

商陆药材中商陆皂苷甲的含量测定^{*}

马杰¹, 赖道万², 孙文基^{1*}

(1. 西北大学陕西省生物医药重点实验室, 西安 710069; 2. 北京大学医学部药学院, 北京 100191)

摘要 目的: 为控制商陆药材的质量, 建立 HPLC-ELSD 法测定商陆药材中商陆皂苷甲的含量。方法: 采用 Kromasil C₁₈ 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 以甲醇-0.4% 醋酸水溶液 (70:30) 为流动相, 流速 1.0 mL·min⁻¹; 用蒸发光散射检测器进行检测, ELSD 漂移管温度 76.5 °C, 载气流速: 2.1 L·min⁻¹。结果: 商陆皂苷甲浓度在 50.7~507 μg·mL⁻¹ ($r=0.9992$) 范围内, 峰面积自然对数与其浓度自然对数呈良好的线性关系; 平均回收率 ($n=9$) 为 98.7%。结论: 该方法简便、准确, 专属性强, 为 2010 年版中国药典一部增订商陆含量测定项做了研究。

关键词: 商陆; HPLC-ELSD; 商陆皂苷甲

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2010)01-0163-03

Content determination of esculentoside A in herbal medicines Radix Phytolaccae^{*}

MA Jie¹, LAIDao-wan², SUN Wen-ji^{1*}

(1. Bimedicine Key Laboratory of Shaanxi Province Northwest University, Xi'an 710069, China;

2. School of Pharmacy, Peking University Health Science Center, Beijing 100191, China)

Abstract Objective To develop an HPLC-ELSD method to determine the content of esculentoside A in herbal medicines Radix Phytolaccae for controlling the quality. **Methods** Kromasil C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) column was adopted with mixture of methanol and 0.4% acetic acid (70:30) as mobile phase, the flow rate was 1.0 mL·min⁻¹. An evaporative light scattering detector was used. The temperature of drift tube was set at 76.5 °C, and the gas flow rate was 2.1 L·min⁻¹. **Results** The linear range of esculentoside A was 50.7~507 μg·mL⁻¹, the correlation coefficient was 0.9992. The average recovery ($n=9$) was 98.7%. **Conclusion** This method is simple, accurate, specific. It can offer references for the quality control of herbal medicines Radix Phytolaccae.

Key words Radix Phytolaccae; HPLC-ELSD; esculentoside A

商陆药材为商陆科植物商陆 (*Phytolacca acinosa* Roxb.) 或垂序商陆 (*P. amERICANA* L.) 的干燥根, 用作传统中药, 为中国药典所收录^[1]。其味苦, 性寒, 有毒, 归肺、肾、大肠经。有逐水消肿、通利二便、解毒散结的功能。主治水肿胀满、二便不通、癰疽、疮毒等^[2]。商陆皂苷的主要成分为商陆皂苷甲, 具有显著的抗炎、免疫抑制、提高 DNA 的合成率^[3]等作用, 它与商陆皂苷活性相似。对于商陆皂苷甲的含量研究, 有薄层扫描法^[4,5]和蒸发光散射检测 (HPLC-ELSD) 法^[6,7], 方法较为复杂。鉴于 2010 年版中国药典中商陆药材标准拟在原有基础上增订其专属性的含量测定项, 本文建立了用 HPLC-

ELSD 测定商陆皂苷甲含量的方法, 用于控制商陆药材的内在质量。

1 仪器和试剂

日本日立公司 HITACHI L-7110 型高效液相色谱仪, 美国奥泰公司 Alltech ELSD-2000ES 型蒸发光散射检测器, AnaStar 色谱工作站; 美国 MILLIPORE 公司超纯水发生器; YCQ-300 型超声波清洗器 (上海凯波超声设备有限公司)。

