

HPLC-ELSD法测定短葶山麦冬中短葶山麦冬皂苷 C 的含量

甄^{1,2,3}, 狄天云³, 王刚力¹, 林瑞超¹, 刘丽芳^{2*}

(1. 中国药品生物制品检定所, 北京 100050 2 中国药科大学 现代中药教育部重点实验室, 南京 210009, 3 宁夏药品检验所, 银川 750004)

摘要 目的: 建立短葶山麦冬中短葶山麦冬皂苷 C 的含量测定方法, 并对其块根和须根中短葶山麦冬皂苷 C 的含量进行了测定。方法: 采用 HPLC-ELSD 法, 使用 Phenomenex C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 流动相为乙腈-水, 梯度洗脱 (0~15 min 乙腈 20% → 30%; 15~16 min 乙腈 30% → 48%; 16~40 min 乙腈 48%), 流速 1 mL·min⁻¹, 柱温 30 °C, 漂移管温度 105 °C, 氮气流速 2.4 L·min⁻¹。结果: 短葶山麦冬皂苷 C 进样量在 1.04~8.34 μg 范围内线性良好 (r = 0.9998); 平均回收率 (n = 6) 为 95.8%; RSD 为 1.5%。结论: 本方法简便、准确, 可用于短葶山麦冬中短葶山麦冬皂苷 C 的定量分析。须根中的短葶山麦冬皂苷 C 含量明显高于块根。

关键词 短葶山麦冬; 短葶山麦冬皂苷 C; 高效液相色谱-蒸发光散射

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2011)01-0127-04

HPLC-ELSD determination of ruscogenin 1-O- [β-D-glucopyranoside (1→2)] [β-D-xylopyranosyl(1→3)] - β-D-fucopyranoside in *Liriope muscari* (Decne.) Bailey

DING Rui^{1,2,3}, DITian-yun³, WANG Gang-li¹, LIN Rui-chao¹, LIU Li-fang^{2*}

(1. National Institute for the Control of Pharmaceutical and Biological Products, Beijing 100050 China

2. The Key Laboratory of Modern Chinese Medicines (Ministry of Education) and Department of Pharmacognosy

China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China 3. Ningxia Institute for Drug Control Yinchuan 750004 China)

Abstract Objective To develop a method for the determination of ruscogenin 1-O- [β-D-glucopyranoside (1→2)] [β-D-xylopyranosyl(1→3)] - β-D-fucopyranoside in *Liriope muscari* (Decne.) Bailey and study on the ruscogenin 1-O- [β-D-glucopyranoside(1→2)] [β-D-xylopyranosyl(1→3)] - β-D-fucopyranoside content in tuber and fibrous root of *Liriope muscari* (Decne.) Bailey. **Methods** The HPLC-ELSD method was adopted. The analysis was performed on a Phenomenex C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) column and the mobile phase consisted of a mixture of acetonitrile-water with gradient elution (0-15 min acetonitrile 20% → 30%; 15-16 min acetonitrile 30% → 48%; 16-40 min acetonitrile 48%) at the flow rate of 1.0 mL·min⁻¹. The column temperature was 30 °C, the drift tube temperature was 105 °C, and the nebulizer gas flow rate was 2.4 L·min⁻¹. **Results** The linear range of ruscogenin 1-O- [β-D-glucopyranoside(1→2)] [β-D-xylopyranosyl(1→3)] - β-D-fucopyranoside was 1.04-8.34 μg (r = 0.9998), and the average recovery (n = 6) was 95.8% with RSD of 1.5%. **Conclusion** The method is simple, reliable and accurate, and can be used for the quality analysis of ruscogenin 1-O- [β-D-glucopyranoside(1→2)] [β-D-xylopyranosyl(1→3)] - β-D-fucopyranoside in *Liriope muscari* (Decne.) Bailey. Obviously, the contents of ruscogenin 1-O- [β-D-glucopyranoside(1→2)] [β-D-xylopyranosyl(1→3)] - β-D-fucopyranoside in fibrous root were higher than that in tuber.

