

反相高效液相色谱法测定朱砂根中的朱砂根皂苷

甄 铎, 蒲尚饶, 马明东, 刘均利

(四川农业大学, 四川 都江堰 611830)

摘要 :建立了朱砂根中朱砂根皂苷的反相高效液相色谱分析方法。采用 SHIM-PACK VP-ODS 色谱柱(250 mm × 4.6 mm 5 μm), 流动相为乙腈-水(体积比为 37:63), 流速 1.0 mL/min, 检测波长 205 nm, 柱温 40 °C。朱砂根皂苷的进样量为 144 ng ~ 57.6 μg 时线性关系良好($r = 0.9997$); 加标回收率($n = 3$)为 94.2% ~ 99.4%, 相对标准偏差为 0.5% ~ 2.0%。方法简便, 准确性高, 重复性好, 适用于朱砂根中朱砂根皂苷的测定。

关键词 :反相高效液相色谱法(RP-HPLC) 朱砂根皂苷(ardicrenin) 朱砂根(*Ardisia crenata*)

中图分类号 :O658 文献标识码 :B 文章编号 :1000-8713(2007)06-0944-02 栏目类别 :技术与应用

朱砂根(*Ardisia crenata* Sims)为紫金牛科紫金牛属植物,又名红铜盘、大罗伞、富贵籽、铁凉伞、凉伞遮金珠、平地木、娘伞树等,分布于我国长江流域各省^[1],是中医及民间的常用药物,有着明显的生理活性和药用功效,其所含三萜皂苷具有明显的抑制癌细胞增殖和直接杀伤癌细胞等作用^[2-5]。目前,关于从朱砂根中提取、纯化三萜皂苷的研究已有报道^[6],而对于朱砂根中皂苷含量分析方法的报道较少,通常主要采用薄层色谱法进行定性分析。本文采用反相高效液相色谱法(RP-HPLC)测定朱砂根中朱砂根皂苷(cyclamiretin A-3-O-[α-L-rhamnopyranosyl-(1→4)-β-D-glucopyranosyl-(1→4)] [β-D-glucopyranosyl-(1→2)]-α-L-arabinopyranoside, ardicrenin)^[7](结构见图1)的含量。方法操作简便、准确性高、稳定性好。

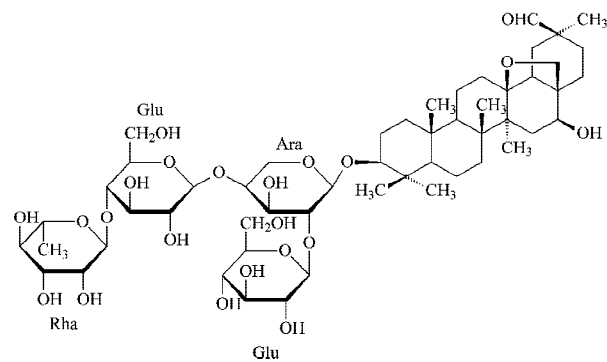


图1 朱砂根皂苷(ardicrenin)的化学结构式

1 实验部分

1.1 仪器和药品

岛津 LC-20AB 高效液相色谱系统,配有 CTO-10AS 柱箱、DGU-20A₃ 在线脱气、CBM-20A 系统控制器、SPD-20A 紫外-可见检测器、LCsolution 工作

站;TU-1810PC 紫外-可见分光光度计(北京普析通用仪器有限公司);RE52-98 旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂);KQ-500 超声器(昆山超声仪器有限公司)等。

朱砂根对照药材(中国药品生物制品检定所);朱砂根皂苷对照品(本实验室制备,经中国科学院成都生物研究所质谱与核磁共振分析,鉴定该品为朱砂根皂苷,分子式为 C₅₃H₈₆O₂₂,相对分子质量为 1074,熔点为 239 ~ 241 °C,结构同图1);朱砂根天然植株(四川都江堰灵岩山、般若寺等地野生天然植株,其形态由四川农业大学植物分类学专家易同培研究员鉴定,经与朱砂根对照药材进行薄层色谱比较鉴定,确定为紫金牛科紫金牛属植物朱砂根);朱砂根组培苗(炼苗成活两月)的植株和愈伤组织(继代3次后的茎段愈伤材料,由四川农业大学都江堰分校组培实验室提供)。HPLC 分析用甲醇、乙腈为色谱纯(SIGMA);重蒸水;提取用甲醇为分析纯(成都市科龙化工试剂厂)。

1.2 对照品储备液的制备

精密称定朱砂根皂苷对照品 90.0 mg,置于 25 mL 量瓶中,加甲醇适量溶解并定容,摇匀,即得对照品储备液 A(3.6 mg/mL)。分别精密吸取储备液 A 5.0 mL 和 1.0 mL,分别置于 10 mL 和 100 mL 量瓶中,加甲醇定容,摇匀,即得对照品储备液 B(1.8 mg/mL)和 C(36 μg/mL)。

1.3 样品溶液的制备

将采集的朱砂根鲜植株洗净泥土,于 50 °C 恒温烘干,分部位粉碎,过 40 目筛,取朱砂根粉末 2 g,精密称定。加入 16 mL 80% 甲醇,于 70 °C 回流提取 3 h,离心,收集上层清液;在沉淀物中加入 12 mL 80% 甲醇,于 70 °C 回流提取 2 h,离心,收集上层清

液,在沉淀物中加入 8 mL 80% 甲醇,于 70 ℃ 回流提取 1 h,离心,收集上层清液。合并 3 次上层清液,用 0.45 μm 滤膜过滤后定容至 50 mL,摇匀即得。

