

高效液相色谱法检测不同采收期邵阳龙牙百合的秋水仙碱含量

唐湘伟*

(邵阳市食品药品检验所, 邵阳 422000)

摘要: **目的** 建立高效液相色谱法比较不同采收期邵阳龙牙百合中秋水仙碱含量。**方法** 样品加水浸泡过夜后超声提取, 再用氯仿萃取, 氯仿层水浴蒸干, 以流动相溶解稀释。色谱柱: Waters C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-水(40:60, V:V), 等度洗脱; 流速: 1.0 mL/min; 检测波长: 254 nm; 柱温: 30 ℃; 进样量: 20 μL。**结果** 秋水仙碱在 1.025~20.50 μg/mL 范围内线性关系良好($r^2=0.9997$, $n=5$), 回收率为 99.2%($n=9$)。样品实测显示, 不同采收期龙牙百合秋水仙碱含量不同, 茎叶枯黄脱落时期含量最高, 平均含量达到 3.64 mg/g。**结论** 该法简单快速, 定量准确, 可以为评价龙牙百合质量和选择最佳采收时间提供参考。**关键词:** 龙牙百合; 秋水仙碱; 高效液相色谱法

Determination of colchicine content in Shaoyang *Lilium brownii* var. *viridulum* with different harvest time by high performance liquid chromatography

TANG Xiang-Wei*

(Shaoyang Institute for Food and Drug Control, Shaoyang 422000, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for determination of colchicine in *Lilium brownii* var. *viridulum* with different harvest time by high performance liquid chromatography. **Methods** The samples were ultrasonic extracted after soaking in the water for the night, then extracted with chloroform. The chloroform layer was steamed with water bath, and the residue was dissolved and diluted by flow phase. Column was Waters C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm), mobile phase was methanol-water (40:60, V:V), flow rate was 1.0 mL/min, detection wavelength was 254 nm, column temperature was 30 ℃, and sample amount was 20 μL. **Results** The colchicine showed a good linear relationship within the range of 1.025~20.50 μg/mL ($r^2=0.9997$, $n=5$), and the average recovery was 99.2% ($n=9$). The results of sample measurement showed that the content of colchicine in *Lilium brownii* var. *viridulum* was different in different harvest time, which stems and leaves turn yellow and fall off period was the highest, and the average content of colchicine in *Lilium brownii* var. *viridulum* reached 3.64 mg/g. **Conclusion** This method is accurate, simple and reliable, which provides a reference for the evaluation of quality and selection of the best harvest time of *Lilium brownii* var. *viridulum*.

KEY WORDS: *Lilium brownii* var. *viridulum*; colchicines; high performance liquid chromatography

*通讯作者: 唐湘伟, 主管药师, 主要研究方向为食品、药品、保健食品、化妆品检验与质量标准研究。E-mail: 125072690@qq.com

*Corresponding author: TANG Xiang-Wei, Pharmacist, Shaoyang Institute for Food and Drug Control of Hunan Province, Shaoyang 422000, China. E-mail: 125072690@qq.com

1 引言

百合为百合科植物的干燥肉质鳞叶,最早被收录于《神农本草经》,《中国药典》规定入药的3种百合为卷丹(*Lilium lancifolium* Thunb.)、百合(*Lilium brownie* F.E. Brown var. *viridulum* Baker)或细叶百合(*Lilium pumilum* DC.),有养阴润肺、清心安神功效,用于阴虚燥咳,劳嗽咳血,虚烦惊悸,失眠多梦,精神恍惚等症^[1]。百合也是食品和保健食品重要原料,被列入国家《既是食品又是药品的物品名单》中^[2]。百合富含蛋白质、磷脂、氨基酸、维生素和微量元素等营养物质,现代研究表明百合含有酚性甘油酯类、百合多糖、百合甾体皂苷、黄酮类、生物碱等多种生物活性成分^[3-6],具有抗氧化、抗疲劳、抗肿瘤、抗增殖、抗抑郁、降糖、止咳等作用^[7-10]。百合中对细胞有丝分裂有明显的抑制作用的秋水仙碱,是研究最早的一种生物碱,可用于诱导植物多倍体,临床用于肿瘤、急性痛风等,在早期肝硬化、心血管疾病等许多方面都有应用^[11-13]。