Key words *Liriope muscari* (Decne.) Bailey; ruscogenin 1-O- [β-D-glucopyranoside(1→2)] [β-D-xylopyranosyl(1→3)] - β-D-fucopyranoside; HPLC-ELSD

* 通讯作者 Tel (025) 86185373 Fax (025) 85301528 E-mail liulifang 69@126.com

短葶山麦冬 *Liriopemuscari* (Decne.) Bailey 为百合科山麦冬属植物, 此属植物包括 8 个种 (1 个变种)^[1], 其中短葶山麦冬和湖北山麦冬一同收载于中国药典 2010 年版山麦冬项下^[2]。短葶山麦冬主要分布在福建泉州市洛江区及莆田市仙游等地, 其具有养阴生津、润肺清心的作用, 含有多糖和多种鲁斯可皂苷, 其中短葶山麦冬皂苷 C 含量较多, 也是重要的活性成分, 现代研究表明^[3-5], 短葶山麦冬皂苷 C 具有良好的免疫调节、抗炎、抗肿瘤、抗疲劳等作用。目前, 中国药典收载的山麦冬 (短葶山麦冬和湖北山麦冬), 它们的药用部位是块根, 大量的须根资源被弃之。本文建立了 HPLC-ELSD 法, 分别测定短葶山麦冬须根和块根中短葶山麦冬皂苷 C 含量, 并做了一些比较研究。所建立的方法可以为短葶山麦冬的质量控制研究提供一些有用的参考。

1 仪器、试剂和样品

Waters 2695 高效液相色谱仪; Alltech ELSD-2000ES 型蒸发光散射检测器; Empower 色谱数据工作站。

短葶山麦冬皂苷 C 对照品为自制。经 IR、MS、¹H-NMR、¹³C-NMR 确定结构为短葶山麦冬皂苷 C, 采用本文的色谱条件测定, 峰面积归一化法计算纯度大于 98.0%。

短葶山麦冬的须根和块根样品均来自福建泉州市罗溪镇、马甲镇等不同的种植地区, 由中国药品生物制品检定所中药室张继老师鉴定。

2 溶液制备

2.1 对照品储备液 精密称取短葶山麦冬皂苷 C 对照品 26.07 mg 置 25 mL 量瓶中, 用甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得。

2.2 供试品溶液 取短葶山麦冬须根、块根粉末 (过 3 号筛) 约 1 g 精密称定, 精密加入 95% 乙醇 50 mL, 称定重量, 回流提取 2 h 补充损失重量, 过滤, 精密量取续滤液 25 mL, 减压回收溶剂, 残渣用甲醇溶解并定容于 5 mL 量瓶中, 摇匀, 即得。

3 色谱条件

色谱柱: Phenomenex C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-水, 梯度洗脱 (0~15 min 乙腈 20% → 30%; 15~16 min 乙腈 30% → 48%; 16~40 min 乙腈 48%); 流速: 1 mL·min⁻¹; 柱温: 30 °C; 漂移管温度: 105 °C; 气体流速: 2.4 L·min⁻¹; 进样量: 10 μL。在本文色谱条件下, 按短葶山麦冬皂苷 C 的色谱峰计算, 理论塔板数不小于 4000, 对照品及样品色谱图见图 1。

4 线性关系考察

精密量取“2.1”项下对照品储备液 0.5, 1, 2, 3, 4 mL, 分别置 5 mL 量瓶中, 用甲醇定容, 摇匀, 即得 5 个浓度的对照品溶液, 分别进样 10 μL, 测定峰面积积分值。以进样量 (μg) 的常用对数值 *X* 为横坐标, 峰面积积分值的常用对数值 *Y* 为纵坐标, 进行线性回归, 回归方程为:

$$Y = 1.639X + 5.670 \quad r = 0.9998$$

短葶山麦冬皂苷 C 进样量在 1.04~8.34 μg 范围内线性关系良好。

5 精密度试验

取“2.1”项下的对照品储备液适量, 用甲醇稀释成 0.6257 mg·mL⁻¹ 的对照品溶液, 连续进样 6 次, 记录短葶山麦冬皂苷 C 的峰面积积分值, 计算 RSD (*n* = 6) 为 0.52%, 表明精密度良好。

