

## HPLC-ELSD法同时测定盾叶薯蓣根中 3种皂苷的含量

王银红<sup>1</sup>, 康阿龙<sup>2</sup>, 樊宝娟<sup>3</sup>, 孙文基<sup>1\*</sup>

(1. 西北大学陕西省生物医药重点实验室, 西安 710069)

2. 解放军第四五一医院, 西安 710055; 3. 陕西省食品药品检验所, 西安 710061)

**摘要** 目的: 建立同时测定盾叶薯蓣根中黄姜素 A、盾叶新苷及薯蓣皂苷 3 种成分含量的 HPLC-ELSD 分析方法, 考察不同产地盾叶薯蓣根中 3 种成分的含量。方法: 药材粉末经 70% 乙醇回流提取, 以 HPLC-ELSD 法进行测定。色谱柱采用 Dimasil C<sub>18</sub> (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为甲醇 (A) - 水 (B), 梯度洗脱 (0~10 min 78% A; 10~13 min 78% A → 90% A; 13~45 min 90% A), 流速为 1.0 mL · min<sup>-1</sup>, 漂移管温度为 79.0 °C, 气体流速为 2.1 L · min<sup>-1</sup>。结果: 黄姜素 A、盾叶新苷和薯蓣皂苷三者均有良好的线性关系; 其平均回收率 (n = 6) 分别为 100.4%, 103.0%, 95.3%。结论: 本方法操作简便, 结果可靠, 可用于同时定量分析盾叶薯蓣根中黄姜素 A、盾叶新苷及薯蓣皂苷 3 种成分。

**关键词:** 盾叶薯蓣根; 黄姜素 A; 盾叶新苷; 薯蓣皂苷; HPLC-ELSD

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2009)05-0739-04

HPLC-ELSD simultaneous determination of three components in root of *Dioscorea zingiberensis* C. H. WrightWANG Yin-hong<sup>1</sup>, KANG A-long<sup>2</sup>, FAN Bao-juan<sup>3</sup>, SUN Wen-ji<sup>1\*</sup>

(1. Bimedicine Key Laboratory of Shaanxi Province, Northwest University, Xi'an 710069, China)

2. 451 Military Hospital of China, Xi'an 710055, China

3. Shaanxi Institute for Food and Drug Control, Xi'an 710061, China)

**Abstract Objective** To establish a quantitative method for the simultaneous determination of Huangjiangsu A, zingiberensis new saponin and dioscin and contrast the contents of three compounds in root of *Dioscorea zingiberensis* C. H. Wright from different habitats. **Method** After refluxed with 70% ethanol, samples were separated by Diamonsil C<sub>18</sub> column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); The mobile phase consisted of methanol (A) - water (B) with gradient elution (0-10 min 78% A; 10-13 min 78% A → 90% A; 13-45 min 90% A), and the flow rate was 1.0 mL · min<sup>-1</sup>. The temperature of drift tube and gas flow rate were 79.0 °C and 2.1 L · min<sup>-1</sup>, respectively. **Results** Huangjiangsu A, zingiberensis new saponin and dioscin showed good linearity, and the average recoveries were 100.4%, 103.0% and 95.3%, respectively. **Conclusion** The method is simple and accurate for the simultaneous analysis of Huangjiangsu A, zingiberensis new saponin and dioscin in root of *Dioscorea zingiberensis*.

**Key words** root of *Dioscorea zingiberensis* C. H. Wright; Huangjiangsu A; zingiberensis new saponin; dioscin; HPLC-ELSD

盾叶薯蓣 (*Dioscorea zingiberensis* C. H. Wright) 为我国特有的薯蓣品种, 其根内薯蓣皂素 (薯蓣皂苷元) 含量最高达 16.13%, 是目前世界上最好的激素类药源植物。其性味甘、苦、凉, 具有清肺止咳、利湿通淋、通络止痛、解毒消肿等功效, 其甾体皂苷成

