

HPLC-ELSD 法测定蒺藜粗皂苷中 3 种甾体皂苷元

方惠娟¹, 李清¹, 关潇滢², 钱忠直³, 王铁杰^{2*}, 毕开顺^{1*}

1. 沈阳药科大学药学院, 辽宁 沈阳 110016

2. 深圳市药品检验所, 广东 深圳 518057

3. 国家药典委员会, 北京 100061

摘要: 目的 同时测定蒺藜粗皂苷中海柯皂苷元、薯蓣皂苷元和替告皂苷元的量。方法 采用 HPLC-ELSD 法, 色谱柱为 Agilent Zorbax SB-C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-水 (86:14), 漂移管温度 100 °C, 载气体积流量 2.5 L/min。结果 海柯皂苷元、薯蓣皂苷元和替告皂苷元分别在 114.1~1 141.0 μg/mL ($R^2=0.999 2$), 16.88~168.80 μg/mL ($R^2=0.999 4$), 78.60~786.00 μg/mL ($R^2=0.999 3$) 呈良好线性关系; 蒺藜粗皂苷中海柯皂苷元、薯蓣皂苷元和替告皂苷元的平均回收率分别为 99.7% (RSD 为 1.6%)、99.3% (RSD 为 1.4%)、99.4% (RSD 为 1.1%)。结论 该方法简便、准确、快速, 且专属性良好, 可用于蒺藜粗皂苷的质量评价。

关键词: HPLC-ELSD; 蒺藜粗皂苷; 海柯皂苷元; 薯蓣皂苷元; 替告皂苷元; 质量评价

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2012)12-2417-03

Determination of three steroid saponin in crude saponin of *Tribulus terrestris* by HPLC-ELSD

FANG Hui-juan¹, LI Qing¹, GUAN Xiao-ying², QIAN Zhong-zhi³, WANG Tie-jie², BI Kai-shun¹

1. School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China

2. Shenzhen Institute for Drug Control, Shenzhen 518057, China

3. Chinese Pharmacopoeia Commission, Beijing 100061, China

Key words: HPLC-ELSD; *Tribulus terrestris* L. crude saponin; hecogenin; diosgenin; tigogenin; quality evaluation

蒺藜为蒺藜科植物蒺藜 *Tribulus terrestris* L. 的干燥果实, 味辛、苦, 微温, 有小毒, 归肝经^[1]。现代研究表明, 蒺藜中含有皂苷、生物碱、黄酮、多糖、氨基酸等多种成分, 主要活性成分为皂苷类成分^[2-4]。

蒺藜甾体皂苷元主要有海柯皂苷元、薯蓣皂苷元、替告皂苷元和吉托皂苷元等, 由于皂苷元紫外吸收较弱且主要为末端吸收, 采用 HPLC-DAD 进行定量具有一定困难^[5], ELSD 是一种通用检测器, 可以弥补 DAD 检测器的不足^[6]。本实验采用 HPLC-ELSD 法测定蒺藜粗皂苷中量较高的海柯皂苷元、薯蓣皂苷元和替告皂苷元, 为蒺藜粗皂苷的质量评价提供依据。

1 仪器与材料

高效液相色谱仪 Waters 2695 (在线脱气机、四元泵、自动进样器、柱温箱), Empower 色谱数据工作站 (美国 Waters 公司); Alltech 2000 型蒸发光散射检测器 (美国奥泰公司); XWK-3A 空气泵 (天津市分析仪器厂技术服务经营部); LC-MS (Waters 2695、Waters 2487 检测器、Quattro Micro、Masslynx 工作站, 美国 Waters 公司); Millipore-Q 超纯水制备仪 (法国密理博公司)。

海柯皂苷元对照品购自 TCI 公司 (经纯化至质量分数 97.5%), 薯蓣皂苷元对照品购自中国药品生物制品检定所 (批号 111539-200001), 替告皂苷元购自成都瑞芬思生物科技有限公司 (质量分数为

收稿日期: 2012-03-19

基金项目: 广东省科技计划项目 (2010A030100018)

作者简介: 方惠娟 (1985—), 女, 河南义马人, 硕士研究生。Tel: 15670377243 E-mail: huijuanfanghj@126.com

*通讯作者 王铁杰 毕开顺 Tel: (024)23986016 E-mail: bikaishun@yahoo.com

网络出版时间: 2012-11-26 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/12.1108.R.20121126.1813.014.html>

