

HPLC 法测定蒺藜提取物中原薯蓣皂苷

惠玉虎, 强 妮, 寇玉锋, 杨建莉

(西安皓天生物工程技术有限责任公司, 陕西 西安 710075)

蒺藜, 别名刺蒺藜、白蒺藜、硬蒺藜, 为蒺藜科植物蒺藜 *Tribulus terrestris* L. 的干燥成熟果实, 分布于全国各地, 在长江以北最普遍。蒺藜味苦辛, 性温, 有平肝解郁、活血祛风、明目、止痒功能, 用于头痛眩晕, 目赤多泪, 皮肤瘙痒, 胸胁胀闷, 经闭癥瘕^[1,2]。蒺藜中含有甾体皂苷。从蒺藜中提取的原薯蓣皂苷(protodioscin)能增强性欲, 提高性功能^[3,4]。HPLC-ELSD 和 RP-HPLC 检测蒺藜提取物中原薯蓣皂苷已有相关报道^[5,6]。本实验采用高效液相色谱梯度洗脱法对蒺藜提取物中原薯蓣皂苷检测方法进行研究, 为进一步研究原薯蓣皂苷提供方法依据。

1 仪器与试剂

Waters 1525 型高效液相色谱仪, Waters 2996 二极管阵列检测器, Empower 色谱工作站(美国 Waters 公司)。KQ-250DE 型数控医用超声波清洗仪(昆山市超声仪器有限公司), Sartorius BP211D 型电子分析天平(瑞士 Sartorius 公司)。

原薯蓣皂苷(上海和杰科技有限公司提供, 质量分数为 98%), 蒺藜提取物为西安皓天生物工程技术有限责任公司生产。乙腈为色谱纯, 甲醇为分析纯, 水为二次重蒸水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适用性: 色谱柱: Intersil ODS-3 (150 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-水; 梯度洗脱条件: 0 min, 30% A (70%B), 30 min, 55% A (45%B); 运行时间: 35 min; 柱温: 室温; 检测波长: 203 nm; 体积流量: 1.0 mL/min; 进样量: 10 μL。在此条件下, 原薯蓣皂苷保留时间约 10 min。原薯蓣皂苷与其他组分达到基线分离, 分离度>1.5。理论塔板数按原薯蓣皂苷计大于 3 000。色谱图见图 1。

2.2 对照品溶液配制: 精密称取原薯蓣皂苷对照品 5.39 mg 于 25 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并加至刻度, 即得 0.215 6 mg/mL 对照品储备液。

2.3 供试品溶液制备: 精密称取蒺藜提取物约 50 mg 于 50 mL 量瓶中, 加甲醇约 40 mL, 超声 20 min, 静置至室温后加甲醇至刻度, 用 0.45 μm 微孔

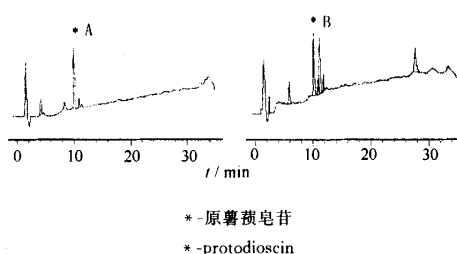


图 1 原薯蓣皂苷对照品(A)和蒺藜提取物(B)的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC Chromatograms of protodioscin reference substance (A) and *T. terrestris* extract (B)

滤膜滤过, 即得供试品溶液。

2.4 线性关系考察: 精密吸取原薯蓣皂苷对照品储备液, 用甲醇分别配制成质量浓度为 0.053 9、0.086 2、0.107 8、0.161 7、0.172 5、0.194 0 mg/mL 对照品溶液, 各取 20 μL 进样, 测定峰面积值。以峰面积为纵坐标, 质量浓度为横坐标进行回归处理, 得到回归方程 $Y=997\,205\,X-14\,000$, $r=0.999\,5$, 表明原薯蓣皂苷在 0.053 9~0.194 0 mg/mL 与峰面积线性关系良好。

2.5 精密度试验: 取 0.215 6 mg/mL 原薯蓣皂苷对照品储备液, 连续进样 6 次, 测定峰面积, 计算 RSD 为 1.03%。

2.6 重现性试验: 精密称取同一批蒺藜提取物样品适量, 按供试品溶液制备方法制备 6 份, 依法测定。结果原薯蓣皂苷的平均质量分数为 16.43%, RSD 为 0.93%。

2.7 稳定性试验: 精密吸取同一供试品溶液每隔 2 h 进样测定原薯蓣皂苷峰面积, 计算 RSD 为 0.65%。结果表明供试品溶液在 12 h 基本稳定。

2.8 加样回收率试验: 采用加样回收法。精密称取含原薯蓣皂苷 1.40% 的蒺藜提取物约 0.1 g, 加 0.215 6 mg/mL 原薯蓣皂苷对照品储备液 8 mL, 制备供试品溶液, 依法测定, 计算, 结果平均回收率为 99.25%, RSD 为 0.98% ($n=5$)。

