文章编号:1000-5404(2009)22-2275-03

论著

高效液相法测定水杨柳提取物中水柳皂苷的含量

车仁宇[1],赵 晶[1],王圣燕[2] ([1]成都军区昆明总医院临床实验科,[2]昆明医学院昆明总医院临床医学院,昆明 650032)

摘 要:目的 建立测定水杨柳提取物中水柳皂苷的高效液相色谱法。**方法** 采用RP-HPLC法,色谱柱为HYPERSILBDS-C_{18}色谱柱(200 mm×4.6 mm,5 μm);流动相为乙腈:水=75:25;流速为1.0 ml/min;检测波长为203 nm;柱温为30 ℃;柱压为10.0 MPa。**结果** 该方法的线性范围为5~500 μg/ml(r=0.999 8);平均加样回收率为99.44%,RSD为0.52%(n=15)。**结论** 该方法重现性好,精密度高,可用于水杨柳药材及其制剂的质量控制。

关键词: 水杨柳;水柳皂苷;RP-HPLC;质量控制;甾体皂苷
中图法分类号: R282.71;R284.1 **文献标识码:** A

Content determination of riparsaponin in *Homonoia riparia Lour* by HPLC

CHE Ren-yu[1], ZHAO Jing[1], WANG Sheng-yan[2] ([1]Department of Clinical Experiment, Kunming General Hospital of Chengdu Military Command, [2]Department of Clinical Medicine, Kunming Medical College, Kunming 650032, China)

Abstract: Objective To develop a HPLC method for determining the content of riparsaponin in *Homonoia riparia Lour*. Methods The determination was performed on the HYPERSILBDS-C_{18} (200 mm × 4.6 mm, 5 μm) with mobile phase consisted of acetonitrile-water (75:25) at a flow rate of 1.0 ml/min. The detection wavelength was set at 203 nm, the column temperature was 30 ℃, and the column pressure was 10.0 MPa. Results There was a good linear relationship for riparsaponin over the ranges of 5 to 500 μg/ml (r=0.999 8). The average recovery was 99.44%, and RSD was 0.52% (n=15). Conclusion The method has good reproducibility and high precision. It can be applied in quality control of *Homonoia riparia Lour*.

Key words: Homonoia riparia Lour; riparsaponin; RP-HPLC; quality control; steroidal saponin

水杨柳为大戟科植物水杨柳(*Homonoia riparia Lour*)的干燥根茎叶。水杨柳主要分布在我国云南、广西、广东、台湾等省[1],云南主要分布于滇南、滇西、滇东南、西双版纳等地,在海拔50~1 400 m的环境下生长,为云南省民族药材[2]。水杨柳为常绿灌木,叶纸质,互生,线状长圆形或狭披针形;花小,单性,雌雄异株,无花瓣;蒴果近球形,密被灰褐色短柔毛;种子近卵形,长约2 mm;花期2~5个月,果期4~11个月[3]。在云南少数民族传统医药中,水杨柳的根部被作为药用部位,主要用来治疗肝炎、关节肿痛、腹痛、烫伤等,具有清热解毒,利尿的功效。以往的研究证明在水杨柳的叶中含有蒲公英赛酮、没食子酸、黄酮糖苷等[4],心材和树皮里含有β-谷甾醇、5-(E)-12二十烯酸、没食子酸等[5]。近期研究发现在水杨柳的根部主要含有包括1-羰基-油桐酸、油桐酸、3-乙酰氧基-油桐酸、蒲公英赛酮等13个化合物[6]。我们的前期工作运用系统溶剂提取法发现了水杨柳中含量较高的8种化合物,其中一甾体皂苷类化合物为新化合物,暂命名为水柳皂苷(Riparsaponin)。体外黄嘌呤氧化酶抑制活性筛选中发现该化合物具有显著的抑制黄嘌呤氧化酶活性作用[7]。为便于水杨柳及其活性成分的深入研究,需建立水柳皂苷的含量测定方法。本研究在前期工作的基础上,根据水柳皂苷的特殊化学结构(多羟基甾体皂苷),探讨水柳皂苷的色谱行为,优化水杨柳总皂苷中水柳皂苷的分离和含量测定条件,旨在为建立优化水柳皂苷富集方法打下基础。