分对心肌缺血、胸痛、高血脂等具明显的治疗作用<sup>[1]</sup>。

盾叶薯蓣根中的主要甾体皂苷类成分有黄姜素 A、盾叶新苷和薯蓣皂苷<sup>[2]</sup>, 前两者苷元为螺甾类, 后者苷元为呋甾类。盾叶薯蓣的定量分析主

\* 通讯作者, Tel: (029) 88304569; E-mail: cxhm@nwnu.edu.cn

要是将样品水解后用比色法<sup>[3]</sup>或薄层扫描法<sup>[4]</sup>测定薯蓣皂苷元的含量,对薯蓣皂苷的含量测定虽有报道,但大都是测定单一成分<sup>[5,6]</sup>。本文建立了 HPLC-ELSD 法同时测定盾叶薯蓣根中黄姜素 A、盾叶新苷及薯蓣皂苷 3 种成分含量,并考察了此 3 种主要成分在不同产地样品中的分布,为更好地分析盾叶薯蓣药材的内在质量提供了新的依据。

### 1 仪器和试剂

日本 HITACHI L-7110 型高效液相色谱仪;美国 Alltech ELSD 2000ES 型蒸发光散射检测器;EC 2000 色谱数据工作站。

对照品黄姜素 A、盾叶新苷及薯蓣皂苷均为陕西省生物医药重点实验室提供,经 IR、MS、<sup>1</sup>H NMR、<sup>13</sup>C NMR 确证结构,峰面积归一化法计算纯度均大于 99%;所用试剂均为色谱纯,水采用重蒸水;所用药材均为人工种植品,由西北大学生命科学学院王亚洲副教授鉴定。

### 2 色谱条件

色谱柱: Diamondsil C<sub>18</sub> 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 采用甲醇-水梯度洗脱 (0~10 min 78:22, 10~13 min 78:22 → 90:10, 13~45 min 90:10), 流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 进样量为 10 μL; 漂移管温度为 79.0 °C, 雾化载气流速为 2.1 L·min<sup>-1</sup>。理论塔板数按黄姜素 A、盾叶新苷和薯蓣皂苷三者的色谱峰计算, 结果分别为 3817, 29793, 27146 分离度分别为 2.4, 5.4, 3.7。

### 3 溶液制备

**3.1 对照品储备液** 精密称定对照品黄姜素 A、盾叶新苷及薯蓣皂苷适量, 用 70% 甲醇溶解并定容至 10 mL, 制成浓度分别为 0.736, 1.014, 0.810 mg·mL<sup>-1</sup> 的混合溶液, 微孔滤膜 (0.45 μm) 滤过后备用。

**3.2 供试品溶液** 取盾叶薯蓣根药材粉末 (过 20 目筛) 约 2 g 精密称定。以 70% 乙醇 20 mL 回流提取 3 次, 每次 2 h 滤过, 合并滤液, 蒸干, 用 70% 甲醇分次溶解并定容至 50 mL 量瓶中, 摇匀, 微孔滤膜 (0.45 μm) 滤过后备用。

### 4 方法学考察

**4.1 线性范围** 精密量取“3.1”项下的对照品储备液 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 mL, 分别以 70% 甲醇定容至 5 mL 量瓶中, 摇匀, 得到黄姜素 A 浓度分别为 0.0736, 0.1472, 0.2944, 0.4416, 0.5888, 0.7360 mg·mL<sup>-1</sup>; 盾叶新苷浓度分别为 0.1014,

0.2028, 0.4056, 0.6084, 0.8112, 1.0140 mg·mL<sup>-1</sup>; 薯蓣皂苷浓度分别为 0.0801, 0.1602, 0.3204, 0.4806, 0.6408, 0.8010 mg·mL<sup>-1</sup> 的系列对照品混合溶液。精密吸取各浓度溶液 10 μL 注入液相色谱仪, 按“2”项下色谱条件测定峰面积, 以峰面积的对数值对浓度的对数值作图, 得黄姜素 A、盾叶新苷、薯蓣皂苷回归方程分别为:

$$Y = 1.718X + 10.57 \quad r = 0.9991$$

$$Y = 1.480X + 10.52 \quad r = 0.9992$$

$$Y = 1.553X + 10.69 \quad r = 0.9992$$

线性范围分别为 0.0736 ~ 0.7360, 0.1014 ~ 1.0140, 0.0801 ~ 0.8010 mg·mL<sup>-1</sup>。

**4.2 精密度** 取黄姜素 A 浓度为 0.4416 mg·mL<sup>-1</sup> 的对照品混合溶液 10 μL, 重复进样 6 次, 按“2”项下色谱条件进行测定, 其相对保留时间稳定。黄姜素 A、盾叶新苷和薯蓣皂苷的平均峰面积 ( $n = 6$ ) 分别为 10603, 19559, 13763, RSD 分别为 1.9%, 1.0%, 1.5%。表明仪器精密度良好。

