

HPLC-ELSD 测定吉祥草中皂苷 A 的含量

刘丽娜, 查俊, 张桂青, 兰燕宇, 龙庆德, 王爱民, 李勇军*

(贵阳医学院药学院 贵州省药物制剂重点实验室, 贵阳 550004)

[摘要] 目的: 建立 HPLC-ELSD 法测定吉祥草中皂苷 A 含量的方法。方法: 采用 Aglient Eclipse-XDB-C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 150 mm, 5 μm), 甲醇-水 (46:54) 为流动相, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 40 °C, ELSD 漂移管温度 40 °C, 雾化空气压力 0.30 MPa。结果: 皂苷 A 进样量在 0.618 ~ 9.888 μg 呈良好线性关系 ($r = 0.999\ 8$), 平均回收率为 99.11%, RSD 2.47%。结论: 该方法简便、快速、准确、灵敏度高, 可用于吉祥草中皂苷 A 含量测定。

[关键词] 吉祥草; 皂苷 A; 高效液相色谱-蒸发光散射法

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)17-0112-03

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20120704.1739.022.html>

[网络出版时间] 2012-07-04 17:39

Determination of Saponin A in *Reineckia carnea* by HPLC-ELSD

LIU Li-na, ZHA Jun, ZHANG Gui-qing, LAN Yan-yu, LONG Qing-de, WANG Ai-ming, LI Yong-jun*

(School of Pharmacy, Guiyang Medical University, Guizhou Provincial
Key Laboratory of Pharmaceutical Preparation, Guiyang 550004, China)

[Abstract] **Objective:** To establish HPLC-ELSD method for the determination of saponin A in *Reineckia carnea*. **Method:** The column was Elipse-XDB-C₁₈ (4.6 mm × 150 mm, 5 μm) and mixture of methanol-water (46:54) as mobile phase; the flow rate was 1.0 mL·min⁻¹ and the column temperature was at 40 °C. Drift tube temperature was 40 °C, pressure of nebulizer gas was 0.3 MPa. **Result:** The linearity of saponin A was good in the range of 0.618-9.888 μg ($r = 0.999\ 8$). The average recovery was 99.11%, with RSD of 2.47%. **Conclusion:** The method is convenient, rapid, accurate with high sensitivity and can be used reliably for analyzing saponin A in *R. carnea*.

[Key words] *Reineckia carnea*; saponin A; HPLC-ELSD

吉祥草为百合科植物, 又名小叶万年青、玉带草等, 应用历史悠久, 分布广泛, 具有滋阴润肺、凉血止

血的功效, 用于肺燥咳喘、阴虚咳嗽等症^[1]。该药材多以水煎煮提取广泛应用于咳速停糖浆、咳清胶囊、复方吉祥草含片等 8 个苗药制剂中, 其中皂苷类成分是其功能主治的重要物质基础^[2-4]。目前关于吉祥草药材含量测定的报道有周婵媛^[5]等和刘亮^[6]等采用紫外分光光度法测定总皂苷含量以及周婵媛^[7]等采用 HPLC-ELSD 测定凯提皂苷元的含量, 但未见有关皂苷成分的含量测定进行研究。为有效控制苗药吉祥草药材及其制剂的质量, 笔者采用 HPLC-ELSD 法对吉祥草代表性皂苷成分皂苷 A [(1β, 3β, 16β, 22 S)-cholest-5-ene-1, 3, 16, 22-tetrol, 16-di-(β-D-glucopyranoside)]^[8-11]的含量测定进行研究, 建立了皂苷 A 含量测定方法, 以期对吉祥草药材及其制剂的质量控制提供参考依据。

[收稿日期] 20120405(017)

[基金项目] 贵州省中药现代化项目(黔科合[2007]5016); 贵州省科技厅科技计划项目(黔科合[2009]4001); 贵阳市科技计划项目(筑科合[2009]9304); 贵州省科技创新人才团队项目; 贵州省中药现代化项目(黔科合[2011]5081)

[第一作者] 刘丽娜, 讲师, 硕士, 从事中药质量控制研究, Tel: 0851-6908468, E-mail: gylln815@126.com

[通讯作者] * 李勇军, 教授, 硕士, 从事天然药物化学、中药新药制备工艺及质量标准研究, Tel: 0851-6908468, E-mail: liyongjun026@126.com

1 材料

1.1 仪器 岛津 Prominence HPLC 液相色谱仪系统(日本岛津),Alltech ELSD 800 型 蒸发光检测器(美国奥泰科技公司),WML 色谱工作站(威玛龙色谱科技公司),WYB-5000 型全自动空气泵(北京怡丰瑞普科技有限公司),AE 240 型电子天平(梅特勒-托利多仪器上海有限公司),超纯水机(四川沃特尔科技发展有限公司)。