所用甲醇为色谱纯 (天津市科密欧化学试剂有限公司), 冰醋酸 (西安化学试剂厂)、乙醇 (天津市致远化学试剂有限公司) 为分析纯, 水为超纯水 (自制)。

商陆皂苷甲对照品由北京大学药学院赖道万提

* 中国药典 2010 年版研究项目: 国家药典中发 [2008]99 号

** 通讯作者 Tel: (029) 88304569 E-mail: cxhm@nwnu.edu.cn

供,纯度在 98% 以上。

商陆药材样品部分由浙江中医药大学中药饮片厂、陕西宏达制药厂提供,部分购自西安万寿路药材市场及 2007 年 8 月采集于湖南、云南等地,经西北大学生命科学学院王亚洲教授鉴定,福建产样品为垂序商陆 *Phytolacca americana* L 的干燥根,其余样品为商陆科植物商陆 *Phytolacca acinosa* Roxb 的干燥根。

2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适用性试验 采用 Kromasil C₁₈ 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 以甲醇 - 0.4% 醋酸水溶液 (70:30) 为流动相, 流速 1.0 mL · min⁻¹; 用蒸发光散射检测器进行检测, ELSD 漂移管温度 76.5 °C, 载气流速: 2.1 L · min⁻¹。在上述色谱条件下, 药材中其他色谱峰对商陆皂苷甲色谱峰无干扰, 理论塔板数为 2715, 商陆皂苷甲色谱峰能达到基线分离, 峰形尖锐, 基线平稳。色谱图见图 1。

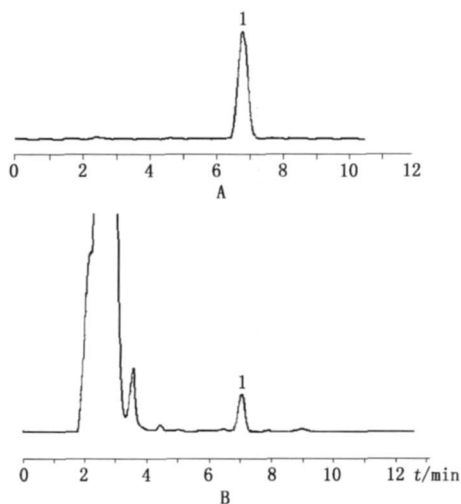


图 1 商陆皂苷甲对照品 (A)、商陆 3 号药材 (B) 色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms of reference substances (A) and medical material of No 3 (B)

1 商陆皂苷甲 (esculentoside A)

2.2 对照品溶液和供试品溶液制备 精密称定商陆皂苷甲对照品 10.14 mg 用甲醇溶解并定容至 20 mL, 制成浓度为 507 μg · mL⁻¹ 的对照品溶液。取商陆药材适量, 粉碎, 过 3 号筛, 取药材粉末约 1 g 精密称定, 置于具塞锥形瓶中, 精密加入 50% 乙醇 25 mL, 称定重量, 超声 (功率 500 W, 频率 40 kHz) 处理 0.5 h 放冷至室温, 再称定重量, 用 50% 乙醇补足减失的重量, 摇匀, 滤过, 即得。

2.3 线性关系考察 精密量取“2.2”项下的对照品溶液 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 mL, 分别以甲醇定容至 5 mL 量瓶中, 摇匀, 得到浓度分别为 50.7,

101.4, 202.8, 304.2, 405.6, 507 μg · mL⁻¹ 的一系列浓度的对照品溶液。各精密吸入 10 μL 注入液相色谱仪, 照“2.1”项下色谱条件测定峰面积, 将所得到的峰面积 *A* 与浓度 *C* (μg · mL⁻¹) 分别取自然对数后进行线性回归, 回归方程为:

$$Y = 1.441X + 0.0059 \quad r = 0.9992$$

线性范围为 50.7 ~ 507 μg · mL⁻¹。

2.4 精密度试验 精密吸取上述同一浓度 (304.2 μg · mL⁻¹) 对照品溶液 10 μL, 连续进样 5 次, 按上述色谱条件测定商陆皂苷甲峰面积的 RSD (*n* = 5) 为 0.56%。表明仪器精密度良好。

