

HPLC-CAD 法测定盐制前后知母中知母皂苷 B II 和菝葜皂苷元

吴莹^{1,2,3}, 高慧^{1,2,3*}, 宋泽璧^{1,2,3}

1. 辽宁中医药大学 药学院, 辽宁 大连 116600

2. 国家中医药管理局中药炮制原理解析重点实验室, 辽宁 大连 116600

3. 辽宁省中药炮制工程技术研究中心, 辽宁 大连 116600

摘要: 目的 利用 HPLC - 电雾式检测器 (charged aerosol detector, CAD) 联用技术建立知母中知母皂苷 B II 和菝葜皂苷元的测定方法, 并比较知母盐制前后两种成分的变化。方法 知母皂苷 B II 以乙腈 - 水 (25 : 75) 为流动相, 进样量为 10 μ L; 菝葜皂苷元以甲醇 - 水 (95 : 5) 为流动相, 进样量为 20 μ L; 其他色谱条件均采用 Thermo C₁₈ 柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m), 体积流量为 1 mL/min, 柱温为 30 $^{\circ}$ C; Corona 参数: 氮气压力为 241.3 kPa, Filter: High, Range: 200 pA。结果 知母皂苷 B II 在 0.305~4.880 μ g 线性关系良好, $r=0.999\ 4$, 平均回收率为 99.1%, RSD 值为 1.2%; 菝葜皂苷元在 0.490~7.840 μ g 线性关系良好, $r=0.999\ 1$, 平均回收率为 98.0%, RSD 值为 1.3%。知母中知母皂苷 B II 为 3.16%~5.92%, 盐制后为 4.15%~7.20%; 知母中菝葜皂苷元为 0.42%~1.39%, 盐制后为 0.52%~1.54%。结论 CAD 检测器具有较为平稳的基线和较高的灵敏度, 更加适用于知母皂苷类及含有较弱或无紫外吸收成分的测定, 知母盐制后知母皂苷 B II 和菝葜皂苷元的量均有所升高。
关键词: 知母; 盐知母; 知母皂苷 B II; 菝葜皂苷元; HPLC-CAD

中图分类号: R286.02

文献标志码: A

文章编号: 1674 - 5515(2014)07 - 0737 - 05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2014.07.009

Determination of timosaponin B II and sarsasapogenin in *Anemarrhenae Rhizoma* before and after processing with salt-water by HPLC-CAD

WU Ying^{1,2,3}, GAO Hui^{1,2,3}, SONG Ze-bi^{1,2,3}

1. College of Pharmacy, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China

2. Key Laboratory of Processing Theory Analysis of State Administration of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China

3. Engineering Technology Research Center of Traditional Chinese Medicine processing of Liaoning Province, Dalian 116600, China

Abstract: Objective To establish a method for the determination of timosaponin B II and sarsasapogenin in *Anemarrhenae Rhizoma* by HPLC with the charged aerosol detector (CAD), and to compare the contents of the two components in *Anemarrhenae Rhizoma* before and after processing with salt-water. **Methods** Analysis was performed on Thermo C₁₈ column (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m). Acetonitrile - water (25 : 75) was as the mobile phase for timosaponin B II with the injection volume of 10 μ L, and methanol - water (95 : 5) as the mobile phase for sarsasapogenin with injection volume of 20 μ L. The other chromatographic conditions were : flow rate of 1 mL/min and column temperature of 30 $^{\circ}$ C. The Corona parameters were as follows: nitrogen pressure was 241.3 kPa, high filter, and range of 200 pA. **Results** The linear range of timosaponin B II was 0.305 — 4.880 μ g ($r=0.999\ 4$), and the average recovery rate was 99.1% (RSD = 1.2%). The linear range of sarsasapogenin was 0.490 — 7.840 μ g ($r=0.999\ 1$), and the average recovery rate was 98% (RSD = 1.3%). The contents of timosaponin B II were obtained over 3.16% — 5.92% for *Anemarrhenae Rhizoma* and 4.15% — 7.20% after processing; The contents of sarsasapogenin were obtained over 0.42% — 1.39% for *Anemarrhenae Rhizoma* and 0.52% — 1.54% after processing. **Conclusion** CAD has some advantages in saponins detection of *Anemarrhenae Rhizoma* such as its steady baseline and good sensitivity. CAD is the most favorable detector for the determination of saponins or other constituents without UV absorption, and the contents of timosaponin B II and sarsasapogenin increase after processing.

