

· 论著 ·

HPLC-ELSD 法同时测定知母药材中 5 种成分的含量

戴建英^{1,2}, 尤巍², 田甜², 洪战英^{1,2} (1. 福建中医药大学药学院, 福建 福州 350122; 2. 海军军医大学药学院, 上海 200433)

[摘要] 目的 采用高效液相色谱-蒸发光散射检测方法(HPLC-ELSD)建立同时测定知母药材中新芒果苷、芒果苷、知母皂苷 BⅡ、宝藿苷 I 及知母皂苷 AⅢ的含量测定方法。方法 采用 Agilent poroshell 120 EC-C₁₈ 柱, 流动相采用乙腈-0.2% 醋酸水系统, 梯度洗脱; 柱温为 30 ℃, 流速为 0.7 ml/min; 蒸发光散射检测器以氮气为雾化气, 雾化气温度为 40 ℃, 漂移管温度为 90 ℃, 氮气体积流量为 2.0 L/min; 进样量为 20 μl。结果 5 种成分均能达到基线分离, 新芒果苷 24.1 ~ 386 μg/ml ($r=0.999\ 3$)、芒果苷 23.2 ~ 371 μg/ml ($r=0.998\ 6$)、知母皂苷 BⅡ 54.2 ~ 867.2 μg/ml ($r=0.995\ 6$)、宝藿苷 I 5.3 ~ 84.8 μg/ml ($r=0.996\ 8$)、知母皂苷 AⅢ 10 ~ 160 μg/ml ($r=0.998\ 9$) 的浓度范围内呈现良好的线性关系。5 种成分的平均加样回收率在 101.8% ~ 105.0% 之间, 重复性 RSD 小于 2.4%, 知母药材中上述 5 种成分含量分别为 1.62%、0.82%、7.36%、0.07%、0.34%。结论 该方法操作简便、准确、灵敏度高, 可用于知母药材的多指标成分定量测定。

[关键词] 高效液相色谱-蒸发光散射检测法; 知母; 含量测定

[中图分类号] R284.1

[文献标志码] A

[文章编号] 1006-0111(2022)01-0034-04

[DOI] 10.12206/j.issn.1006-0111.202109070

Simultaneous determination of five components in *Anemarrhenae Rhizoma* by HPLC-ELSD

DAI Jianying^{1,2}, YOU Wei², TIAN Tian², HONG Zhanying^{1,2} (1. School of Pharmacy, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, China; 2. School of Pharmacy, Naval Medical University, Shanghai 200433, China)

[Abstract] **Objective** To establish a method for the simultaneous determination of new mangiferin, mangiferin, artemisinin BⅡ, icariin and artemisinin A in *Anemarrhenae Rhizoma* by high performance liquid chromatography-evaporation light scattering detector (HPLC-ELSD). **Methods** The column was Agilent Poroshell 120 EC-C₁₈. The mobile phase used acetonitrile-0.2% acetic acid water system with gradient elution. Column temperature was 30 ℃. Flow rate was 0.7 ml/min. Evaporative light scattering detector used nitrogen as atomizing gas. The atomizing gas temperature was 40 ℃ and the drift tube temperature was 90 ℃. The nitrogen volume flow rate was 2.00 L/min and the sample volume was 20 μl. **Results** The five components were able to achieve baseline separation. Neomangiferin, Mangiferin, Anemaponin BⅡ, Baohuoside I, Anemarrhena saponin AⅢ were determined as 24.1-386 μg/ml ($r=0.999\ 3$), 23.2-371 μg/ml ($r=0.998\ 6$), 54.2-867.2 μg/ml ($r=0.995\ 6$), 5.3-84.8 μg/ml ($r=0.996\ 8$), 10-160 μg/ml ($r=0.998\ 9$) respectively, which showed a good linear relationship within the concentration range. The average recovery rate of the five components was between 101.8% and 105.0%, and the repeatability RSD was less than 2.4%. The content of the above five components in Zhimu medicinal materials were 1.62%, 0.82%, 7.36%, 0.07%, 0.34%, respectively. **Conclusion** The method is simple, accurate, and highly sensitive, which could be used as the quantitative determination of multiple index components of *Anemarrhenae Rhizoma*.