**4.3 稳定性** 精密吸取供试品溶液 (产地: 旬阳) 10 μL, 分别在 0, 2, 4, 6, 8, 10 h 进样测定。结果黄姜素 A、盾叶新苷和薯蓣皂苷的平均峰面积 ( $n = 6$ ) 分别为 7250, 12037, 4295, RSD 分别为 1.1%, 1.3%, 1.8%。表明供试品溶液在 10 h 内稳定性良好。

**4.4 重复性** 取同一批盾叶薯蓣根药材粉末 (产地: 旬阳) 共 5 份, 每份约 2 g 精密称定, 按“3.2”项下方法平行制备供试品溶液, 以外标两点法计算样品中 3 种成分的的含量。结果黄姜素 A、盾叶新苷和薯蓣皂苷的平均含量分别为 0.543%, 0.713%, 1.035%; RSD 分别为 2.7%, 2.7%, 0.8%。

**4.5 加样回收率** 取已知含量的盾叶薯蓣根药材粉末共 6 份, 每份约 1 g 精密称定, 每份分别精密加入对照品黄姜素 A 6 mg, 盾叶新苷 10 mg 及薯蓣皂苷 7 mg, 按“3.2”项下方法制备溶液, 进样 10 μL, 测定回收率。结果黄姜素 A、盾叶新苷和薯蓣皂苷平均回收率 ( $n = 6$ ) 分别为 100.4%, 102.9%, 95.3%; RSD 分别为 2.0%, 1.9%, 1.6%。

### 5 样品测定

取不同产地采集的盾叶薯蓣根药材, 按“3.2”项下方法制备供试品溶液, 每种药材平行制备 3 份溶液, 在上述色谱条件下各进样 10 μL, 以外标两点法分别计算样品中 3 种成分的含量。含量测定结果见表 1, 色谱图见图 1。

表 1 不同产地盾叶薯蓣根中 3 种成分的含量 (n = 3)

Tab 1 The contents of three compounds in root of *Dioscorea zingiberensis* from different habitats

| 产地 ( habitat )                   | 含量 ( contents ) %           |                                      |                      | 总含量<br>( total ) % | 折合薯蓣皂苷元含量<br>( convert into the<br>content of diosgenin ) % |
|----------------------------------|-----------------------------|--------------------------------------|----------------------|--------------------|-------------------------------------------------------------|
|                                  | 黄姜素 A<br>( Huangjiangsu A ) | 盾叶新苷<br>( zingiberensis newsaponin ) | 薯蓣皂苷<br>( dioscin )  |                    |                                                             |
| 陕西白河 ( Bahe county, Shaanxi )    | 0.64 ( 2.1 )                | 0.24 ( 2.3 )                         | 未检出 ( not detected ) | 0.88               | 0.34                                                        |
| 陕西澄县 ( Cheng county, Shaanxi )   | 0.38 ( 1.0 )                | 1.22 ( 1.7 )                         | 0.40 ( 1.9 )         | 2.00               | 0.82                                                        |
| 陕西汉阴 ( Hanyin county, Shaanxi )  | 0.44 ( 2.9 )                | 1.11 ( 1.8 )                         | 0.73 ( 2.4 )         | 2.28               | 0.96                                                        |
| 河南内乡 ( Nexiang county, Henan )   | 0.97 ( 2.0 )                | 0.11 ( 2.1 )                         | 0.07 ( 1.0 )         | 1.15               | 0.45                                                        |
| 陕西平利 ( Pingli county, Shaanxi )  | 1.21 ( 2.2 )                | 0.07 ( 2.6 )                         | 0.44 ( 1.5 )         | 1.72               | 0.72                                                        |
| 陕西旬阳 ( Xunyang county, Shaanxi ) | 0.84 ( 1.1 )                | 1.19 ( 1.3 )                         | 0.78 ( 1.7 )         | 2.81               | 1.17                                                        |
| 陕西紫阳 ( Ziyang county, Shaanxi )  | 0.51 ( 1.6 )                | 1.55 ( 0.8 )                         | 1.51 ( 1.2 )         | 3.57               | 1.53                                                        |

