

一测多评法同时测定预知子中4种三萜皂苷

宋永贵^{1,2}, 张武岗^{1,2*}, 刘岩庭², 侯雄军², 李志峰^{1,2}, 苏丹^{1,2}, 冯育林^{1,2*}, 杨世林^{1,2}

1. 中药固体制剂制造技术国家工程研究中心, 江西 南昌 330006

2. 江西中医学院, 江西 南昌 330006

摘要: 目的 建立同时测定预知子中多种三萜皂苷成分的一测多评质量控制方法。方法 采用 Alltech Apollo C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 以乙腈和 0.1% 的磷酸水溶液为流动相梯度洗脱; 以常春藤皂苷元 3-O-α-L-吡喃鼠李糖基-(1→2)-α-L-吡喃阿拉伯糖苷 (皂苷 P_D, saponins P_D) 为内标物, 考察在不同色谱柱、流动相系统、HPLC 仪器条件下, 皂苷 P_D 与常春藤皂苷元 3-O-β-D-吡喃葡萄糖基-(1→3)-α-L-吡喃鼠李糖基-(1→2)-α-L-吡喃阿拉伯糖苷 (皂苷 X, saponin X)、常春藤皂苷元 3-O-β-D-吡喃木糖基-(1→2)-α-L-吡喃阿拉伯糖苷 (皂苷 B, saponin B)、常春藤皂苷元 3-O-α-L-吡喃阿拉伯糖苷 (皂苷 A, saponin A) 之间的相对校正因子, 并利用该相对校正因子 (RCF) 计算皂苷 X、皂苷 B 和皂苷 A 量。采用外标法同时测定药材中该 4 种成分的量, 将测定值与计算值进行多种统计学检验, 以验证该质控方法的准确性和可行性。结果 在不同的条件下, 预知子中皂苷 P_D 与皂苷 X、皂苷 B 及皂苷 A 的相对校正因子重现性良好, (RSD=0.70%、0.56%、0.59%), RCF 分别为 1.180、1.045、0.893。10 批预知子中皂苷 X、皂苷 B 及皂苷 A 的计算值与外标法实测值相比没有显著性差异 ($P>0.05$)。结论 采用一测多评法控制预知子的质量是准确的、可行的。

关键词: 预知子; 一测多评; 相对校正因子; 皂苷 P_D; 皂苷 X; 皂苷 B; 皂苷 A; HPLC

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2012)07-1418-04

Quantitative analysis of multi-assessment by single marker on four triterpenoid saponins in *Akebiae Fructus*

SONG Yong-gui^{1,2}, ZHANG Wu-gang^{1,2}, LIU Yan-ting², HOU Xiong-jun², LI Zhi-feng^{1,2}, SU Dan^{1,2}, FENG Yu-lin^{1,2}, YANG Shi-lin^{1,2}

1. National Pharmaceutical Engineering Center for Solid Preparation in Chinese Herbal Medicine, Nanchang 330006, China

2. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330006, China

Key words: *Akebiae Fructus*; quantitative analysis of multi-assessment by single marker (QAMS); relative correction factor (RCF); saponins P_D; saponin X; saponin B; saponin A; HPLC

预知子为木通科木通属植物五叶木通 *Akebia quinata* (Thunb.) Decne.、三叶木通 *A. trifoliata* (Thunb.) Koidz. 和白木通 *A. tridoliata* (Thunb.) Koidz. var. *australis* (Diels) Rehd. 的成熟果实^[1]。具有舒肝和胃、活血止痛、散结、利尿功效。用于腕肘胀痛、痛经经闭、痰核痞块、小便不利^[2]。三萜皂苷类成分是预知子中的主要成分, 具有抗癌、抗菌、抗炎等^[3-5]广泛的生物活性。目前对预知子质量控制标准方面, 王家明等^[6]对皂苷 P_K 进行了 HPLC 分析, 《中国药典》2010 版将 α-常春藤皂苷作为测定指标^[2], 而关于预知子中其他三萜皂苷的多成分测定尚未见报道。

由于中药成分的复杂性, 多指标综合质量控制模式已成为中药质量评价的发展趋势。但在实际工作中, 由于多种原因中药化学对照品常常很难获得, 这就限制了一般外标法或内标法实现多指标质量控制。一测多评法 (QAMS) 利用中药有效成分内在的函数关系和比例关系, 实现了采用一种易得对照品对多个成分的同步测定。该法在茶叶^[7]、大黄^[8]、人参^[9]等药材中得到发展和验证, 黄连的一测多评标准已被《中国药典》2010 年版收录^[2]。本实验采用一测多评法建立的校正因子, 提高了方法的实用性, 可用于预知子的质量评价, 更准确、方便地实现多成分同步测定, 更好地控制该药材质量。

