

## 知母的 HPLC-ELSD 指纹图谱研究

钟可<sup>1</sup>, 王文全<sup>2\*</sup>, 靳风云<sup>1</sup>, 姚鹏<sup>1</sup>, 杨芳芳<sup>1</sup>

1. 贵阳中医学院, 贵州 贵阳 550025

2. 中国医学科学院 北京协和医学院药用植物研究所, 北京 100193

**摘要:** 目的 采用 HPLC-ELSD 法建立知母的指纹图谱, 全面综合反映和控制知母整体质量。方法 Thermo 色谱柱 C<sub>8</sub> (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈 (A)-0.2%冰醋酸水溶液 (B) 梯度洗脱: 0~5 min, 5%~7% A; 5~15 min, 7%~15% A; 15~36 min, 15%~22% A; 36~43 min, 22%~35% A; 43~51 min, 35%~50% A; 51~60 min, 100% A; 柱温 25 °C, 体积流量 1 mL/min, ELSD 检测器雾化器 (空气) 体积流量 2.6 L/min, 漂移管温度 100 °C, 进样量 20 μL。结果 在 60 min 内获得了较好分离效果的特征图谱, 确定 12 个主要特征峰作为共有峰, 建立了能够使多数化学成分色谱分离的知母药材 HPLC-ELSD 指纹图谱。结论 该方法简便、可靠, 并且同时指认了知母中皂苷类和双苯吡酮类成分, 能较全面地反映知母整体性的化学成分特征, 可用于全面有效地控制知母的质量。

**关键词:** HPLC-ELSD; 指纹图谱; 知母; 知母皂苷 BII; 知母皂苷 AIII; 芒果苷; 新芒果苷; 知母皂苷 C

中图分类号: R286.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2016)15-2747-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.15.025

## Research on HPLC-ELSD fingerprint of *Anemarrhenae Rhizoma*

ZHONG Ke<sup>1</sup>, WANG Wen-quan<sup>2</sup>, JIN Feng-yun<sup>1</sup>, YAO Peng<sup>1</sup>, YANG Fang-fang<sup>1</sup>

1. Guiyang College of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025, China

2. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100193, China

**Abstract: Objective** To provide the HPLC-ELSD fingerprint analysis method of *Anemarrhenae Rhizoma*, and to reflect and comprehensively control the quality of *Anemarrhenae Rhizoma*. **Methods** The HPLC-ELSD separation was performed on a C<sub>8</sub> analytical column (4.6 mm×250 mm, 5 μm) gradient eluted with a mixture consisting of acetonitrile (A) and 0.2% acetic acid-water (B) at a flow rate of 1 mL/min with ELSD detector. Using a linear gradient of 0 min, 5% A; 5 min, 7% A; 5—15 min, 15% A; 15—36 min, 22% A; 36—43 min, 35% A; 43 min, 40% A; 51 min, 50% A; 51—60 min, 100% A. The temperature of column was 25 °C. The flow rate of ELSD detector atomizer (air) was 2.6 mL/min. The temperature of the drift tube was 100 °C and the injection volume was 20 μL. **Results** The fingerprint with better separation effect by using gradient elution method within 60 min was established, and also the 12 peak which are common peak were determined. The most of chemical components of *Anemarrhenae Rhizoma* were chromatographic separated in this HPLC-ELSD fingerprint. **Conclusion** The method is simple and reliable, and in this way for the steroidal saponins and flavonoids of *Anemarrhenae Rhizoma* can be identified at the same time. Moreover, it can fully reflect the characteristics of the chemical composition of *Anemarrhenae Rhizoma*, therefore it can be used as an effective quality control method for *Anemarrhenae Rhizoma*.

