色谱条件测定,以峰面积代入回归方程中计算薯蓣皂苷元的含量,结果见表 2。

## 3 讨论

试验中分别考察了超声提取、加热回流、索氏提

表 1 薯蓣皂苷元加样回收率试验 (n=9)

称样量 /g	样品中含 量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
0.125 4	0.868 3	0.700 0	1.544 6	96.61		
0.125 0	0.865 5	0.700 0	1.553 4	98.27		
0.125 2	0.866 9	0.700 0	1.544 2	96.76		
0.125 2	0.866 9	0.850 0	1.716 2	99.92		
0.125 1	0.866 2	0.850 0	1.709 4	96.85	98.47	1.38
0.125 3	0.867 6	0.850 0	1.712 5	99.40		
0.125 1	0.866 2	1.000 0	1.851 8	98.56		
0.125 2	0.866 9	1.000 0	1.860 2	99.33		
0.125 2	0.866 9	1.000 0	1.859 4	99.25		

表 2 不同采收期滇重楼中薯蓣皂苷元的含量 (n=3)

No.	采集日期	薯蓣皂苷元 /mg	RSD/%
1	2009-04-15	0.495 0	2.69
2	2009-05-15	1.229 7	1.61
3	2009-06-16	1.219 2	1.83
4	2009-07-16	0.561 8	2.01
5	2009-08-14	0.557 3	2.82
6	2009-09-15	0.692 4	2.36
7	2009-10-18	0.635 5	1.25

取等方法的提取效果,以超声提取法的提取效率最高<sup>[6]</sup>。而超声提取法中,又分别比较了不同的溶剂(甲醇、乙醇、三氯甲烷、石油醚等)、不同的提取时间、不同的提取次数、石油醚萃取的次数等的提取效果,试验表明以甲醇为提取溶剂,提取 40 min,提取 2 次,30 mL 石油醚脱脂 3 次可将滇重楼中的薯蓣皂苷元基本提取完全。

在流动相系统的选择中,试验比较了甲醇-水、乙腈-水等流动相系统<sup>[7-8]</sup>,从分离情况和出峰时间等综合分析选择乙腈-水(90:10)等度洗脱为佳,峰形对称且分离度较好,保留值适宜,柱后处理简便、省时。

用二极管阵列检测器在本试验溶剂体系条件下,分析了薯蓣皂苷元对照品色谱峰和 7 个样品中目标组分相应色谱峰的紫外光谱,结果保留值相同处紫外光谱基本一致,薯蓣皂苷元在 203 nm 处有最大吸收。待测组分与杂质峰基本能基线分离,检测灵敏度高。

滇重楼的生长发育一般分为营养生长期(4 月)、授粉期(5-6 月)、果熟期(7-9 月)、衰老期(9

-10 月)等 4 个物候期<sup>[9]</sup>。试验结果表明,薯蓣皂苷元在营养生长期含量最低,可能与其生长过程中根茎自身营养消耗大有关;授粉期含量最高,可能与光合作用后根茎大量合成自身营养物质有关,但其药用部位(根茎)进入旺盛生长期、影响产量,所以不经济<sup>[10]</sup>;果熟期与衰老期含量次之。采收期是影响中药材产量和质量的重要环节之一,确定最佳采收期需要从药材的产量和质量 2 个方面进行综合考虑<sup>[11]</sup>。因此,滇重楼的最佳采收期兼顾产量和资源保护等因素,应以衰老期为宜,这与实际生产中传统采收期基本一致。

由于本次采集样品均为野生变家种的种植药材,很难确定其准确的生长年限,可考虑规范化种植后再用本方法对滇重楼的最佳采收期进行进一步研究,并得出更为准确、可靠的结论。

#### [参考文献]

- [1] 中国药典.一部[S].2010:243.
- [2] 何俊,张舒,王红,等.滇重楼植物的研究进展[J].云南植物研究,2006,28(3):271.
- [3] 陆辉,许继宏,陈锐平,等.云南重楼属植物资源现状与保护对策[J].云南大学学报:自然科学版,2006,28(S1):307.
- [4] 黄端华,王凤英,童萍,等.气相色谱法测定重楼中薯蓣皂苷的水解产物[J].福州大学学报·自然科学版,2009,37(1):133.
- [5] 王丽娟,王岩,陈声武,等.薯蓣皂苷元体内、外的抗肿瘤作用[J].中国中药杂志,2002,27(10):777.
- [6] 吕金海,舒孝顺,高中洪,等.菝葜总皂苷元超声萃取研究[J].中国中药杂志,2007,32(2):155.
- [7] 韦建荣,董汛.重楼中薯蓣皂苷元的反相高效液相色谱测定[J].色谱,1999,17(5):498.
- [8] 杨文远,熊楚明.反相高效液相色谱法测定中药中薯蓣皂苷元[J].分析实验室,2002,21(1):74.
- [9] 金梅.药用植物重楼快速繁殖技术研究前景[J].保山师范高等专科学校学报,2005,24(2):16.
- [10] 刘丽娟,金德祥,牛志多,等.穿龙薯蓣最佳采收期的研究[J].中草药,2005,36(12):1879.
- [11] 李化,黄璐琦,杨滨.论植物物候学指导中药材采收期的研究[J].中国药理学杂志,2008,43(19):1441.

[责任编辑 顾雪竹]