

HPLC-ELSD 同时测定知母药材中 4 种主要皂苷的含量

尹 茶¹, 吴婷婷², 朱东亮³, 刘职瑞³, 柴逸峰³ (1. 第二军医大学出版社, 上海 200433; 2. 解放军 263 医院药械科, 北京 101149; 3. 第二军医大学药学院药物分析教研室, 上海 200433)

[摘要] 目的 建立同时测定知母药材中 4 种主要皂苷成分的 HPLC-ELSD 方法。方法 采用 Agilent Zorbax SB-C₁₈ 柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 以水(冰醋酸调节 pH 3.3) (A)-乙腈 (B) 为流动相进行梯度洗脱 0~8 min, 12%~23% B; 8~25 min, 23% B; 25~35 min, 23%~45% B; 35~40 min, 45%~95% B。蒸发光散射检测器漂移管温度 55℃, 以氮气为雾化气, 压力为 4.0 Bar。结果 知母皂苷 B、知母皂苷 E1、知母皂苷 BII、知母皂苷 AIII 浓度分别在 42.10~252.6 μg/ml ($r=0.9993$)、48.80~292.8 μg/ml ($r=0.9991$)、192.2~1153 μg/ml ($r=0.9997$)、8.512~85.12 μg/ml ($r=0.9985$) 的范围内呈良好的线性关系。4 种成分精密度试验 RSD < 1%, 48 h 内稳定性 RSD < 1%, 加样回收率为 96.04%~102.8%。结论 该含量测定方法简便, 分离效果好, 能同时测定知母皂苷 B、知母皂苷 E1、知母皂苷 BII 和知母皂苷 AIII 4 种有效成分的含量, 结果准确可靠。

[关键词] 知母; 多成分含量测定; 知母皂苷 B; 知母皂苷 E1; 知母皂苷 BII; 知母皂苷 AIII; 高效液相蒸发光检测

[中图分类号] R284 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2012)06-0433-04

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2012.06.010

Determination of four major steroid glycosides in *Anemarrhena asphodeloides* by HPLC-ELSD

YIN Cha¹, WU Ting-ting², ZHU Dong-liang³, LIU Zhi-rui³, CHAI Yi-feng³ (1. Publishing house, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 2. Department of Pharmacy, the 263rd Hospital of PLA, Beijing 101149, China; 3. Department of Pharmaceutical Analysis, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[Abstract] **Objective** To develop a new high performance liquid chromatography (HPLC) coupled with Evaporative Light Scattering Detector (ELSD) method for simultaneous determination of four major steroid glycosides (Timosaponin B, Timosaponin E1, Timosaponin BII and Timosaponin AIII). **Methods** HPLC analysis was performed on an Agilent Zorbax SB-C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) with a mobile phase of water (adjust to pH 3.3 by acetic acid) (A) and acetonitrile (B). The gradient elution program was as follow: 0~8 min, 12%~23% B; 8~25 min, 23% B; 25~35 min, 23%~45% B; 35~40 min, 45%~95% B. The temperature of drift tube was 55 °C and the nebulizer nitrogen flow rate was 4.0 Bar. **Results** The linearity was obtained over 42.10~252.6 μg/ml ($r=0.9993$) for Timosaponin B, 48.80~292.8 μg/ml ($r=0.9991$) for Timosaponin E1, 192.2~1153 μg/ml ($r=0.9997$) for Timosaponin BII and 8.512~85.12 μg/ml ($r=0.9985$) for Timosaponin AIII. The RSDs of precision and stability of the samples were both less than 1% in 48 hours. The average recovery was between 96.04%~102.8%. **Conclusions** The present method, with satisfactory efficacy, was simple which could simultaneously determine multiple steroid glycosides in *Anemarrhena asphodeloides* Bge. from different areas.

