

HPLC法测定14个不同产地滇重楼中薯蓣皂苷元的含量[△]

罗静^{1*}, 沈昱翔², 周浓^{3#}, 邓立苹³(1.重庆市食品药品检验检测研究院/重庆市药物过程与质量控制工程技术研究中心, 重庆 401121; 2.安顺学院农学院, 贵州安顺 561000; 3.重庆三峡学院生命科学与工程学院, 重庆 404000)

中图分类号 R284.1; R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)21-2965-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.21.31

摘要 目的:建立测定滇重楼中薯蓣皂苷元含量的方法,并比较不同产地滇重楼中薯蓣皂苷元的含量。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为Intersil ODS-C₁₈,流动相为乙腈-水(92:8, V/V),流速为1.0 ml/min,检测波长为203 nm,柱温为35 ℃,进样量为20 μl。结果:薯蓣皂苷元进样量在0.539~13.475 μg范围内与其峰面积呈良好的线性关系($r=0.9999$);精密度、稳定性、重复性试验的RSD均≤1.92%;平均加样回收率为98.48%,RSD为1.21%($n=6$)。14个不同产地滇重楼中薯蓣皂苷元的含量在3.869 4~21.074 7 mg/g之间。结论:该方法快速、简便,结果准确、可靠,可用于不同产地滇重楼中薯蓣皂苷元的含量测定。薯蓣皂苷元含量受产地、环境因素影响较大,滇重楼品质表现出一定的地域及生境依赖性。

关键词 滇重楼;薯蓣皂苷元;高效液相色谱法;含量测定

Content Determination of Diosgenin in *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* from 14 Different Habitats by HPLC
LUO Jing¹, SHEN Yu-xiang², ZHOU Nong³, DENG Li-ping³(1.Chongqing Institute for Food and Drug Control/Chongqing Engineering Research Center for Pharmaceutical Process and Quality Control, Chongqing 401121, China; 2.College of Agriculture, Anshun University, Guizhou Anshun 561000, China; 3.College of Life Science and Engineering, Chongqing Three Gorges University, Chongqing 404000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the content determination of diosgenin in *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* and compare the contents in *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* among different habitats. METHODS: HPLC was performed on the column of Intersil ODS-C₁₈ with mobile phase of acetonitrile-water (92:8, V/V) at the flow rate of 1.0 ml/min, the detection wavelength was 203 nm, column temperature was 35 ℃, and volume was 20 μl. RESULTS: The linear range of diosgenin was 0.539-13.475 μg ($r=0.9999$); RSDs of precision, stability and reproducibility tests were all no more than 1.92%; average recovery was 98.48% (RSD=1.21%, $n=6$). The contents of diosgenin in *P. polyphylla* var. *yunnanensis* from 14 different habitats were in the range of 3.869 4-21.074 7 mg/g. CONCLUSIONS: The method is fast, simple, accurate and reliable, and can be used to determine the content of diosgenin in *P. polyphylla* var. *yunnanensis*. The diosgenin content can be greatly affected by habitat and environmental factors. *P. polyphylla* var. *yunnanensis* shows certain region- and habitat-dependent.

KEYWORDS *Paris polyphylla* var. *yunnanensis*; Diosgenin; HPLC; Content determination

滇重楼为百合科云南重楼 *Paris polyphylla* Smith var. *yunnanensis* 的干燥根茎^[1],有着悠久的药用历史,其含多种甾体皂苷类成分,其中薯蓣皂苷元的糖苷是重楼的主要活性成分^[2],而薯蓣皂苷元是生产甾体激素类药物的重要原料。滇重楼主要分布于云南、贵州和四川一带,是我国西南地区的道地药材,也是“云南白药”“热毒清”和“宫血宁”等多种中成药的主要原料之一^[3]。现代药理研究发现,薯蓣皂苷元具有抗肿瘤、抗心血管系统疾病、抗炎、抗皮肤病、雌激素样作用等显著的

药理活性^[4],是评价滇重楼质量的重要指标之一。课题组前期研究发现不同采收期滇重楼中薯蓣皂苷元含量会发生明显变化^[5]。本研究在此基础上继续对滇黔境内14个不同产地的滇重楼进行含量测定,考察不同产地薯蓣皂苷元的含量变化,以全面掌握滇重楼资源状况,为其质量控制和资源的合理利用、有效保护提供科学依据。