98%), 甲醇(色谱纯)为 Merck 公司产品, 水为 Millipore-Q 制超纯水, 其他试剂均为分析纯。蒺藜粗皂苷 2 批(批号 20080702、20090806)购自吉林敖东洮南药业股份有限公司, 2 批(批号 20050821、20070916)购自上海复旦复华药业有限公司, 2 批(批号 20081025、20081221)购自陕西奥泽生物科技有限公司。

2 方法与结果

2.1 色谱条件及系统适用性试验

色谱柱为 Agilent Zorbax SB-C₁₈ 柱(250 mm ×

4.6 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-水(84:16), 体积流量 1.0 mL/min, 柱温 35 °C, ELSD 检测器漂移管温度 100 °C, 载气体积流量 2.5 L/min, 进样量 10 μL。在上述色谱条件下分析, 理论塔板数按海柯皂苷元计算不低于 8 424, 按薯蓣皂苷元计算不低于 17 376, 按替告皂苷元计算不低于 16 969, 3 种成分与相邻色谱峰的分离度均大于 1.5, 拖尾因子在 0.95~1.05, 色谱图见图 1。

2.2 对照品储备液的制备

分别取海柯皂苷元、薯蓣皂苷元和替告皂苷元

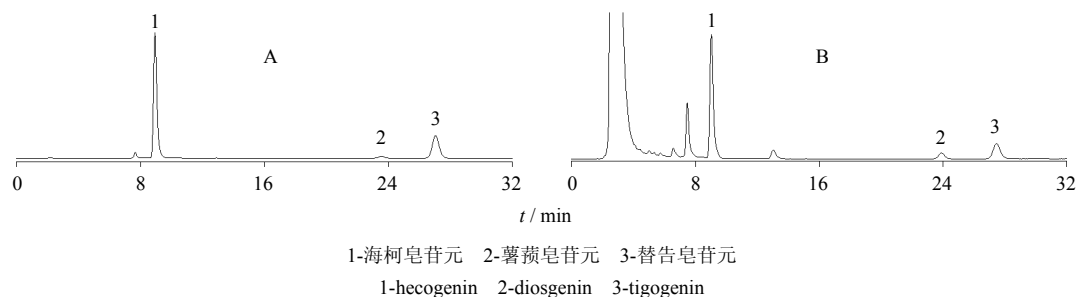


图 1 对照品 (A) 与样品 (B) 的 HPLC 色谱图

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

对照品适量, 精密称定, 置 20 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并定容, 制成含海柯皂苷元、薯蓣皂苷元和替告皂苷元质量浓度分别为 2.852、0.422、1.965 mg/mL 的对照品混合溶液, 作为对照品储备溶液。

2.3 供试品溶液的制备

取蒺藜粗皂苷约 0.5 g, 精密称定, 置 100 mL 圆底烧瓶中, 加甲醇-25%盐酸(4:1)混合溶液 25 mL, 回流提取 5 h, 转移至 25 mL 量瓶中, 冷却后用甲醇定容, 摇匀, 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 即得。

2.4 线性关系考察

分别精密吸取“2.2”项下对照品储备液 0.4、0.8、1.0、1.5、2.0、3.0、4.0 mL 置 10 mL 量瓶中, 用甲醇定容至刻度, 摇匀, 即得系列对照品混合溶液。按“2.1”项下色谱条件依次进样分析, 记录色谱峰面积。以峰面积的对数为纵坐标(Y), 对照品质量浓度的对数为横坐标(X), 进行线性回归分析, 得回归方程分别为海柯皂苷元 $Y=1.653X+6.079$, $R^2=0.9992$; 薯蓣皂苷元 $Y=1.758X+4.476$, $R^2=0.9994$; 替告皂苷元 $Y=1.972X+5.565$, $R^2=0.9993$ 。结果表明, 海柯皂苷元在 114.1~1 141.0 μg/mL、薯蓣皂苷元在 16.88~168.80 μg/mL、替告皂苷元在 78.60~786.00 μg/mL, 质量浓度的对数与峰面积的对数呈良好线性关系。

2.5 精密度试验

精密吸取混合对照品溶液(海柯皂苷元 285.2 μg/mL, 薯蓣皂苷元 42.2 μg/mL, 替告皂苷元 196.5 μg/mL) 10 μL, 重复进样 6 次, 按上述色谱条件测定, 海柯皂苷元、薯蓣皂苷元和替告皂苷元峰面积的 RSD 分别为 0.2%、0.7%、0.7%。

2.6 重复性试验

取同一批样品(批号 20080702), 精密称取 6 份, 按“2.3”项下操作, 依上述色谱条件分析, 测得海柯皂苷元、薯蓣皂苷元和替告皂苷元的量, 计算其 RSD 分别为 0.5%、1.1%、0.8%。