**Key words:** HPLC-ELSD; fingerprint; *Anemarrhenae Rhizoma*; timosaponin BII; imosaponin AIII; mangiferin; neomangiferin; timosaponin C

知母 *Anemarrhenae Rhizoma* 为常用中药, 来源于百合科植物知母 *Anemarrhena asphodeloide* Bunge. 的干燥根茎。其药用历史悠久, 始载于《神农本草经》, 列为中品, 具有清热泻火、润肠燥、止渴除烦等功效<sup>[1]</sup>。在我国主要分布于河北、山西、

内蒙古、辽宁、黑龙江、吉林等省区。数 10 年来, 国内外学者对知母的化学成分进行了广泛深入的研究, 发现知母中含有甾体皂苷、双苯吡酮类、木脂素类、多糖类、有机酸类及微量元素类成分, 其主要成分为甾体皂苷类和双苯吡酮类成分。其中双苯

收稿日期: 2016-03-16

基金项目: 贵州省科技厅联合基金资助 (黔科合中中药字[2010]LKZ7031)

作者简介: 钟可 (1980—), 女, 副教授。E-mail: lionzhongke@163.com

\*通信作者 王文全 E-mail: wwq57@126.com

吡酮类中的化学成分芒果苷 (mangiferin) 和新芒果苷 (neomangiferin) 是知母中主要的抗炎、抗病毒和抗氧化成分。芒果苷和新芒果苷还有降血糖和改善 2 型糖尿病症状的作用<sup>[2]</sup>。现代药理研究发现知母中的甾体皂苷有着重要的药用价值, 其中知母皂苷 BII (timosaponin BII) 和知母皂苷 AIII (timosaponin AIII) 具有抗血栓、抗动脉粥样硬化、改善记忆功能障碍和治疗老年性痴呆等作用, 在抗癌方面也表现出显著的活性。知母皂苷 C (timosaponin C) 是知母中量较高的呋甾皂苷之一, 其水解脱糖后可转化生成菝葜皂苷元, 具有改善老年痴呆症状和抗氧化、抗辐射的作用<sup>[3-4]</sup>。利用色谱指纹图谱获取全面的中药化学成分特征信息已广泛地应用于中药的质量控制, 中药色谱指纹图谱是对中药整体性化学特征的表达和反映。目前, 美国食品药品监督管理局 (FDA)、英国草药典、德国药用植物学会、印度草药典、加拿大药用植物学会均接受和收载指纹图谱的质量控制方法, 指纹图谱已成为国际公认的控制中成药、天然药物质量的最有效方法。《中国药典》2015 年版以知母中芒果苷和知母皂苷 BII 的量测定来控制药材质量, 且分别采用 2 种不同的检测器来测定这 2 种化学成分的量, 测定方法较繁琐。因此, 建立能反映甾体皂苷类和双苯吡酮类这 2 类成分的知母指纹图谱方法具有重要的意义。

## 1 仪器、试剂与材料

安捷伦 1100 液相色谱仪, 配有二元高压溶剂系统、自动进样恒温箱样品管理器、柱温箱、ALLTECH 2000ES 蒸发光散射检测器; 台式系列数控超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司)。十万分之一电子分析天平 (德国 Sartorius)。对照品知母皂苷 BII (批号 120926)、知母皂苷 AIII (批号 121022)、芒果苷 (批号 110910)、新芒果苷 (批号 110920) 均由上海融禾生物科技有限公司提供, 质量分数均大于 98%; 知母皂苷 C 为实验室自制 (经红外、质谱及核磁鉴定和纯度检查, 质量分数 > 98%)。乙腈 (色谱纯, 美国 Fisher 公司), 其他试剂均为分析纯, 娃哈哈纯净水。

知母样品经中国医学科学院王文全教授鉴定为百合科植物知母 *Anemarrhena asphodeloide* Bunge. 的根茎。干燥后, 粉碎备用。样品来源见表 1。

表 1 不同来源知母样品信息

Table 1 Sample information of *Anemarrhena Rhizoma* from different origins

样品	来源地	样品	来源地
1	河北易县西陵镇太平峪村	9	河北安国市伍仁桥镇伍仁村
2	河北易县西陵镇忠义村	10	河北安国市祁州药市街道中阳村
3	河北易县西陵镇华北村	11	河北安国市祁州药市街道北各堡村
4	河北易县坡仓乡宝石村	12	河北安国市祁州镇南七公村
5	河北易县西陵乡晓新村	13	河北安国市东河乡西固村
6	河北安国市石佛镇米庄村	14	河北安国市明官店乡辛庄村
7	河北安国市石佛镇南阳村	15	河北安国市西安国城乡北堡村
8	河北安国市石佛镇流各庄		

