

知母商品药材中的皂苷类成分含量测定

原源^{1,3}, 陈万生^{2,3}, 孙连娜^{1,3}, 郑水庆^{1,3}, 姜子洋¹, 张汉明¹ (1. 第二军医大学药学院, 上海 200433; 2. 第二军医大学附属长征医院, 上海 200003; 第二军医大学现代中药研究中心, 上海 200433)

[摘要] 目的: 考察市场流通商品知母药材的品质。方法: 采用高效液相 蒸发光散射法测定不同流通地区的商品知母药材中皂苷类成分的含量。结果: 知母皂苷 E_I、知母皂苷 B-II、知母皂苷 B、知母皂苷 A-III 的平均回收率分别为 100.31% (RSD 为 1.93%)、99.22% (RSD 为 1.72%)、101.80% (RSD 为 2.04%)、101.54% (RSD 为 1.76%), 4 种皂苷类成分的含量之和为 4.450 2%~6.285 4%。结论: 知母商品药材中皂苷类成分含量存在一定的差异, 其品质差异的影响因素有待进一步考察。

[关键词] 知母; 商品药材; 高效液相 蒸发光散射法; 知母皂苷

[中图分类号] R927.2 [文献标识码] A [文章编号] 1001-5213(2006)06-0656-03

Determination of the content of saponins in commercial herbs of *Rhizoma Anemarrhenae*

YUAN Yuan^{1,3}, CHEN Wansheng^{2,3}, SUN Liana^{1,3}, ZHENG Shuqing^{1,3}, LOU Ziyang¹, ZHANG Haiming¹ (1. College of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 2. Department of pharmaceuticals, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China; 3. Modern Research Center For Traditional Chinese Medicine, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the quality status of *Rhizoma Anemarrhenae* through analysis of the commercial herbs. **METHODS** The content of saponins in *Rhizoma Anemarrhenae* was determined by HPLC-ELSD. **RESULTS** The average recovery of the four saponins were 100.31% (RSD was 1.93%), 99.22% (RSD was 1.72%), 101.80% (RSD was 2.04%), 101.54% (RSD was 1.76%), and the content of the total saponins was 4.450 2%~6.285 4%. **CONCLUSION** The content of saponins in commercial herbs of *Rhizoma Anemarrhenae* from various districts is different in some extent, and the influence factors of the quality should be investigated.

KEY WORDS: *Rhizoma Anemarrhenae*; commercial herbs; HPLC-ELSD; saponins

知母(*Rhizoma Anemarrhenae*)为百合科植物知母*Anemarrhena asphodeloides* Bunge.的根茎,具有滋阴降火、润燥、滑肠的功效,常用于外感热病、高热烦渴、肺热燥咳、骨蒸潮热、内热消渴、肠燥便秘等症的治疗。现代药理研究证明,其活性成分主要是皂苷类^[1,2]。我们的前期实验表明,知母防治缺血性脑中风的有效成分为知母总皂苷。知母药材虽为单一品种,但分布较广,广泛分布于华北、东北、西北地区。目前商品知母药材在各地药品市场流通,其品质优劣有待考察。本文选择知母皂苷类成分,建立高效液相色谱 蒸发光散射法^[3~5],考察测定了各地商品知母药材中该类成分的含量。现报道如下。

1 仪器与试药

美国 WATERS 510 型泵;法国 SEDEX75 型蒸发光散射检测器(ELSD);SrA3dv 色谱数据工作站。知母皂苷标准品:知母皂苷 E_I、知母皂苷 B-II、知母皂苷 B、知母皂苷 A-III 自提,批号分别为 20030510、20030501、20030704、20030528,经四大光谱鉴定及高效液相归一

化法检测,纯度均为 99% 以上,知母药材于全国 18 个地区收集,经第二军医大学药学院生药学教研室张汉明教授鉴定,均为百合科植物知母*Anemarrhena asphodeloides* Bunge.,药材来源见表 1);甲醇,乙腈为色谱纯,水为二次纯化水。

表 1 知母药材的来源

Tab 1 Samples of *Rhizoma Anemarrhenae*

样品号	收集地	收集时间	样品号	收集地	收集时间
1	安徽亳州	2003.9	10	山东济宁	2003.9
2	山东烟台	2003.9	11	上海	2003.9
3	山西太原	2003.9	12	海南海口	2003.9
4	江苏南京	2003.9	13	浙江温州	2003.9
5	湖南邵阳	2003.9	14	山西长治	2003.9
6	湖南长沙	2003.9	15	山东青岛	2003.9
7	吉林长春	2003.9	16	河南郑州	2003.9
8	辽宁沈阳	2003.9	17	河南洛阳	2003.9
9	辽宁丹东	2003.9	18	河南新乡	2003.9

