

UPLC-ELSD 法同时测定重楼中重楼皂苷 I、II、VI、VII

韩燕全¹, 洪燕², 夏伦祝^{1*}, 左冬², 姜蕾², 罗欢²

1. 安徽中医学院第一附属医院 国家中医药管理局中药制剂三级实验室, 安徽 合肥 230031

2. 安徽中医学院, 安徽 合肥 230031

摘要: 目的 建立同时测定重楼中重楼皂苷 I、II、VI、VII 的超高效液相色谱-蒸发光散射 (UPLC-ELSD) 分析方法。方法 采用 Waters Acquity UPLC H-Class 色谱系统, ELSD 检测器, BEH C₁₈ 色谱柱 (50 mm×2.1 mm, 1.7 μm), 流动相为乙腈-水, 以体积流量 0.45 mL/min 进行梯度洗脱, 柱温 30 °C。结果 被测成分在线性范围内均具有良好的线性关系 ($r > 0.9995$); 平均回收率在 98.36%~100.11%, RSD≤1.56%。结论 UPLC 法分离效果及重现性好, 且快速、简便, 可作为重楼的质量控制方法。

关键词: 重楼; 超高效液相色谱-蒸发光散射; 重楼皂苷 I; 重楼皂苷 II; 重楼皂苷 VI; 重楼皂苷 VII

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2012)02-0305-03

Simultaneous determination of *Paris* saponins I, II, VI, and VII in *Paridis Rhizoma* by UPLC-ELSD method

HAN Yan-quan¹, HONG Yan², XIA Lun-zhu¹, ZUO Dong², JIANG Lei², LUO Huan²

1. The First Affiliated Hospital, Anhui College of Traditional Chinese Medicine, Grade 3 Laboratory of Traditional Chinese Medicine Preparation, State Administration of TCM, Hefei 230031, China

2. Anhui College of Traditional Chinese Medicine, Hefei 230031, China

Key words: *Paridis Rhizoma*; UPLC-ELSD; *Paris* saponin I; *Paris* saponin II; *Paris* saponin VI; *Paris* saponin VII

重楼是百合科 (Liliaceae) 重楼属 *Paris* L. 植物的泛称, 以蚤休之名首载于《神农本草经》。重楼属植物全世界共有 24 种, 我国种类最多, 拥有 19 种, 其中西南各省区种类和资源极为丰富^[1-3]。该属植物主要分布于我国的云南、四川、贵州等地, 具有清热解毒、消肿止痛、息风定惊的功效, 主要用于臃肿疮毒、毒蛇咬伤等症, 是云南白药、宫血宁胶囊等中成药的主要组成药物。《中国药典》2010 年版一部规定药用重楼来源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^[4]。皂苷是其主要活性成分, 主要苷元为异螺甾烷醇类的薯蓣皂苷元和偏诺皂苷元, 本研究中重楼皂苷 I、II 属于薯蓣皂苷, 重楼皂苷 VI、VII 属于偏诺皂苷^[2]。本实验在文献研究的基础上^[4-5], 采用超高效液相色

谱-蒸发光散射 (UPLC-ELSD) 法, 建立了同时测定重楼皂苷 I、II、VI、VII 的色谱条件, 测定了不同产地的重楼中重楼皂苷的量, 测定时间只是常规 HPLC 法的 20%, 且灵敏度高, 准确性好, 是一种简便、快速、准确的检测方法, 为重楼的质量控制和临床合理应用提供了一定的科学依据。

1 仪器与试剂

Waters Acquity H-Class UPLC 超高效液相色谱仪 (美国 Waters 公司), 包括四元梯度泵、恒温自动进样器、柱温箱、Acquity ELSD 检测器以及 Waters Empower 2 软件; KQ3200DB 型超声清洗器 (江苏昆山超声仪器有限公司); 0.2 μm 微孔滤膜 (上海陆纳生物科技有限公司)。重楼皂苷 I (111590-200402)、重楼皂苷 II (111591-200402)、重楼皂苷 VI (111592-200402)、重楼皂苷 VII (111593-200402) 对照品均购自中国药品生物制品检定所; 乙腈为色

收稿日期: 2011-06-20

基金项目: 国家中医药管理局重点学科肺病学科开放基金项目 (kfj201115); 安徽中医学院临床科研基金 (2009LC1-019A)

作者简介: 韩燕全 (1977—), 男, 博士, 主要从事中药质量控制和新药研究。E-mail: hyquan2003@163.com

*通讯作者 夏伦祝 E-mail: xlunzhu@sohu.com

谱纯 (Tedia, 美国); 屈臣氏蒸馏水; 乙醇等试剂均为分析纯。

不同产地重楼药材分别购于安徽省合肥市的医院、零售药店和亳州药材市场, 经安徽中医学院第一附属医院中药房李立华副主任药师鉴定均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。详细信息见表 1。

