

HILIC-HPLC 测续断药材中多种皂苷含量

刘京晶^{1,2}, 郭宝林^{1*}, 黄文华¹, 肖培根¹, 宋海波¹, 王川易^{1,3}

(1. 中国医学科学院 药用植物研究所, 北京 100193;

2. 浙江农林大学 林业与生物技术学院 亚热带森林培育国家重点实验室培育基地, 浙江 临安 311300;

3. 大连市药品检验所, 辽宁 大连 116021)

【摘要】 目的: 建立同时测定续断药材中3种主要皂苷(川续断皂苷VI、X和XII)含量的HILIC-HPLC方法, 对不同产地、商品等级、药材部位的药材质量进行分析。方法: Venusil HILIC 色谱柱(4.6 mm × 250 mm 5 μm); 流动相为水-乙腈线性梯度洗脱; 流速1 mL · min⁻¹; 柱温25 °C; 检测波长203 nm。结果: 建立同时测定续断药材中3种皂苷含量的方法。不同产地药材川续断皂苷VI、X和XII的含量范围分别为0.77% ~ 14.31%、0.39% ~ 3.19%、0.41% ~ 1.49%, 云南、四川含量较高, 湖北、贵州含量较低; 商品等级低的药材含量较高; 芦头、残茎和须根含量低于主根。结论: 本方法操作简便、结果准确, 可用于续断药材中皂苷含量的测定, 为其质量评价提供了参考。

【关键词】 亲水作用色谱-高效液相色谱法(HILIC-HPLC); 川续断; 川续断皂苷VI; 川续断皂苷X; 川续断皂苷XII; 含量测定

续断 *Dipsaci Radix* 为川续断科植物川续断 *Dipsacus asperoides* C. Y. Cheng et T. M. Ai 的干燥根, 具有治疗腰膝酸软、风湿痹痛、崩漏、胎漏、跌扑损伤的功效^[1]。始载于《神农本草经》, 历代本草多有记载, 但品种共涉及唇形科、菊科的数十种植物, 明代《滇南本草》首次记载为川续断科植物, 《本草纲目》中描述的续断与现今药材相符^[2]。续断主产于四川、重庆、湖北、云南、贵州等省。本草所载续断产区为川滇一带(《本草纲目》“川中来”、《植物名实图考》“滇蜀密布”), 有研究报道湖北鄂西地区为主产区, 尤以恩施州质量优^[3], 其中五峰县、鹤峰县所产“五鹤续断”有近百年的名称和贸易历史^[4-5]; 也有作者提出四川攀枝花地区和西昌地区是现代主产区, 质量上乘^[6]。从2000年版药典开始规定了续断药材的含量标准, 川续断皂苷VI的含量不得低于2.0%。有研究报道, 不同产地的川续断含量为0.5% ~ 10%, 差异极大, 云南产的药材通常含量非常高, 其次是四川, 一般高于湖北和重庆, 贵州最次^[7-11]。续断中已经报道的三萜皂苷类成分有27

个, 尚有环烯醚萜苷及酚酸等化学成分, 其中总皂苷是促进骨伤愈合和抗骨质疏松作用的活性成分^[11-13]。本研究组分离并鉴定了8个皂苷类成分, 经体外活性研究, 发现均具有促进成骨样细胞碱性磷酸酶(ALP)活性, 且川续断皂苷XII和X在浓度为4 μmol · L⁻¹时对大鼠成骨肉瘤细胞(成骨样细胞)UMR106具有显著的增殖作用。本文测定其中川续断皂苷VI、X和XII在续断药材的含量, 以建立更合理的续断药材质量评价与控制指标。

亲水作用色谱(HILIC)近年来因其对极性化合物具有较好的分离而迅速发展。HILIC固定相表面是与水有很好的亲和性的强极性基团, 如氨基、羟基、酰胺基、两性离子等, 从而使化合物的保留时间随化合物的极性增强而增加(类似正相色谱行为)。HILIC模式的选择性与目前HPLC常用的反相色谱柱C₁₈填料完全不同, 在一定程度上弥补了RP-HPLC的不足^[14-18]。前期研究尝试了多种品牌不同粒径的C₁₈色谱柱及苯基色谱柱, 均不能有效分离川续断皂苷X和XII, 选择了HILIC-HPLC方法。