注 ( note ): 括号内的数值为 RSD 值 ( RSD in the parentheses is % )

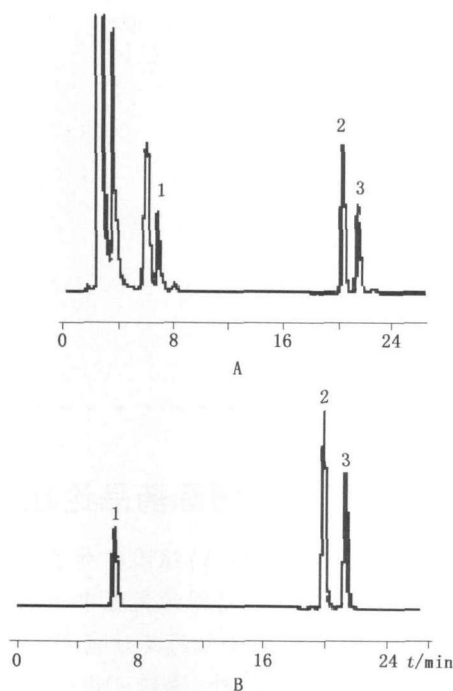


图 1 旬阳产样品 ( A ) 和对照品 ( B ) 的 HPLC 图

Fig 1 HPLC chromatograms of sample from Xunyang ( A ) and reference substances ( B )

1. 黄姜素 A ( Huangjiangsu A ) 2. 盾叶新苷 ( zingiberensis newsaponin ) 3. 薯蓣皂苷 ( dioscin )

## 6 讨论

**6.1 样品的预处理** 本实验考察了不同溶剂 ( 不同浓度的甲醇和乙醇 ) 及不同提取方法 ( 超声提取、冷浸提取、回流提取 ) 的提取效率, 发现提取溶剂以 70% 甲醇的提取效率最高, 70% 乙醇次之; 提取方法中以回流提取效率最高。在提取过程中考虑到甲醇在回流的过程中有可能会使皂苷类成分甲基化而影响其结构, 故采用 70% 乙醇作为溶剂, 以药材 10 倍量体积的溶剂提取 3 次, 每次 2 h, 可将药材中的甾体皂苷基本提取完全。

**6.2 检测器的选择** 盾叶薯蓣中的黄姜素 A、盾叶新苷及薯蓣皂苷 3 种成分均属于甾体类化合物, 用紫外检测器测定时因其只有末端吸收而不易测定, 蒸发光散射检测器为质量型检测器, 可用于无紫外吸收或紫外仅有末端吸收的化合物的测定, 且无溶剂峰干扰, 基线平稳, 易于测定, 故选用蒸发光检测器。

**6.3 流动相的选择** 实验比较了乙腈 - 水和甲醇 - 水流动相系统的分离效果, 结果表明甲醇 - 水系统的分离效果较好。本实验进一步对比了等度洗脱和梯度洗脱, 由于等度洗脱时, 黄姜素 A、盾叶新苷及薯蓣皂苷 3 种成分的保留时间相差较大, 改用梯度洗脱可对三者的保留时间进行调整, 故采用梯度洗脱。同时本试验也考察了不同的梯度系统, 以 0~ 10 min 时甲醇 - 水比例为 78: 22, 10~ 13 min 时甲醇 - 水的比例升至 90: 10, 13~ 45 min 时甲醇 - 水比例为 90: 10 的梯度洗脱系统分离效果最好, 保留时间适中, 对照品及样品中 3 种成分均能达到较好的分离。

**6.4 小结** 采用本文的 HPLC - ELSD 法梯度洗脱, 不仅可以同时测定盾叶薯蓣中黄姜素 A、盾叶新苷和薯蓣皂苷的含量, 同时还可以根据它们与薯蓣皂苷元相对分子质量之比计算出药材中薯蓣皂苷元的含量 ( 见表 1 ), 不必经过酸水解过程, 操作简单且不会对环境造成污染, 可间接反映样品中薯蓣皂苷元含量。本实验选取了陕南 6 个不同地区及河南内乡县的盾叶薯蓣根药材进行测定, 结果表明不同产地的样品, 3 种成分的含量均有很大的差别。由表 1 可以看出, 黄姜素 A 以陕西平利县的盾叶薯蓣根药材中含量最高, 盾叶新苷和薯蓣皂苷均以陕西紫阳县的盾叶薯蓣根药材中为最高, 3 种成分折合为薯蓣皂苷元含量后以陕西紫阳县的总含量为最高, 旬