2 方法与结果

2.1 色谱及检测条件 色谱柱:依利特 Hypersil ODSC₁₈柱(4.6 mm×200 mm, 25 μm);柱温:25℃;流动相:采用梯度洗脱: A 相为乙腈, B 相为纯化水;

[基金项目] 上海市科委重大科技专项(编号 03DZ19514) [作者简介] 原源,女,博士,主管药师,电话:021-25074573, E-mail: yuanyuan74@mail.china.com [通讯作者] 陈万生, E-mail: chenws@vnet.citiz.net

流速: 0.8 mL·min⁻¹; ELSD 检测器漂移管温度: 40 °C; 载气流速: 3.4 BAR; 理论塔板数按知母皂苷 B-II 计算应不低于 4 000。梯度洗脱程序见表 2。

表 2 梯度洗脱程序

Tab 2 Gradient elution program

时间/min	流速/mL·min ⁻¹	A/%	B/%
0	0.8	0	100
10	0.8	30	70
35	0.8	60	40
45	0.8	100	0

2.2 对照品溶液制备 分别精密称取知母皂苷 E_I、知母皂苷 B-II、知母皂苷 B、知母皂苷 A III 标准品 12.02, 10.00, 12.80, 10.20 mg, 以水溶解, 定容于 10 mL 量瓶中, 摇匀, 配制成 1.202, 1.000, 1.280, 1.020 g·L⁻¹ 的对照品溶液。

2.3 供试品溶液制备 各商品知母药材样品, 60 °C 烘干, 粉碎, 过 10 目筛, 分别精密称取 10 g, 以 5 倍量 30% 乙醇浸 24 h, 渗漉, 收集 24 倍量渗漉液, 浓缩, 定容至 100 mL, 取 1 mL, 稀释并定容于 25 mL 量瓶中, 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 滤液为供试品溶液。

2.4 标准曲线制备 精密吸取知母皂苷 E_I 对照品溶液 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0 mL 至 10 mL 量瓶中, 加水至刻度, 摇匀, 进样 20 μL, 以峰面积的常用对数为纵坐标, 以浓度的常用对数为横坐标, 线性回归, 回归方程见表 3。

精密吸取知母皂苷 B-II 对照品溶液 0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 2.5 mL 至 5 mL 量瓶中, 加水至刻度, 摇匀, 进样 20 μL, 以峰面积的常用对数为纵坐标, 以浓度的常用对数为横坐标, 线性回归, 回归方程见表 3。

精密吸取知母皂苷 B 对照品溶液 0.1, 0.3, 0.6, 0.8, 1.0 mL 至 10 mL 量瓶中, 加水至刻度, 摇匀, 进样 20 μL, 以峰面积的常用对数为纵坐标, 以浓度的常用对数为横坐标, 线性回归, 回归方程见表 3。

精密吸取知母皂苷 A III 对照品溶液 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0 mL 至 10 mL 量瓶中, 加水至刻度, 摇匀, 进样 20 μL, 以峰面积的常用对数为纵坐标, 以浓度的常用对数为横坐标, 线性回归, 回归方程见表 3。

表 3 4 种知母皂苷的线性方程, 相关系数与线性范围

Tab 3 Linear equation, correlative coefficient and linear range of saponins

对照品	线性方程	r	线性范围/ng
知母皂苷 E _I	Y = 1.168 9X + 3.969 0	0.999 2	120.20~1 202.00
知母皂苷 B-II	Y = 1.499 8X + 3.109 3	0.999 7	400.00~1 000.00
知母皂苷 B	Y = 1.288 9X + 3.700 6	0.999 0	256.00~2 560.00
知母皂苷 A III	Y = 1.002 6X + 3.583 1	0.997 5	102.00~2 040.00

2.5 稳定性试验 取知母皂苷 E_I、知母皂苷 B-II、知母皂苷 B、知母皂苷 A III 对照品混合溶液, 于配

制后的 0, 4, 8, 12, 24, 48 h 测定, 其峰面积积分值的 RSD 分别为 1.76%, 1.32%, 1.51%, 1.48%, 结果表明在 48 h 内稳定。

2.6 精密度试验 取同一份知母供试品溶液连续重复进样 3 次, 测定峰面积积分值, 计算知母皂苷 E_I、知母皂苷 B-II、知母皂苷 B、知母皂苷 A III 日内精密度的 RSD 分别为 2.01%, 1.22%, 1.31%, 1.68%。另取同一份知母供试品溶液每日进样 1 次, 连续重复 3 d, 测定峰面积积分值, 计算知母皂苷 E_I、知母皂苷 B-II、知母皂苷 B、知母皂苷 A III 日间精密度的 RSD 分别为 1.73%, 1.34%, 1.90%, 2.11%。