[Key words] high performance liquid chromatography-evaporative light scattering detector; *Anemarrhenae Rhizoma*; content determination

中药知母(*Anemarrhenae rhizoma*)为百合科植物知母(*Anemarrhena asphodeloides* Bge.)的干燥

根茎, 始载于《神农本草经》, 具有清热泻火, 肺热燥咳, 滋阴润燥以及肠燥便秘等作用^[1]。知母根茎中含有甾体皂苷类、黄酮类、双苯吡酮类、木质素类、多糖类和生物碱类等多种成分, 甾体皂苷类是其首要药理活性成分。其中新芒果苷、芒果苷等黄酮苷类单体成分具有降低血糖的作用, 知母皂苷 BⅡ以及知母皂苷 AⅢ等甾体皂苷类单体成分具有

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81673386、81872829)

[作者简介] 戴建英, 硕士研究生, 研究方向: 中药活性成分和代谢组学研究, Email: 1327170885@qq.com, Tel: 15205030253

[通信作者] 洪战英, 教授, 研究方向: 中药化学物质组与代谢组学研究, Email: hongzhy001@163.com, Tel: (021)81871269

改善学习记忆、抗老年痴呆的作用^[2]。

《中国药典》(2020 年版)将芒果苷和知母皂苷 B II 作为知母的质量评价指标^[3],目前知母中芒果苷和新芒果苷的含量测定方法多采用高效液相-紫外检测法,而知母中另外一类重要的活性成分甾体皂苷类,由于不存在共轭结构、缺少紫外吸收,需通过衍生化技术将其转化成有紫外特征吸收的物质;但这种操作复杂、耗时,且准确度受衍生物稳定性的影响较大^[4-5],因此紫外检测器并不适用于甾体皂苷类物质的检测。相比于紫外检测器,蒸发光散射检测器(ELSD)不要求化合物带有发色团或荧光基团,能够测定没有紫外吸收或为紫外末端弱吸收的样品;而且可以在多溶剂梯度的情况下获得稳定的基线和较高的分辨率。目前,已有应用 HPLC-ELSD 法对知母药材中单种成分或多成分含量测定的报道^[6-7],但是所建立的方法往往分析时间较长,消耗试剂较多。

本文建立了一种快速、简便、准确的 HPLC-ELSD 方法,可同时测定知母中 3 个黄酮类成分(新芒果苷、芒果苷、宝藿苷 I)和 2 个甾体皂苷类成分(知母皂苷 B II、知母皂苷 A III)的含量,可为知母药材质量控制提供参考依据。

1 仪器与试药

1.1 仪器

高效液相色谱仪(1260 Infinity II Prime LC, 美国安捷伦公司);蒸发光散射检测器(G4260B, 美国安捷伦公司);分析天平(XS205, 梅特勒-托利多国际公司)、涡旋混合器(SCILOGEX MX-S, 美国 Scilogex 公司)、超声波清洗器(2300TH 型, 上海安谱实验科技股份有限公司)。

1.2 试药

新芒果苷对照品(批号: 3671)、芒果苷对照品(批号: 5586)、知母皂苷 B II 对照品(批号: 1369)、宝藿苷 I 对照品(批号: 1869)、知母皂苷 A III 对照品(批号: 3892)购自上海诗丹德标准技术服务有限

公司;知母药材由上海市食品药品检验所中药室赠予;色谱纯乙腈(北京迪科马科技有限公司);色谱纯异丙醇(上海安谱实验科技股份有限公司);分析纯乙醇和乙酸(国药集团化学试剂有限公司)。

2 方法与结果

2.1 溶液的配制

2.1.1 对照品溶液

精密称取芒果苷、新芒果苷、知母皂苷 B II、宝藿苷 I 和知母皂苷 A III 对照品适量,置于 5 ml 容量瓶中,加 50% 乙醇溶液适量,超声溶解后,加入 50% 乙醇稀释并定容得到混合溶液,精密量取 1 ml 该混合溶液置于 5 ml 容量瓶中,加 50% 乙醇溶液定容,最终得含芒果苷 464 $\mu\text{g/ml}$,新芒果苷 482 $\mu\text{g/ml}$,知母皂苷 B II 1084 $\mu\text{g/ml}$,宝藿苷 I 106 $\mu\text{g/ml}$,知母皂苷 A III 200 $\mu\text{g/ml}$ 的混合对照品储备液,摇匀备用。