## 2 方法与结果

### 2.1 溶液的制备

**2.1.1 对照品溶液的制备** 分别称取知母皂苷 BII、知母皂苷 AIII、芒果苷、新芒果苷、知母皂苷 C 对照品适量, 加 50% 乙醇配制成知母皂苷 BII、知母皂苷 AIII、芒果苷、新芒果苷、知母皂苷 C 质量浓度分别为 2.0、1.6、3.9、1.3、6.3 mg/mL 的混合对照品溶液, 摇匀, 备用。

**2.1.2 供试品溶液的制备** 取知母粉末 (过 4 号筛) 约 1.0 g, 精密称定。置具塞锥形瓶中, 精密加入 50% 乙醇 25 mL, 称定质量。超声 30 min (功率 400 W, 频率 40 kHz)。放冷, 再称定质量, 用 50% 乙醇补足减失的质量, 摇匀。滤过, 取续滤液, 0.45 μm 针头微孔过滤器滤过, 作为供试品溶液。

### 2.2 色谱条件

Thermo C<sub>8</sub> 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相乙腈 (A) - 0.2% 醋酸水 (B) 溶液, 梯度洗脱: 0~5 min, 5%~7% A; 5~15 min, 7%~15% A; 15~36 min, 15%~22% A; 36~43 min, 22%~35% A; 43~51 min, 35%~50% A; 51~60 min, 100% A; 柱温 25 °C; 体积流量 1 mL/min; ELSD 检测器雾化器 (空气) 体积流量 2.6 L/min, 漂移管温度 100 °C; 进样量 20 μL。

### 2.3 方法学考察

**2.3.1 精密度试验** 取同一份供试品 (1 号样品), 按照供试品的制备方法和色谱条件连续进样 6 次, 按照 “2.1.2” 项下方法和 “2.2” 项下色谱条件进行检测, 以知母皂苷 BII 峰为内参比峰, 计算占总峰面积 5% 以上峰的相对保留时间和峰面积, 结果显示 5% 以上峰相对保留时间的 RSD 为 0.01%~0.24%, 相对峰面积的 RSD 为 1.33%~2.55%, 均小

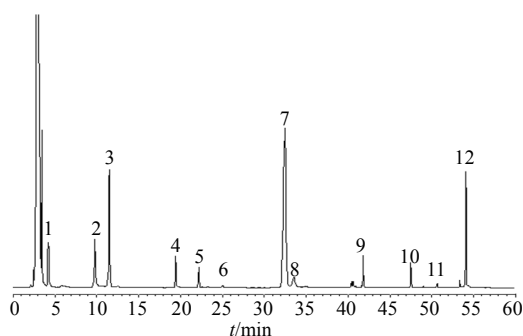
于 3%，符合指纹图谱技术要求。

**2.3.2 稳定性试验** 取同一份供试品（1 号样品）溶液，分别在 0、2、4、8、12、24 h 按照“2.1.2”项方法和“2.2”项下色谱条件进行检测，以知母皂苷 B II 峰为内参比峰，计算占总峰面积 5% 以上峰的相对保留时间和峰面积，结果表明，占总峰面积 5% 以上峰的相对峰面积的 RSD 为 1.28%~1.81%，相对保留时间的 RSD 值为 0.01%~0.23%，均小于 3%，符合指纹图谱技术要求。

**2.3.3 重复性试验** 取同一供试品（1 号样品）6 份，按照“2.1.2”项方法和“2.2”项下色谱条件进行检测，以知母皂苷 B II 峰为内参比峰，计算占总峰面积 5% 以上峰的相对保留时间和峰面积，结果表明，占总峰面积 5% 以上峰的相对峰面积的 RSD 为 1.77%~2.82%，相对保留时间的 RSD 为 0.01%~0.57%，均小于 3%，符合指纹图谱技术要求。

**2.4 知母指纹图谱的建立**

根据上述液相色谱条件，分别精密吸取对照品溶液及供试品溶液（1 号样品）各 20 μL，注入液相色谱仪，记录 60 min 内的色谱峰，色谱图见图 1，同时以对照品的图谱进行比对，确认了 2 号峰为新芒果苷，3 号峰为芒果苷，7 号峰为知母皂苷 B II，9 号峰为知母皂苷 C，12 号峰为知母皂苷 A III。按上述确定的供试品溶液制备方法进行样品分析，将 15 个不同批次的知母供试品的 HPLC-ELSD 色谱图（图 2）通过“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”2010 版软件，将峰面积较大、分离度较好的色谱峰进行标定，确定 12 个主要特征峰作为共有峰。