6 重复性试验

取短葶山麦冬须根样品 1 共 6 份, 每份 1 g 精密称定, 依“2.2”项下方法制备供试品溶液, 进样测定, 外标法计算短葶山麦冬皂苷 C 的含量。结果须根样品中短葶山麦冬皂苷 C 含量平均值 (*n* = 6) 为 0.528%, RSD 为 1.2%, 表明方法的重复性良好。

7 稳定性试验

取短葶山麦冬须根样品的供试品溶液, 在本文色谱条件下, 每隔 4 h 进样 1 次, 共 6 次, 结果短葶山麦冬皂苷 C 峰面积积分值的 RSD (*n* = 6) 为 0.75%, 表明供试品溶液在 20 h 内稳定。

8 加样回收率试验

取已测知短葶山麦冬皂苷 C 含量 (0.528%) 的短葶山麦冬须根样品 6 份, 每份 0.5 g 精密称定。分别加入 0.6257 mg·mL⁻¹ 的对照品溶液 0.5 mL, 挥干溶剂, 依“2.2”项下方法制备供试溶液, 进样测定, 计算回收率。结果平均回收率 (*n* = 6) 为 95.8%, RSD 为 1.5%。

9 样品测定

取不同产地短葶山麦冬的块根和须根样品, 依“2.2”项下方法制备供试品溶液, 在“3”项色谱条件下进样测定, 以外标法计算各样品中短葶山麦冬皂苷 C 含量。结果 9 批块根样品中短葶山麦冬皂苷 C 含量分别为 0.273%, 0.267%, 0.261%, 0.239%, 0.257%, 0.262%, 0.253%, 0.263%, 0.251%; 8 批须根样品中短葶山麦冬皂苷 C 含量分别为 0.528%, 0.539%, 0.537%, 0.517%, 0.526%, 0.558%, 0.531%, 0.528%。