阳次之。说明生态环境对盾叶薯蓣中皂苷成分的含量有明显影响,这对各地区盾叶薯蓣的大面积种植及质量评价都具有一定的指导意义。

#### 参考文献

- 1 TANG Shi-rong(唐世蓉), WU Yu-fen(吴余芬), PANG Zi-jie(庞自洁). Isolation and identification of steroidal saponins from *Dioscorea zingiberensis* C. H. Wright(盾叶薯蓣甾体皂苷的分离鉴定). *Acta Bot Sin*(植物学报), 1983, 25(6): 55
- 2 QIAN Shi-hui(钱士辉), YUAN Li-hong(袁丽红), YANG Nian-yun(杨念云), et al Study on steroidal compound from *Dioscorea zingiberensis*(盾叶薯蓣中甾体类化合物的分离与结构鉴定). *J Chin Med Mater*(中药材), 2006, 29(11): 1174
- 3 CHEN Zhan-guo(陈战国), GENG Zheng(耿征), LIU Qian-guang(刘谦光), et al Determination of diosgenin by spectrophotometry(薯蓣皂苷元的分光光度法测定). *Chin J Anal Chem*(分析化学), 1996, 24(2): 27
- 4 WEI Yong-chun(魏永春), LI Qian(李谦), LU Xiu-hua(刘绣华), et al Determination of diosgenin in *Dioscorea zingiberensis* by TLCs(黄姜中薯蓣皂苷元的薄层扫描法测定). *Chin J Anal Lab*(分析实验室), 2006, 25(11): 67
- 5 ZAN Li-xia(簪丽霞). HPLC-ELSD determination of dioscin in *Dioscorea zingiberensis*(高效液相色谱法-蒸发光散射检测器测定盾叶薯蓣中薯蓣皂苷的含量). *J Jiangxi Norm Univ*(江西师范大学学报), 2007, 31(1): 94
- 6 GU Yong-ming(顾永明), YUAN Li-hong(袁丽红), LI Wen-qian(李文谦), et al Determination of diosgenin in *Dioscorea zingiberensis* cell by RP-HPLC(RP-HPLC法测定盾叶薯蓣细胞中薯蓣皂苷元的含量). *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2004, 16(4): 331

(本文于 2008年 5月 13日收到)

## 马双成处长随 SFDA 团赴美国参加 FDA CDER 第八届国际药品论坛

2009年4月20日至24日,应美国FDA邀请,国家食品药品监督管理局(SFDA)组团参加了在美国马里兰州 Silver Spring 举行的 FDA 第八届国际药品论坛。中方代表团由中国医药国际交流中心副主任常永亨为团长,成员包括:SFDA 药品安全监管司药品经营监管处处长陈谓、SFDA 药品注册司杨胜博士、SFDA 药品审评中心左晓春、张宁博士及中检所药品检验处处长马双成。此外,论坛还邀请了来自加拿大、加纳、韩国、尼日利亚、津巴布韦、马来西亚、哥斯达黎加、乌干达、土耳其、南非、秘鲁、巴基斯坦等国家的代表。

论坛由 FDA 药品审评部(CDER)、国际项目副主任 Justina A 博士主持,在为期 5天的日程中安排了 CDER 几乎所有涉及药品审评环节的部门共 43位资深专家作报告并参加讨论。内容主要包括:FDA 总体组织框架;CDER 的职能和作用;相关技术法规的介绍;GPP(Good Guidance Practices);CTD 和 eCTD(Common Technical Documents);CDER 的评审程序和过程;药品审评过程中咨询委员会的作用;审评员的培训;OTC 药品的管理;化学药品和生物制品的技术要求;仿制药的审批;另外还包括临床药 GCR 药理学、毒理学风险评估、统计学的应用、化学评价和生物等效性问题、GMP 检查和批准前核查、上市后风险管理和监测、信息化管理等一系列问题。

通过与其他国家代表和 FDA 专家进行讨论沟通,进一步加深了我国相关部门对 FDA,特别是 CDER 部门工作的全面了解,许多技术管理理念和模式值得我们借鉴。

详见 <http://www.nicpbp.org.cn>