2.1.2 供试品溶液

取知母药材适量,干燥后粉碎,过 3 号筛得知母药材粉末。取药材粉末 0.5 g,精密称定,置于 50 ml 具塞锥形瓶中,精密加入 50% 乙醇 50 ml,称重,超声(功率 300 W, 60 Hz)处理 30 min。超声结束后放置至室温后再次称定质量,使用 50% 乙醇补足所减失的质量,摇匀后滤过。取续滤液过 0.22 μm 微孔滤膜,作为供试品溶液。

2.2 色谱条件

色谱柱为 Agilent poroshell 120 EC- C_{18} 柱(2.1 $\times$ 100 mm, 2.7 μm);流动相为乙腈(A)-0.2% 醋酸水(B);梯度洗脱程序设定为 0~3 min, 4%~10%A; 3~5 min, 10%A; 5~7 min, 20%A; 7~11 min, 20%~25%A; 11~14 min, 25%~90%A; 14~18 min, 90%A; 18~19 min, 90%~4%A; 19~20 min, 90%~4%A。柱温为 30 $^{\circ}\text{C}$;流速为 0.7 ml/min。蒸发光散射器的参数设定雾化气温度为 40 $^{\circ}\text{C}$;漂移管温度为 90 $^{\circ}\text{C}$;氮气体积流量为 2.0 ml/min。供试品进样量为 20 μl 。混合对照品和供试品色谱图见图 1,新

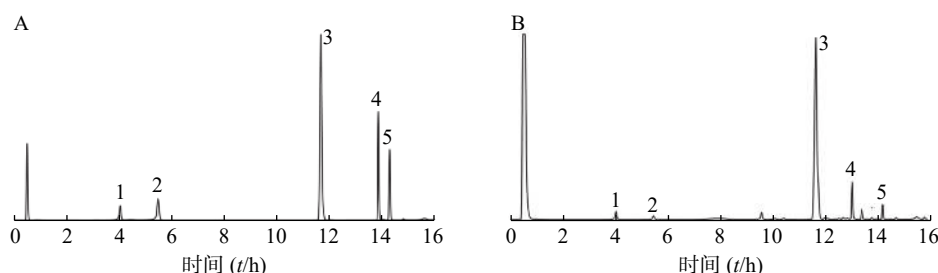


图 1 知母混合对照品(A)和样品(B)的 HPLC-ELSD 色谱图

1.新芒果苷;2.芒果苷;3.知母皂苷 B II;4.宝藿苷 I;5.知母皂苷 A III。

芒果苷、芒果苷、知母皂苷 BⅡ、宝藿苷 I、知母皂苷 AⅢ 的保留时间分别为 4.05、5.49、11.63、13.85、14.38 min, 各成分之间分离度均>1.5。

2.3 方法学考察

2.3.1 线性关系

精密量取 1.6 ml 混合对照品储备液和 0.4 ml 50% 乙醇溶液, 涡旋 30 s 混匀, 后使用 50% 乙醇依次对半稀释。按上述色谱条件进行测定, 以峰面积(A)的对数值与进样浓度(C)的对数值进行线性回归, 考察结果见表 1, 表明知母中各成分在相应的浓度范围内均呈现良好的线性关系。

表 1 知母中 5 种成分线性回归方程和线性范围

成分	回归方程	线性范围(μg/ml)	r
新芒果苷	$\lg A=1.8601 \times \lg C-1.6874$	24.1 ~ 386	0.9993
芒果苷	$\lg A=1.8445 \times \lg C-1.3955$	23.2 ~ 371	0.9986
知母皂苷 BⅡ	$\lg A=1.43 \times \lg C-0.184$	54.2 ~ 867.2	0.9956
宝藿苷 I	$\lg A=1.4974 \times \lg C+0.3364$	5.3 ~ 84.8	0.9968
知母皂苷 AⅢ	$\lg A=1.4808 \times \lg C+0.2387$	10 ~ 160	0.9989

2.3.2 精密度试验

精密吸取混合对照品 20 μl, 按上述色谱条件连续进样 6 次, 计算 5 种成分峰面积的 RSD 值, 结果显示, 新芒果苷、芒果苷、知母皂苷 BⅡ、宝藿苷 I、知母皂苷 AⅢ 的 RSD 分别为 1.3%、1.0%、0.9%、1.5%、1.0%、1.4%, 表明仪器精密度良好。

2.3.3 重复性试验

称取知母药材粉末 0.5 g, 精密称定, 平行称取 6 份, 按上述操作制备供试品溶液, 进样测定, 计算新芒果苷、芒果苷、知母皂苷 BⅡ、宝藿苷 I、知母皂苷 AⅢ 的含量分别为 1.62%、0.82%、7.36%、0.07%、0.34%, RSD 分别为 1.8%、1.8%、1.4%、2.2%、2.4%, 显示方法重复性良好。