[Key words] *Anemarrhena asphodeloides* Bge.; multiple components assaying; Timosaponin B; Timosaponin E1; Timosaponin BII; Timosaponin AIII; HPLC-ELSD

知母为百合科知母 *Anemarrhena asphodeloides* Bge. 的干燥根茎, 具有清热泻火、生津润燥的功能。临床用于外感风寒、高热烦渴、肺热燥咳、骨蒸潮热、内热消渴、肠燥便秘^[1]。现代药理学研究表明知母

中的甾体皂苷具有多种的药理活性, 包括: 抑制血小板的聚集^[2]、清除自由基^[3]、降血脂^[4]、抗肿瘤^[5]、抑制 Na⁺-K⁺-ATP 酶^[6] 以及改善认知功能、提高学习记忆能力^[7] 等作用。知母中所含甾体皂苷种类较多, 水解后的苷元主要是菝葜皂苷元 (sarsasapogenin) 2000 年及以前药典以菝葜皂苷元含量作为指标, 反映总皂苷的含量。此法虽可作为知母药材基本的质量控制方法, 但是仅能间接反映总皂苷的含量。而且水解的过程改变了药材中成分的原有组

[基金项目] 国家自然科学基金(81072614), 上海市自然科学基金(09dz1975100)。

[作者简介] 尹 茶(1971-), 女, 博士, 副研究员。E-mail: yincha111@yahoo.com.cn。

[通讯作者] 柴逸峰。Tel: (021) 81871201, E-mail: yfchai@smmu.edu.cn。

成,操作也相对繁琐。因此直接测定药材中主要皂苷的含量应该更能反映药材的质量状况。知母药材中皂苷的含量测定已有一些报道^[8-10],包括单独测定知母 B II 和同时测定几种知母皂苷,但测定时间都较长。此外同时对中药中多成分的测定,还要保证方法的快速、简便、广泛,从而提高方法的适用性和实用性。因此本文建立了同时测定知母药材中知母皂苷 B、知母皂苷 E1、知母皂苷 BII 和知母皂苷 AIII 的 HPLC-ELSD 方法,该法简便、准确、重现性好,且具有足够的灵敏度,可为知母药材的品质评价提供参考依据。

1 仪器与试剂

WATERS 510 型双泵;996 PDA 检测器;Rheodyne 7725i 进样器;法国 SEDEX 75 型蒸发光散射检测器(ELSD);柱后连接 PDA,再与 ELSD 采用串连方法连接;WATERS Empower pro 色谱工作站;SrA3dv 色谱数据工作站;ORION MODEL 828 型 pH 计;METTLER AE240 电子天平;BRANSON SB3200-T 型超声仪。

知母生药材均由本校生药教研室陈万生教授采集鉴定为百合科知母 *Anemarrhena asphodeloides* Bge. 的干燥根茎。并按照《中国药典》2010 版一部规定进行干燥,切片,粉碎,过 40 目筛,60℃ 干燥至恒定质量等预处理。知母皂苷 E、知母皂苷 B、知母皂苷 BII 和知母皂苷 AIII 对照品由本校生药教研室制备;乙腈为色谱纯(Fisher 公司),冰醋酸为分析纯(上海精细科技研究所),水为去离子水,其它试剂均为分析纯。

2 方法

2.1 色谱条件 色谱柱:Zorbax SB-C₁₈ 柱(5 μm, 4.6 mm × 250 mm, Agilent);流动相:A 相为水(冰醋酸调节 pH 3.3),B 相为乙腈,梯度洗脱,洗脱程序如下:0~8 min,12%~23% B;8~25 min,23% B;25~35 min,23%~45% B;35~40 min,45%~95% B;流速:1.0 ml/min;柱温:30℃;进样量 10 μl。进样前以流动相初始梯度平衡 10 min。检测器漂移管温度 55℃,蒸发温度 70℃,蒸发光散射检测器以氮气为雾化气,压力为 4.0 Bar。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 分别精密称取知母皂苷 B、知母皂苷 BII、知母皂苷 E1 对照品 4.21、19.22、4.88 mg,以 70% 乙腈溶解,定容于 10 ml 量瓶中,摇匀,即得对照品储备溶液。另精密称取知母皂苷 AIII 对照品 5.32 mg,以 70% 乙腈溶解,定容于 25 ml 量瓶中,摇匀,即得对照品储备溶液,置于 4℃ 冰箱保存。