2.5 重复性试验 精密称取粉碎后过 3 号筛的湖南株洲产商陆药材粉末 5 份, 按“2.2”项下方法制成供试品溶液, 精密吸取 10 μL 在上述色谱条件下进样测定, 用外标两点法计算商陆皂苷甲的平均含量 (*n* = 5) 为 0.38%, RSD 为 0.73%。

2.6 稳定性试验 精密吸取湖南株洲产商陆的供试品溶液 10 μL, 分别于 0, 1, 2, 3, 4, 5, 24 h 进样测定, 测得商陆皂苷甲峰面积的 RSD 为 2.5%。结果表明, 供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.7 加样回收率试验 取已知含量 (产地湖南株洲, 含量为 0.38%) 的商陆样品 0.5 g 共 9 份, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 平均分为 3 组, 每组分别加入新配制的商陆皂苷甲对照品溶液 (0.956 mg · mL⁻¹) 1.6, 2.4 mL, 即相当于药材中商陆皂苷甲含有量的 0.8 倍、1 倍和 1.2 倍量, 混合均匀并挥去溶剂。按照“2.2”项下方法制备所需溶液。在上述色谱条件下分别进样 10 μL, 测定商陆皂苷甲的量, 计算加样回收率。结果低、中、高浓度回收率 (*n* = 3) 分别为 98.5%, 97.7%, 99.8%; RSD 分别为 1.4%, 1.5%, 2.1%。平均回收率 (*n* = 9) 为 98.7%。

2.8 含量测定结果 按“2.2”项下方法操作, 制备 1~12 号供试品溶液。精密吸取 10 μL, 按“2.1”项下色谱条件进行测定, 用外标法计算商陆皂苷甲含量。结果见表 1。

3 讨论

3.1 样品提取方法的研究 样品提取一般采用的方法有加热回流法、超声法等等, 有文献报道用加热回流方法提取^[6,7], 本实验采用超声提取法, 考察了不同浓度不同体积倍量的甲醇和乙醇分别超声提取 10, 20, 30, 40, 60, 90 min 对商陆皂苷甲含量的影响, 结果表明 50% 乙醇较其他溶剂提取效率更高, 且当提取时间 25 min, 溶剂体积倍量为 25 时, 提取最为完全。因超声提取方法较为简单, 易于操作, 所需时

表 1 样品信息 (%, $n = 2$)
Tab 1 A summary of tested samples

样品编号 (sample No.)	产地 (habitats)	来源 (origins)	商陆皂苷甲含量 (contents of esculentoside A) %
1	福建宁化 (Ninghua Fujian)	2007年 8月自采 (collected by author in August 2007)	0.86
2	云南宣威 (Xuanwei Yunnan)		0.18
3	湖南株洲 (Zhuzhou Hunan)		0.38
4	河南内乡 (Nèixiāng Henan)		0.27
5	陕西西安 (Xi'an Shaanxi)		0.32
6	陕西长武 (Changwu Shaanxi)	陕西宏达制药厂 (Hongda Drug Manu factory, Shaanxi province China)	0.35
7	陕西安康 (Ankang Shaanxi)	西安万寿路中药材市场 (Wanshou Road Chinese Crude Drug Market Xi'an Shaanxi province, China)	0.18
8	四川绵阳 (Mianyang Sichuan)		0.26
9	山西临汾 (Linfen Shanxi)		0.25
10	江苏 (Jiangsu)	浙江中医药大学中药饮片厂 (Chinese Crude Drug Factory, Zhejiang Chinese Medical University Hangzhou)	0.66
11	安徽 (Anhui)		0.58
12	安徽来安 (Lai'an, Anhui)	Zhejiang province China)	0.60