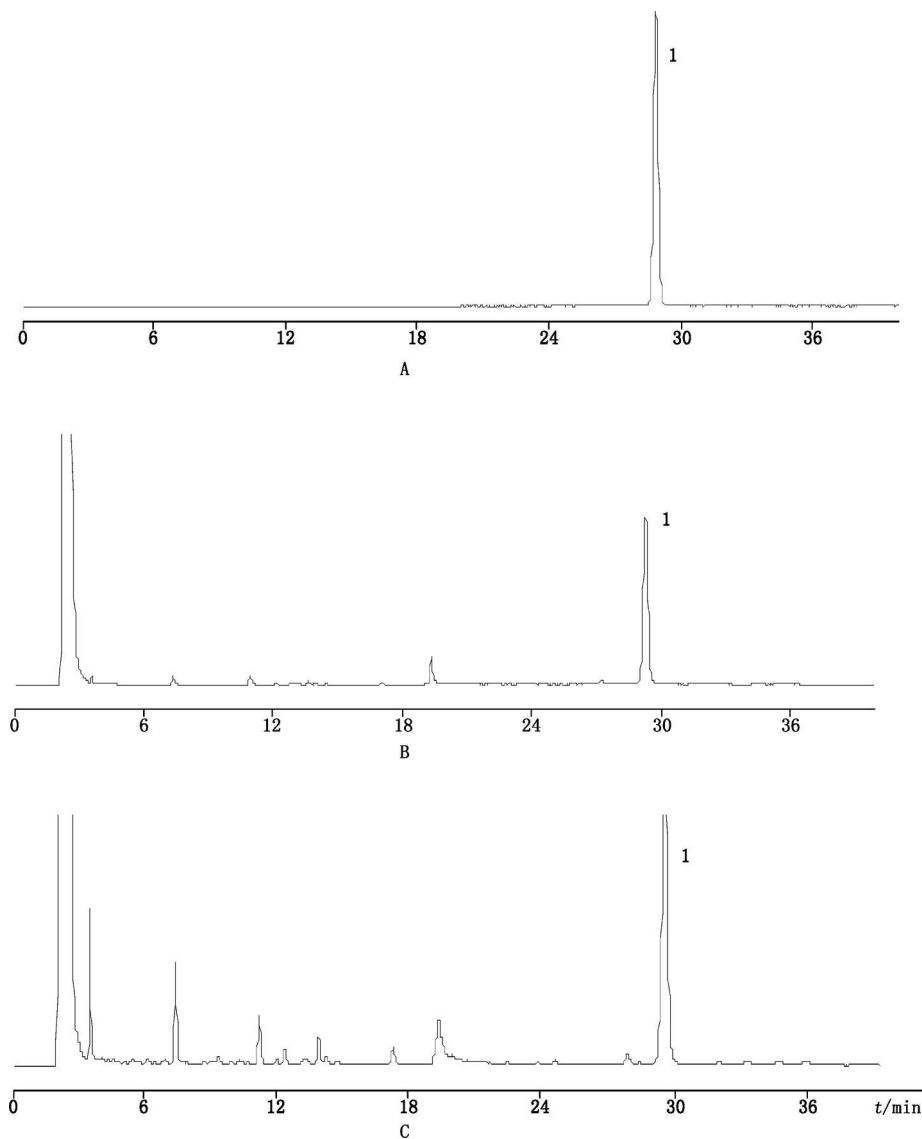


图 1 对照品(A)、块根样品(B)及须根样品(C)色谱图

Fig 1 Chromatograms of reference substance(A), tuber sample(B) and fibrous root sample(C)

1 短葶山麦冬皂苷 C (nuscogenin 1- O - [β - D - glucopyranoside (1 → 2)] [β - D - xylopyranosyl (1 → 3)] - β - D - fucopyranoside)

10 讨论

10.1 中国药典 2010年版一部山麦冬鉴别项下短葶山麦冬皂苷 C 的薄层色谱鉴别提取溶剂为甲醇, 本文考察 95% 乙醇作提取溶剂时发现, 提取液中糖的量明显减少; 同时省去了正丁醇萃取的步骤。从供试品溶液 HPLC - ELSD 色谱图可以看到待测组分短葶山麦冬皂苷 C 和多数组分散谱峰均达到分离要求, 经实验摸索可知 95% 乙醇对短葶山麦冬皂苷 C 提取效果与和甲醇作提取溶剂几乎一样, 因此本文选择 95% 乙醇作提取溶剂。

10.2 由于短葶山麦冬须根中的短葶山麦冬皂苷 C 和其他多个组分在紫外检测器中无吸收, 本实验选

择蒸发光检测器。尽管蒸发光检测器灵敏度和重现性较差, 但本文所建立的测定短葶山麦冬中短葶山麦冬皂苷 C 含量的方法可以为短葶山麦冬的质量控制提供一定的参考。

10.3 从本文的测定结果可以看出, 短葶山麦冬须根中的短葶山麦冬皂苷 C 含量明显高于块根; 从 HPLC - ELSD 色谱可以看到, 须根中的化学成分也多于块根 (见图 2), 2 个部位的化学成分和含量都有明显的区别。