1 材料

1.1 仪器

LC-20AT型高效液相色谱(HPLC)仪,包含真空在线脱气机、四元泵、自动进样器、柱温箱、二极管阵列检测器和LC solution工作站(日本岛津公司);KQ-250DB型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);BP221S型电子天平(德国Sartorius公司);AX205型电子天平(瑞士Mettler-Toledo公司)。

△基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81260622);贵州省科学技术厅科学技术基金资助项目(No.黔科合J字LKA[2012]07号)

* 硕士,讲师,主管中药师。研究方向:中药资源及中药材质量标准化。电话:023-86072727。E-mail:jasmine1002@163.com

通信作者:副教授,硕士生导师。研究方向:药用植物栽培与质量控制。电话:023-58102522。E-mail:erhaizn@126.com

1.2 试剂

薯蓣皂苷元对照品(中国食品药品检定研究院,批号:111539-200001);乙腈为色谱纯(美国Fisher公司),甲醇、盐酸、石油醚(60~90℃)为分析纯,水为超纯水。

1.3 药材

滇重楼样品于2012年11月—2013年11月采自云南省、贵州省的14个不同地区,经重庆三峡学院周浓副教授鉴定为百合科植物云南重楼 *P. polyphylla* Smith 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

色谱柱: Intersil ODS-C₁₈ (150 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-水(92:8, V/V); 流速: 1.0 ml/min; 检测波长: 203 nm; 柱温: 35℃; 进样量: 20 μl。在此色谱条件下,理论板数按薯蓣皂苷元峰计算不低于8 000,与其他峰的分度均>1.5。色谱详见图1。

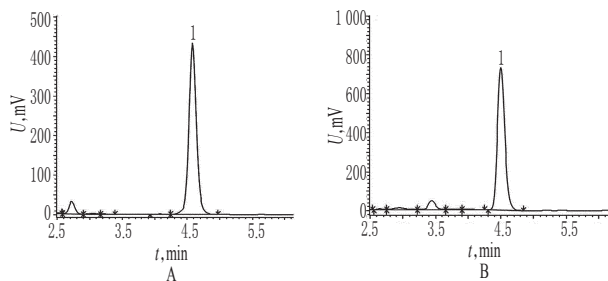


图1 高效液相色谱图

A.对照品;B.供试品;1.薯蓣皂苷元

Fig 1 HPLC chromatograms

A.reference;B.test sample;1.diosgenin

2.2 对照品溶液的制备

精密称取薯蓣皂苷元对照品适量,加甲醇制成每1 ml含0.539 mg的薯蓣皂苷元对照品溶液,即得。

2.3 供试品溶液的制备

取本品粉末适量,过50目筛[(355±13)μm],取约0.25 g,精密称定,置于100 ml具塞锥形瓶中,加甲醇20 ml,超声(功率:600 W,频率:40 kHz)处理30 min,静置,放冷,滤过,重复操作1次,合并滤液,减压回收甲醇至干;加2 mol/L盐酸7.5 ml,置沸水浴中水解3 h,冷却后用石油醚(60~90℃)萃取3次,每次30 ml;合并石油醚萃取液,水洗至中性,减压回收石油醚至干,残渣用甲醇溶解并转移至10 ml量瓶中,定容,摇匀,即得。

2.4 线性关系考察

精密吸取质量浓度为0.539 mg/ml的对照品溶液各1、2、5、10、15、20、25 μl,分别注入液相色谱仪,以进样量(x, μg)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程为y=649 568x+16 096(r=0.999 9)。结果表明,薯蓣皂苷元进样量在0.539~13.475 μg范围内与其峰面积呈良好的线性关系。

2.5 精密度试验

精密吸取对照品溶液(0.539 mg/ml)适量,按“2.1”项下色谱条件重复进样6次,记录峰面积。结果,RSD为0.39%,表明

仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验

精密吸取同一供试品溶液(编号10)适量,分别于放置0、4、8、12、16、24 h时按“2.1”项下色谱条件进样测定。结果,RSD为0.96%,表明供试品溶液在24 h内稳定性良好。