2.7 重复性实验 取同一批样品精密称取 5 份, 按样品测定方法进行 5 次平行试验, 测得值 RSD (n = 5) 分别为知母皂苷 E_I: 1.06%; 知母皂苷 B-II: 2.64%; 知母皂苷 B: 1.58%; 知母皂苷 A III: 2.71%。

2.8 回收率试验 取已知含量的知母药材样品约 1 g 精密称定, 定量加入知母皂苷 E_I、知母皂苷 B-II、知母皂苷 B、知母皂苷 A III 对照品, 按前述方法操作及测定, 平均回收率及 RSD (n = 3) 为: 知母皂苷 E_I: 100.31%, RSD: 1.93%; 知母皂苷 B-II: 99.22%, RSD: 1.72%; 知母皂苷 B: 101.80%, RSD: 2.04%; 知母皂苷 A III: 101.54%, RSD: 1.76%。

2.9 测定法 分别吸取对照品及各供试品溶液 20 μL 注入液相色谱仪, 将峰面积及浓度均取常用对数后用外标法计算, 求出供试品浓度的常用对数, 再换算供试品的含量, 色谱图见图 1、图 2, 结果见表 4。

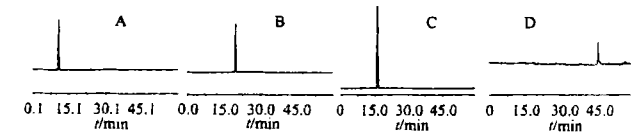


图 1 高效液相色谱图
A. 知母皂苷 E_I; B. 知母皂苷 B-II; C. 知母皂苷 B; D. 知母皂苷 A III
Fig 1 HPLC chromatogram
A. saponins E_I; B. saponins B-II; C. saponins B; D. saponins A III

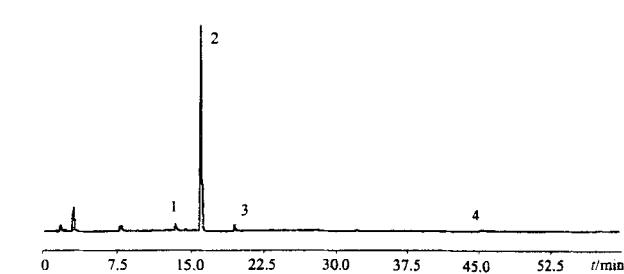


图 2 供试品 HPLC 图谱
1- 知母皂苷 E_I; 2- 知母皂苷 B-II; 3- 知母皂苷 B; 4- 知母皂苷 A III
Fig 2 HPLC chromatogram of samples
1- Saponins E_I; 2- Saponins B-II; 3- Saponins B; 4- Saponins A III

表 4 各地商品知母药材样品测定结果(%)

Tab 4 The contents of samples(%)

样品	知母皂苷 E ₁	知母皂苷 B _{II}	知母皂苷 B	知母皂苷 A _{III}	4 种皂苷之和
1	0.826 5	3.904 0	1.104 8	0.250 9	6.086 2
2	0.858 5	4.434 3	0.500 3	0.212 5	6.005 6
3	0.778 9	4.247 1	0.474 2	0.231 6	5.731 8
4	0.655 3	3.768 0	0.529 9	0.232 2	5.185 4
5	0.837 2	4.428 8	0.485 4	0.207 2	5.958 6
6	0.717 7	3.892 6	0.577 9	0.219 3	5.407 5
7	0.629 3	3.571 2	0.532 2	0.196 8	4.929 5
8	0.724 8	3.585 1	0.497 8	0.249 1	5.056 8
9	0.720 1	4.133 0	0.821 2	0.223 0	5.897 3
10	0.851 8	4.394 7	0.803 9	0.235 0	6.285 4
11	0.833 2	4.061 2	0.821 5	0.217 1	5.933 0
12	0.785 3	3.996 1	0.942 9	0.275 6	5.999 9
13	0.642 2	2.861 1	0.702 1	0.244 8	4.450 2
14	0.739 7	3.353 6	1.002 5	0.232 3	5.328 1
15	0.774 1	3.714 4	0.970 3	0.222 9	5.681 7
16	0.900 4	3.984 9	0.882 1	0.243 8	6.011 2
17	0.732 2	3.875 7	0.964 3	0.244 1	5.816 3
18	0.486 7	3.555 9	0.579 0	0.192 8	4.814 4

3 讨论

知母总皂苷为甾体皂苷类成分, 不含发色基团, 没有紫外吸收, 不适用紫外检测器。而蒸发光散射检测器(evaportive light scattering detector, ELSD) 是一种质量型通用检测器。其最大的优越性在于能检测皂苷元等不含发色团的化合物, 其响应值与被测物质的官能团和光学性质无关, 并具有以下显著优点: (1) 灵敏度高, 能排除流动相的干扰; (2) 不受温度变化的影响。也就消除了流动相因温度波动而产生的误差; (3) 可进行梯度洗脱^[5~7]。将其用于知母的检测可充分体现其优越性。检测结果表明, 其灵敏度与稳定性均能满足要求。