2-新芒果苷 3-芒果苷 7-知母皂苷 B II 9-知母皂苷 C  
12-知母皂苷 A III  
2-neomangiferin 3-mangiferin 7-timosaponin B II 9-timosaponin C  
12-timosaponin A III

图 1 知母 HPLC-ELSD 对照图谱

Fig. 1 HPLC-ELSD Chromatograph of *Anemarrhenae Rhizoma* sample

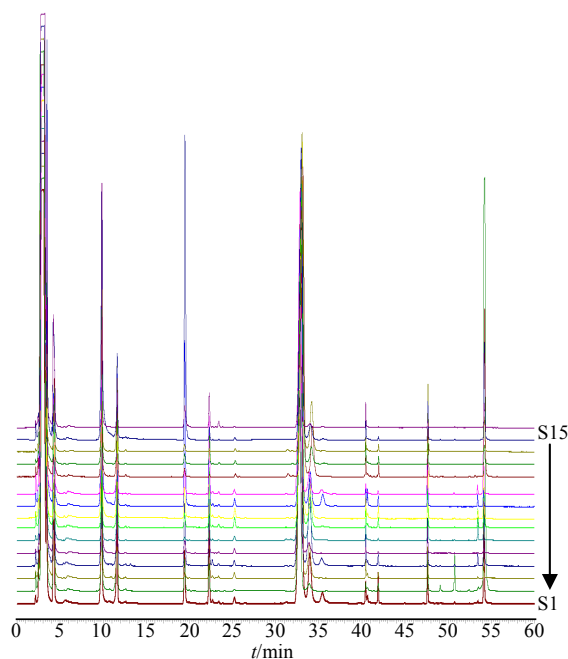


图 2 15 批知母样品 HPLC-ELSD 图谱

Fig. 2 HPLC-ELSD Chromatograph of 15 batches of *Anemarrhenae Rhizoma*

根据 15 个不同批次的知母供试品溶液的 HPLC-ELSD 色谱图，对照指纹图谱生成法，通过“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”2010 版软件，计算各药材样品的 HPLC-ELSD 图谱与生成对照指纹图谱之间的相似度，结果见表 2。

由表 2 知母 HPLC-ELSD 指纹图谱相似度可知，15 个不同批次的知母 HPLC-ELSD 指纹图谱的相似度 > 0.97 以上。实验结果表明所收集的知母样品整体性的化学成分特征相似。

**3 讨论**

知母中所含的皂苷类成分为甾体皂苷，没有紫外吸收，用传统的紫外检测器对其进行定性定量分析不适用，而 ELSD 可以弥补这方面的不足。本实验筛选出合适的知母化学成分提取方法和对 ELSD 检测器的各项参数进行了选择，确定了最优的 HPLC-ELSD 指纹图谱色谱条件，采用梯度洗脱方法在 60 min 内获得了较好分离效果的特征图谱，确定 12 个主要特征峰作为共有峰，建立了能够使多数化学成分色谱分离的知母道地药材 HPLC-ELSD 指纹图谱。该图谱特征性较强，主要共有峰达到了基线分离。在分析过程中，对芒果苷、新芒果苷、知母皂苷 B II、知母皂苷 A III、知母皂苷 C 同时进行了指认，克服了在以往的知母 HPLC 指纹图谱中无

表 2 15 批知母 HPLC-ELSD 指纹图谱相似度

Table 2 Similarity of HPLC-ELSD fingerprint of 15 batches of *Anemarrhenae Rhizoma*

