

HPLC-ELSD测定知母中知母皂苷 BII 的含量

沙东旭¹, 刘兆妍¹, 张满来¹, 宋少江²

(1. 辽宁省食品药品检验所, 沈阳 110023 2. 沈阳药科大学, 沈阳 110016)

摘要 目的: 采用 HPLC-ELSD 法测定知母中知母皂苷 BII 的含量, 为质量标准的建立提供数据。方法: 采用 Agilent TC-C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 以乙腈-水 (25:75) 为流动相, 流速 0.8 mL·min⁻¹, 漂移管温度为 105 ℃, 载气流速为 3.0 L·min⁻¹。结果: 知母皂苷 BII 进样量在 0.785~19.6 μg 范围内呈良好线性关系; 在药材中的平均回收率 ($n=6$) 为 103.1%, RSD 为 1.0%。不同来源知母药材和饮片 (各 10 批) 中知母皂苷 BII 的含量在 3.84%~9.91% 范围内。结论: 本方法简便、准确, 无干扰, 可用于知母中知母皂苷 BII 的含量测定。

关键词: 知母; 知母皂苷 BII; HPLC-ELSD

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2009)12-2106-03

HPLC-ELSD determination of timosaponin BII in *Anemarrhena asphodeloides* Bge.

SHA Dong-xu¹, LIU Zhao-yan¹, ZHANG Man-lai¹, SONG Shao-jiang²

(1. Liaoning Institute for Food and Drug Control Shenyang 110023, China 2. Shenyang Pharmaceutical University Shenyang 110016, China)

Abstract Objective To establish the quantitative method for timosaponin BII in *Anemarrhena asphodeloides* Bge by HPLC-ELSD. **Method** The column used was a packed with 5 μm stationary phase Agilent TC-C₁₈ (250 mm × 4.6 mm). The mobile phase consisted of acetonitrile-water (25:75) at a flow rate of 0.8 mL·min⁻¹; The temperature of drift tube was 105 ℃, and the nebulizer nitrogen flow rate was 3.0 L·min⁻¹. **Result** The linear range of the component was 0.785-19.6 μg. The average recovery ($n=6$) of timosaponin BII in crude material was 103.1% with RSD of 1.0%. The contents of timosaponin BII in crude form and slices of *Anemarrhena asphodeloides* from different sources were 3.84%-9.91%. **Conclusion** The method is reliable, simple and precise, and it can be used for the determination of *Anemarrhena asphodeloides* Bge.

Key words *Anemarrhena asphodeloides* Bge; timosaponin BII; HPLC-ELSD

知母 (*Anemarrhena asphodeloides* Bge) 为百合科植物知母的干燥根茎, 始载于《神农本草经》, 具有清热泻火、生津润燥的功效。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。现收载于中国药典 2005 年版第一部^[1]。知母的化学成分主要为甾体皂苷、双苯吡酮类、木脂素类、多糖类等, 活性成分主要是甾体皂苷^[2], 如知母皂苷 AIII (timosaponin AIII)、BII (timosaponin BII)、芒果苷 (mangiferin) 等。近年来国内外学者对知母皂苷及其苷元进行了多项药理研究, 提示知母具有较好的抗衰老作用。同时, 现代药理研究证明, 血小板聚集和血栓形成是缺血性心脑血管损伤的重要原因, 而知母皂苷 BII、AIII 均能抑制血小板聚集^[3,4]。目前知

母的含量测定方法较多, 一般都是以菝葜皂苷元为对照品, 采用薄层色谱扫描法^[5]、HPLC-RI 法^[6]和 HPLC-ELSD 法^[1,7,8] 测定知母中总皂苷的含量。本实验选取知母皂苷 BII 为指标进行知母含量测定方法的研究, 经过方法学研究, 建立了采用 HPLC-ELSD 测定知母中知母皂苷 BII 含量的方法。

1 仪器和试剂

Waters 高效液相色谱仪 (515 双泵, 美国 Waters 公司); Alltech 2000 型蒸发光散射检测器 (美国奥泰公司); 717 自动进样器 (美国 Waters 公司); Empower 2 色谱工作站 (美国 Waters 公司)。

不同来源知母药经辽宁省食品药品检验所王维宁副主任药师鉴定为百合科植物知母 *Anemarrhena*

asphodebides Bge 的干燥根茎。知母皂苷 BII 对照品 (自制, 经红外、紫外、核磁共振和质谱鉴定结构; 纯度 96.96%)。甲醇为色谱纯, 其他试剂均为分析纯; 水为超纯水。

2 溶液的制备

2.1 对照品溶液 精密称取知母皂苷 BII 对照品适量, 加 30% 乙腈溶解制成 $0.4 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液, 即得。

2.2 供试品溶液 取样品粉末 (过 3 号筛) 约 0.2 g [同时另取样品粉末测定水分 (中国药典 2005 年版一部附录 IX H 第一法)], 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加 30% 乙腈 25 mL, 称定质量, 超声处理 (功率 250 W, 频率 30 kHz) 30 min, 放冷, 再称定质量, 用 30% 乙腈补足减失的质量, 摇匀, 离心 ($10000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 10 min), 取上清液即得。