Key words: *Anemarrhenae Rhizoma*; processed with salt-water; timosaponin B II; sarsasapogenin; HPLC-CAD

收稿日期: 2014-05-19

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81102810); 教育部高等学校博士学科点专项科研基金资助项目 (20012133120009)

作者简介: 吴莹 (1987—), 女, 硕士, 从事中药炮制原理研究。Tel: (0411) 87586115 E-mail: 823209547@qq.com

*通信作者 高慧, 副教授, 博士, 从事中药炮制原理研究。Tel: (0411) 87586011 E-mail: gaohutcm@163.com

知母为百合科知母属植物知母 *Anemarrhena asphodeloides* Bunge 的干燥根茎, 始载于《神农本草经》, 具有清热泻火、滋阴润燥的功效, 临床常用于外感热病、高热烦渴、肺热燥咳、骨蒸潮热等症^[1]。主产于河北, 传统认为河北易县西陵一带所产品质最佳, 称之为西陵知母。历版《中国药典》收载知母的品种均为生知母、盐知母。知母皂苷是知母中的活性成分, 知母皂苷 B II 和菝葜皂苷元分别是《中国药典》2010、2005 年版知母测定的指标性成分, 因属甾体皂苷, 无紫外吸收, 故均采用蒸发光散射检测器 (ELSD)。ELSD 的特点是散射光的对数响应值与组分的质量的对数呈线性关系, 但此对数关系变异性较大, 且其灵敏度较低, 最低检测限在 50~100 ng。电雾式检测器 (charged aerosol detection, CAD) 与 ELSD 比较, 具有更高的灵敏度, 对无紫外吸收化合物的检测, 其最低检测限达到了 1 ng^[2], 更适用于含有较弱或无紫外吸收的皂苷类成分分析。本实验采用 HPLC-CAD 法测定不同产地的知母和盐知母中知母皂苷 B II 和菝葜皂苷

元, 并比较知母盐炙前后变化, 为知母饮片的质量控制提供实验依据。

1 仪器与试药

LC—20AB 型高效液相色谱仪 (日本岛津公司), 配置自动进样器、PDA 检测器; Corona 电雾式检测器 (美国 ESA 公司); KQ—250DB 型数控超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); 电热恒温水浴锅 (北京市长风仪器仪表公司); Mettler AE240 型十万分之一分析天平 (瑞士 Mettler); FA1004B 电子天平 (上海精密科学仪器有限公司)。

知母皂苷 B II 对照品 (质量分数 ≥ 98%, 批号 Z08-110523) 购自江西本草天工科技有限责任公司; 菝葜皂苷元对照品 (质量分数 ≥ 98%, 批号 110744-200509) 购自中国食品药品检定研究院。8 个不同产地知母药材见表 1, 经辽宁中医药大学翟延君教授鉴定为百合科知母属植物知母 *Anemarrhena asphodeloides* Bunge 的干燥根茎。甲醇、乙腈为色谱纯, 娃哈哈纯净水, 其余试剂均为分析纯。

表 1 不同产地的知母药材样品

Table 1 Samples of *Anemarrhena Rhizoma* from different habitats

编号	产 地	备注
1	河北省易县大华龙乡	采于 2013 年 3 月
2	河北省易县西陵太和庄	采于 2013 年 10 月
3	河北省易县西陵龙泉庄	采于 2013 年 10 月
4	河北省易县西陵龙泉庄	采于 2013 年 10 月
5	山西省	散货, 购于 2010 年 9 月
6	四川省	购自四川新荷花中药饮片有限公司 (批号 1204167)
7	安徽省亳州市	散货, 购于 2010 年 9 月
8	内蒙古	散货, 购于 2010 年 9 月