表 1 重楼来源

Table 1 Origins and sources of *Paridis Rhizoma*

编号	购买地	产地	基 源
1	合肥市百姓缘大药房	安徽	七叶一枝花
2	合肥市华嘉药房	四川	七叶一枝花
3	合肥市为民大药房	云南	云南重楼
4	合肥市绿中原医药连锁点	安徽	七叶一枝花
5	合肥市蜀山区门诊部药房	广西	七叶一枝花
6	合肥市上善大药房	四川	七叶一枝花
7	亳州中药材市场	云南	云南重楼

2 方法与结果

2.1 色谱条件^[6-7]

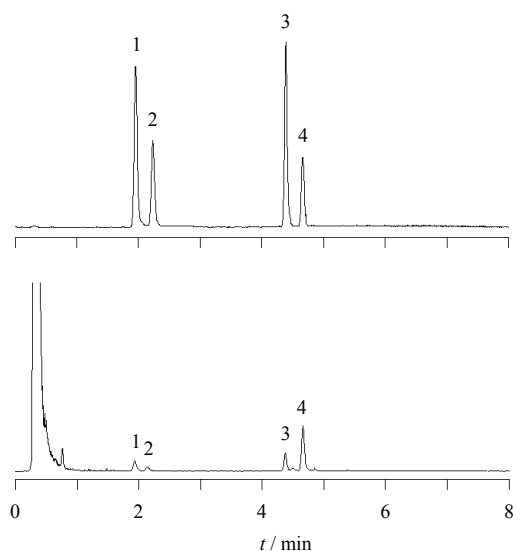
Acquity UPLC BEH C₁₈ 色谱柱 (50 mm×2.1 mm, 1.7 μm), 柱温 30 °C, 分析时间 8 min, 进样量: 对照品最大 5 μL (样品进样 2 μL), 流动相为乙腈 (A) -水 (B), 梯度洗脱: 0~2.5 min, 40%~45% A; 2.5~3.5 min, 45%~55% A; 3.5~4.5 min, 55%~60% A; 4.5~6.5 min, 65%~40% A; 体积流量 0.45 mL/min。进样前流动相梯度初始条件平衡 15 min, 柱温 30 °C。弱洗溶剂: 乙腈-水 (90:10), 800 μL; 强洗溶剂: 乙腈-水 (10:90), 500 μL; ELSD 条件^[5]包括: 增益 500, 数据率 1.0×10⁻⁵, 喷雾器模式为冷却; 漂移管温度 50 °C, 气体压力 275.8 kPa。色谱图见图 1。

2.2 混合对照品溶液的制备

分别精密称取重楼皂苷 I、II、VI、VII 对照品适量于 5 mL 量瓶中, 甲醇定容, 制成重楼皂苷 I、II、VI、VII 分别为 99.6、118.4、84.0、133.6 μg/mL 溶液, 存放于 4 °C 冰箱中供分析用, 临用时 0.2 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液作为混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备

分别取 7 批不同产地重楼样品细粉 (过 60 目筛) 约 1.0 g, 精密称定, 置圆底烧瓶中, 分别精确加入



1-重楼皂苷 VII 2-重楼皂苷 VI 3-重楼皂苷 II 4-重楼皂苷 I
1-*Paris saponin* VII 2-*Paris saponin* VI 3-*Paris saponin* II
4-*Paris saponin* I

图 1 重楼皂苷混合对照品 (A) 和样品 (B) 的 UPLC 色谱图

Fig. 1 UPLC chromatograms of *Paris saponins* mixed reference substances (A) and sample (B)

乙醇 25 mL, 称定质量, 回流提取 30 min, 称定质量, 用乙醇补足减失的质量, 静置 10 min。取上清液过 0.2 μm 滤膜, 取续滤液, 即得供试品溶液, 存放于 4 °C 冰箱中供分析用, 临用时以 0.2 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液作为供试品溶液。

2.4 线性关系考察

依次精密量取混合对照品溶液 1.00、2.00、3.00、4.00、5.00 μL, 分别进样, 测定峰面积。分别以各色谱峰面积积分值 (Y) 对其质量浓度 (X) 进行线性回归, 线性范围及回归方程见表 2。

2.5 精密度试验

吸取对照品溶液 2.0 μL, 连续进样 5 次, 测定, 计算得重楼皂苷 I、II、VI、VII 峰面积的 RSD 分别为 0.98%、0.30%、1.03%、1.08%, 结果表明仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验

取 6 号重楼样品制备供试品溶液, 分别在 0、2、4、8、12、24 h 进样, 每次进样 2.0 μL 测定峰面积, 结果重楼皂苷 I、II、VI、VII 峰面积的 RSD 分别为 1.07%、1.13%、1.89%、1.50%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.7 重现性试验

取 6 号重楼样品, 平行取样 5 份, 按“2.3”项

表 2 重楼皂苷 I、II、VI、VII 线性回归方程和相关系数

Table 2 Linear regression equation and correlation coefficient of *Paris* saponins I, II, VI, and VII