收稿日期: 2011-11-19

基金项目: 国家“重大新药创制”科技重大专项 (2012ZX09103201-008); 江西省科技支撑计划项目 (20111BBG70005-2)

作者简介: 宋永贵 (1979—), 男, 讲师。

*通讯作者 冯育林 Tel: (0791)87119632 E-mail: fengyulin2003@hotmail.com

张武岗 Tel: (0791)87119650 E-mail: zwgchf98@foxmail.com

1 材料与仪器

Waters 高效液相色谱仪; Millipore Simplicity 超纯水器; AUW220D 型电子分析天平 (上海天平仪器厂); AB135—S 十万分之一天平 (Mettler Toledo)。

乙腈 (色谱纯), 甲醇 (分析纯)。常春藤皂苷元 3-*O*- α -*L*-吡喃鼠李糖基-(1 $\rightarrow$ 2)- α -*L*-吡喃阿拉伯糖苷 (皂苷 P_D)、常春藤皂苷元 3-*O*- β -*D*-吡喃葡萄糖基-(1 $\rightarrow$ 3)- α -*L*-吡喃鼠李糖基-(1 $\rightarrow$ 2)- α -*L*-吡喃阿拉伯糖苷 (皂苷 X)、常春藤皂苷元 3-*O*- β -*D*-吡喃木糖基-(1 $\rightarrow$ 2)- α -*L*-吡喃阿拉伯糖苷 (皂苷 B)、常春藤皂苷元 3-*O*- α -*L*-吡喃阿拉伯糖苷 (皂苷 A) 由本实验室分离纯化, 质量分数 > 98%。预知子收集自不同产地, 经江西医学院杨世林教授鉴定为三叶木通 *Akebia trifoliata* (Thunb.) Koidz. 的成熟果实, 见表 1。

表 1 样品来源
Table 1 Sources of samples

编号	产地	编号	产地
1	江苏灌南	6	河南商城
2	江苏赣榆	7	安徽滁州
3	江苏洪泽	8	安徽金寨
4	湖北宜昌	9	安徽霍山
5	河南西峡	10	四川通江

2 方法与结果

2.1 方法原理

在一定的范围内成分的量 (质量或浓度) 与检测器响应成正比, 可得响应因子 $f=A/C$ 。在预知子的多指标质量评价时, 以皂苷 P_D 为内标, 建立皂苷 P_D 与其他 3 种三萜皂苷成分 (皂苷 X、B、A) 之间的相对校正因子 (RCF 值, f_{sa} , f_{sb} , f_{sc} …), 通过相对校正因子计算皂苷 X、皂苷 B、皂苷 A 的量^[10]。同时用常规外标法进行同步测定, 以验证计算值的正确性和可行性。

2.2 一测多评方法学考察

2.2.1 色谱条件 色谱柱为 Alltech Apollo C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μ m); 流动相为乙腈-0.1% 磷酸水溶液 (45:55); 体积流量为 1.0 mL/min; 检测波长为 203 nm; 柱温 30 $^{\circ}$ C; 进样量 20 μ L。在上述色谱条件下, 各待测峰的分离度均大于 1.5, 理论塔板数大于 5 000, 色谱图见图 1。

2.2.2 对照品溶液制备 精密称取各对照品适量,

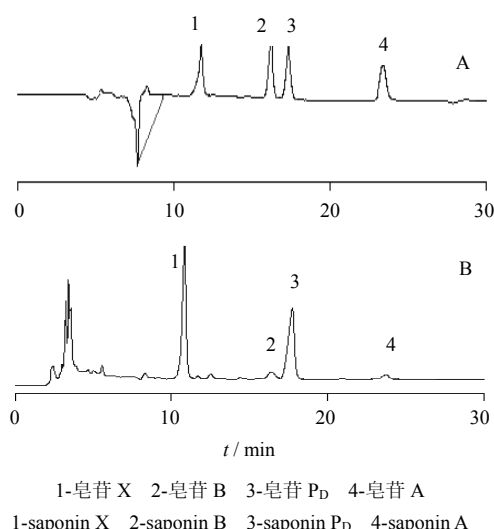


图 1 对照品 (A) 和样品 (B) 的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC chromatograms of reference substances (A) and sample (B)

置于同一 25 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 制成皂苷 P_D、皂苷 X、皂苷 B 和皂苷 A 的质量浓度分别为 0.310 2、0.210 4、0.25、0.15 mg/mL。

2.2.3 供试品溶液制备 取本品粉末 (过 60 目筛) 约 1 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 70% 乙醇 100 mL, 密塞, 称定质量, 超声处理 (功率 300 W, 频率 50 kHz) 30 min, 放冷, 再称定质量, 用 70% 乙醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 经 0.45 μ m 微孔滤膜滤过, 10 μ L 进样。