2 方法与结果

2.1 盐知母的制备

按前期优选的炮制工艺自行炮制^[3]。100 g 知母饮片加入 30 mL 盐水 (含 3 g 食盐) 拌匀润透, 在 150~160 °C 炒制 8 min, 得盐知母, 收率为 98%。

2.2 知母皂苷 B II 的测定

2.2.1 色谱条件 Thermo C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 乙腈-水 (25:75) 为流动相, 体积流量为 1 mL/min, 进样量为 10 μL, 柱温为 30 °C; Corona 参数: 氮气压力为 241.3 kPa, Filter: High, Range: 200 pA。

2.2.2 对照品溶液的制备 取知母皂苷 B II 对照品适量, 精密称定, 加入 30% 丙酮制成 4.88 mg/mL 对照品溶液, 备用。

2.2.3 供试品溶液的制备 取样品粉末 0.5 g (过 4 号筛), 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 30% 丙酮 25 mL, 称定质量, 超声处理 (功率 400 W, 频率 40 Hz) 30 min, 取出, 放冷, 再称定质量, 用 30% 丙酮补足缺失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.2.4 线性关系考察 精密吸取 4.88 mg/mL 知母皂苷 B II 对照品溶液, 用 30% 丙酮逐级稀释成 30.5、

61、122、244、488 $\mu\text{g/mL}$ 溶液, 进样分析, 测定色谱峰面积。以质量浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 绘制标准曲线, 计算回归方程, 得回归方程 $Y=145\ 105\ X+459\ 248$, $r=0.999\ 4$ 。结果表明, 知母皂苷 B II 在 $0.305\sim 4.880\ \mu\text{g}$ 与峰面积呈良好的线性关系。

2.2.5 精密度试验 精密吸取 $4.88\ \text{mg/mL}$ 知母皂苷 B II 对照品溶液, 连续进样 6 次, 测定知母皂苷 B II 峰面积, 计算得其 RSD 值为 0.5%。

2.2.6 稳定性试验 取生知母(样品 1)供试品溶液, 每次进样 $10\ \mu\text{L}$, 分别在 0、1、2、4、6、8、10 h 进样分析, 测定知母皂苷 B II 色谱峰面积, 计算得其 RSD 值为 1.45%。结果表明供试品溶液在 10 h 内稳定性良好。

2.2.7 重复性试验 取生知母(样品 1) 6 份, 分别制备供试品溶液, 按上述色谱条件进样测定知母皂苷 B II 色谱峰面积, 计算知母皂苷 B II 质量分数的 RSD 值为 1.2%。

2.2.8 加样回收率试验 取生知母粉末(样品 1) $0.25\ \text{g}$, 平行 6 份, 精密称定, 分别精密加入 $0.455\ \text{mg/mL}$ 知母皂苷 B II 对照品溶液 $20\ \text{mL}$, 制备供试品溶液, 进样分析, 测定知母皂苷 B II 峰面积, 计算回收率, 结果平均回收率为 99.1%, RSD 值为 1.2%。

2.2.9 样品测定 取不同产地的生、盐知母样品, 分别制备供试品溶液, 进样测定, 外标法计算生、盐知母中知母皂苷 B II 的质量分数, 结果见表 2, 色谱图见图 1。

表 2 不同产地生、盐知母中知母皂苷 B II 和菝葜皂苷元的测定结果 ($n=2$)

Table 2 Determination of tmosaponin B II and sarsasapogenin in *Anemarrhenae Rhizoma* and *Anemarrhenae Rhizoma* processed with salt-water from different habitats ($n=2$)

编号	知母皂苷 B II/%		菝葜皂苷元/%	
	生知母	盐知母	生知母	盐知母
1	3.71	5.32	1.14	1.36
2	4.20	5.83	1.21	1.39
3	5.75	7.11	1.34	1.52
4	5.92	7.20	1.39	1.54
5	3.34	4.92	0.43	0.61
6	3.16	4.15	0.44	0.58
7	3.22	4.56	0.42	0.52
8	3.21	4.34	0.46	0.57