目前关于百合中活性成分测定的研究主要在薯蓣皂苷元等皂苷类成分、总多糖、总黄酮、微量元素、酚性甘油酯等方面^[14,15]。秋水仙碱为百合中主要功效成分之一,测定秋水仙碱的方法较多,《中国药典》2015年版^[1]用高效液相色谱法选择辛烷基硅烷键合硅胶柱测定秋水仙碱片中秋水仙碱的含量,但没有百合中秋水仙碱测定方法。有文献比较超临界流体和乙醇提取百合中秋水仙碱,使用高效液相色谱法测定其含量^[16]。超临界流体提取有成本低、污染少、提取效率高等优点,但在许多分析测试实验室尚未普及,且操作相对繁琐;用乙醇提取其他干扰成分多,液相色谱条件也有待进一步优化,待测组分峰形明显不对称,且与其他组分不能完全分离。本文通过建立高效液相色谱法测定不同采收期的邵阳龙牙百合中秋水仙碱的含量,以期对百合质量控制和选择最佳采收期提供参考。

2 材料与方法

2.1 仪器与试剂

Waters 2695 高效液相色谱仪、2996 PDA 检测器、717 自动进样器(美国沃特斯公司);MS205DU 电子天平(梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司)。

甲醇(色谱纯,国药集团化学试剂有限公司);秋水仙碱对照品(批号:101176-201202,含量:93.6%,中国食品药品检定研究院);超纯水由实验室自制。

在湖南邵阳隆回选取3个龙牙百合种植地,分别在6个时期采收龙牙百合样本共18批,同法处理晾干,粉碎过40目筛。I期:7月5日采收,自花凋萎后1月左右,茎叶基本停止生长但尚未枯黄。II期:7月25日采收,茎叶自然枯黄但未脱落。III期:8月15日采收,茎叶完全自然枯黄开始

脱落。IV期:9月15日采收,茎叶完全脱落。V期:12月15日采收。VI期:第二年3月1日,新芽未发时。

2.2 色谱条件

色谱柱:Waters C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:甲醇-水(40:60, V:V),等度洗脱;流速:1.0 mL/min;检测波长:254 nm;柱温:30 ℃;进样量:20 μL。

2.3 对照品溶液的配制

精密称取秋水仙碱10.95 mg,置100 mL量瓶中,加水溶解并稀释至刻度,摇匀,精密量取1、2、5、10、20 mL,加水定容至100 mL,配制成质量浓度约为1、2、5、10、20 μg/mL的对照品系列工作溶液。

2.4 样品溶液的制备

精密称取样品约2 g,加水25 mL,振摇使充分浸润,放置过夜,超声30 min,放冷,加氯仿萃取4次,每次25 mL,合并氯仿层,水浴蒸干,用流动相溶解并定容至100 mL,摇匀,过滤,续滤液作供试溶液。

3 结果与分析

3.1 提取方法和色谱柱选择

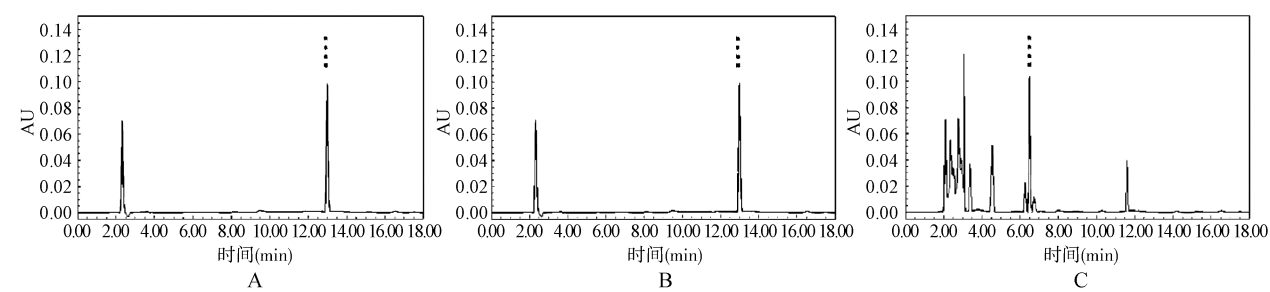
秋水仙碱易溶于水、乙醇、氯仿等。分别用水、乙醇提取样品,待测成分提取效率相当。提取液中其他成分较多,容易污染色谱柱,且在主成分附近有很多峰,干扰测定。因此选择水提再用氯仿萃取,可有效分离待测成分,减少干扰。取同一批样品,加水分别浸泡4、6、8、10、12、16 h,超声30 min,测得秋水仙碱含量分别为2.10、2.83、3.35、3.69、3.68、3.71 mg/kg,说明浸泡10 h以上超声30 min,可完全提取百合中秋水仙碱。同一份供试溶液,用C₈柱,秋水仙碱保留时间为6~7 min,其他成分与其保留时间相差较小,容易干扰测定,用C₁₈柱,秋水仙碱保留时间为13 min左右,与其他成分完全分离。因此选择以水作溶剂,浸泡过夜后超声,再用氯仿萃取,分离氯仿层蒸干,加流动相溶解定容,用C₁₈柱测定,其他组分没有干扰,峰形良好,出峰时间合适,结果见图1。