10.4 短葶山麦冬须根中短葶山麦冬皂苷 C 含量丰富。所以, 在提取活性成分短葶山麦冬皂苷 C 时可以考虑选择须根为提取原料。

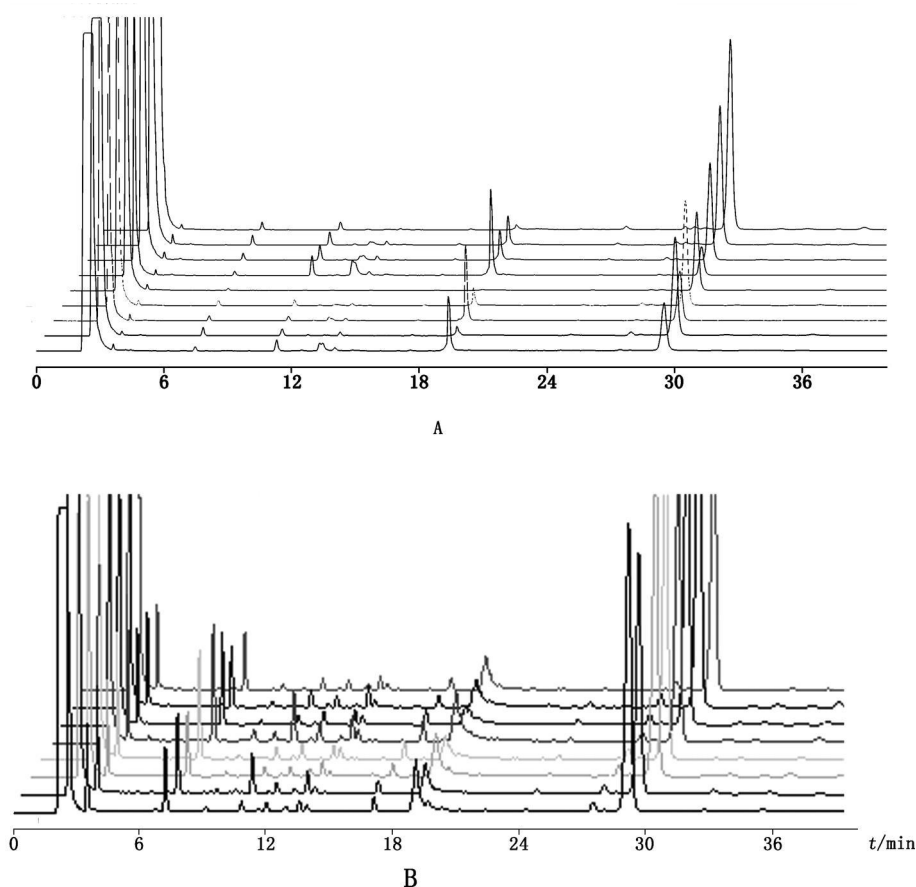


图 2 9批块根样品(A)及 8批须根样品(B)的 HPLC-ESLD 色谱图

Fig 2 Chromatograms of 9 tuber sample(A) and 8 fibrous root sample(B)

参考文献

1 YU Bo- yang(余伯阳), XU Guo- jun(徐国钧). Studies on resource utilization of Chinese drug dwarf lilyturf(*Ophiopogon japonicus*) (中药麦冬资源的利用研究). *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1995, 26(4): 205

2 ChP(中国药典). 2010 Vol I (一部): 25

3 Wu Feihua Cao Jingsong Jiang Jieyun, et al Ruscogenin glycoside (Lm-3) isolated from *Liriope muscari* improves liver injury by dysfunctioning liver-infiltrating lymphocytes *J Pharm Pharmacol*, 2001, 53(5): 681

4 Liu Jianli Chen Ting Yu Boyang et al Ruscogenin glycoside(Lm-3) isolated from *Liriope muscari* inhibits lymphocyte adhesion to extracellular matrix *J Pharm Pharmacol* 2002, 54(7): 959

5 YU Bo- yang(余伯阳), YIN Xia(殷霞), RONG Zu- yuan(荣祖元), et al Study on the pharmacological activity of ruscogenin glycoside(Lm-3) isolated from *Liriope muscari*(短葶山麦冬皂苷 C 的药理活性研究). *J China Pharm Univ*(中国药科大学学报), 1994, 25(5): 286

(本文于 2010年 6月 23日收到)