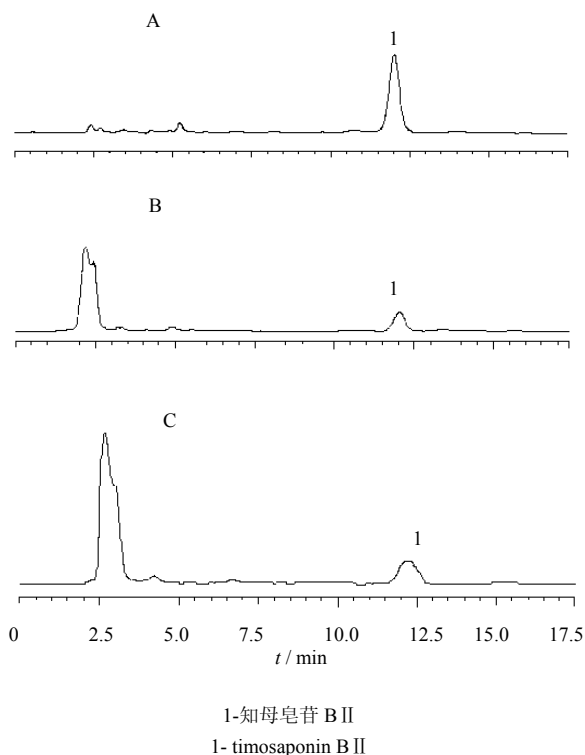


图 1 知母皂苷 B II 对照品(A)、生知母(B)和盐知母(C)的 HPLC-CAD 色谱图

Fig. 1 HPLC-CAD chromatograms of timosaponin B II reference substance (A), *Anemarrhenae Rhizoma* sample (B), and *Anemarrhenae Rhizoma* processing with salt-water sample (C)

2.3 菝葜皂苷元的测定

2.3.1 色谱条件 Diamonsil C_{18} 柱 ($250\ \text{mm}\times 4.6\ \text{mm}$, $5\ \mu\text{m}$), 甲醇-水 (95:5) 为流动相, 体积流量为 $1\ \text{mL/min}$, 进样量为 $20\ \mu\text{L}$, 柱温为 30°C ; Corona 参数: 氮气压力为 $241.3\ \text{kPa}$, Filter: High, Range: $200\ \text{pA}$ 。

2.3.2 对照品溶液的制备 精密称取菝葜皂苷元对照品适量, 加甲醇制成 $3.92\ \text{mg/mL}$ 对照品溶液, 备用。

2.3.3 供试品溶液的制备 取样品粉末(过三号筛) $0.5\ \text{g}$, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入乙醇 $25\ \text{mL}$, 称定质量, 浸泡过夜, 超声处理(功率 $200\ \text{W}$, 频率 $30\ \text{kHz}$) $40\ \text{min}$, 放冷, 再称定质量, 用乙醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过。精密量取续滤液 $10\ \text{mL}$, 蒸干, 加水 $10\ \text{mL}$, 盐酸 $1\ \text{mL}$, 加热回流 $2\ \text{h}$, 取出, 冷至室温, 边振摇边滴加 40% 氢氧化钠溶液至溶液颜色由橙黄突变为橙红, 用三氯甲烷振摇提取 2 次, 每次 $30\ \text{mL}$, 合并三氯甲烷液, 蒸干, 残渣加甲醇溶解, 转移至 $10\ \text{mL}$ 量瓶中, 并

稀释至刻度, 摇匀, 即得。

2.3.4 线性关系考察 精密吸取菝葜皂苷元对照品溶液, 逐级用甲醇稀释成 24.5、49、98、196、392 $\mu\text{g/mL}$ 溶液, 进样分析, 测定色谱峰面积。以质量浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 绘制标准曲线, 计算回归方程, 得回归方程 $Y=1\,994\,152.3 X+17\,035.6$, $r=0.999\,1$ 。结果表明, 菝葜皂苷元在 $0.490\sim 7.840\,\mu\text{g}$ 与峰面积呈良好的线性关系。