1.2 试剂 对照品由课题组从吉祥草药材中制备,经¹H-NMR,¹³C-NMR,MS 等波谱鉴定为皂苷 A,采用 HPLC-ELSD 检测其峰面积归一化结果 > 98%;各批次吉祥草经贵阳医学院药物研究开发中心生药学研究室龙庆德副教授鉴定为吉祥草 *Reineckia carnea* Kunth 的干燥全草;甲醇为色谱纯、水为超纯水,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

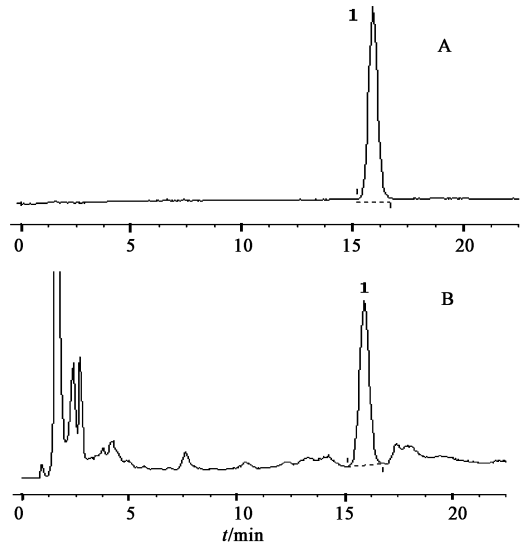
2.1 色谱条件 Agilent Eclipse-XDB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm),Security Guard C₁₈ 保护柱(3 mm × 4 mm, Phenomenex),流动相甲醇-水(46:54),流速 1 mL·min⁻¹,柱温 40 °C,蒸发光散射检测器(ELSD),漂移管温度 40 °C,雾化空气压力 0.30 MPa,进样量 10 μL。

2.2 对照品溶液的制备 精密称取皂苷 A 对照品适量,加甲醇制成 0.247 2 g·L⁻¹ 的对照品溶液,即得。

2.3 供试品溶液的制备 取吉祥草药材粉末(过 40 目筛)约 2.5 g,精密称定,置索氏提取器中,加三氯甲烷适量,加热回流 2 h,弃去三氯甲烷液,残渣加甲醇适量,加热回流 4 h,提取液回收溶剂并浓缩至干,残渣加氨试液 20 mL 溶解,用水饱和的正丁醇振摇提取 4 次,每次 10 mL,合并正丁醇液,用正丁醇饱和的水溶液振摇提取 2 次,每次 10 mL,弃去水溶液,正丁醇液蒸干,残渣加甲醇溶解,转移至 5 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,滤过,取续滤液 0.45 μm 微孔滤膜滤过,作为供试品溶液,备用。

2.4 线性关系考察 精密称取皂苷 A 对照品 30.9 mg,置于 25 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,其质量浓度为 1.236 g·L⁻¹,作为对照品储备液备用。精密量取储备液 0.5,1.0,2.0,4.0,8.0 mL 分别置于 10 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,即得。分别精密吸取 10 μL 注入液相色谱仪。测定峰面积,以对照品进样量的对数值为横坐标,以峰面积的对数值为纵坐标绘制标准曲线,得回归方程为 $Y =$

$1.543X + 5.204 (r = 0.9998)$ 。结果表明皂苷 A 进样量在 0.618 ~ 9.888 μg 呈良好的线性关系。对照品及吉祥草药材的色谱图见图 1。



A. 对照品; B. 吉祥草药材; 1. 皂苷 A

图 1 吉祥草的 HPLC-ELSD

2.5 精密度试验 取质量浓度为 0.247 2 g·L⁻¹ 的皂苷 A 对照品溶液在 2.1 色谱条件下连续进样 5 次,测得皂苷 A 峰面积的 RSD 0.94%,表明精密度良好。

2.6 重复性试验 取同一批样品 9 份,分别约 2.0,2.5,3.0 g 按照 2.3 项下每组制备 3 份样品操作,测定其平均含量为 0.79 mg·g⁻¹,RSD 1.82%,结果表明本方法重复性良好。

2.7 稳定性试验 取同一供试品溶液,照 2.1 项下色谱条件分别于 0,1,2,4,8 h 进样测定,每次进样 10 μL,结果皂苷 A 峰面积的 RSD 1.74%,表明供试品溶液在 8 h 内稳定性良好。

2.8 回收率试验 取已测定含量的药材(批号 20100420,0.79 mg·g⁻¹)9 份,每份约 1.25 g,精密称定,分别加入皂苷 A (0.434 g·L⁻¹) 对照品溶液 1.0,2.0,3.0 mL,分别于室温下挥干后,按 2.3 项下操作,分别进样 10 μL,测定含量,计算皂苷 A 回收率,结果见表 1。