2.2.2 样品溶液的制备 取知母药材粉末 0.8 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,称重,加入 50 ml 80% 甲醇,超声 45 min,以 80% 甲醇补足重量后滤纸直接过滤,再经过 0.22 μm 微孔滤膜过滤,取续滤液,作为供试品溶液。

2.3 方法学考察

2.3.1 系统适应性 在 2.1 项的色谱条件下,以对照品溶液和样品进样,根据色谱参数计算系统适应性。理论塔板数以知母皂苷 E1 计算大于 14 000;以知母皂苷 BII 计算大于 15 000;以知母皂苷 B 计算大于 25 000;以知母皂苷 AIII 计算大于 60 000;待测物峰与相邻峰的分离度均大于 1.5,符合含量测定要求。对照品及样品的色谱图见图 1。

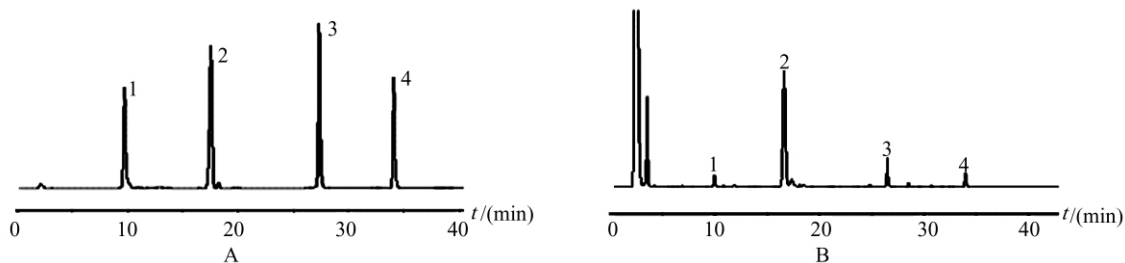


图 1 混合对照品(A)和样品(B)溶液的 HPLC-ELSD 色谱图

1-知母皂苷 B; 2-知母皂苷 E1; 3-知母皂苷 BII; 4-知母皂苷 AIII

2.3.2 线性关系 精密吸取对照品混合溶液逐级用 70% 乙腈减半稀释,得 5 个浓度梯度的对照品混合溶液(知母皂苷 B 依次为:42.10、84.20、168.4、210.5、252.6 μg/ml,知母皂苷 E1 依次为:49.80、

97.60、195.2、244.0、292.8 μg/ml,知母皂苷 BII 依次为:192.2、384.4、768.8、961.0、1153 μg/ml,知母皂苷 AIII 依次为:8.512、17.02、34.05、42.56、85.12 μg/ml。按照 2.1 项下色谱条件进样测定,以峰面

积的常用对数为纵坐标 (Y), 质量浓度的常用对数为横坐标 (X) 绘制标准曲线, 计算回归方程知母皂苷 B 在 42.10 ~ 252.6 $\mu\text{g/ml}$ 的范围内, 回归方程 $Y = 1.5076X + 2.9955$ ($r = 0.9993$); 知母皂苷 E1 在 48.80 ~ 292.8 $\mu\text{g/ml}$ 的范围内, 回归方程 $Y = 1.4946X + 2.5933$ ($r = 0.9991$); 知母皂苷 BII 在 192.2 ~ 1153 $\mu\text{g/ml}$ 的范围内, 回归方程 $Y = 1.3290X + 2.9574$ ($r = 0.9997$); 知母皂苷 AIII 在 8.512 ~ 85.12 $\mu\text{g/ml}$ 的范围内, 回归方程 $Y = 1.3817X + 3.6622$ ($r = 0.9985$)。