1 材料

WatersTM 高效液相色谱仪(996 DAD 检测器, 2690 泵, Empower 色谱工作站); KQ-250DB 超声清洗器(昆山市超声仪器有限公司); XS105 型电子分析天平(METTLER TOLEDO 公司)。

川续断皂苷VI、X、XII对照品由本实验室自制,

• 2367 •

【稿件编号】 20101209008

【通信作者】 * 郭宝林, 研究员, 博士生导师, 主要从事中药资源研究与开发, Tel: (010) 62895049, E-mail: guobaolin010@163.com

【作者简介】 刘京晶, 博士研究生, 主要从事中药资源化学和质量管理研究, Tel: (010) 62895049, E-mail: jing_jing_6@163.com

通过解析其 MS, NMR 数据确定结构, 与文献^[19-21] 比对一致, 化学结构式见图 1, HPLC 面积归一化法测定其纯度大于 96.8%。乙腈(色谱纯, Fisher), 水(纯净水, 娃哈哈), 95% 乙醇(分析纯, 北京化工厂)。

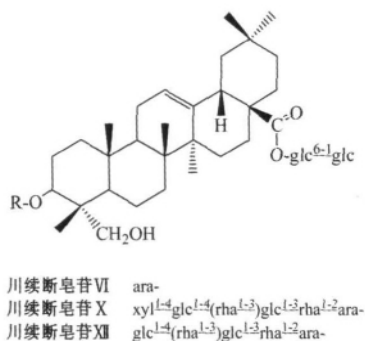
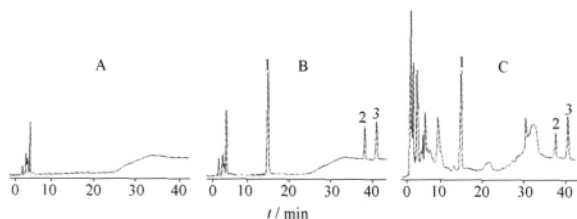


图1 川续断皂苷 VI, X, XII 的化学结构式

续断药材购自全国药材市场及产地, 经郭宝林教授鉴定为川续断 *D. asperoides* 的干燥根。含量测定前均置 40 °C 烘箱中烘干。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Venusil HILIC 色谱柱(4.6 mm × 250 mm 5 μm); 流动相水(A)-乙腈(B), 线性梯度洗脱程序 0 ~ 18 min, 85% ~ 84% B, 18 ~ 27 min, 84% ~ 74% B, 27 ~ 40 min, 74% ~ 74% B; 柱温 25 °C; 流速 1 mL · min⁻¹; 检测波长 203 nm; 进样量 10 μL。在此条件下, 空白溶剂、对照品和样品 HPLC 图见图 2, 3 种成分的理论塔板数均不低于 5 000。



A. 空白溶剂; B. 对照品; C. 供试品; 1. 川续断皂苷 VI;
2. 川续断皂苷 XII; 3. 川续断皂苷 X。

图2 川续断药材 HPLC 图

2.2 对照品溶液的制备 精密称取川续断皂苷 VI, XII, X 对照品适量, 加 75% 乙醇配成质量浓度分别为 0.234 0, 0.152 0 和 0.152 0 g · L⁻¹ 的混合溶液, 即得。

2.3 供试品溶液的制备 取 0.3 g 续断粉末(过 60 目筛), 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 75% 乙醇 15 mL, 称定质量, 室温浸泡 30 min 后超声提取 30 min(初始温度 35 °C, 功率 250 W, 频率 40 KHz), 放冷称定, 补足减失的质量, 摇匀, 经 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 取续滤液, 即得。

2.4 线性关系考察 精密吸取 2.2 项下对照品溶液 1, 5, 10, 20, 40, 100 μL, 按上述色谱条件进样分析。以进样量(X)为横坐标, 峰面积积分值(Y)为纵坐标, 制备标准曲线, 得川续断皂苷 VI 回归方程为 $Y = 259\ 677X - 69\ 393$ ($r = 0.999\ 9$, $n = 6$), 川续断皂苷 XII 为 $Y = 159\ 137X - 32\ 477$ ($r = 0.999\ 6$, $n = 6$), 川续断皂苷 X 为 $Y = 126\ 379X - 25\ 662$ ($r = 0.999\ 4$, $n = 6$); 线性范围分别为 0.234 ~ 23.40, 0.152 ~ 15.20, 0.152 ~ 15.20 μg。定量限依次为 0.018, 0.027, 0.043 μg。