成 分	线性范围 / ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	回归方程	<i>r</i>
重楼皂苷 I	133.6~668.0	$Y=87\,618.0 X-51\,192.6$	0.999 9
重楼皂苷 II	84.4~422.0	$Y=175\,686.9 X-138\,575.3$	0.999 7
重楼皂苷 VI	118.4~592.0	$Y=108\,943.9 X-67\,272.3$	0.999 6
重楼皂苷 VII	99.6~498.0	$Y=169\,110.4 X-104\,956.6$	0.999 7

下处理制备供试品溶液, 进样 2.0 μL 测定各成分的峰面积, 结果重楼皂苷 I、II、VI、VII 峰面积的 RSD 分别为 1.01%、1.53%、1.24%、1.52%。

2.8 加样回收率试验

精密称取 6 号重楼样品 0.5 g, 共 6 份, 分别置 10 mL 量瓶中, 加入各对照品溶液适量, 按“2.3”项下处理, 用甲醇稀释定容, 过 0.2 μm 微孔滤膜, 取 2.0 μL 续滤液注入液相色谱仪, 测定, 计算得重楼皂苷 I、II、VI、VII 的平均回收率分别为 100.11%、98.36%、99.92%、99.04%, RSD 分别为 1.49%、1.39%、1.56%、1.35%。

2.9 样品测定

取各重楼样品, 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 进样 2.0 μL , 记录峰面积, 代入回归方程, 计算各样品中各成分的量, 结果见表 3。

表 3 重楼中重楼皂苷 I、II、VI、VII 的质量分数

Table 3 Contents of *Paris* saponins I, II, VI, and VII in *Paridis Rhizoma*

编 号	质量分数 / ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)			
	重楼皂苷 I	重楼皂苷 II	重楼皂苷 VI	重楼皂苷 VII
201001	4.488	8.456	2.020	4.762
201002	1.958	5.413	1.776	4.061
201003	1.402	0.000	0.459	0.968
201004	2.464	0.366	1.002	0.161
201005	2.877	0.819	0.000	0.825
201006	0.000	1.176	0.000	1.345
201007	7.203	0.000	1.464	2.304

3 讨论

对样品的前处理方法进行了考察, 主要考察了乙醇和甲醇两种溶剂, 加热回流和超声两种提取方法对提取结果的影响, 结果以乙醇回流提取的总体效果为佳, 30 min 即可提取完全。分别考察了乙腈-水不同比例的流动相系统进行等度和梯度洗脱, 结果表明, 用乙腈-水进行梯度洗脱为佳, 各色谱峰保

留时间适中, 峰形和分离均较好。本实验比较了二极管阵列检测器和蒸发光散射检测器, 结果二极管阵列检测器干扰较大。由于皂苷类物质无紫外吸收或仅为末端吸收, 而蒸发光散射检测器 (ELSD) 为通用质量型检测器, 其响应不依赖样品的光学性质, 只要样品的挥发性低于流动相即可被检测^[8], 故本实验选用蒸发光散射检测器进行检测。UPLC 法具有分析时间快、灵敏度高等特点, 在中药成分分析中应用越来越广泛。《中国药典》2010 年版一部以 HPLC 法测定重楼药材中 4 种皂苷成分, 分析时间需要 50 min 以上^[6], 而本研究采用 UPLC 方法, 在 8 min 内即可完成 1 次进样, 分离效果和效率均有大幅度提高。本实验结果表明, UPLC 法简单易行, 用时较短, 适用于重楼药材中 4 种皂苷类成分的质量控制。

参考文献

- [1] 唐炳兰. 中药重楼的研究进展 [J]. 右江民族医学院学报, 2006, 28(6): 1062-1064.
- [2] 黄贤校, 高文远, 满淑丽, 等. 重楼属药用植物皂苷类化学成分及其生源途径的研究进展 [J]. 中草药, 2009, 40(3): 483-489.
- [3] 赵志勇, 高文远, 黄贤校, 等. 重楼属植物分类学研究进展 [J]. 药物评价研究, 2010, 33(3): 244-246.
- [4] 徐丽丽, 赵 亮, 夏 晖, 等. RP-HPLC 法测定重楼中四种甾体皂苷的含量 [J]. 药学实践杂志, 2009, 27(3): 201-204.
- [5] 覃红萍, 鲁 静, 林瑞超. HPLC-ELSD 法测定黄芪药材中黄芪皂苷 I、II、III、IV [J]. 中草药, 2009, 40(3): 471-473.
- [6] 中国药典 [S] 一部. 2010.
- [7] 毕晓黎, 胥爱丽, 罗文汇. HPLC-ELSD 法测定清咽胶囊中重楼皂苷 I 和重楼皂苷 II 的含量 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(4): 64-66.
- [8] 吴剑威, 谭丽杰, 赵润怀, 等. 免疫亲和柱-高效液相色谱检测中药中赭曲霉毒素 [J]. 中草药, 2011, 42(8): 1557-1559.