3 色谱条件

采用 Agilent TC - C_{18} 分析柱 ($4.6 \text{ mm} \times 250 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$); 流动相为乙腈 - 水 (25: 75); 流速 $0.8 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, ELSD 检测器漂移管温度 105°C , 载气流速 $3.0 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$, 柱温为室温 (25°C)。对照品溶液进样 10 和 20 μL , 供试品溶液进样 5~15 μL (以使供试品溶液中主成分的峰面积落在 2 个对照品溶液峰面积之间)。按以上色谱条件得到对照品、知母药材和饮片的色谱分离图, 见图 1。

4 方法与结果

4.1 线性关系考察 精密称取知母皂苷 BII 对照品 10.12 mg 置 25 mL 量瓶中, 加 30% 乙腈溶解并稀释至刻度, 摇匀, 浓度为 $0.3925 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。分别精密吸取 2.5 10 20 30 50 μL , 依次注入液相色谱仪中, 按上述色谱条件测定峰面积, 以进样量的自然对数为横坐标, 色谱峰面积的自然对数为纵坐标, 绘制标准曲线, 回归方程为:

$$\ln Y = 1.664 \ln X + 4.967 \quad r = 0.9999$$

结果表明知母皂苷 BII 对照品进样量在 0.785~19.6 μg 范围内其对数值与峰面积的对数值呈良好的线性关系。

4.2 稳定性试验 取供试品溶液, 分别于制备后 0 2 4 8 12 20 h 进样 10 μL 进行测定, 计算知母皂苷 BII 色谱峰峰面积的 RSD 为 1.0%。

4.3 精密度试验 精密吸取供试品溶液 10 μL , 连续进样 6 次, 测定, 计算知母皂苷 BII 色谱峰峰面积的 RSD 为 1.3%。

4.4 重复性试验 取同一批次的知母药材 6 份, 精密称定, 按“2.2”项下方法制备供试品溶液, 进样 15

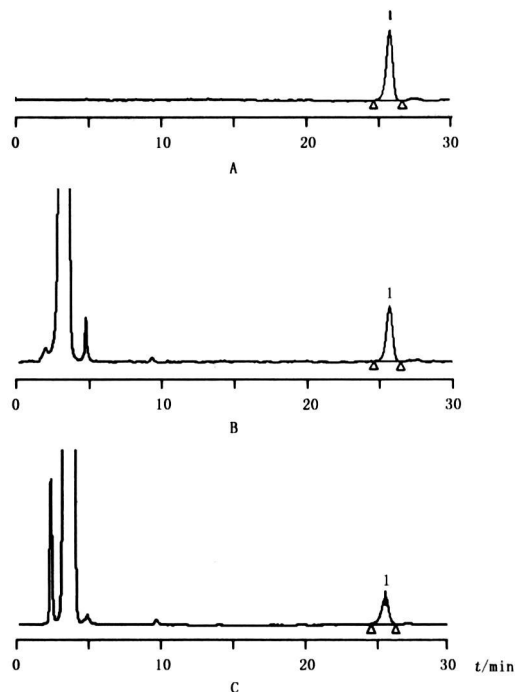


图 1 对照品 (A)、内蒙古赤峰知母药材 (B) 及内蒙古赤峰饮片 (C) 高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms of reference substance (A), crude drug from Chifeng NeiMenggol (B), and slice from Chifeng NeiMenggol (C)
1. 知母皂苷 BII (timosaponin BII)

μL , 药材中知母皂苷 BII 平均含量 ($n = 6$) 为 5.15%, RSD 为 2.1%。

4.5 回收率试验 取本品粉末 (含量 5.15%) 6 份, 每份约 0.1 g 精密称定, 分别精密加 30% 乙腈 10 mL, 再精密加入知母皂苷 BII 对照品溶液 ($0.270 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 15 mL, 余按“2.2”项下方法制备供试品溶液, 进样 15 μL , 依法测定。计算知母皂苷 BII 平均回收率 ($n = 6$) 为 103.1%, RSD 为 1.0%。

4.6 样品测定 分别精密吸取对照品溶液 10 20 μL 与供试品溶液 5~15 μL , 注入液相色谱仪, 依上述色谱条件测定, 外标两点法计算知母皂苷 BII 的含量, 结果见表 1。

5 讨论

5.1 检测器参数的优化 根据流动相种类和比例, 分别在 105°C 、 110°C 和 115°C 的漂移管温度及在 $2.8 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$ 、 $3.0 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$ 和 $3.2 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$ 的载气流速条件下观察知母皂苷 BII 对照品的信号强度, 最后确定漂移管温度 105°C , 载气流速 $3.0 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$ 为最优参数。

5.2 提取溶剂的选择 知母皂苷 BII 为呋甾皂苷, 在无水甲醇中加热回流, 其 22 位碳上相连的羟基可发生甲醚化, 结构发生转变^[9]; 并且另有文献报道

表 1 样品含量测定结果 (n= 3)