2.9 样品测定 取 18 批不同产地的吉祥草药材,分别按 2.3 项下方法制备供试品溶液,按上述色谱条件测定并计算含量,结果见表 2。

3 讨论

吉祥草药材中皂苷类成分具有紫外末端吸收若采用 HPLC-UV 法进行检测,基线难以分离且杂质

表 1 皂苷 A 加样回收率测定

No	取样量 /g	样品中 含量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
1	1.246 9	0.985 1	0.434	1.407	97.12		
2	1.249 8	0.987 3	0.434	1.413	97.99		
3	1.252 2	0.989 2	0.434	1.408	96.45		
4	1.250 2	0.987 7	0.868	1.889	103.89		
5	1.252 1	0.989 2	0.868	1.855	99.78	99.11	2.47
6	1.250 6	0.988 0	0.868	1.873	101.98		
7	1.250 3	0.987 7	1.736	2.697	98.45		
8	1.240 7	0.980 2	1.736	2.667	97.19		
9	1.249 1	0.986 8	1.736	2.708	99.16		

表 2 16 批药材含量测定 (n = 2) mg · g⁻¹

No.	药材来源	皂苷 A
1	贵阳	1.24
2	贵阳	0.81
3	贵阳	0.69
4	高坡	0.79
5	遵义	0.95
6	遵义	0.26
7	凯里	1.41
8	凯里	0.44
9	贵定	0.58
10	修文	0.39
11	富山	1.92
12	龙里	0.46
13	龙里	0.85
14	黔东南	0.31
15	安顺	0.80
16	毕节	1.14
17	阳坝	1.09
18	兴义	0.50

峰干扰较大。而采用 HPLC-ELSD 法基线平稳,干扰物质较少,灵敏度高^[12],能简便、快速、准确的测定吉祥草药材中皂苷 A 的含量。

吉祥草药材中皂苷 A 易溶解于甲醇,采用甲醇超声或回流提取后直接测定,干扰物质较多且目标

峰分离不完全,笔者根据皂苷 A 的性质,将吉祥草药材采用三氯甲烷索氏提取,除去油脂类等干扰物质,同时参照 2010 年版《中国药典》黄芪药材中黄芪甲苷 A 的含量测定方法处理样品^[13],经试验表明此法适用于测定吉祥草中皂苷 A 的含量测定。

不同产地吉祥草药材中皂苷 A 的含量差异较大,其中贵阳产的吉祥草皂苷 A 含量差异较小,可以指导我们合理选择吉祥草药材。

[参考文献]

[1] 贵州省药品监督管理局. 贵州省中药材、民族药材质量标准[S]. 贵阳:贵州科技出版社,2003:151.

[2] 张元,杜江,许建阳,等. 吉祥草总皂苷溶血、止咳、化痰、抗炎作用的研究[J]. 武警医学,2006,17(4):282.

[3] 张元,胡一冰,王学勇,等. 吉祥草总皂苷对非胰岛素依赖性糖尿病模型——大鼠肌糖原、肝糖原及糖代谢的影响[J]. 武警医学,2008,19(9):818.

[4] 张元,许建阳,杜江,等. 观音草总皂苷对哮喘大鼠血清及支气管肺泡灌洗液中 NO, NOS 浓度的影响[C]. 第三届国际传统医药大会文集,2004:261.

[5] 周婵媛,陈华国,周欣,等. 紫外分光光度法测定吉祥草中的总皂苷[J]. 华西药学杂志,2010,25(3):344.

[6] 刘亮,杜江,潘炉台,等. 苗药观音草中总皂苷的含量测定[J]. 中国民族民间医药,2011,20(4):2.

[7] 周婵媛,陈华国,周欣,等. HPLC-ELSD 测定不同产地吉祥草中凯提皂苷元的含量[J]. 中国药学杂志,2010,45(13):1029.

[8] 周欣,刘海,赵超,等. 吉祥草化学成分研究[J]. 中国中药杂志,2008,33(23):2793.

[9] 陈梦菁. 铃兰族的甾体皂甙[J]. 植物学通报,1999,16(1):37.

[10] 刘海. 吉祥草化学成分研究[D]. 贵阳:贵州大学,2008.

[11] Zhang Zhong-quan, Chen Jian-chao, Zhou Lin, et al. Two new cholestane bisdesmosides from *Reineckia carnea* [J]. Helvetica Chimica Acta,2007,90:616.

[12] 黄江剑,高英,李卫民,等. HPLC-ELSD 测定不同产地百合中薯蓣皂苷的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,11(5):110.

[13] 中国药典. 一部[S]. 2010:283.

[责任编辑 顾雪竹]