2.5 精密度的试验 精密吸取同一对照品溶液 10 μL, 按上述色谱条件重复进样 5 次。结果, 川续断皂苷 VI, XII, X 峰面积的 RSD 依次是 0.41%, 0.82%, 0.47%, 表明仪器精密度的良好。

2.6 稳定性试验 取同一样品, 按 2.3 项下方法制备供试品溶液, 分别于 0, 4, 8, 12, 22 h 精密吸取 10 μL 进行分析。结果, 川续断皂苷 VI, XII, X 峰面积的 RSD 依次是 2.7%, 0.40%, 3.9%, 表明供试品在 22 h 内稳定性良好。

2.7 重复性试验 精密称取同一批样品 6 份, 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。结果, 川续断皂苷 VI, XII, X 峰面积的 RSD 依次是 0.57%, 2.9%, 2.4%, 表明方法重复性良好。

2.8 加样回收率试验 取 0.150 g 已知含量的样品 9 份, 精密称定, 分别精密加入高、中、低 3 个剂量的川续断皂苷 VI, XII, X 对照品溶液, 按上述色谱条件测定。结果川续断皂苷 VI 回收率为 99.67%, RSD 3.1%; 川续断皂苷 XII 为 100.7%, RSD 4.8%; 川续断皂苷 X 为 99.8%, RSD 2.4%。

2.9 样品含量测定 精密称取续断粉末 0.3 g, 按 2.3 方法制备供试品溶液, 按 2.1 色谱条件测定, 进样量 10 μL; 测定结果高于线性范围的样品溶液进样量减半为 5 μL。含量结果见表 1; 对湖北恩施收集到的不同商品等级的样品分别考察, 结果见表 2; 对根类药材中混入的地上部分——芦头和残茎分别进行测定, 结果见表 3。



表1 全国主产地续断药材质量分数 %

产地(或收购地)	川续断 皂苷 VI	川续断 皂苷 XII	川续断 皂苷 X
云南 丽江	14.31	0.62	1.35
云南 大理	13.53	0.61	0.61
云南 昆明菊花园药市	9.61	1.48	3.18
云南 大理	6.59	0.57	1.44
四川 盐源	12.28	1.11	0.58
四川 成都荷花池药市	3.59	1.49	3.19
湖北 襄樊	2.96	0.92	2.20
湖北 恩施	2.23	0.89	1.19
湖北 鹤峰	1.30	1.04	0.47
贵州 龙里(种植)	1.59	0.75	0.84
贵州 毕节	0.77	0.41	0.39

表2 续断(湖北恩施)不同商品等级质量分数 %

等级	川续断 皂苷 VI	川续断 皂苷 XII	川续断 皂苷 X
未分等根	2.23	0.89	1.19
细支根和须根	1.30	0.59	1.73
柴心次品	0.74	1.01	0.81
一二等	0.99	0.69	0.61
三等	2.00	0.71	1.06

表3 续断不同部位质量分数 %

产地 (或收购地)	部位	川续断 皂苷 VI	川续断 皂苷 XII	川续断 皂苷 X
湖北恩施	残茎	0.06	0.01	0.02
	芦头	0.31	0.54	0.07
	主根	2.23	0.89	1.19
云南菊花园药市	芦头	1.80	0.19	0.14
	主根	9.61	1.48	3.18
湖北襄樊	芦头	0.69	0.26	0.14
	主根	2.96	0.92	2.31
	须根	1.10	0.59	2.17

3 讨论

3.1 定量分析指标成分的选择 作者分离得到的8个三萜皂苷化合物中,经HPLC分析,川续断皂苷VI、X和XII为含量较高成分,其他成分含量很低,因此选择此3个成分作为含量测定成分。

3.2 色谱条件的选择 续断中皂苷类化合物紫外最大吸收波长小于190 nm(末端吸收),《中国药典》测定川续断皂苷VI设定为212 nm,本实验中仪器的信噪比在212 nm时略高于203 nm。但影响含量测定的“杂峰”主要为最大吸收波长是230~245 nm的环烯醚萜苷类化合物,在203 nm时其吸收强

