

HPLC-ELSD 测定不同产地预知子中四种皂苷的含量

吴蓓¹, 余黄鹏^{2,3}, 孟月华^{2,4}, 欧阳辉², 何明珍⁵, 李志峰^{2,5}, 杨世林^{2,5}, 冯育林^{2,5*}

- (1. 南昌市食品药品检验所, 南昌 330029; 2. 江西中医药大学, 南昌 330006;
3. 江西省九江市第三人民医院, 江西 九江 343000;
4. 河北省石家庄市第一医院, 石家庄 361000;
5. 中药固体制剂制造技术国家工程研究中心, 南昌 330006)

[摘要] 目的: 采用 HPLC-ELSD 测定预知子中常春藤皂苷元 3-O-β-D-吡喃葡萄糖基-(1→3)-α-L-吡喃鼠李糖基-(1→2)-α-L-吡喃阿拉伯糖苷(皂苷 X, saponins X), 常春藤皂苷元 3-O-β-D-吡喃木糖基-(1→2)-α-L-吡喃阿拉伯糖苷(皂苷 B, saponins B), 常春藤皂苷元 3-O-α-L-吡喃鼠李糖基-(1→2)-α-L-吡喃阿拉伯糖苷(皂苷 P_D, saponins P_D), 常春藤皂苷元 3-O-α-L-吡喃阿拉伯糖苷(皂苷 A, saponins A) 的含量。方法: 采用安捷伦 1100 手动高效液相色谱仪, 色谱柱为 Cosmosil-C₁₈ ODS 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), ELSD 检测器, 流动相乙腈-0.2% 甲酸水(45:55), 体积流量 1.0 mL·min⁻¹; 蒸发光散射检测器检测参数: 漂移管温度 98 ℃, 氮气流量 2.8 L·min⁻¹。结果: 皂苷 X, 皂苷 B, 皂苷 P_D, 皂苷 A 进样量在 2~10 μg 线性关系良好(R² 分别为 0.999 0, 0.999 0, 0.999 1, 0.999 1)。平均回收率(n=6)分别为 96.8%, 101.9%, 99.3%, 100.5%; RSD 分别为 0.9%, 1.2%, 0.7%, 1.3%。结论: 该方法简单, 分离效果好, 结果准确, 可用于预知子药材中皂苷 X, 皂苷 B, 皂苷 P_D, 皂苷 A 的含量测定。

[关键词] 预知子; 皂苷 X; 皂苷 B; 皂苷 P_D; 皂苷 A; 高效液相色谱-蒸发光检测

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)18-0082-04

[doi] 10.11653/syjf2013180082

Quantitative Determination of Four Components of *Akebiae Fructus* from Different Habitats

WU Bei¹, YU Huang-peng^{2,3}, MENG Yue-hua^{2,4}, OU Yang-Hui²,
HE Ming-zhen⁵, LI Zhi-feng^{2,5}, YANG Shi-lin^{2,5}, FENG Yu-lin^{2,5*}

- (1. Nanchang Food and Drug Inspection Office, Nanchang 330029, China;
2. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330006, China;
3. The Third People's Hospital of Jiujiang City in Jiangxi Province, Jiujiang 343000, China;
4. The First Hospital of Shijiazhuang City in Hebei Province, Shijiazhuang 361000, China;
5. National Pharmaceutical Engineering Center for Solid Preparation in Chinese Herbal Medicine, Nanchang 330006, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a method for the determination of the content of 3-O-β-D-glucopyranosyl (1→3)-α-L-rhamnopyranosyl-(1→2)-α-L-arabinopyranosyl hederagenin (saponins X), 3-O-β-D-xylopyranosyl-(1→2)-α-L-arabinopyranosyl hederagenin (saponins B), 3-O-α-L-rhamnopyranosyl-(1→2)-α-L-arabinopyranosyl hederagenin (saponins P_D), 3-O-α-L-arabinopyranoside hederagenin (saponins A) in

[收稿日期] 20130604(021)

[基金项目] 国家“重大新药创制”科技重大专项(2012ZX09103201-008); 江西省科技支撑计划项目(201111BBG70005-2, 201211BBG70019); 江西省自然科学基金(20114BAB215046)