2.3.5 精密度试验 精密吸取 3.92 mg/mL 菝葜皂苷元对照品溶液, 按照上述色谱条件, 连续进样 6 次, 测定菝葜皂苷元峰面积, 计算得其 RSD 值为 0.79%。

2.3.6 稳定性试验 取生知母 (样品 1) 供试品溶液, 每次进样 10 μL , 分别在 0、1、2、4、6、8、10 h 进样分析, 测定菝葜皂苷元色谱峰面积, 计算得其 RSD 值为 1.3%。结果表明供试品溶液在 10 h 内稳定性良好。

2.3.7 重复性试验 取生知母 (样品 1) 6 份, 分别制备供试品溶液, 按上述色谱条件测定, 计算菝葜皂苷元质量分数的 RSD 值为 1.2%。

2.3.8 加样回收率试验 取生知母粉末 (样品 1) 0.25 g, 平行 6 份, 精密称定, 分别精密加入 0.350 mg/mL 菝葜皂苷元对照品溶液 8 mL, 制备供试品溶液并测定, 计算回收率, 结果平均回收率为 98.0%, RSD 值为 1.3%。

2.3.9 样品测定 取不同产地的生、盐知母样品, 分别制备供试品溶液, 进样测定, 外标法计算生、盐知母中菝葜皂苷元的质量分数, 结果见表 2, 色谱图见图 2。

可见不同产地知母药材中知母皂苷 B II 质量分数为 3.16%~5.92%, 盐制后质量分数为 4.15%~7.20%; 菝葜皂苷元质量分数为 0.42%~1.39%, 盐制后质量分数为 0.52%~1.54%。表明盐制后知母皂苷 B II 和菝葜皂苷元质量分数均有所升高。

结果表明, 河北易县一带产知母, 即“西陵知母”中知母皂苷 B II 和菝葜皂苷元的量明显高于山西、四川、安徽和内蒙等产地, 可见知母皂苷 B II 和菝葜皂苷元的量与知母药材的道地性呈现正相关。

3 讨论

电雾式检测器作为一种新型通用检测器, 其检测信号不依赖于被检测物质的化学结构, 对不同结构的化合物有统一的响应^[4], 已经用于皂苷类、糖、

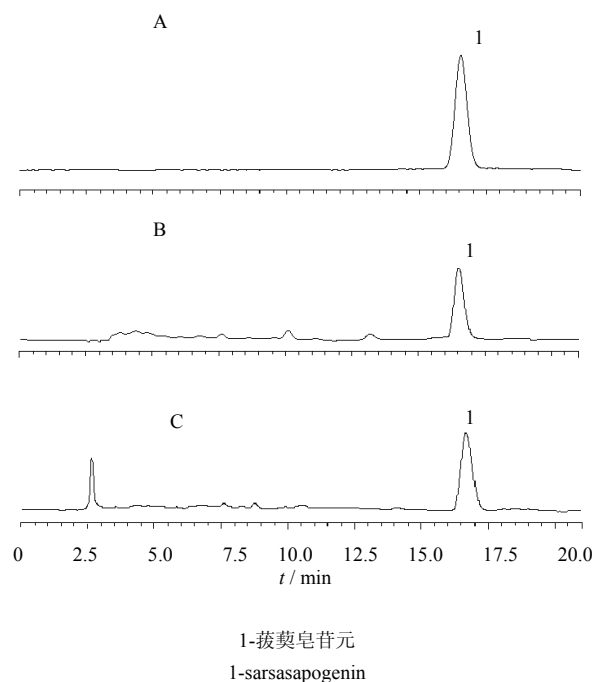


图 2 菝葜皂苷元对照品 (A)、生知母 (B) 和盐知母 (C) 的 HPLC-CAD 色谱图

Fig. 2 HPLC-CAD chromatograms of sarsasapogenin reference substance (A), *Anemarrhenae Rhizoma* sample (B), and *Anemarrhenae Rhizoma* processing with salt-water sample (C)