度显著小于212 nm,考虑到人参皂苷等常选用203 nm进行定量,因此选定203 nm为检测波长有利于减少干扰使定量更准确。

由于川续断皂苷X和川续断皂苷XII在反相液相色谱时色谱峰完全重叠,本实验对色谱柱进行了重点考察。尝试了包括使用UPLC仪器的Acquity UP-LC BEH C₁₈柱(1.7 μm)在内的多种品牌多种粒径色谱柱Merck Hibar Lichrospher 100, Waters Sunfire, Kromasil, Venusil XDB, Ultimate AQ, Diamonsil(5, 3 μm)等,此外还试用了苯基柱Synergi Polar-RP,在不同比例乙腈-水(或酸水)及甲醇-水条件下,这2个化合物均没有分离趋势。最终使用填料为键合酰胺基团的Venusil HILIC色谱柱很好的将其分开。

流动相的选择: 样品在HILIC中的保留基于分配机制——亲水的固定相可以富集缓冲液中的水分子从而在固定相表面形成一个水层,亲水的溶质在这个水层和疏水洗脱液中进行分配;而甲醇具有强的氢键作用能力,可在固定相材料表面上与水竞争吸附从而干扰吸附水层的形成,严重缩短样品分子的保留时间^[15-16]。因此流动相使用乙腈-水,并且与C₁₈相反,运行梯度洗脱程序时水的比例不断升高,以洗脱大极性、强保留的化合物。

由于不同型号液相色谱仪泵工作原理存在差异,不同仪器死体积不同等原因,即使同一样品溶液采用同一色谱柱、相同流动相梯度条件在不同HPLC仪器上运行,待测化合物的保留时间会有差异,也可能受到杂峰的影响。本实验曾用3台不同型号Waters HPLC仪器对同一份样品(四川成都)进行分析,通过调整流动相比例1%~2%可使待测化合物色谱峰分离度和峰形良好,含量结果RSD小于5%,说明本方法中间精密度和耐用性较好。

3.3 样品处理方法的优化 考察了不同溶剂及提取方法对指标成分提取效率的影响。结果表明,75%乙醇提取率高于甲醇,50%乙醇或水;室温浸泡30 min后超声30 min的提取率高于回流1 h或直接超声;并且超声温度有很大影响,初始温度35℃的提取率高于20℃或50℃,结合回流1.5 h提取率略低于1 h的现象,提示皂苷类化合物可能在高温条件下稳定性差;浸泡后超声不同时间(30, 45, 60 min)无明显差异。

3.4 含量分析 不同产地续断药材中川续断皂苷VI含量差异和文献报道基本相符,即云南最高,四

川高低差异大,湖北、贵州含量较低;川续断皂苷X和XII在不同药材样品中的含量范围分别为0.39%~3.19%和0.41%~1.49%,应属于续断中的高含量成分,从结构上看,分别较川续断皂苷VI在苷元的3位上多5个或4个苷化糖,其含量高低与川续断皂苷VI含量对应关系不明显,建议作为续断的质量控制成分。

续断的商品等级按照主根粗细分级,级别低的细根各种皂苷的含量高于高等级;柴心药材含量很低,不做药用是合理的;药典规定续断药材为除去支根和须根的主根部位,但市场药材中带有芦头残茎、支根和须根的情况比较普遍,本研究发现,支根和须根、芦头和残茎的各皂苷含量均低于主根,因此应当在生产加工过程中去头(去芦头)去尾(去小支根和须根),保证用药部位正确。本研究样本尚少,上述结论有待于进一步证实。

[参考文献]