样品编号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15	对照指纹图谱
S1	1.000	0.967	0.913	0.999	0.993	0.891	0.960	0.927	0.928	0.981	0.996	0.989	0.975	0.942	0.900	0.972
S2	0.967	1.000	0.979	0.975	0.984	0.972	0.999	0.980	0.987	0.990	0.985	0.991	0.995	0.995	0.975	0.998
S3	0.913	0.979	1.000	0.925	0.941	0.990	0.980	0.990	0.992	0.965	0.940	0.961	0.976	0.992	0.992	0.981
S4	0.999	0.975	0.925	1.000	0.997	0.908	0.970	0.937	0.942	0.986	0.998	0.993	0.981	0.954	0.914	0.980
S5	0.993	0.984	0.941	0.997	1.000	0.928	0.981	0.945	0.956	0.986	0.999	0.993	0.985	0.966	0.928	0.986
S6	0.891	0.972	0.990	0.908	0.928	1.000	0.976	0.978	0.995	0.952	0.926	0.944	0.964	0.990	0.987	0.971
S7	0.960	0.999	0.980	0.970	0.981	0.976	1.000	0.979	0.988	0.987	0.981	0.987	0.992	0.995	0.976	0.997
S8	0.927	0.980	0.990	0.937	0.945	0.978	0.979	1.000	0.986	0.975	0.948	0.970	0.982	0.989	0.994	0.984
S9	0.928	0.987	0.992	0.942	0.956	0.995	0.988	0.986	1.000	0.976	0.955	0.970	0.983	0.997	0.988	0.988
S10	0.981	0.99	0.965	0.986	0.986	0.952	0.987	0.975	0.976	1.000	0.990	0.997	0.995	0.983	0.959	0.995
S11	0.996	0.985	0.940	0.998	0.999	0.926	0.981	0.948	0.955	0.990	1.000	0.996	0.988	0.966	0.929	0.987
S12	0.989	0.991	0.961	0.993	0.993	0.944	0.987	0.970	0.970	0.997	0.996	1.000	0.996	0.979	0.953	0.995
S13	0.975	0.995	0.976	0.981	0.985	0.964	0.992	0.982	0.983	0.995	0.988	0.996	1.000	0.990	0.971	0.998
S14	0.942	0.995	0.992	0.954	0.966	0.990	0.995	0.989	0.997	0.983	0.966	0.979	0.990	1.000	0.989	0.994
S15	0.900	0.975	0.992	0.914	0.928	0.987	0.976	0.994	0.988	0.959	0.929	0.953	0.971	0.989	1.000	0.975
对照指纹图谱	0.972	0.998	0.981	0.98	0.986	0.971	0.997	0.984	0.988	0.995	0.987	0.995	0.998	0.994	0.975	1.000

法反映皂苷类成分信息的不足<sup>[5-6]</sup>以及知母 HPLC-ELSD 指纹图谱中双苯吡酮类成分没有分离和鉴定的缺陷<sup>[7-8]</sup>, 经方法学考察, 建立的知母 HPLC-ELSD 指纹图谱方法符合指纹图谱的要求。该特征图谱能较全面地反映知母整体性的化学成分特征。

#### 参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] 王颖异, 郭宝林, 张立军. 知母化学成分的药理研究进展 [J]. 科技导报, 2010, 28(22): 110-115.
- [3] 彭 纓, 李玲芝, 李成磊, 等. 知母中菝葜皂苷元分离其衍生物合成及活性 [J]. 沈阳药科大学学报, 2012(12): 23-28.
- [4] 党小平, 毛春芹, 陆兔林, 等. HPLC 法测定生知母和盐知母中芒果苷和菝葜皂苷元 [J]. 中草药, 2009, 40(2): 236-238.
- [5] 蔡玉荣, 王世勇, 刘乡乡, 等. 知母 HPLC 指纹图谱研究及相似度评价 [J]. 湖南中医杂志, 2005, 21(4): 79-80.
- [6] 张志斐, 肖 蓉, 袁志芳, 等. 河北道地药材知母 HPLC-ELSD 指纹图谱研究 [J]. 药物分析杂志, 2006, 26(11): 1569-1573.
- [7] 刘彤焱, 张胜强, 石 涛, 等. 知母药材苷类成分 RP-HPLC-ELSD 指纹图谱研究 [J]. 东南大学学报, 2006, 25(1): 24-27.
- [8] 黄 玮, 毛春芹, 宋 坤, 等. 盐知母 HPLC 指纹图谱的建立 [J]. 上海中医药大学学报, 2008, 22(3): 79-81.