2.9 样品的测定: 精密称取蒺藜提取物 5 批, 按供试

品溶液制备方法制备,测定。每批样品测定 3 份,按外标法计算原薯蓣皂苷质量分数,测定结果见表 1。

表 1 蕹菜提取物中原薯蓣皂苷的测定结果 ($n=3$)

Table 1 Protodioscin in *T. terrestris* extract ($n=3$)

批号	原薯蓣皂苷/(mg·g ⁻¹)	RSD/%
050612	164.90	0.90
050608	153.21	1.12
050616	161.65	0.85
050528	165.86	0.75
050620	160.62	1.05

3 讨论

3.1 检测波长的选择:将原薯蓣皂苷对照品储备液在紫外分光光度计上于 200~700 nm 进行波长扫描,结果原薯蓣皂苷在 203 nm 处有特征吸收,因此确定 203 nm 为原薯蓣皂苷的检测波长。

3.2 洗脱条件的选择:采用高效液相色谱等度洗脱时,流动相比比例为 35% 乙腈水溶液,由于原薯蓣皂苷结构式中只含有一个双键,因此,在 203 nm 处吸

收值很小,色谱峰面积也很小,色谱峰分离效果不好。而采用高效液相色谱梯度洗脱法时,虽然基线有波动,但色谱峰能够达到很好的分离,并且色谱峰面积稳定。因此宜采用梯度洗脱法进行测定。

References:

- [1] Ch P (中国药典) [S]. Vol 1. 2005.
- [2] Chu S D, Qu W J, Li M, et al. Research advance on chemical component and pharmacological action of *Tribulus terrestris* [J]. *Chin Wild Plant Resour* (中国野生植物资源), 2003, 22(4): 4-7.
- [3] Adimoelja A. Phytochemicals and the breakthrough of traditional herbs in the management of sexual dysfunctions [J]. *Int J Androl*, 2000, 23(Suppl 12): 82-84.
- [4] Gauthaman K, Adaikan P G, Prasad R N V. Aphrodisiac properties of *Tribulus terrestris* extract (protodioscin) in normal and castrated rats [J]. *Life Sci*, 2002, 71(12): 1385-1396.
- [5] Ganzera M, Bedir E, Khan I A. Determination of steroidal saponins in *Tribulus terrestris* by reversed-phase high performance liquid chromatography and evaporative light scattering detection [J]. *J Pharm Sci*, 2001, 11: 1752-1758.
- [6] Trimbak R, Sasikumar M, Yashwantrao A, et al. Quantitation of protodioscin in *Tribulus terrestris* L. fruit powder by reversed-phase high-performance thin-layer chromatography [J]. *J Planar Chromatogra*, 2004, 17: 379-382.

雷公藤叶提取物高效液相色谱指纹图谱的研究

李 克,王曙东,陈 爽

(南京军区南京总医院 检验中心,江苏 南京 210002)

雷公藤 *Tripterygium Wilfordii* Hook. F. 系卫矛科雷公藤属植物,主产于浙江、江西、福建、广东、安徽等地。主要含有二萜、三萜、倍半萜、生物碱及苷类、糖类、醇类和微量元素等成分。具有抗肿瘤、抗炎以及免疫抑制等药理活性。雷公藤提取物研制的制剂用于治疗类风湿性关节炎、白血病、肾病综合症、肿瘤等取得了较好的疗效并已被广泛认可^[1~4]。雷公藤含有许多毒性成分,在临床应用上仍会经常发生不良反应^[5,6]。因此,需要对雷公藤药材进行整体质量的综合控制。研究开发新型、低毒剂型显得十分必要。指纹图谱分析是近年发展起来的对中药及其制剂进行综合宏观分析和质量控制的可行手段,现已成为控制中药质量的有效方法^[7,8]。

本实验采用 HPLC 法研究了采收于不同季节的雷公藤叶提取物的色谱指纹图谱,并利用色谱相对峰面积和相对保留时间作为参数,比对了对不同季节的雷公藤叶之间的异同,为合理开发利用雷公藤药材提供了参考。

1 材料

Integral 100 高效液相色谱仪系统(美国 Perkin Elmer 公司)。N-2000 色谱数据工作站(浙江大学智能信息工程研究所)。雷公藤甲素对照品(批号:1566-200201)购自中国药品生物制品检定所。雷公藤叶药材购自浙江省永康市,其采收期分别为夏季(7月)和冬季(12月),经南京军区南京总医院王玉玺副主任药师鉴定。D-101 大孔吸附树脂购自天津海光化工有限公司。储备液制备:精确称取雷公藤甲素对照品 5 mg,加少许甲醇溶解后,以流动相确定容至 5 mL,摇匀,置 4℃ 冰箱保存。

流动相采用色谱纯级乙腈配制。其余试剂均为分析纯级试剂,试验用水均使用超纯净水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件:色谱柱:Lichrospher C₁₈ 高效液相色谱分离柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)(江苏汉邦科技有限公司);流动相:乙腈-水(39:61);检测波长:210 nm;体积流量:0.80 mL/min;定量管体积:20