1.4 色谱条件

色谱柱 :SHIM-PACK VP-ODS(250 mm × 4.6 mm 5 μm) ;流动相 :乙腈-水(体积比为 37:63) ;流速 :1.0 mL/min ;柱温 :40 ℃ ;最大进样量 :20 μL ;检测波长 205 nm ;灵敏度 0.16 AUFS。

2 结果与讨论

2.1 色谱条件的选择

经紫外光谱扫描,朱砂根皂苷的最大吸收波长为 205 nm。故本试验采用 205 nm 为检测波长。朱砂根皂苷在乙腈-水中易溶,乙腈的紫外截止波长为 190 nm,因而用 205 nm 作为紫外检测波长,采用乙腈-水为 HPLC 的流动相是很好的选择。乙腈的比例越高,保留时间越短。

在“ 1.4 ”节色谱条件下,朱砂根皂苷的保留时间适中,峰形良好(见图 2),理论塔板数大于 3 000。

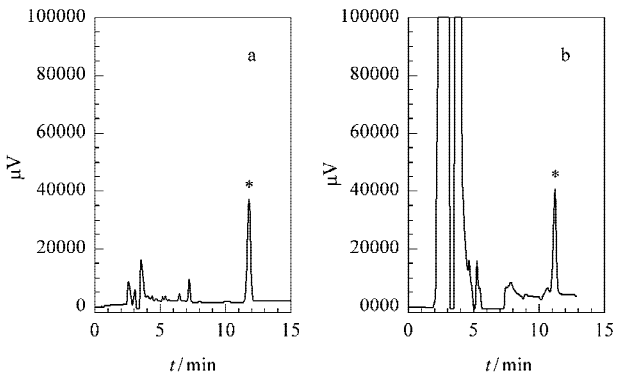


图 2 (a)朱砂根皂苷对照品和(b)朱砂根提取液的色谱图
* 朱砂根皂苷。

2.2 标准曲线的建立

取朱砂根皂苷对照品储备液 A,分别进样 16.0,10.0 8.0 μL;取其对照品储备液 B,分别进样 12.0 8.0 4.0 μL;取其对照品储备液 C 分别进样 12.0 8.0 4.0 μL 进行分析。以进样量(X, μg)为横坐标,色谱峰面积(Y)为纵坐标,绘制标准曲线,得回归方程为 : $Y = 2.08 \times 10^4 X + 1.47 \times 10^4$ ($r = 0.9997$)。结果表明,当朱砂根皂苷的进样量为 144 ng ~ 57.6 μg 时,线性关系良好。

2.3 精密度试验

取朱砂根对照品溶液 10 μL 进样,重复测定 5 次,记录峰面积,得其相对标准偏差(RSD)为 0.97%,说明仪器的精密度良好。

2.4 稳定性试验

对一样品溶液,在 0,2,4,6,8,10,12 h 各进

样 6 次,每次 10 μL,记录峰面积值,其 RSD 为 1.1%,表明样品溶液在 12 h 内稳定性良好。

2.5 重复性试验

取同一批朱砂根粉末 5 份,各 2.0 g 精密称定。按“ 1.3 ”节所述方法制备样品溶液,同日内测定 5 次,每次进样 10 μL,测得峰面积的日内精密度(以 RSD 计)为 1.8%,表明该方法的重复性良好。

2.6 加标回收率试验

取含量已知的朱砂根粉末 9 份,各 1.0 g,精密称定。每 3 份为一组,按照比例加入朱砂根皂苷对照品溶液,按“ 1.3 ”节所述方法制备样品溶液,得到低、中、高浓度溶液各 3 份。按“ 1.4 ”节所述色谱条件分析,计算加标回收率。结果见表 1。

表 1 回收率试验结果

本底值/ mg	添加值/ mg	检测值/ mg	回收率/ %	平均回收率/ %	RSD/ %
53.4		87.46	94.6		
56.3	36.0	90.20	94.2	94.2	0.5
58.3		92.04	93.7		
54.8		109.19	100.7		
53.7	54.0	106.11	97.1	98.7	1.9
55.2		108.27	98.3		
56.2		129.37	101.6		
58.1	72.0	128.85	98.3	99.4	1.9
54.5		125.19	98.2		

2.7 含量测定

取“ 1.1 ”节所述四川都江堰天然野生朱砂根植株各部位、组培苗的植株和愈伤组织,按“ 1.3 ”节所述方法制备样品溶液。精密吸取各样品溶液 10 μL,进样分析测得的朱砂根皂苷在各样品中的含量(以质量分数计)如下 :在天然野生朱砂根植株的根、茎、枝和叶中分别为 5.6%,0.24%,0.14% 和 0.14%;在组培苗植株的根、茎和叶中分别为 3.06%,0.026% 和 0.012%;在疏松愈伤组织和致密愈伤组织中分别为 0.22% 和 0.058%。

参考文献 :

[1] 陈介. 中国植物志(第五十八卷). 北京 : 科学出版社,1979 : 68
[2] Plohmman B, Bader G, Hiller K, Franz G. Pharmazie, 1997, 52(12): 953
[3] 梁克明,王四旺,王晓娟. 第四军医大学学报,2001,22(7): 671
[4] 陶小军,龙静雯,贺建宇,姚鸿萍,刘静,曹永孝. 中国药理学通报,2005,21(9): 1 070
[5] Piacente S, Pizza C, de Tommasi N, Mahmood N. J Nat Prod, 1996, 59(6), 565
[6] 尤晓宏,鱼红闪,金凤雯. 大连轻工业学院学报,2006,25 (1): 23
[7] Wang M T, Guan X T, Han X W, Hong S H. Planta Med, 1992, 58(2): 205