测定结果表明, 知母皂苷 B_{II} 是知母药材中的主要有效成分, 在 4 种皂苷中含量最高, 知母总皂苷的含量高低由知母皂苷 B_{II} 的含量决定; 收集的各地样品中皂苷含量分别为知母皂苷 E₁ 0.486 7%~

0.900 4%, 知母皂苷 B_{II} 2.861 1%~ 4.434 3%, 知母皂苷 B 0.474 2%~ 1.104 8%, 知母皂苷 A_{III} 0.192 8%~ 0.275 6%, 知母总皂苷含量在 4.450 %2~ 6.285 4% 范围内。安徽亳州、山东烟台、山东济宁、河南郑州、海南海口等地的药材中含量相对较高; 吉林长春、浙江温州、河南新乡药材中含量相对较低, 各地市场流通商品药材中未见伪品。由结果推断, 各地商品药材的品质优劣与地域无相关性, 无论哪个流通地区, 商品药材品质都有可能优或劣。且市售药材经多方转手, 环境、气候、土壤条件等产地因素及采收时间、贮存时间等不明确, 而这些均是影响药材品质的重要因素, 将直接影响临床用药的有效性和安全性。商品知母药材的品质有待规范, 产地、采收时间、贮存时间等因素对知母药材中皂苷类成分含量的影响有待进一步考察。

参考文献:

[1] 杨丽蓉. 知母的化学成分及药理作用研究进展[J]. 国外医学中医中药分册, 2002, 24(4): 207.
[2] 边际, 徐绥绪. 知母化学及药理研究进展[J]. 沈阳药学院学报, 1993, 10(2): 141.
[3] 孙有略, 王强. 薄层扫描法测定知母中知母皂甙 A_{III} 的含量[J]. 中国药科大学学报, 1990, 21(6): 369.
[4] 李会军, 李萍. 高效液相色谱法蒸发光散射检测器测定酸枣仁中酸枣仁皂苷 A 及 B 的含量[J]. 药物分析杂志, 2000, 20(2): 82.
[5] 沈岚, 朱汭平, 宋崎, 等. RP-HPLC-ELSD 法测定知母药材及含知母制剂中菝葜皂苷元的含量[J]. 中草药, 2001, 32(10): 889.
[6] 冯埃生, 邹汉法, 汪海林, 等. 影响高效液相色谱 挥发激光散射检测器检测性能基本因素的考察[J]. 药物分析杂志, 1996, 16(6): 414.
[7] 邓海根, 曹雨震. 高效液相色谱仪的通用型质量检测器—蒸发光散射检测器(ELSD) [J]. 药物分析杂志, 1994, 14(3): 612.

[收稿日期] 2005-10-19

异莲心碱对牵张性心律失常的作用

陈默思¹, 贾麟¹, 费宇杰¹, 马嵘¹, 杨莉², 王嘉陵¹ (1. 华中科技大学同济医学院药理学系, 湖北 武汉 430030; 2. 湖北中医学院生理学教研室, 湖北 武汉 430061)

[摘要] 目的: 研究异莲心碱(isoliensinine, IL) 对牵张性心律失常的拮抗效应。方法: 采用离体心脏心外膜心电图和在体心脏单相动作电位记录技术, 观察膨胀大鼠左心室腔和结扎豚鼠升主动脉引起的心律失常、单相动作电位时程缩短和触发活动变化。结果: IL(1, 2.5, 5 μmol·L⁻¹)能剂量依赖性地缩短膨胀引起的牵张性心律失常持续时间, 从对照组的(2.18±0.28) s 减少到(1.12±0.18) s, (0.75±0.14) s 和 (0.57±0.15) s。在麻醉豚鼠, 静脉注射 IL 2.5 mg·kg⁻¹能够显著对抗结扎主动脉引起的 50% 和 90% 动作电位时程的缩短, 从对照组水平的(94±7) ms 和 (112±8) ms 延长至(114±8) ms 和 (128±8) ms; 可减少触发活动的发生率, 从对照组的(28.6±8.1)% 减少到(6.5±4.6)%。结论: IL 具有拮抗牵张性心律失常作用, 这种作用可能是通过阻断牵张活化的离子通道实现。

[关键词] 异莲心碱; 牵张性心律失常; 动作电位

[基金项目] 华中科技大学科学基金支助项目(编号: 31510026) [作者简介] 陈默思, 男, 2001 级临床医学七年制学生, 电话: 027-83691697