[第一作者] 吴蓓, 硕士, 主管药师, 从事药物质量控制与评价研究, Tel: 0791-88538270, E-mail: wubei8@163.com

[通讯作者] * 冯育林, 副教授, 从事中药化学成分研究, Tel: 0791-87119632, E-mail: fengyulin2003@hotmail.com.cn

Akebiae Fructus using high-performance liquid chromatography with evaporative light scattering detector (HPLC-ELSD). **Method:** The separation of *A. Fructus* was performed on an Agilent 1100 manual high performance liquid chromatograph, Cosmosil-C₁₈ ODS chromatography column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm). The mobile phase was acetonitrile-water and the flow rate was 1.0 mL·min⁻¹. The detector was ELSD. The temperature of drift tube was 98 °C. And the nebulizer nitrogen flow rate was 2.8 L·min⁻¹. **Result:** The linear range of saponin X, saponin B, saponins P_D, saponin A was 2-10 μg (*R*² was 0.999 0, 0.999 0, 0.999 1, 0.999 1, respectively), and the average recovery (*n* = 6) was 96.8%, 101.9%, 99.3%, 100.5%, respectively; and RSD was 0.9%, 1.2%, 0.7%, 1.3%, respectively. **Conclusion:** The method is simple, reliable and accurate. It can be used to determine saponins X, saponins B, saponins P_D, saponins A content and control the quality in *Akebiae Fructus*.

[Key words] *Akebiae Fructus*; saponins X; saponins B; saponins P_D; saponins A; HPLC-ELSD

预知子为木通科植物木通 *Akebia quinata* (Thunb.) Decne.、三叶木通 *A. trifoliata* (Thunb.) Koidz. 或白木通 *A. tridoliata* (Thunb.) Koidz. var. *australis* (Diels) Rehd. 的干燥近成熟果实。夏、秋二季果实绿黄时采收,晒干,或置沸水中略烫后晒干^[1]。预知子主要的化学成分为皂苷类化合物^[2-5],皂苷类化合物具有抗癌、抗菌、抗炎等^[6-8]广泛的生物活性。

本文建立了 HPLC-ELSD 法测定预知子药材中皂苷 X,皂苷 B,皂苷 P_D,皂苷 A 的含量,此前宋永贵等^[9]运用 HPLC-UV 一测多评法同时测定预知子中这 4 种三萜皂苷,但是紫外检测器仅适用于含生色基团的物质,而皂苷类多为紫外末端吸收,易受溶剂干扰;而蒸发光检测器(ELSD)是质量型检测器,适用于皂苷类成分的分析,更加能准确的反映出药材中皂苷的含量。本文采用 HPLC-ELSD 串联检测技术同时测定多产地药材的皂苷含量,通过与 HPLC-UV 比较证明所建立的方法可以为预知子药材的开发和利用提供有用的参考。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 美国 Agilent 1100 高效液相色谱仪;Cosmosil C₁₈ ODS 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm);Alltech-2000 型蒸发光散射检测器(美国奥泰科技公司),Millipore Simplicity 超纯水器,AR5120 型托利多 1/万电子分析天平,AB135-S 型 1/10 万天平(Mettler Toledo),昆山 KQ-250 型超声波清洗器。

常春藤皂苷元 3-*O*-β-*D*-吡喃葡萄糖基-(1→3)-α-*L*-吡喃鼠李糖基-(1→2)-α-*L*-吡喃阿拉伯糖苷(皂苷 X, saponins X),常春藤皂苷元 3-*O*-β-*D*-吡喃木糖基-(1→2)-α-*L*-吡喃阿拉伯糖苷(皂苷 B, saponins B),常春藤皂苷元 3-*O*-α-*L*-吡喃鼠李糖基-(1→2)-α-*L*-吡喃阿拉伯糖苷(皂苷 P_D, saponins P_D),常春藤皂苷元 3-*O*-α-*L*-吡喃阿拉伯糖苷(皂苷 A, saponins

