

1-丹参素钠 2-原儿茶醛

1-D(+)- β -(3,4-dihydroxyphenyl)-lactate sodium

2-protocatechualdehyde

图 1 丹参素钠的制备型 RP-HPLC 色谱图及中心切割示意图

Fig. 1 Central incision of D(+)- β -(3,4-dihydroxyphenyl)-lactate sodium by preparative RP-HPLC

3.3 分析型 RP-HPLC 条件转换至制备型 RP-HPLC 条件: 分析型 HPLC 条件向制备型 HPLC 转化时扩展因子 $SF = (r_p)^3 \times L_p / (r_a)^3 \times L_a = 105$ (式中: p -制备型 HPLC, a -分析型 HPLC, r -色谱柱内径, L -色谱柱长度)

选择小的容量因子有利于分离时间的缩短和出峰体积的缩小。高的分离度与制备型 HPLC 可能出现的过载相适应。

3.4 分离参数^[5]: 制备型 HPLC 的效能取决于分离速度、产品纯度和上样量(制备量)。为保证产品的最终纯度,采用的方法是选择与分析型 HPLC 粒度相同的反相键合固定相,加快流动相的流速(45 mL/min)和逐步加大上样量。

3.5 洗脱程序优化: 将分析型的填料直接应用于制备型色谱,无需对流动相作较大改动。为了提高色

谱效率,扩大各组分的容量因子的差别,在分析型 HPLC 优化条件的基础上,选择梯度分离条件。一次分离可在 30 min 内完成,丹参素钠的纯度达 98.3%。

3.6 色谱柱的超载和色谱峰中心切割: 为提高制备 HPLC 的分离能力,由分析型 HPLC 的分离规模和扩展因子转化为制备型 HPLC 分离时,逐步加大上样样品的浓度,使色谱柱浓度超载。此时的分离为非线性色谱,采用“中心切割”技术(图 1)进行收集,有效避免了丹参素钠色谱峰前后微量组分的污染。

3.7 本实验以丹参干燥根为原料,采用预处理、稳定化和 HPLC 制备方法进行了丹参素钠的分离纯化研究,得出如下结论: 利用亲脂性吸附树脂和制备型液相色谱组合分离技术,能较好地解决丹参素钠在分离过程物理性质不稳定问题,初步筛选出批量制备丹参素钠的工艺条件。分离所得丹参素钠产品,经 LC-MS, IR, UV, HPLC 和熔点鉴定以及对照品比较,纯度达到 98%。

References

- [1] Liu Y L, Liu G T. Inhibition of human low-density lipoprotein oxidation by salvianolic acid A [J]. *Acta Pharm Sin* (药理学报), 2002, 37(2): 81-85.
- [2] Zhang H J, Li L N. Salvianolic acid I: a new depside from *Salvia cavaleriei* [J]. *Planta Med*, 1994, 60: 71-73.
- [3] Zhang D C, Wu W L, Liu X J, et al. Studies on water soluble active components of *Salvia miltiorrhiza* II. The structure of D(+)- β -(3,4-dihydroxyphenyl)-lactate [J]. *Acta Acad Med Shanghai* (上海第一医学院学报), 1980, 7(5): 384-385.
- [4] Cheng Z X, Gu W H, Huang H Z, et al. Studies on water soluble phenolic acid of *Salvia miltiorrhiza* [J]. *Acta Pharm Sin* (药学通报), 1981, 16(9): 536-537.
- [5] Attila F, Georges G. Comparing the optimum performance of the different modes of preparative liquid chromatography [J]. *J Chromatogr A*, 1998, 796: 59-74.