2.7 重复性试验

取同一产地样品(编号10)适量,按“2.3”项下方法制备6份供试品溶液,在上述色谱条件下测定薯蓣皂苷元的含量。结果,RSD为1.92%,表明该方法重复性良好。

2.8 加样回收率试验

精密称取已知含量的滇重楼样品(编号10)共6份,每份约0.125 g,分别精密加入一定量的薯蓣皂苷元对照品,按供试品溶液的制备方法制备,测定含量,并计算回收率,结果详见表1。

表1 加样回收率试验结果(n=6)

Tab 1 Results of recovery tests (n=6)

称样量,g	样品含量,mg	加入量,mg	测得量,mg	加样回收率,%	平均加样回收率,%	RSD,%
0.125 8	1.199 9	1.185 8	2.385 1	99.95		
0.125 1	1.193 3	1.185 8	2.342 8	96.94		
0.125 3	1.195 2	1.185 8	2.357 5	98.02	98.48	1.21
0.125 9	1.200 9	1.185 8	2.385 2	99.87		
0.125 4	1.196 1	1.185 8	2.357 8	97.97		
0.125 5	1.197 1	1.185 8	2.361 1	98.16		

2.9 样品含量测定

取不同产地的滇重楼药材适量,以“2.3”项下方法制备供试品溶液,进样20 μl,进行HPLC分析,测定峰面积,以外标两点法计算各重楼样品中薯蓣皂苷元的含量,结果详见表2。

表2 不同产地滇重楼中薯蓣皂苷元含量

Tab 2 Contents of diosgenin in *P. polyphylla* var. *yunnanensis* from different habitats

编号	产地	采集日期	薯蓣皂苷元含量,mg/g	RSD,%
1	云南省大理州农业科学推广研究院1	2012.11.18	5.143 2	1.05
2	云南省大理州农业科学推广研究院2	2012.11.18	20.750 8	1.39
3	云南省大理州农业科学推广研究院3	2013.03.28	4.300 0	0.80
4	云南省弥渡县弥城镇新庄村黄矿厂	2012.11.20	5.608 1	1.03
5	云南省弥渡县红岩镇三毛中药材种植专业合作社	2012.11.20	3.869 4	1.68
6	云南省大理市花甸坝药材场2组	2012.11.22	7.433 9	1.00
7	云南省大理市花甸坝药材场1组	2013.11.22	4.818 4	0.89
8	云南省大理市下关镇	2012.11.20	10.265 5	1.17
9	云南省丽江市古城区	2013.11.19	11.289 0	1.52
10	贵州毕节地区黔西县大坪村移植于尾后栽培	2012.11.18	9.538 4	1.15
11	贵州黔东南州晴隆县老云村后山	2012.11.11	7.415 0	0.95
12	贵州黔东南州兴义市五沙镇舍格村打石坡	2012.11.16	21.074 7	1.31
13	贵州安顺市龙宫镇蔡官乡	2012.11.13	5.348 0	1.24
14	贵州安顺市114厂后山	2012.11.16	5.135 9	0.76

3 讨论

3.1 提取条件的优化

试验比较了甲醇、95%乙醇、无水乙醇、氯仿、丙酮为提取溶剂,对比超声提取、水浴回流及索氏提取等不同提取方法的

效果,结果以甲醇超声 30 min 提取 2 次效率最高。同时,比较了不同浓度(0.5、1、1.5、2、3 mol/L)的盐酸、硫酸、盐酸+硫酸对薯蓣皂苷元含量的影响。结果发现,以硫酸进行水解的结果重现性差,可能因硫酸的氧化性引起副反应较复杂所致,故选择盐酸作为调节酸度的水解介质,结果表明以 2 mol/L 的盐酸溶液水解为佳。继而分别考察水解时间(1、2、3 h),结果盐酸水解 3 h,能使水解完全。水解后继以石油醚(60~90 ℃)振荡提取,发现在用石油醚提取第 4 次进样已无薯蓣皂苷元色谱峰。由此可见,采用石油醚振荡提取 3 次,每次 30 ml,能有效地富集纯化薯蓣皂苷元。