2.3.3 精密度 在 2.1 项色谱条件下, 分别以对照品溶液连续进样 5 次, 计算其峰面积的相对标准偏差 (RSD) 结果知母皂苷 E、知母皂苷 B、知母皂苷 BII 和知母皂苷 AIII 峰面积积分值 RSD 分别为 0.35%、0.29%、0.79%、0.46% 符合含量测定要求。

2.3.4 稳定性 精密称取产地为山东济南的知母药材粉末 0.8 g, 照 2.2.2 项下的方法制备样品溶液。分别在 0、3、6、12、18、24、26、48 h 测定 4 种有效成分的峰面积, 计算其 RSD 结果知母皂苷 E、知母皂苷 B、知母皂苷 BII 和知母皂苷 AIII 峰面积积分值 RSD 分别为 0.56%、0.81%、0.71%、0.91%, 符合含量测定要求。

2.3.5 重复性 精密称取批号为 H2011080502 的

知母药材粉末 5 份各约 0.8 g, 按照 2.2.2 项方法制备样品溶液, 测定 4 种有效成分的含量, 计算其 RSD。结果知母皂苷 E、知母皂苷 B、知母皂苷 BII 和知母皂苷 AIII 含量的 RSD 分别为 0.56%、0.81%、0.71%、0.91% 符合含量测定要求。

2.3.6 最低检测限 经一系列稀溶液测定, 当信噪比为 3:1 时知母皂苷 E1、知母皂苷 BII、知母皂苷 B 和知母皂苷 AIII 的最低检测限分别为 4.9、5.5、6.2、3.7 $\mu\text{g/ml}$ 。

2.3.7 加样回收率 取批号为 H2011080502 的知母药材粉末约 0.8 g, 精密称定, 其中知母皂苷 E1、知母皂苷 BII、知母皂苷 B 和知母皂苷 AIII 含量分别是 7.0796、50.9815、6.0649、0.8277 mg/g, 分别精密加入适量的对照品溶液, 分别按 2.2.2 项方法制备样品溶液, 测定 4 种有效成分的含量, 结果其平均加样回收率为 102.8%、96.04%、97.27%、98.15%; 其 RSD 分别为 1.11%、0.46%、1.06%、3.24% 结果表明此方法的准确性良好, 符合含量测定的要求。

2.4 样品含量测定 取不同产地知母药材, 分别按 2.2.2 项方法制备样品溶液, 测定 4 种皂苷成分的含量, 每份供试品溶液重复测量 3 次, 取其平均值作为各产地药材的成分含量。结果见表 1。

表 1 不同产地知母药材中知母皂苷含量 ($\bar{x} \pm s, n = 3, \text{mg/g}$)

批号	产地	知母皂苷 B	知母皂苷 E1	知母皂苷 BII	知母皂苷 AIII
H2011073101	河北易县	1.435 \pm 0.063	9.754 \pm 0.033	63.02 \pm 0.082	0.6578 \pm 0.0035
H2011080502	河北易县	2.392 \pm 0.087	15.55 \pm 0.071	63.05 \pm 0.131	2.053 \pm 0.009
H2011081904	河北赤城	1.160 \pm 0.077	11.15 \pm 0.083	56.52 \pm 0.074	0.7754 \pm 0.0018
H2011100901	河北赤城	3.897 \pm 0.034	9.679 \pm 0.054	56.82 \pm 0.129	0.8525 \pm 0.0021
H2011010903	河北阳原	6.346 \pm 0.036	9.292 \pm 0.017	67.31 \pm 0.051	0.4633 \pm 0.0019
H2010081601	河北阳原	4.265 \pm 0.025	10.57 \pm 0.080	58.47 \pm 0.110	0.9916 \pm 0.0033
A2009080303	安徽亳州	15.68 \pm 0.031	7.226 \pm 0.076	39.09 \pm 0.033	1.541 \pm 0.005
H2012030609	湖南长沙	4.223 \pm 0.032	7.753 \pm 0.045	49.78 \pm 0.175	2.186 \pm 0.007
L2012010402	辽宁丹东	4.981 \pm 0.044	8.052 \pm 0.039	54.55 \pm 0.117	1.263 \pm 0.008
S2011080901	山东济南	5.144 \pm 0.029	7.080 \pm 0.041	52.15 \pm 0.194	2.721 \pm 0.013
S2011060703	山东青岛	6.065 \pm 0.018	7.770 \pm 0.029	50.98 \pm 0.096	0.8277 \pm 0.0041
Z2011051201	浙江温州	8.721 \pm 0.064	7.873 \pm 0.013	48.16 \pm 0.141	1.100 \pm 0.006
H2012031801	河南新乡	7.042 \pm 0.085	8.169 \pm 0.037	43.05 \pm 0.071	1.356 \pm 0.012