高效液相色谱法和薄层色谱法测定重楼中薯蓣皂苷元的含量

李惠芬¹, 平 渊², 陈 刚¹, 李军燕², 何 强^{1*}

(1. 天津医科大学药学院, 天津 300070; 2. 中国中医研究院广安门医院, 北京 100053)

摘要: 目的 采用高效液相色谱和薄层色谱技术, 分别测定重楼中薯蓣皂苷元的含量。方法 采用 HPLC 法, 选用 ODS 柱, 流动相: 乙腈-水 (90:10), 检测波长: 203 nm, 柱温: 35℃; TLC 法选用硅胶 G 板, 展开剂: 环己烷-乙酸乙酯 (4:1), 测定波长: 610 nm, 参比波长: 420 nm。结果 线性范围分别为 1.2~7.2 μ g ($r=0.9998$), 0.2~1.0 μ g ($r=0.9957$)。平均回收率分别为 102.2%, $RSD=3.39\%$ ($n=6$); 100.9%, $RSD=2.68\%$ ($n=6$)。结论 两种方法均可用于重楼中薯蓣皂苷元的质量控制。

关键词: 重楼; 薯蓣皂苷元; 高效液相色谱; 薄层色谱

中图分类号: R286.02

文献标识码: B

文章编号: 0253-2670(2002)12-0127-03

* 收稿日期: 2002-04-28

* 现在贵州省, 中国科学院天然产物化学重点实验室

Determination of diosgenin in *Rhizoma Paridis* by HPLC and TLC

LI Hui-fen¹, PING Yuan¹, CHEN Gang¹, LI Jun-yan², HE Jun¹

(1. College of Pharmacy, Tianjin University of Medical Sciences, Tianjin 300070, China; 2. Guanganmen Hospital, CA TCM, Beijing 100053, China)

Abstract **Object** To determine the contents of diosgenin in *Rhizoma Paridis* by HPLC and TLC. **Methods** ODS column was used in HPLC with mobile phase: acetonitrile-water (90: 10), detection wavelength: 203 nm, column temperature: 35℃; silica gel plate was used in TLC with developer: cyclohexane-ethyl acetate (4: 1), scan wavelength: 610 nm, reference wavelength: 420 nm. **Results** The linear ranges of HPLC and TLC were 1.2—7.2 μg ($r=0.9998$), 0.2—1.0 μg ($r=0.9957$). The average recovery and RSD were 102.2%, 3.39% ($n=6$) and 100.9%, 2.68% ($n=6$) respectively. **Conclusion** Both of two methods can be used for the quality control of diosgenin in *Rhizoma Paridis*.

Key words *Rhizoma Paridis*; diosgenin; HPLC; TLC

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]。其药用历史悠久,以蚤休之名始载于《神农本草经》,具有清热解毒、消肿止痛、凉肝定惊之功效^[1]。含有多甙皂苷元,其中薯蓣皂苷元的糖苷是重楼的主要活性成分。现代药理研究发现,重楼活性成分具有抗肿瘤、消炎、抑菌、镇静、镇痛、止血等作用,广泛用于临床治疗癌症、子宫出血、慢性支气管炎和流行性腮腺炎^[2]。《中华人民共和国药典》2000年版一部中尚无含量测定方法。本实验采用反相高效液相色谱法^[3]和薄层色谱法^[4]分别对重楼中薯蓣皂苷元进行测定,希望为该药材的质量控制提供定量方法。

1 仪器和材料

Waters 515 双泵型高效液相色谱仪,配有 2847 双通道紫外检测器, Millennium³² 色谱管理系统; CS-930 型双波长薄层扫描仪 (日本岛津株式会社); 硅胶 G 薄层板 (青岛海洋化工厂, 110℃ 活化 30 min); 美国定量毛细管 (0.5, 1.0 μL); 微量注射器 (Hamilton Co.); BP210S 电子天平 (Sartorius 公司); 薯蓣皂苷元对照品 (中国药品生物制品检定所); 重楼药材 (天津市中药饮片厂, 经天津中医学院第一附属医院尚英和药师鉴定为七叶一枝花); 乙腈 (色谱纯, 天津市康科德科技有限公司); 重蒸水, 其他试剂均为分析纯。