1 材料与方法

1.1 仪器、试剂

Waters 810高效液相色谱仪、EC2000化学工作站(美国Waters公司),电热套(天津泰斯特仪器有限公司,2 000 ml),三用紫外仪(上海市安亭电子仪器厂,ZF-2型),旋转蒸发仪(日本,EYELA,N-1000),索氏提取器(5 cm ×20 cm),WFZ-26A紫外可见分光光度计(天津市拓普仪器有限公司),Mettler Toledo EL104万分之一电子天平(瑞士梅特勒-托利多集团),数控恒温水浴锅HH-Z(国华电器有限公司),101-OA型电热鼓风干燥

作者简介: 车仁宇,男,重庆市人,硕士,主要从事天然活性物质方面的研究。电话:(023)68754016, E-mail:chelua111@sina.com

收稿日期: 2009-04-13;**修回日期:** 2009-05-21

箱(天津市泰斯特仪器有限公司)。

水杨柳药材经中科院昆明植物研究所李景秀老师鉴定。水柳皂苷对照品纯度高于99.5%(由成都军区昆明总院临床实验科提供,图1),高效液相所用甲醇、乙醇、乙腈均为色谱纯,其他有机溶剂均为分析纯。

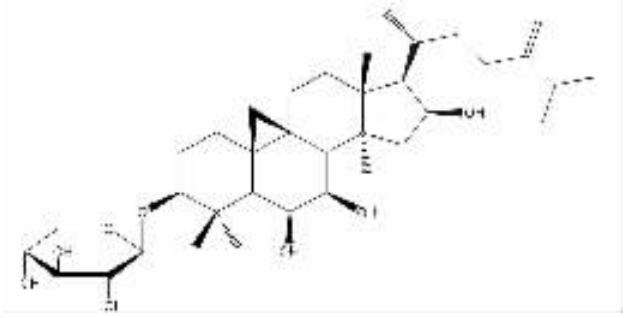


图1 水柳皂苷结构式

1.2 方法

1.2.1 检测波长的选择 取水柳皂苷对照品适量用正丁醇溶解配制成1 mg/ml对照品正丁醇溶液,以正丁醇溶液为空白,在200~400 nm波长范围内扫描。

1.2.2 色谱条件与系统适应性 HYPERSILBDS-C_{18}色谱柱(200 mm×4.6 mm,5 μm);流动相为乙腈:水=75:25(体积比);流速为1.0 ml/min;检测波长为203 nm;柱温为30 ℃;柱压为10.0 MPa;进样体积为20 μl;理论塔板数按目标化合物计不低于3 000。

1.2.3 溶液的制备 对照品溶液的制备:精密称取水柳皂苷对照品1 mg置1 ml容量瓶中,加入甲醇适量使之溶解,用甲醇稀释至刻度,摇匀,用0.45 μm微孔滤膜滤过,即得水柳皂苷对照品储备液(1 mg/ml)。供试品溶液的制备:水杨柳药材粉碎至20目,以30%乙醇渗滤,提取液喷雾干燥成细粉。取浸膏粉60 g于60 ℃恒温干燥箱中干燥3 h,放冷,置于索氏提取器(5 cm×20 cm)中。先用石油醚进行热回流脱脂,然后以正丁醇为提取溶剂进行热回流提取。得到的提取液经旋转蒸发仪干燥得5.8 g浸膏粉,从中取35 mg,置4 ml容量瓶中,加入适量甲醇使之溶解,用甲醇定容,摇匀,用0.45 μm微孔滤膜滤过,即得供试品溶液(每毫升相当于原生药0.9 g)。取20 μl进样,记录供试品化合物和峰面积,由回归方程计算其含量。

1.2.4 标准曲线的制备 精密吸取水柳皂苷对照品储备液(1 mg/ml)5、10、20、50、100、375、500 μl分别置于1 ml容量瓶中用甲醇定溶即得5、10、20、50、100、375、500 μg/ml的标准品溶液,按标准品色谱条件进行测定。