3 讨论

3.1 样品前处理方法优化 对知母药材样品溶液的制备, 有文献报道^[10], 采用 80% 乙醇提取效果最好, 本实验对比了不同提取方法 (超声、回流、索氏提取)、不同提取溶剂 (100% 甲醇、80% 甲醇、80% 乙醇) 对知母药材的提取效果, 结果采用索氏提取与回流的效果相差不大, 超声的提取效率显著高于前两者, 且采用 80% 甲醇超声的提取效果较 80% 乙

醇和 100% 甲醇要好得多。综合经济实用、快捷简便等各个方面, 故确定最终的提取条件采用 80% 甲醇 50 ml, 超声处理 45 min。这样既可把其中有效成分尽可能多的提取出来, 又可节约时间, 方便操作。

3.2 色谱条件优化 在预实验中, 分别使用甲醇-水系统以及乙腈-水系统, 发现乙腈-水系统获得的总的分离度大于甲醇-水系统, 故选择乙腈-水系统作为基础的流动相, 同时发现降低流动相的 pH 值有助于改善色谱峰峰型及优化分离, 故向流动

相中加入一定比例的冰醋酸。知母皂苷 B、E1、BII 为呋甾皂苷,知母皂苷 A III 为螺甾皂苷,两类皂苷极性相差较大,用等度洗脱无法同时保证 4 种皂苷的合适保留时间和较好的分离。经过反复试验,采用水(醋酸调至 pH 3.3)和乙腈溶液为流动相进行梯度洗脱,使极性较大的呋甾皂苷不致出峰过早,极性较小的螺甾皂苷也不会因保留时间过长而峰形展宽,4 个成分均能够分离良好,保障了测定的准确性。

3.3 ELSD 工作参数的确定 在 ELSD 实验中,为了获得更高的灵敏度,需要调节载气压力和漂移管温度这 2 个最关键的仪器参数。它们的通用参数为载气压力(3.5 Bar)和漂移管温度(40 °C),但在本梯度条件下,由于实验采用了乙腈-水系统,初始梯度含有高比例的水,色谱图中会由于溶剂的挥发不完全而导致毛刺峰的产生,通过对仪器的通用参数进行优化,逐渐提高载气压力,当载气压力到达至 4.0 Bar 时,色谱图中的毛刺峰基本消失,再增加载气压力,不能得到更优化的结果,在此载气条件下逐渐调节漂移管温度,当温度逐渐上升时,色谱图中毛刺峰也有一定的优化,当设为 55 °C 后,基本达到最佳。故最终确定的 ELSD 检测参数:漂移管温度 55 °C;载气压力 4.0 Bar。另外,设定增益值为 7,可以使信号相应较高,且基线的噪音不会对检测产生任何影响。特别值得注意的是,由于 ELSD 独特的散射光检测原理,物质的响应与浓度不成线性关系,而是对数关系,在制定标准曲线时,对峰面积以及样品浓度均采用双对数进行运算,得到的标准曲线也不会经过原点,在进行样品含量测定时,也采用同样的计算方式。