3.2 测定结果的分析

中药中有效成分的含量与生长环境密切相关。不同产地生长的滇重楼,由于海拔、气温和土壤等复杂多变,其化学成分含量也会发生变化,从而使其品质表现出一定的地域及生境依赖性^[6-7]。李海涛等^[6]曾报道,云南不同产地滇重楼皂苷含量受地理环境、土壤和气候的影响而存在差异;周浓等^[7]也曾报道,重楼药材中总皂苷含量和质地呈现明显的地域、生境依赖性。

本试验首次对滇黔境内 14 个不同产地的滇重楼中薯蓣皂苷元含量进行测定,其中,来自贵州黔西南州兴义市五沙镇舍格村、云南省大理州农业科学推广研究院 2 的样品含量最高,分别为 21.074 7、20.750 8 mg/g;来自贵州毕节地区黔西县大坪村、云南省大理市下关镇与丽江市古城区的样品含量居中,分别为 9.538 4、10.265 5、11.289 0 mg/g;其他产区的样品含量在 3.87~7.43 mg/g 之间。结果显示,不同产地药材之间薯蓣皂苷元含量存在一定差异,可能与不同生长年限、栽培技术等有关^[8-9];同一栽培品种在不同栽培地区之间的差异可能与栽培技术、生态环境等有关^[9-10]。这表明,今后需加大对重楼的

人工栽培技术研究,以确保重楼药材质量的稳定性与资源可持续利用。

参考文献

- [1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2010年版.北京:中国医药科技出版社,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] 岳蕾,陈玲,寇俊萍,等.薯蓣皂苷元药理活性及其机制研究进展[J].中国临床药理学与治疗学,2010,15(2):233.
- [5] 周浓,郭吉芬,杨丽云,等.HPLC 测定不同采收期滇重楼中薯蓣皂苷元的含量[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(18):54.
- [6] 李海涛,罗先文,管燕红,等.云南省不同地区滇重楼皂苷含量的对比及影响因子分析[J].中国中药杂志,2014,39(5):803.
- [7] 周浓,夏从龙,邹亮,等.影响滇重楼产量和品质诸因素的研究进展[J].亚太传统医药,2009,5(9):167.
- [8] 张焯,吕霜霜,周浓,等.不同生长年限滇重楼中 4 种重楼皂苷的含量比较[J].中国药房,2011,22(43):4 081.
- [9] 杨永红,戴丽君,何昆鸿,等.土壤营养与人工栽培滇重楼品质相关性评价[J].中药材,2012,35(10):1 557.
- [10] 杨斌,李绍平,严世武,等.滇重楼资源现状及可持续利用研究[J].中药材,2012,35(10):1 698.

(收稿日期:2015-03-18 修回日期:2015-06-03)

(编辑:余庆华)

首届中国-中东欧国家卫生部长论坛总结会在京召开

本刊讯 2015年6月26日上午,国家卫生和计划生育委员会召开首届中国-中东欧国家卫生部长论坛总结会,国家卫生和计划生育委员会副主任马晓伟出席会议。

会议回顾总结了论坛从酝酿、筹备到举办过程中的相关工作,指出经过 1 年的筹备,首届中国-中东欧国家卫生部长论坛于 2015 年 6 月 15-17 日在捷克首都布拉格成功举行。国务院副总理刘延东率中国政府代表团参加。论坛通过的《中国-中东欧国家卫生合作与发展布拉格宣言》,签署的多个双边合作协议和中捷政府支持的中东欧地区第一家中医中心-中捷中医中心正式揭牌标志着论坛取得了丰硕成果,为未来中国与中东欧国家开展卫生计生领域合作并发展更宽领域的人文交

流迈出了坚实的一步。

马晓伟讲话指出,此次论坛的成功举办是国家卫生和计划生育委员会成立以来在境外举办的最大的一次卫生外交行动,开启了与中东欧国家卫生合作和交流的新局面。下一步需要各方再接再厉,开创新局面。要优先应对以下挑战:一是中医药走出去如何在海外争取更有力的法律环境,在国内加强组织协调;二是中央和地方单位加强协作,中央一级要有相关的合作项目的总体规划,地方单位要配合落实一批实质性的卫生项目;三是重点推进卫生体制、政策研究项目,促成合作机制的建立。