3.2 线性范围与检测限

取对照品系列工作溶液测定峰面积,用外标法进行定量,以质量浓度为横坐标(X),峰面积为纵坐标(Y)绘制标准曲线,计算回归方程。结果秋水仙碱在1.025~20.50 μg/mL范围内线性关系良好,回归方程为 $Y=758.3X+309.7(n=5, r^2=0.9997)$ 。在样品取样量2 g,定容至100 mL情况下,以信噪比计算,检出限(S/N=3)为0.1 mg/kg,定量限(S/N=10)为0.3 mg/kg。

3.3 加标回收率

取已知秋水仙碱含量为3.68 mg/g的同一批样品9份,



注: A: 对照品溶液; B: 样品溶液(C₁₈柱); C: 样品溶液(C₈柱)。

图 1 样品色谱图

Fig. 1 Chromatograms of samples

分别加入适量对照品溶液,与样品同法处理,测定回收率,秋水仙碱回收率在 96.9%~101.1%,平均回收率达到 99.2%,RSD 为 1.3%($n=9$),结果见表 1。

3.4 样品测定

取上述 15 批样品分别测定秋水仙碱含量,结果见表 2。从表 2 可见,3 块种植地的样品均显示相同的规律,不同采收期龙牙百合中秋水仙碱含量差异比较明显;龙牙百合中秋水仙碱的含量从 I 期到 IV 期逐步上升,从 IV 期到 VI 期逐

步下降,第 IV 期(即茎叶完全枯黄脱落)3 块种植地的龙牙百合中秋水仙碱平均含量达到 3.64 mg/g,含量最高。

4 结 论

不同时期的龙牙百合中秋水仙碱含量不同,茎叶未枯黄时秋水仙碱含量尚未达到最高值,在地里越冬后采收,秋水仙碱含量有所下降,在此期间采收可能影响药材质量和疗效。茎叶枯黄至脱落期间秋水仙碱含量最高,作为药用或者食疗原料,主要利用百合中秋水仙碱成分,适宜在这期间采收。

本文优化提取工艺,回收率达到 99.2%,可以完全提取龙牙百合中秋水仙碱;用氯仿萃取待测成分有效去除了其他水溶性成分干扰。优化色谱条件,能有效分离待测成分,峰形良好,保留时间适当。建立的方法简单快速,定量准确,可用于龙牙百合中秋水仙碱含量测定及选择最佳采收时间。

参考文献

[1] 中华人民共和国药典 2015 年版一部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015.
Pharmacopoeia of the People's Republic of China 2015 Edition part I [M]. Beijing: China Medical Science and Technology Press, 2015.
[2] 既是食品又是药品的物品名单[EB/OL]. [2012-12-07]. <http://www.sda.gov.cn/WS01/CL1159/76527.html>.
A list of food and medicine[EB/OL]. [2012-12-07]. <http://www.sda.gov.cn/WS01/CL1159/76527.html>.
[3] 李艳, 苗明三. 百合的化学、药理与临床应用分析[J]. 中医学报, 2015, 30(7): 1021-1023.
Li Y, Miao MS. Analysis of chemical, pharmacological and clinical application of lily [J]. J Chin med, 2015, 30(7): 1021-1023.
[4] 彭程, 周晓琛, 敬黎, 等. 百合化学成分及其提取方法研究进展[J]. 西北民族大学学报(自然科学版), 2011, 32(84): 11-16.
Peng C, Zhou XC, Jing L, et al. Research progress of chemical composition and extraction method of lily [J]. J Northwest Univ Nation (Nat Sci Ed), 2011, 32(84): 11-16.
[5] 黄燕萍. 百合的研究现状[J]. 中国药业, 2010, 19(8): 88-90.
Huang YP. Research status of lily [J]. China Pharm, 2010, 19(8): 88-90.