2.2.4 线性关系考察 精密量取对照品溶液各 0.5、1、2、4、8、10 mL, 分别置 10 mL 量瓶中, 用甲醇定容至刻度, 摇匀。分别精密吸取上述各混合溶液 10 μ L 进样, 按上述色谱条件测定。以峰面积 (Y) 对质量浓度 (X) 进行线性回归, 得皂苷 P_D、皂苷 X、皂苷 B、皂苷 A 的标准曲线, 见表 2, 各标准曲线在线性范围内线性关系良好。

2.2.5 相对校正因子 (RCF) 计算 以皂苷 P_D 为内标, RCF 值按照公式 $f_{si}=f_s/f_i=A_s \times C_i/C_s \times A_i$ (式

表 2 预知子中 4 种三萜皂苷类成分的标准曲线

Table 2 Calibration curves of four triterpenoids from *Akebiae Fructus*

成分	标准曲线	线性范围 / (μ g·mL ⁻¹)	r
皂苷 P _D	$Y=8.38 \times 10^3 X - 1.674$	15.51~310.2	0.999 9
皂苷 X	$Y=6.961 \times 10^3 X + 2.641$	10.52~210.4	0.999 7
皂苷 B	$Y=8.01 \times 10^3 X - 0.953$	12.50~250.0	0.999 8
皂苷 A	$Y=9.50 \times 10^3 X - 6.597$	7.500~150.0	0.999 9

中 A_s 为内参物对照品峰面积, C_s 为皂苷 P_D 质量浓度, A_i 为某待测成分对照品 i 峰面积; C_i 为某待测成分对照品 i 质量浓度), 结合“2.2.4”项下系列浓度对照品溶液所得峰面积数据, 计算皂苷 P_D 对皂苷 X、皂苷 B 和皂苷 A 的 RCF 值, 分别为 1.180、1.045、0.893。

2.2.6 精密度试验 精密吸取同一供试品溶液 (6 号), 在上述色谱条件下, 连续进样 6 次, 测定峰面积。皂苷 P_D 、皂苷 X、皂苷 B 和皂苷 A 的峰面积 RSD 分别为 1.9%、2.7%、2.0%、1.5%。表明仪器的精密度良好。

2.2.7 稳定性试验 取 2 号供试品溶液, 室温下放置, 分别于 0、2、4、6、8、10、12、24 h 测定, 皂苷 P_D 、皂苷 X、皂苷 B 和皂苷 A 峰面积的 RSD 分别为 2.7%、2.1%、1.9%、1.2%。表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.2.8 重复性试验 称取 2 号样品粉末 6 份, 按“2.2.3”项下方法操作, 在上述色谱条件下进行分析测定, 计算皂苷 P_D 、皂苷 X、皂苷 B 和皂苷 A 质

量分数的 RSD 分别为 2.5%、2.7%、1.7%、1.8%。表明该方法的重复性良好。

2.2.9 加样回收率试验 取已测定的 2 号样品共 9 份, 每份取约 0.5 g, 精密称质量, 3 份为 1 组, 每 3 组按低、中、高质量浓度分别精密加入相当于药材 50%、100%、150% 的对照品溶液, 依“2.2.3”项下方法操作, 测定, 计算加样回收率。皂苷 P_D 、皂苷 X、皂苷 B 和皂苷 A 的平均加样回收率分别为 100.0%、102.0%、99.1%、98.2%, RSD 分别为 2.3%、2.0%、2.1%、1.5%。

2.3 不同色谱柱和高效液相色谱仪校正因子的重现性考察

精密吸取“2.2.4”项下系列混合对照品溶液, 进样 10 μ L 测定, 按照“2.2.5”项下分别计算皂苷 P_D 对皂苷 X、皂苷 B 和皂苷 A 的 RCF 值。试验考察了 Agilent 1100 和 Shimadzu LC-10AT 型高效液相色谱仪和 Diamonsil C_{18} (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m), Elite Hypersil DBS (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m), Phenomenex Gemini C_{18} (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m) 3 种色谱柱, 见表 3。

表 3 不同仪器和色谱柱测定 RCF ($n=6$)

Table 3 Determination of RCFs by different instruments and columns ($n=6$)

仪 器	色 谱 柱	RCF 值		
		皂苷 X	皂苷 B	皂苷 A
Agilent 1100	Diamonsil	1.231	1.029	0.862
Agilent 1100	Elite	1.238	1.019	0.872
Agilent 1100	Phenomenex	1.226	1.010	0.875
Shimadzu LC-10AT	Diamonsil	1.215	1.019	0.870
Shimadzu LC-10AT	Elite	1.222	1.022	0.878
Shimadzu LC-10AT	Phenomenex	1.224	1.028	0.875
RSD / %		2.5	2.5	2.1