脂质和多肽等样品的检测^[5-10]。文献报道^[5], 通过对皂苷类成分的检测分析, 与紫外和蒸发光散射检测器相比, 电雾式检测器更加灵敏、准确和稳定。本实验建立 HPLC-CAD 法测定知母中知母皂苷 B II 和菝葜皂苷元, 为知母及其他含有较弱或无紫外吸收成分药材的质量控制和分析研究提供参考。实验结果表明, 得到的知母皂苷 B II 和菝葜皂苷元标准曲线, CAD 检测器的响应值与组分的质量呈线性关系, 不同于蒸发光散射检测器响应值与组分质量的对数关系, 且更便于计算。

知母皂苷 B II 是《中国药典》2010 年版规定的指标性成分, 具有抗抑郁^[11]、保护神经细胞损伤作用^[12], 其快速制备方法已有报道^[13]。知母中所含甾体皂苷水解后的苷元主要是菝葜皂苷元, 能间接反映总皂苷的量。因此, 测定知母中这 2 种皂苷更能反映药材的真实质量状况。知母盐制后这 2 种皂苷量均增加, 可能为盐知母滋阴降火作用增强的物质基础之一。推测知母在炮制过程中受辅料和加热等因素影响, 其他皂苷发生水解, 转化成知母皂苷 B II 和菝葜皂苷元, 具体的转化机制还需进一步研究。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2010: 197-198.
- [2] 姜庆伟, 杨 瑞, 梅兴国, 等. HPLC-电雾式检测器 (CAD) 检测法测定脂质体中磷脂含量 [J]. 中国药学杂志, 2007, 42(23): 1794-1796.
- [3] 高 慧. 盐知母炮制原理研究 [D]. 沈阳: 辽宁中医药大学, 2010.
- [4] Senda M, Fukushima K, Hashiguchi K, *et al.* A new universal detector, corona charged aerosol detection [J]. *Chromatography*, 2006, 27(3): 119-124.
- [5] 白长财, 柴兴云, 王海龙, 等. 利用电雾式检测器建立三七药材液相色谱指纹图谱 [J]. 中国药科大学学报, 2009, 40(1): 54-58.
- [6] Sun P, Wang X, Alquier L, *et al.* Determination of relative response factors of impurities in paclitaxel with high performance liquid chromatography equipped with ultraviolet and charged aerosol detectors [J]. *J Chromatogr A*, 2008, 1177(1): 87-91.
- [7] Moreau R A. The analysis of lipids via HPLC with a charged aerosol detector [J]. *Lipids*, 2006, 41(7): 727-734.
- [8] Brunelli C, Górecki T, Zhao Y, *et al.* Corona-charged aerosol detection in supercritical fluid chromatography for pharmaceutical analysis [J]. *Anal Chem*, 2007, 79(6): 2472-2482.
- [9] Dixon R W, Peterson D S. Development and testing of a detection method for liquid chromatography based on aerosol charging [J]. *Anal Chem*, 2002, 74(13): 2930-2937.
- [10] Gorecki T, Lynen F, Szucs R, *et al.* Universal response in liquid chromatography using charged aerosol detection [J]. *Anal Chem*, 2006, 78(9): 3186-3192.
- [11] 路明珠, 张治强, 伊 佳, 等. 知母皂苷 B-II 抗抑郁作用及其机制研究 [J]. 药学实践杂志, 2010, 28(4): 283-287.
- [12] 邓 云, 马百平, 从玉文, 等. 知母皂苷 B II 对 $A\beta_{25-35}$ 诱导的原代大鼠神经细胞损伤的保护作用 [J]. 中国药理学通报, 2009, 25(2): 244-247.
- [13] 冀 旭, 吴智宇, 陈千良, 等. 知母皂苷 B II 对照品的快速制备研究 [J]. 中草药, 2010, 41(11): 1803-1806.