2 方法和结果

2.1 高效液相色谱条件: 色谱柱: Prodigy ODS 柱 (4.6 mm×250 mm, 5 μm); 柱温: 35℃; 流动相: 乙腈-水 (90: 10); 测定波长: 203 nm; 流速: 1.0 mL/min; 进样量: 20 μL。

2.2 薄层色谱与扫描条件: 硅胶 G 板 (10 cm×10

cm); 上行展开; 展距: 10 cm; 展开剂: 环己烷-乙酸乙酯 (4: 1), 预饱和 20 min; 显色剂: 50% 磷钼酸乙醇溶液, 110℃ 烘烤 5 min 至蓝色清晰斑点出现; 扫描方式: 双波长锯齿扫描; 狭缝宽度: 1.2 mm×1.2 mm; 线性参数: $S_x=3$; $\lambda_s=610$ nm, $\lambda_R=420$ nm。

2.3 样品溶液的制备: 取已干燥的重楼样品适量, 粉碎过 50 目筛, 精密称取 1.000 g 装滤纸包, 置索氏提取器中, 加入甲醇 75 mL 提取至无色后, 回收甲醇至干, 加 2 mol/L 盐酸 20 mL, 置沸水浴中水解 2 h, 冷却后用石油醚 (60℃~90℃) 萃取 3 次, 每次 20 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, 定容于 10 mL 容量瓶中, 作为供试品溶液。

2.4 高效液相色谱法测定

2.4.1 标准曲线及线性范围: 精密称取薯蓣皂苷元对照品 10.0 mg, 置 25 mL 容量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 作为对照品溶液。精密吸取对照品溶液 3, 6, 9, 12, 15, 18 μL 按上述色谱条件测定, 以峰面积为纵坐标, 进样量为横坐标作标准曲线, 得回归方程 $Y=645462X+44709$, $r=0.9998$ 。结果表明, 进样量在 1.2~7.2 μg 峰面积与进样量呈良好线性。

2.4.2 精密度试验: 精密吸取对照品溶液分别进样 5 次, 每次 10 μL, 测得各次峰面积积分值, 计算得 $RSD=0.413\%$, 表明仪器精密度高。

2.4.3 重现性试验: 精密移取供试品溶液 5 份各 1.5 mL 置 5 mL 容量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 测定, 薯蓣皂苷元含量的 RSD 为 2.91%。

2.4.4 加样回收率试验: 精密称取样品粗粉 1.000 g 12 份, 其中 6 份精密加入对照品溶液 1 mL, 按样品溶液制备方法提取, 进样, 测定, 平均加样回收率为 102.2%, $RSD=3.39\%$ ($n=6$)。

2.4.5 样品测定: 依 HPLC法操作,测定结果见表 1,色谱图见图 1

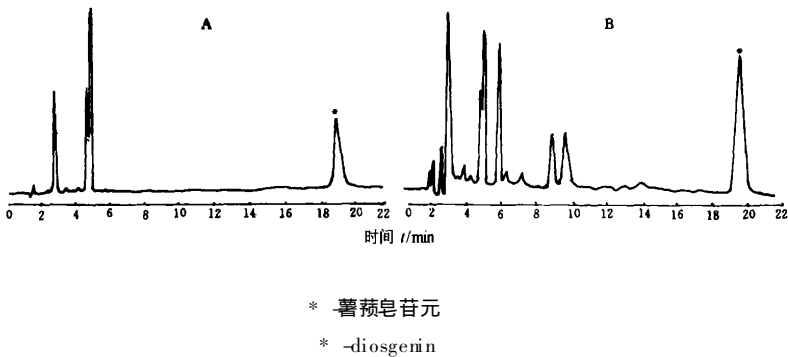


图 1 薯蓣皂苷元对照品 (A)和供试品 (B)的 HPLC图谱

Fig. 1 HPLC chromatograms of diosgenin reference substance (A) and sample (B)