间较短,并且可以提取完全,所以本实验最终选择了该提取方法。

3.2 色谱条件的选择

试验比较了甲醇-水、乙腈-水流动相系统的分离效果,结果表明乙腈-水体系分离效果较差。但是,当以甲醇-水 (70:30)为流动相时,发现对照品色谱峰的峰形出现分叉,且有较强拖尾等现象,当水相中含 0.4% 醋酸之后,峰形较好,无分叉,拖尾因子为 0.99至 1.03之间。

商陆皂苷甲为三萜皂苷类化合物,紫外扫描图中可以看出其仅存在末端吸收,所以不宜用 UV 检测。而蒸发光散射检测器是一种质量通用型检测器,吸收峰的多少和大小基本可以反映中药成分的多少和含量的大小,可以检测任何挥发性低于流动相的化合物,灵敏度和精确度也均能符合要求,所以我们采用蒸发光散射检测器作为测定商陆皂苷甲含量的检测器。根据 Alltech ELSD-2000ES 型应用程序的推荐,流动相为甲醇-0.4% 醋酸水溶液 (70:30),流速为 $1.0\text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 时,ELSD 的初始操作条件为漂移管温度 $76.5\text{ }^{\circ}\text{C}$,载气流速 $2.1\text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$,经试验,在该条件下,信噪比最佳,用 HPLC-ELSD 法测定商陆皂苷甲的含量获得较好的效果。

3.3 含量限度的确定 以本法测定 12 份样品,其含量的平均值为 0.40%,最高 0.86%,最低 0.18%。综合上述结果考虑,最后认为将其限量定为 0.20% 为宜。以上数据可为增加 2010 年版中国药典中商陆含量限度的确定提供参考。

3.4 小结 采用 HPLC-ELSD 法测定商陆药材中

商陆皂苷甲的含量,经过精密度、加样回收率试验等系统方法学的考察,均符合要求,该方法灵敏,快速准确,作为新增 2010 年版中国药典 (一部) 中商陆药材含量测定项较为合适。

参考文献

- 1 ChP(中国药典). 2005. Vol I (一部): 227
- 2 XIAO Pei-gen(肖培根). Modern Chinese Materia Medica(新编中药志). Vol I (第一卷). Beijing(北京): Chemical Industry Press(化学工业出版社), 2001. 926
- 3 State Administration of Traditional Chinese Medicine of People's Republic of China 《Chinese Materia Medica》Editorial Department (国家中医药管理局《中华本草》编委会). Chinese Materia Medica(中华本草). Vol II (卷二). Shanghai(上海): Shanghai Science and Technology Publishers(上海科学技术出版社), 1999. 737
- 4 WANG Zhu-ju(王祝举), CHENG Ming(程明), YUAN Si-long(原思通). Determination of phytoalexin in Radix Phytoecae crude drugs by TLCs(薄层扫描法测定商陆饮片中商陆毒素含量). China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 1990 15(9): 21
- 5 FAN Da-jun(范大钧), AN Deng-kui(安登魁), LIXiu-lu(李修禄), et al Determination of esculentoside A in Radix Phytoecae and praeparatum by TLCs(双波长薄层扫描法测定商陆及制剂中商陆皂苷甲的含量). Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 1994 14(6): 44
- 6 XING H ao(邢浩), PANG Xue(庞雪). A quantitative determination of esculentoside A in Radix Phytoecae by high performance liquid chromatography(高效液相色谱法测定商陆植物中皂苷甲的含量). J China Japan Friendship Hosp(中日友好医院学报), 2004 18(5): 304
- 7 WANG Tie-jun(王铁军), GUO Hong-bao(郭宏宝), LU Di(卢迪), et al Determination of esculentosides A in Radix Phytoecae by HPLC(商陆中商陆皂苷 A 的含量测定). China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2000 23(5): 50

(本文于 2008 年 11 月 19 日收到)