Tab 1 Results of samples detem ination

饮片 药材 (slices /crude drug)	来源 (sources)	知母皂苷 BII 含	RSD
		量 (contents of timosaponin BII) %	
饮片 (slices)	安徽亳州 (Bezhou Anhui)	5. 13	0. 36
	河北易县 (Yixian Hebei)	6. 16	1. 09
	河北石家庄 (Shijiazhuang Hebei)	7. 38	0. 16
	内蒙古赤峰 (Chifeng NeiMonggol)	6. 69	1. 16
	河北安国 (Anguo Hebei)	4. 04	2. 55
	河北安国 (Anguo Hebei)	7. 68	1. 09
	安徽亳州 (Bezhou Anhui)	4. 86	1. 26
	安徽亳州 (Bezhou Anhui)	7. 01	0. 72
	河北安国 (Anguo Hebei)	6. 39	0. 84
	安徽亳州 (Bezhou Anhui)	6. 83	1. 27
药材 (crude drug)	河北易县 (Yixian Hebei)	6. 91	1. 46
	山西太原 (Taiyuan Shanxi)	9. 92	0. 33
	辽宁锦州 (Jinzhou Liaoning)	9. 89	0. 36
	河北石家庄 (Shijiazhuang Hebei)	5. 14	2. 61
	河北安国 (Anguo Hebei)	6. 16	1. 10
	河北石家庄 (Shijiazhuang Hebei)	4. 33	0. 31
	安徽亳州 (Bezhou Anhui)	3. 85	1. 20
	山西太原 (Taiyuan Shanxi)	4. 46	1. 03
	内蒙古赤峰 (Chifeng NeiMonggol)	8. 54	1. 55
	辽宁桓仁 (Huanren Liaoning)	9. 74	0. 65
	河北安国 (Anguo Hebei)	6. 47	0. 69

若采用甲醇溶解样品, 样品也可以产生衍生化^[10], 因此实验中分别用 30%、50% 的乙腈、乙醇、丙酮和水饱和正丁醇作为提取溶剂, 溶剂用量分别为 25 mL和 50 mL; 分别采取超声或回流 15 min、30 min和 45 min的处理方法, 来考察从知母药材中提取知母皂苷 BII的最佳方案。结果以 30% 乙腈和 50% 丙酮为溶剂, 超声处理 30 min的方法所得含量最高。但是, 由于丙酮具有强烈的刺激性, 因此选用

30% 乙腈为提取溶剂。

参考文献

1 ChP(中国药典). 2005. VolII (一部): 148

2 YANG Li- rong(杨丽蓉). Research progress in chemical ingredient and pharmacobgical function of *Anemarrhena asphodebides*(知母的化学成分及药理作用研究进展). *J Foreign Med Sci(Tradit Chin Med Sect)*(国外医学 中医中药分册), 2002, 24(4): 207

3 Zhang JY, Meng ZY, ZhangMY, *et al* Effect of six steroidal saponins isolated from *Anemarrhena* rhizome on platelet aggregation and hemolysis in human blood *Clin Chim Acta*, 1999, 289(1- 2): 79

4 Knana N, Zhang JY, Meng ZY, *et al* Effect of timosaponin in E1 and E2 on superoxide generation induced by various stimuli in human neutrophils and on platelet aggregation in human blood *Clin Chim Acta*, 2000, 295(1- 2): 129

5 ChP(中国药典). 2000. VolII (一部): 170

6 WANG Tian- yong(王天勇), YANG Wen- yuan(杨文远). Separation and detem ination of timosaponin BII in *Anemarrhena asphodebides* by RP- HPLC(反相高效液相色谱法分离测定知母中知母皂苷 BII). *J Chin Med Mater*(中药材), 1996, 19(9): 460

7 SHEN Lan(沈岚), ZHU Hu- ping(朱沪平), SONG Qi(宋崎), *et al* Detem ination oftimosaponin BII in crude *Anemarrhena asphaleloides* and its preparation by RP- HPLC- ELSD (RP- HPLC- ELSD 测定知母药材及含知母制剂中知母皂苷 BII 的含量). *Chin TraditH erb Drugs*(中草药), 2001, 32(10): 889

8 SHA Dong- xu(沙东旭), CHEN Gui- fan(陈桂范), ZHANG Man- li(张满来). HPLC- ELSD Detem ination of sarsasapogenin in *Anemarrhena asphaleloides* Bge (高效液相色谱- 蒸发光散射检测法测定知母中菝葜皂苷元的含量). *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志), 2005 25(8): 952

9 Nagumo Seiji Kishi Shinichi Inoue Takao *et al* Saponins of *Anemarrhena* rhizome *Yakugaku Zasshi*, 1991, 111(6): 306

10 YU Jian- dong(于健东), MA Ling- yun(马玲云), MA Shuang- cheng(马双成), *et al* Identification and detem ination of *Anemarrhena*saponin BII in Rhizoma *Anemarrhena* by TLC and HPLC(知母中知母皂苷 BII 的 TLC 鉴别及 HPLC 法含量测定). *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志), 2005 25(12): 1436

(本文于 2008 年 12 月 27 日收到)