3.4 药材之间的质量差异 对 13 个不同产地(批号)的知母药材测定结果表明,与文献中知母皂苷含量在 6% 左右的结果相符,但药材中所含的 4 种皂苷,其含量间的差异较大,其中以知母皂苷 B 的含量差异最大,安徽亳州产地的(A2009080303)与河北赤城产地的(H2011081904)相差高达 13.52

倍,其他成分的含量最大与最小含量之间差异在 1.62 ~ 5.87 倍不等。虽然单个成分的差异较大,但药材中总皂苷的含量差别相对较小,仅为 1.37 倍,充分说明在药材种植过程中,由于影响药材生长的诸多因素等的作用,导致次生代谢产物的产量发生不同变化,也证明需要具体分析药材中的活性成分的含量,而一般仅仅水解皂苷,分析蒽萜皂苷元的做法或者仅仅测定其中的紫外吸收部位对知母的质量控制是不完全的,本文建立的色谱方法能够对知母药材作更加严格的质量控制,从而能够为进一步研究知母活性成分的药理药效提供基础。

【参考文献】

- [1] 中国药典 2010 版.一部[S]. 2010:196.
- [2] Zhang JY, Meng ZY, Zhang MY, *et al.* Effect of six steroidal saponins isolated from *Anemarrhenae rhizoma* on platelet aggregation and hemolysis in human blood[J]. *Clim Chim Acta*, 1999, 289(1): 79.
- [3] Zhang JY, Zhang MY, Sugahara K, *et al.* Effect of steroidal saponins of *Anemarrhenae rhizome* on superoxide in human neutrophils[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, 259(3): 636.
- [4] 韩兵,李春梅,李敏,等.知母皂苷的降脂及抗动脉粥样硬化作用[J]. *上海中医药杂志*, 2006, 40(11): 68.
- [5] Takeda Y, Togashi H, Matsuo T, *et al.* Growth inhibition and apoptosis of gastric cancer cell lines by *Anemarrhenae asphodeloides* Bunge[J]. *J Gastroenterol*, 2001, 36(2): 79.
- [6] 吉星,冯毅凡.知母中皂苷类成分研究进展[J]. *中草药*, 2010, 41(4): 12.
- [7] Lee B, Jung K, Kim DH. Timosaponin AIII, a saponin isolated from *Anemarrhenae asphodeloides*, ameliorates learning and memory deficits in mice[J]. *Pharmacol, Biochem and Behav*, 2009, 93(2): 121.
- [8] 沙东旭,刘兆妍,张满来,等. HPLC-ELSD 测定知母中知母皂苷 B II 的含量[J]. *药物分析杂志*, 2009, 29(12): 2106.
- [9] 陈千良,孙小明,王文全,等. HPLC-ELSD 法同时测定知母药材中 2 种皂苷含量[J]. *中国中药杂志*, 2011, 36(4): 474.
- [10] 原源,陈万生,孙连娜,等.不同产地知母中皂苷类成分的测定[J]. *中草药*, 2006, 37(10): 1574.

[收稿日期]2012-05-18

[修回日期]2012-06-26

(上接第 414 页)

- [21] Sara L, Alessandro M, Crestina C. Pharmaceutical formulation of a platinum derivative[P]. USA. US2003/0109515 A1. 2003-06-12.
- [22] Darryl VW, Aikun L. Oxaliplatin Formulations[P]. USA. US2005/0090544 A1. 2005-03-08.
- [23] Darryl VW, Aikun L. Oxaliplatin Formulations[P]. USA. US2007/0155833 A1. 2007-04-05.

- [24] Ibrahim H, Bayssas M. Pharmaceutical stable oxaliplatin preparation for parenteral administration[P]. Europe. EP1207875B1. 2002-05-29.
- [25] Michaela R, Katrin W. Plastic bottle for oxaliplatin solution[P]. USA. US2008/0208141 A1. 2008-8-28.

[收稿日期]2011-09-09

[修回日期]2012-05-09