1.2.5 精密度实验[8] 分别精密吸取1.2.3的水柳皂苷对照品溶液(20、100、500 μg/ml)20 μl,每个浓度连续进样5次,记录色谱图和峰面积。

1.2.6 稳定性实验[9] 精密称取1.2.3的正丁醇提取的总皂苷浸膏,用甲醇溶解分别配制成每毫升相当于原生药0.45、0.9、1.8 g的低、中、高浓度供试品溶液,在0、4、8、12、24、48 h分别进样20 μl,记录色谱图和峰面积。

1.2.7 加样回收率实验 采用加样回收法[10]。称取1.2.3的浸膏粉末约35 mg,精密称定,分别精密加入水柳皂苷对照品0.5、1.1、1.5、1.9 mg,用甲醇溶解定溶于4 ml容量瓶中,按标准色谱条件进行测定。

1.2.8 样品含量测定 称取1.2.3的正丁醇浸膏粉末约35 mg,精密称定,置4 ml容量瓶中,加入适量甲醇使之溶解,用甲醇定容,摇匀,用0.45 μm微孔滤膜滤过。用微量注射器吸取20 μl进样,记录供试品色谱图,测定水柳皂苷峰面积,由回归方程计算其含量。

2 结果

2.1 检测波长的确定

测得其最大吸收波长为203 nm,故选用203 nm作为检测波长,见图2。

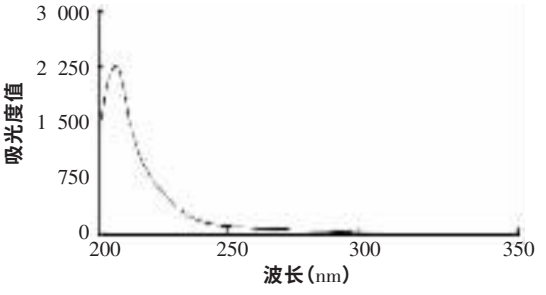


图2 水柳皂苷的紫外扫描光谱分析

2.2 标准回归方程的结果

以峰面积(y)对水柳皂苷浓度(x)进行线性回归,回归方程为$y=2.883\ 1x-11.361$,$r=0.999\ 8$,见图3。结果表明水柳皂苷浓度在5~500 μg/ml范围内与其色谱峰面积之间呈现良好的线性关系。

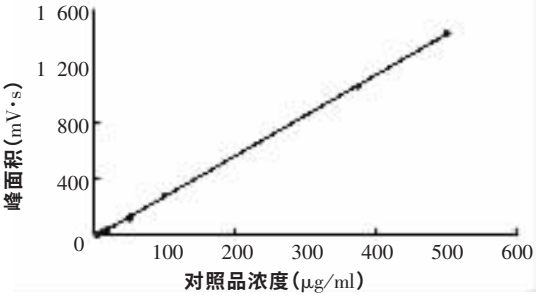


图3 水柳皂苷标准曲线

2.3 精密度实验结果

低、中、高浓度标准品溶液分别连续进样5次,测得20 μg/ml标准品溶液峰面积分别为40.05、40.21、40.12、39.67、40.42,RSD为0.68%;100 μg/ml标准品溶液峰面积分别为287.65、284.98、287.76、285.48、285.32,RSD为0.47%;500 μg/ml标准品溶液峰面积分别为1 438.03、1 435.87、1 440.65、1 436.81、1 440.12,RSD为0.14%。

2.4 稳定性实验结果

低、中、高浓度供试品溶液分别连续进样6次,测得低、中、高浓度供试品溶液峰面积分别为169.21、168.02、166.98、163.65、159.92、157.94,RSD为2.79%;347.61、346.42、342.52、340.21、338.12、332.98,RSD为1.60%;709.38、707.96、706.12、704.24、700.32、694.96,RSD为0.76%。

2.5　加样回收率实验结果

加样回收率实验可得水柳皂苷的平均加样回收率为 99.44%,RSD = 0.52%。

2.6　样品含量测定结果

样品含量测定的均值为 0.494 mg,RSD 为 0.20%,每 1 千克生药中含有水柳皂苷 138 mg。见表 1。

表 1　样品含量测定结果

编号	取样量(mg)	峰面积(mV·s)	含量(mg)
1	35.18	345.847	0.495 9
2	35.16	344.747	0.494 4
3	34.98	344.449	0.493 9
4	35.21	345.890	0.495 9
5	34.96	344.530	0.494 1