A)对照品是自制,经 HPLC-ELSD 面积归一化法测定其纯度达到 98% 以上,乙腈为色谱纯,其余试剂为分析纯,水为超纯水。

预知子药材由南昌市食品药品监督管理局主管药师吴蓓鉴定,来源见表 1。

表 1 预知子样品来源

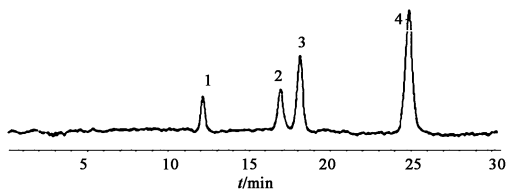
No.	采收地	种属	采收时间
1	安徽大别山	<i>A. tridoliata</i> (Thunb.) Koidz. var. <i>australis</i> (Diels) Rehd.	2011-09
2	安徽金寨	<i>A. trifoliata</i> (Thunb.) Koidz.	2011-09
3	安徽滁州	<i>A. trifoliata</i> (Thunb.) Koidz.	2011-09
4	四川峨眉	<i>A. quinata</i> (Thunb.) Decne.	2011-09
5	湖北宜昌	<i>A. trifoliata</i> (Thunb.) Koidz.	2011-09
6	湖南怀化	<i>A. tridoliata</i> (Thunb.) Koidz. var. <i>australis</i> (Diels) Rehd.	2011-09
7	江苏赣榆	<i>A. trifoliata</i> (Thunb.) Koidz.	2011-09
8	陕西咸阳	<i>A. quinata</i> (Thunb.) Decne.	2011-09
9	四川通州	<i>A. trifoliata</i> (Thunb.) Koidz.	2011-09
10	浙江宁波	<i>A. tridoliata</i> (Thunb.) Koidz. var. <i>australis</i> (Diels) Rehd.	2011-09

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Cosmosil- C₁₈ ODS 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm)色谱柱,流动相乙腈-0.2% 甲酸水(45:55),流速 1.0 mL·min⁻¹。柱温 30 °C,漂移管温度 98 °C,氮气流量 2.8 L·min⁻¹。皂苷 X、皂苷 B、皂苷 P_D、皂苷 A 对照品,样品的 HPLC-ELSD 色谱图见图 1,2。

2.2 对照品溶液的制备 精密称定皂苷 X,皂苷 B,皂苷 P_D,皂苷 A 对照品各 0.005 0 g,置 10 mL 量瓶中,加甲醇定容,制成质量浓度为 0.5 g·L⁻¹ 溶液,即得。

2.3 供试品溶液制备 精密称取预知子药材干燥



1. 皂苷 X; 2. 皂苷 B; 3. 皂苷 P_D; 4. 皂苷 A

图 1 混合对照品 HPLC-ELSD 色谱图

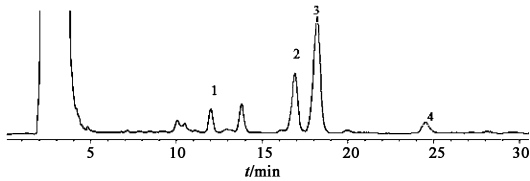


图 2 样品 HPLC-ELSD 色谱图

粉末(过 1 号筛)5 g,精密称定,加 70% 乙醇溶液 40 mL,加热回流提取 1.5 h,过滤,重复操作 1 次,合并两次滤液,用乙醇定容至 100 mL,超声(300W, 25 kHz)5 min 至全部溶解,用 0.45 μm 微孔滤膜过滤,滤液即为供试品溶液。

2.4 标准曲线的制备 分别取皂苷 X,皂苷 B,皂苷 P_D,皂苷 A 对照品溶液 0.1,0.2,0.25,0.3,0.4,0.5 g·L⁻¹注入色谱仪,记录峰面积。取峰面积自然对数与进样量(μg)的自然对数为 Y 轴与 X 轴做标准曲线,得回归方程。皂苷 X 回归方程为 $\lg A = 1.236 2 \lg M + 3.743 2 (R^2 = 0.999 0)$;皂苷 B 回归方程为 $\lg A = 1.233 5 \lg M + 3.355 6 (R^2 = 0.999 0)$;皂苷 P_D 回归方程为 $\lg A = 0.849 8 \lg M + 4.417 9, (R^2 = 0.999 1)$;皂苷 A 回归方程为 $\lg A = 1.335 5 \lg M + 3.900 5 (R^2 = 0.999 1)$ 。表明皂苷 X,皂苷 B,皂苷 P_D,皂苷 A 进样量在 2~10 μg 进样质量的对数值与峰面积的对数值呈良好的线性关系。