表 1 回收率试验结果($n=9$) Table 1 Results of recoveries ($n=9$)				
	标准加入量 (mg)	回收率(%)	平均回收 率(%)	RSD(%)
1	0.1025	97.8		
2	0.1025	99.4		
3	0.1025	96.9		
4	0.5125	100.5		
5	0.5125	98.9	99.2	1.3
6	0.5125	99.5		
7	0.1537	101.1		
8	0.1537	99.3		
9	0.1537	99.7		

表 2 不同采收期百合中秋水仙碱含量(mg/g) Table 2 Content of colchicine in lily with different harvest time (mg/g)						
	I期	II期	III期	IV期	V期	VI期
种植地 1	3.25	3.63	3.66	3.71*	3.58	3.36
种植地 2	2.97	3.42	3.43	3.54*	3.48	3.29
种植地 3	3.19	3.51	3.62	3.68*	3.50	3.31
3 块种植地 平均	3.14	3.52	3.57	3.64*	3.52	3.32

注: *表示同一行数值在 $P < 0.05$ 水平下具有显著性差异。

- [6] 周中流, 石任兵, 刘斌, 等. 卷丹化学成分的研究[J]. 北京中医药大学学报, 2010, 33(1): 57–61.
Zhou ZL, Shi RB, Liu B, *et al.* Chemical constituents of Juandan [J]. J Beijing Univ Tradit Chin Med, 2010, 33(1): 57–61.
- [7] 李玉萍, 皮小芳, 刘成梅, 等. 百合多糖降糖作用机理的体外研究[J]. 时珍国医国药, 2012, 23(8): 1964–1966.
Li YP, Pi XF, Liu CM, *et al.* Study on the mechanism of hypoglycemic effect of lily polysaccharide *in vitro* [J]. Lishizhen Med Mat Med Res, 2012, 23(8): 1964–1966.
- [8] 李新华, 弥曼, 李汾, 等. 百合多糖免疫调节作用的实验研究[J]. 现代预防医学, 2010, 37(14): 2708–2709.
Li XH, Mi M, Li F, *et al.* Experimental research of the immune regulatory action of polysaccharide of lily [J]. Mod Prev Med, 2010, 37(14): 2708–2709.
- [9] Kwon OK, Lee MY, Yuk JE, *et al.* Anti-inflammatory effects of methanol extracts of the root of *Lilium lancifolium* on LPS-stimulated Raw264.7 cells [J]. J Ethnopharm, 2010, 30(1): 28–32.
- [10] Luo J, Li L, Kong L. Preparative separation of phenylpropanoid glycerides from the bulbs of *Lilium lancifolium* by high-speed counter-current chromatography and evaluation of their antioxidant activities [J]. Food Chem, 2012, 131(3): 1056–1061.
- [11] 申利红, 李雅. 秋水仙碱的研究与应用进展[J]. 中国农学通报, 2009, 25(21): 185–187.
Shen LH, Li Y. Research and application of colchicines [J]. Chin Agric Sci Bull, 2009, 15(21): 185–187.
- [12] 陈冠鹏, 唐方明, 包浔娜, 等. 秋水仙碱对恶性肿瘤合并心包积液患者的临床疗效[J]. 包头医学院学报, 2018, 35(1): 4–5, 18.
Chen GP, Tang FM Bao XN, *et al.* Clinical efficacy of colchicine on malignant tumor complicated with pericardial effusion [J]. J Baotou Med Coll, 2018, 35(1): 4–5, 18.
- [13] 赵梦华, 石建平. 秋水仙碱在心血管疾病中的应用进展[J]. 海南医学, 2015, 29(5): 692–695.
Zhao MH, Shi JP. Progress of colchicine in treating cardiovascular diseases [J]. Hainan Med J, 2015, 29(5): 692–695.
- [14] 傅春燕, 刘永辉, 李明娟, 等. 紫外可见分光光度法测定不同产地龙牙百合中皂苷含量[J]. 广东微量元素科学, 2011, 18(5): 55–58.
Fu CY, Liu YH, Li MJ, *et al.* Determination of the content of total saponins in *Lilium brownii* FE Brown var *viridulum* Baker. by UV spectrophotometry [J]. Guangdong Trace Elem Sci, 2011, 18(5): 55–58.
- [15] 曲伟红, 周日宝, 童巧珍, 等. 百合产地加工方法对百合质量影响的研究[J]. 湖南中医杂志, 2004, (4): 73–75.
Qu HW, Zhou RB, Tong QZ, *et al.* The study on quality of lily in different productive processing [J]. Hunan J Tradit Chin Med, 2004, (4): 73–75.
- [16] 何纯莲, 李谷才, 任凤莲, 等. 超临界流体萃取-高效液相色谱法测定百合中秋水仙碱[J]. 天然产物研究与开发, 2003, 15(1): 5–8.
He CL, Li GC, Ren FL, *et al.* Supercritical fluid extraction-high performance liquid chromatography determination of colchicines in lily [J]. Nat Prod Res Dev, 2003, 15(1): 5–8.

(责任编辑: 武英华)

作者简介



唐湘伟, 主管药师, 主要研究方向为食品、药品、保健食品、化妆品检验与质量标准研究。

E-mail: 125072690@qq.com