3　讨论

考虑到目标化合物为多羟基甾体皂苷类化合物,对照品的流动相选用了极性较强的甲醇:乙醇:水 = 55:10:35(体积比)作为流动相,但在对样品进行预实验时发现该流动相极性过强,对供试品中的皂苷类化合物分离效果不好,因此改用极性较小一点的乙腈:水 = 75:25(体积比)作为供试品的流动相,可以获得比较满意的分离度[7]。

前期研究证实水柳皂苷在正丁醇中是最稳定的,紫外扫描发现该化合物在正丁醇、甲醇和乙醇溶液中的最大吸收波长基本一致。在确定检测波长的时候,用正丁醇作溶剂是为了最准确的反映该化合物的紫外吸收特征,排除可能的分解产物干扰。

在水柳皂苷色谱峰的后面有一峰面积小很多的色谱峰,保留时间为 7 min 30 s,在强极性流动相下很难和水柳皂苷色谱峰分离,以往的系统分离试验证实有一化学结构跟水柳皂苷类似的皂苷类化合物,HPLC 提示水柳皂苷色谱峰后面的这个色谱峰很可能是该化合物。以往的研究提示水杨柳中所含的甾体皂苷类化合物种类并不多,因此在用正丁醇提取后可以直接进样测定,其他甾体皂苷类化合物对水柳皂苷的分离影响较小。

本实验研究了全新结构的水柳皂苷的含量测定方法,该方法样品制备快速,测定稳定,重现性好,可用于生药和制剂质量控制。

参考文献:

[1] 中国科学院植物研究所. 中国高等植物图鉴:第 2 册[M]. 北京:科学出版社, 1972:606.

[2] 赵世望, 刀正员. 西双版纳傣药志(第二集)[M]. 景洪:西双版纳州卫生局, 1980:63, 64.

[3] 中科院昆明植物研究所. 云南植物志. 第 10 卷, 种子植物[M]. 北京:科学出版社, 2006:194.

[4] Parver N, Pal-Singh M, Khan N U. Chemical examination of the leaves of Homonoia riparia Lour (Euphorbiaceae)[J]. J Indian Chem Soc, 1988, 815-816.

[5] Viswanadh G S, Atchuta-Ramaiah P, Laatsh H, *et al*. Chemical constituents of the heartwood and bark of Homonoia riparia[J]. J Trop Med Plants, 2006, 7(2):267-273.

[6] Yang S M, Liu X K, Qing C, *et al*. Chemical constituents from the roots of Homonoia riparia[J]. Yao Xue Xue Bao, 2007, 42(3):292-296.

[7] 王秀花, 赵　晶. 阿姆热化学成分分离鉴定及其黄嘌呤氧化酶抑制活性研究[J]. 昆明医学院学报, 2007, 28(4B):124.

[8] 曾　平, 张文惠. HPLC 法测定大山楂丸中金丝桃苷的含量[J]. 江西中医药, 2007, 38(6):70-71.

[9] 张士勇, 吴世蓉. HPLC 法测定益心酮滴丸中金丝桃苷含量[J]. 安徽医药, 2007, 11(4):322-323.

[10] 赵艳普. HPLC 测定照山白浸膏片中金丝桃苷的含量[J]. 中成药, 2008, 130(3):456-457.

(编辑　王小寒)

文献标识码的标识方法

为了便于文献的统计和期刊评价,确定文献的检索范围,提高检索结果的适用性,每篇文章或资料应标识 1 个文献标识码。一般设置以下 5 种标准。

A:理论与应用研究学术论文(包括综述报告)

B:实用性技术成果报告(科技)、理论学习与社会实践总结(社科)

C:业务指导与技术管理性文章(包括领导讲话、特约评论等)

D:一般动态性信息(通讯、报道、会议活动、专访等)

E:文件、资料(包括历史资料、统计资料、机构、人物、书刊、知识介绍等)

不属于上述各类的文章以及文摘、零讯、补白、广告、启事等不加文献标识码。

本刊编辑部