2.5 精密度试验 取同一供试品溶液(产地:安徽大别山),重复进样 6 次,测定峰面积值。皂苷 X 峰面积积分值的 RSD 为 1.1%,皂苷 B 峰面积积分值的 RSD 为 1.5%,皂苷 P_D 峰面积积分值的 RSD 为 1.9%,皂苷 A 峰面积积分值的 RSD 为 1.7%,表明该仪器精密度良好。

2.6 重复性试验 分别取同一个产地(安徽大别山)的药材粉末 6 份,每份 5 g,精密称定依 2.3 项下方法制备供试品溶液,进样测定,外标法计算皂苷 X,皂苷 B,皂苷 P_D,皂苷 A 的含量。结果皂苷 X,皂苷 B,皂苷 P_D,皂苷 A 质量分数的 RSD 分别为 1.7%,1.5%,1.8%,1.1%,表明方法的重复性良好。

2.7 稳定性试验 精密吸取同一供试品溶液(产

地安徽大别山)20 μL,在本文色谱条件下,分别于 0,2,4,6,8,10,12,14,16,18,20,22,24 h 进样 20 μL,测定各峰面积及保留时间。结果显示,24 h 内各测得皂苷 X,皂苷 B,皂苷 P_D,皂苷 A 峰面积积分值的 RSD 分别为 1.9%,1.7%,1.5%,1.2%。表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.8 回收率试验 称取已测知含量的样品(安徽大别山)6 份,每份约 0.1 g,分别精密加入上述 4 种对照品适量,按 2.3 项下方法制备供试品溶液,在 2.1 项色谱条件下进样测定,皂苷 X,皂苷 B,皂苷 P_D,皂苷 A 这 4 种成分的平均回收率和 RSD 分别为 96.80% 和 0.90%,101.90% 和 1.20%,99.30% 和 0.70%,100.50% 和 1.30%。

表 2 预知子中 4 种成分加样回收率试验

成分	称样量 /g	已知量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD
皂苷 X	0.101 0	1.06	2.03	96.81	96.80	0.90
	0.101 5	1.07	2.04	97.11		
	0.102 0	1.08	2.05	97.13		
	0.102 1	1.08	2.05	96.71		
	0.101 2	1.07	2.04	96.21		
	0.102 3	1.08	2.05	96.08		
皂苷 B	0.100 9	0.91	1.93	101.53	101.90	1.20
	0.101 1	0.92	1.94	101.87		
	0.102 1	0.92	1.94	101.77		
	0.102 2	0.92	1.92	100.38		
	0.102 9	0.93	1.93	99.98		
	0.101 3	0.92	1.94	101.90		
皂苷 P _D	0.102 2	1.03	2.01	98.30	99.30	0.70
	0.104 3	1.05	2.05	99.61		
	0.101 9	1.02	2.01	98.63		
	0.101 1	1.02	2.01	99.39		
	0.104 1	1.05	2.05	99.89		
	0.103 2	1.04	2.04	100.02		
皂苷 A	0.104 5	1.03	2.08	105.13	105.50	1.30
	0.102 1	1.00	2.05	105.47		
	0.101 1	0.99	2.04	105.37		
	0.103 2	1.01	2.05	103.98		
	0.101 9	1.00	2.04	103.65		
	0.102 3	1.00	2.06	105.51		

注:加入量均为 1.00 mg。

2.9 样品含量测定 取所采收的 10 个不同产地的预知子药材,按 2.3 项下方法制备供试品溶液,在

2.1 项色谱条件下进样测定,测定结果见表3。

表2 预知子中三萜皂苷类成分含量($n=6$) %

No.	皂苷 X	皂苷 B	皂苷 P _D	皂苷 A
1	1.054	0.905	1.007	0.982
2	0.878	0.954	1.008	0.551
3	1.003	0.307	0.919	0.896
4	0.313	0.805	0.821	0.412
5	0.295	0.935	0.468	0.239
6	0.908	1.064	0.319	0.893
7	0.329	0.679	0.516	0.302
8	1.058	0.895	0.754	0.875
9	0.323	0.957	0.985	0.236
10	0.764	0.856	1.089	0.603