- [1] 中国药典. 一部[S]. 2010:309.
- [2] 王家葵,王一涛. 续断的本草考证[J]. 中药材,1991,14(5):44.
- [3] 冯耀南. 中药材商品规格质量鉴别[M]. 广州:暨南大学出版社,1995:181.
- [4] 张万福. 湖北“五鹤续断”的道地历史考证及开发前景[J]. 湖北民族学院学报:医学版,2002,19(3):24.
- [5] 张万福. 五鹤续断的道地历史考证[J]. 中国中药杂志,2003,28(11):1100.
- [6] 刘华宝. 道地药材川续断的产地考[J]. 攀枝花学院学报,2005,22(6):118.
- [7] 杨中林,何执静. 不同产地续断木通皂甙D含量比较[J]. 中药材,2000,23(2):68.
- [8] 谭洪根,林生. 高效液相色谱法测定续断药材中川续断皂苷VI的含量[J]. 中国中药杂志,2006,31(9):726.
- [9] 卫莹芳,刘永,谢达温,等. 不同产地续断的质量比较[J]. 华西药学杂志,2010,25(2):173.
- [10] 彭英,韦英杰,陈宁,等. HPLC-UV及ELSD法测定续断皂苷VI的比较研究[J]. 中成药,2010,32(2):267.
- [11] 吴春蕾,焦涛,张志峰. RP-HPLC法测定续断药材中的川续断皂苷[J]. 西南民族大学学报:自然科学版,2010,36(5):784.
- [12] 王蕊,邱明才. 单剂量补肾中药防治去卵巢大鼠骨质疏松的骨形态计量学研究[J]. 天津医药,1999,273:131.
- [13] Wong Ricky W K, Rabie A Bakr M, Hägg E Urban O. The effect of crude extract from *Dipsaci Radix* on bone in mice[J]. *Phytother Res* 2007,21(5):596.
- [14] 郭志谋,张秀莉,徐青,等. 亲水作用色谱固定相及其在中药分离中的应用[J]. 色谱,2009,27(5):675.
- [15] 王媛,顾惠新,路鑫,等. 以亲水作用色谱为核心的液相色谱联用技术及其应用研究[J]. 色谱,2008,26(6):649.
- [16] 姜洪宁,黄迪南,侯敢,等. 亲水作用液相色谱及其在蛋白质组学中的应用[J]. 生命的化学,2009,29(2):257.
- [17] 刘艳芳,刘艳明,董军,等. 中药物质基础的高效液相色谱分离分析方法研究[J]. 中国科学B辑:化学,2009,39(8):678.
- [18] Nováková Lucie, Vlčková Hana. A review of current trends and advances in modern bio-analytical methods: chromatography and sample preparation[J]. *Anal Chim Acta*,2009,656(1):8.
- [19] 张永文,薛智. 川续断的化学成分研究[J]. 药学报,1991,26(9):676.
- [20] 张永文,薛智. 川续断中皂甙XI,XII和XIII的结构研究[J]. 药学报,1993,28(5):358.
- [21] 张永文,薛智. 川续断中皂苷IX和X的结构研究[J]. 药学报,1992,27(12):912.

Determination of saponins in *Dipsaci Radix* by HILIC-HPLC

LIU Jingjing^{1,2}, GUO Baolin^{1*}, HUANG Wenhua¹, XIAO Peigen¹, SONG Haibo¹, WANG Chuanyi^{1,3}

(1. Chinese Academy of Medical Sciences Peking Union Medical College Institute of Medicinal
Plant Development, Beijing 100193, China;

2. A Nurturing Station for the State Key Laboratory of Subtropical Silviculture, Zhejiang Agricultural and
Forestry University, Lin'an 311300, China;

3. Dalian Institute for Drug Control, Dalian 116021, China)

[Abstract] **Objective:** To develop an HILIC-HPLC method for simultaneous analysis of three main active triterpenoid saponins including dipsacus asponin VI, dipsacus asponin X and dipsacus asponin XII. To evaluate the medical material from various habitats in China, different commercial grades or parts of plant. **Method:** The HPLC was conducted on Venusil HILIC column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) with acetonitrile and water as the mobile phase at 25 °C, which was in gradient elution. The flow rate was 1 mL · min⁻¹; and the detection wavelength was 203 nm. **Result:** The contents of dipsacus asponin VI, X and XII were 0.77%–4.31%, 0.39%–3.19% and 0.41%–4.49% respectively in different provinces of China, that were related to locations. The contents of saponins from Yunnan and Sichuan provinces were higher than those of Hubei and Guizhou. Thick roots, which were high-class products, contained less saponins than thin ones. In addition, the contents of stem, residual parts of stem and fibrous roots were fewer than main roots. **Conclusion:** This method is simple, sensitive and accurate. It could be used to determine the contents of dipsacus asponin VI, X, XII and evaluate the quality of dipsacus asperoides.

[Key words] Hydrophilic interaction chromatography (HILIC); HPLC; dipsacus asperoides; dipsacus asponin VI; dipsacus asponin X; dipsacus asponin XII; determination

doi: 10.4268/cjcm20111714

[责任编辑 丁广治]