2.7 稳定性试验

取供试品(批号 20080702)溶液, 室温下放置, 分别于 0、2、4、6、8、10、12 h 进样 10 μL, 按“2.1”项下色谱条件分析, 海柯皂苷元、薯蓣皂苷元和替告皂苷元峰面积的 RSD 分别为 0.5%、1.0%、0.8%, 结果表明供试品溶液室温放置 12 h 内稳定。

2.8 回收率试验

取已测定的蒺藜粗皂苷(批号 20080702) 9 份, 每份 0.25 g, 精密称定, 3 份为一组, 每组按低(80%)、中(100%)、高(120%)分别加入一定量的海柯皂苷元、薯蓣皂苷元和替告皂苷元对照品, 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 按上述色谱条

件测定海柯皂苷元、薯蓣皂苷元和替告皂苷元的量，计算回收率，结果海柯皂苷元的平均回收率为99.7%，RSD为1.6%；薯蓣皂苷元平均回收率为99.3%，RSD为1.4%；替告皂苷元平均回收率为99.4%，RSD为1.1%。

2.9 样品的测定

分别取6批蒺藜粗皂苷，按“2.3”项下方法制备供试品溶液，在上述色谱条件下测定，计算结果见表1。

表1 样品中海柯皂苷元、薯蓣皂苷元和替告皂苷元的量

Table 1 Determination of hecogenin, diosgenin, and tigogenin in samples

批号	质量分数 / %		
	海柯皂苷元	薯蓣皂苷元	替告皂苷元
20080702	3.03	0.30	1.87
20090806	3.04	0.31	1.84
20050821	4.52	0.33	2.67
20070916	4.54	0.34	2.64
20081025	0.73	0.00	0.67
20081221	0.72	0.00	0.69

3 讨论

3.1 检测器的选择

实验过程中将ELSD检测器与DAD检测器进行了对比考察。由于皂苷元的紫外吸收很弱甚至没有紫外吸收，其在DAD检测器上响应很低或者没有响应，给皂苷元定量带来了一定的困难，而ELSD作为一种通用质量检测器，可用于检测无紫外吸收的样品，弥补了DAD检测器的不足，实验证明ELSD检测器适合于蒺藜中皂苷元的测定。

3.2 供试品溶液的制备

实验过程中，同时考察了甲醇-25%盐酸(4:1)

水解后直接定容、甲醇-25%盐酸(1:1)水解后氯仿萃取皂苷元、25%盐酸水解后氯仿萃取皂苷元。结果表明，3种提取方法中第1种提取方法所得的色谱峰信息较全面。曾有文献报道，在蒺藜粗皂苷中未发现薯蓣皂苷元^[7]，为此在本实验过程中使用Quattro Micro对供试品溶液及对对照品溶液中的薯蓣皂苷元峰进行一级正离子扫描和二级正离子扫描，结果谱图一致，证明在蒺藜粗皂苷中检测到薯蓣皂苷元，最终供试品溶液的制备方法采用甲醇-25%盐酸(4:1)水解后直接定容，方法简单，可靠。

在测定的蒺藜粗皂苷6批样品中，同一厂家所产不同批次粗皂苷中3种皂苷元的量差别不大，不同厂家所产蒺藜粗皂苷中3种皂苷元的量相差较大，故建议规范蒺藜粗皂苷的提取过程，并使用专属性较强的HPLC-ELSD法对其进行质量评价。

参考文献

- [1] 中国药典[S]. 一部. 2010.
- [2] 顾关云, 蒋昱. 蒺藜及其同属植物的化学与药理学研究进展[J]. 现代药物与临床, 2009, 24(4): 198-202.
- [3] 李莹, 宋宏宇, 张羽冠, 等. 蒺藜皂苷后处理对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 中草药, 2010, 41(8): 1326-1329.
- [4] 张爽, 李红, 魏征人, 等. 蒺藜皂苷预适应对心肌缺血再灌注损伤大鼠心功能的影响[J]. 中草药, 2010, 41(6): 959-963.
- [5] 王艳, 陆蕴如. 刺蒺藜化学成分的研究[J]. 西北药学杂志, 1990, 5(4): 14-17.
- [6] 余晓红. HPLC测定刺蒺藜总皂苷中的薯蓣皂苷元[J]. 华西药学杂志, 2008, 23(4): 475-475.
- [7] 牛伟, 瞿伟菁, 曹群华, 等. RP-HPLC比较蒺藜全草和果实中的主要甾体皂苷元成分[J]. 中成药, 2005, 27(4): 456-458.