2.5 薄层色谱法测定

2.5.1 标准曲线及线性范围: 精密吸取对照品溶液 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 μ L 分别点于同一硅胶板上, 依法展开, 显色, 扫描。以斑点积分面积值为纵坐标, 点样量为横坐标, 得回归方程为: $Y = 90\,822X + 5\,030$, $r = 0.9957$, 结果表明点样量在 0.2~1.0 μ g 与斑点积分面积值呈良好线性关系。

2.5.2 精密度、重现性、稳定性试验: 对同一对照品溶液斑点连续扫描 5 次, 薯蓣皂苷元峰面积的 $RSD = 0.43\%$, 表明仪器精密度良好。取相同量的供试品 5 份, 分别点于同一硅胶板上, 展开, 扫描, 测定, 样品峰面积的 $RSD = 2.86\%$, 表明同板重现性良好。按同板重现性操作方法点于同批不同板上, 依法扫描, 测定, 峰面积的 $RSD = 3.29\%$, 表明异板重现性良好。取供试品溶液适量点于硅胶板上, 展开, 显色, 稳定后每隔 1 h 测定, 结果 8 h 内稳定, 峰面积的 $RSD = 0.73\%$ ($n = 8$)。

2.5.3 回收率试验: 取 2.4.4 项制备的回收溶液适量依法点样, 展开, 扫描, 测定, 平均加样回收率为 100.9%, $RSD = 2.68\%$ ($n = 6$)。

2.5.4 样品含量测定: 精密吸取供试品溶液 0.5 μ L, 对照品溶液 1 μ L 交叉点于硅胶板上, 展开, 显色, 扫描, 按外标两点法测定样品含量, 结果见表 1。

表 1 重楼中薯蓣皂苷元的测定结果 ($n = 5$)

Table 1 Determination of diosgenin in *Rhizoma Paridis* ($n = 5$)

方 法	薯蓣皂苷元 %	RSD %
HPLC	0.955	2.77
TLC	0.940	3.17

3 讨论

3.1 高效液相色谱法是近年来中药材及中成药常用的定量分析方法。我们应用反相高效液相色谱技术对重楼中薯蓣皂苷元的含量进行测定, 并与薄层扫描法比较, 两种方法对重楼中薯蓣皂苷元的分离均较好, 测定结果无明显差异, 均可用于重楼中薯蓣皂苷元的测定。

3.2 在 HPLC 测定中, 柱温高低直接影响分离结果。我们先后选择了 25, 30, 35, 40 $^{\circ}$ C 柱温, 发现柱温升高, 目标峰将与杂质峰部分重叠; 降低柱温, 目标峰保留时间过长, 故选用 35 $^{\circ}$ C 柱温。

3.3 在优化色谱条件的过程中, 乙腈与水的配比分别试用过 75: 25, 80: 20, 85: 15, 90: 10 4 种比例。结果表明, 乙腈-水 (90: 10) 时, 薯蓣皂苷元色谱峰保留时间比较适合, 峰形也好, 故采用了该配比的流动相。

3.4 在薄层色谱展开的过程中, 我们曾试用过两种体系的多种配比: 环己烷-乙酸乙酯 (3: 1, 4: 1, 5: 1), 氯仿-甲醇 (100: 1, 100: 1.2, 100: 0.8)。结果发现, 环己烷-乙酸乙酯 (4: 1) 时 R_f 值适当且斑点集中、清晰。

References

[1] Ch P (中国药典) [S]. 2000 ed. Vol II .
[2] Shi X F, Du D J. Survey of studies and application of pharmacology of *Rhizoma Paridis* [J]. *Inf Tradit Chin Med* (中医药信息), 1991, 8(4): 42-45.
[3] Da S L, Tang X Y, Da H N, et al. Determination of diosgenin in *Dioscorea Zingiberensis* by RP-HPLC [J]. *Chin J Chromatogr* (色谱), 1992, 10(2): 98-99.
[4] Wang Q, Yu X S, Pan R T. Determination of steroidal saponin in Chonglou (*Rhizoma Paridis*) [J]. *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 1991, 11(2): 90-93.