3 讨论

3.1 2种方法比较 有国内学者用 RP-HPLC 法建立预知子药材指纹图谱,检测波长为 210 nm^[9]。由于预知子药材中主要成分是三萜皂苷,没有紫外吸收或紫外吸收系数很低,所以选择 ELSD 检测器,它是一种通用型检测器,其检测结果比紫外检测器的检测结果更能代表样品的内在质量,该方法分离度、重复性好且结果准确,故适用于预知子药材中皂苷 X,皂苷 B,皂苷 P_D,皂苷 A 的含量测定。

3.2 供试品溶液的制备 比较了 40%,50%,60%,70%,80%,90% 乙醇提取溶液,70% 乙醇的提取效较完全,故作为预知子药材的提取溶液;对样品提取时间进行考察,结果表明样品用 70% 乙醇加热回流 2 次,每次 1.5 h,可将皂苷 X,皂苷 B,皂苷 P_D,皂苷 A 提取完全。

3.3 流动相系统的选择 比较了甲醇-水、乙腈-水、乙腈-0.2% 甲酸水 3 种流动相溶剂系统。结果乙腈-0.2% 甲酸水分离效果较好。

3.4 含量测定 采用建立的方法测定了 10 个产地的预知子药材中皂苷 X,皂苷 B,皂苷 P_D,皂苷 A 的含量,测得的结果与宋永贵等^[10]运用 HPLC-UV 一测多评法同时测定预知子中这 4 种三萜皂苷的结果稍有不同。原因是采用的检测器不同,本论文采用

蒸发光检测器,而宋永贵等^[10]运用 HPLC-UV 一测多评法同时测定预知子中这 4 种三萜皂苷中采用的是紫外检测器,紫外检测器仅适用于含生色基团的物质,而皂苷类多为紫外末端吸收,易受溶剂干扰;而蒸发光检测器(ELSD)是质量型检测器,适用于皂苷类成分的分析,更加能准确的反映出药材中皂苷的含量。采用 HPLC-ELSD 测得的皂苷 X,皂苷 B,皂苷 P_D,皂苷 A 4 种皂苷的质量分数范围分别在 0.295% ~ 1.058%,0.307% ~ 1.064%,0.319% ~ 1.089%,0.236% ~ 0.982%。

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010.
- [2] 马双成,陈德昌,赵淑杰. 预知子的化学成分研究(Ⅲ)[J]. 天然产物研究与开发,1996,10(3):49.
- [3] 马双成,陈德昌,赵淑杰. 预知子的化学成分研究 I、白木通种子中的三位单糖链皂苷化合物[J]. 中草药,1994,25(4):171.
- [4] 蒋丹. 预知子化学成分及其活性研究[D]. 吉林:东北师范大学,2006.
- [5] 马双成,陈德昌,赵淑杰. 预知子的化学成分研究 II、白木通种子中的 3,28 位双糖链皂苷类化合物[J]. 中草药,1994,25(11):613.
- [6] 吴立军. 天然药物化学[M]. 第 4 版. 北京:人民卫生出版社,2003.
- [7] 赵春彦,成慧,贾冬梅,等. 龙牙楸木三萜皂苷合成途径关键酶 AeFPS 基因的克隆及原核表达[J]. 中草药,2011,42(10):2092.
- [8] 张佳佳. 黑乳海参三萜皂苷的提取分离及其结构鉴定[J]. 中草药,2011,42(8):1467.
- [9] 王家明,王智民,高慧敏,等. 预知子指纹图谱的初步研究[J]. 2007,42(13):978.
- [10] 宋永贵,张武岗,刘岩庭,等. 一测多评法同时测定预知子中 4 种三萜皂苷[J]. 2012,43(7):1418.

[责任编辑 顾雪竹]