2.4 预知子定量测定一测多评法与常规外标法的结果比较

分别称取预知子粉末 (过 60 目筛) 约 1 g ($n=3$), 精密称定, 按“2.2.3”项下方法制备各供试品溶液, 在上述色谱条件下进样测定。采用外标法和一测多评法计算不同产地及不同种类的预知子中皂苷 P_D 、皂苷 X、皂苷 B 和皂苷 A 量, 结果见表 4。常规的外标法实测值与一测多评计算的含量值经配对 t 检验, 表明两种方法测得结果没有显著性差异 ($P>0.05$)。由此说明一测多评法可用于预知子的多成分质量评价研究。

2.5 预知子一测多评方法的再验证

随机选择另外的预知子 3 批 (产地分别为安徽

滁州, 安徽金寨和湖北宜昌), 分别按“实测法”和“一测多评法” (按建立的校正因子) 计算皂苷 P_D 、皂苷 X、皂苷 B 和皂苷 A 的量, 两种方法所测结果的 Pearson 相关系数均大于 0.99, 表明本实验建立的一测多评法具有科学性和实用性。

3 讨论

三萜及其皂苷类成分为预知子的特征性成分, 有较强专属性, 皂苷 P_D 为三萜皂苷, 具有多方面的药理活性, 尤其对肝脏具有较强的保护作用, 这与预知子的临床药效是相一致的, 同时, 其对照品价廉易得, 因此本方法选用皂苷 P_D 为内参物, 建立预知子中 4 种三萜皂苷成分的一测多评法。

本实验采用超声提取方法并考察了溶媒 (水、

表 4 2 种方法所得的预知子中三萜皂苷类成分量 ($n=3$)

Table 4 Comparison on contents of triterpenoids in *Akebiae Fructus* by two methods ($n=3$)

编号	皂苷 X / ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)		皂苷 B / ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)		皂苷 A / ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)		皂苷 P _D / ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)
	外标法	一测多评法	外标法	一测多评法	外标法	一测多评法	外标法
1	1.812	1.820	8.900	8.92	1.342	1.313	2.743
2	1.591	1.611	7.612	7.638	0.982	0.945	2.512
3	1.415	1.433	8.400	8.430	1.252	1.222	2.382
4	5.153	5.107	19.17	19.13	5.151	5.228	3.931
5	6.052	6.000	2.181	2.170	3.099	3.113	3.815
6	8.040	7.960	2.233	2.223	3.183	3.209	3.369
7	1.771	1.780	1.510	1.506	1.583	1.561	2.620
8	1.832	1.842	1.624	1.621	1.665	1.644	2.553
9	1.652	1.666	1.442	1.439	1.486	1.457	2.701
10	10.61	10.47	12.61	12.54	7.382	7.499	25.22

甲醇、70%甲醇、70%乙醇、50%甲醇) 和超声时间 (15、30、45 min) 对提取效率的影响。结果显示, 70%乙醇为溶媒, 超声 30 min 为最佳提取条件。

采用二极管阵列检测器对待测的皂苷 P_D、皂苷 X、皂苷 B 和皂苷 A 成分进行全波长扫描发现, 4 种皂苷类成分吸收相似, 均在 203 nm 处有最大吸收, 故选取 203 nm 为检测波长。

参考文献

- [1] 宋立人, 洪 恂, 丁渚亮, 等. 现代中药学大词典 (II) [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2001.
- [2] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [3] 吴立军. 天然药物化学 [M]. 第 4 版. 北京: 人民卫生出版社, 2003.
- [4] 赵春彦, 成 慧, 贾冬梅, 等. 龙牙楸木三萜皂苷合成途径关键酶 AeFPS 基因的克隆及原核表达[J]. 中草药, 2011, 42(10): 2092-2096.
- [5] 张佳佳. 黑乳海参三萜皂苷的提取分离及其结构鉴定 [J]. 中草药, 2011, 42(8): 1467-1472.
- [6] 王家明, 高慧敏, 王智民. 预知子中 saponins PK 的 HPLC 分析 [J]. 中国药学杂志, 2007, 42(12): 896-898.
- [7] Wang H F, Gordon J, Provan, K H, *et al.* HPLC determination of catechins in tea leaves and tea extracts using relative response factors [J]. *Food Chem*, 2003(81): 307-312.
- [8] Gao X Y, Jiang Y, Lu J Q, *et al.* One single standard substance for the determination of multiple anthraquinone derivatives in rhubarb using high-performance liquid chromatography-diode array detection [J]. *J Chromatogr A*, 2009(1216): 2118-2123.
- [9] 朱晶晶, 王智民, 匡艳辉, 等. 一测多评法同步测定人参和三七药材中多种人参皂苷的含量 [J]. 药学学报, 2008, 43(12): 1211-1216.
- [10] 王智民, 钱忠直, 张启伟, 等. 一测多评法建立的技术指南 [J]. 中国中药杂志, 2011, 36(6): 657-658.