2.3.4 稳定性试验

称取知母药材粉末 0.5 g, 按上述操作制备供试品溶液, 分别于制备后 0、2、4、6、8、12 h 进样测定, 结果显示新芒果苷、芒果苷、知母皂苷 BⅡ、宝藿苷 I、知母皂苷 AⅢ 的峰面积 RSD 分别为: 2.3%、1.3%、0.9%、3.1%、1.8%, 说明样品在 12 h 内稳定。

2.3.5 加样回收率试验

称取知母药材粉末 0.25 g, 精密称定, 平行称取 6 份, 分别加入与知母药材粉末各成分含量相近的混合对照品溶液, 按上述操作制备供试品溶液, 进样测定, 计算加样回收率。结果见表 2, 知母中

5 种成分的平均回收率为 101.8% ~ 105.0%, 表明该方法准确度良好。

表 2 知母中 5 种成分加样回收率试验结果 (n=6)

成分	原有量 (m/mg)	加入量 (m/mg)	测得量 (m/mg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
新芒果苷	4.06	4.80	9.01	103.2	101.8	1.5
	4.11	4.80	8.99	101.9		
	4.19	4.80	9.07	101.8		
	3.99	4.80	8.87	101.8		
	4.07	4.80	9.04	103.5		
	4.09	4.80	8.83	98.69		
芒果苷	2.08	2.13	4.26	102.8	102.2	2.5
	2.10	2.13	4.20	98.73		
	2.14	2.13	4.39	105.3		
	2.04	2.13	4.27	10.0		
	2.08	2.13	4.19	99.07		
	2.09	2.13	4.28	102.7		
知母皂苷 BⅡ	18.45	10.80	29.88	105.77	104.91	1.28
	18.65	10.8	29.93	104.5		
	19.04	10.80	30.59	107.0		
	18.14	10.80	29.55	105.6		
	18.50	10.80	29.65	103.2		
	18.59	10.80	29.75	103.4		
宝藿苷 I	0.17	0.21	0.39	103.4	102.0	1.8
	0.17	0.21	0.39	102.2		
	0.18	0.21	0.39	102.6		
	0.17	0.21	0.39	100.9		
	0.17	0.21	0.39	98.57		
	0.17	0.21	0.39	104.1		
知母皂苷 AⅢ	0.87	1.17	2.07	103.4	103.2	1.0
	0.88	1.17	2.07	102.7		
	0.90	1.17	2.08	101.7		
	0.86	1.17	2.05	102.5		
	0.87	1.17	2.08	104.3		
	0.88	1.17	2.09	104.7		

2.3.6 样品含量测定

称取知母药材粉末 0.5 g, 精密称定, 按上述操作进样测定, 计算各成分含量, 最终计算得新芒果苷、芒果苷、知母皂苷 BⅡ、宝藿苷 I、知母皂苷 AⅢ 的平均含量分别为 1.62%、0.82%、7.36%、0.07%、0.34%。

3 讨论

3.1 流动相系统选择

本研究首先采用乙腈-水作为流动相, 结果发

现新芒果苷、芒果苷峰形不佳,色谱峰出现分叉现象。考虑到该两种物质呈弱酸性,故采用乙腈-0.2% 醋酸水溶液作为流动相以抑制其解离,结果

显示其分叉现象消失,各峰之间的分离度良好,且基线平稳,因此最终采用乙腈-0.2% 醋酸水溶液作为最终流动相系统。结果如图 2 所示。

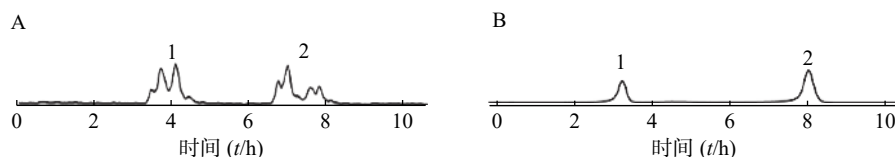


图 2 不同流动相系统对新芒果苷(1)和芒果苷(2)的影响

A. 乙腈-水; B. 乙腈-0.2% 醋酸水溶液。

3.2 氮气流速考察

流动相出色谱柱后在载气压力的作用下与雾化气体(氮气)在雾化室内混合形成细小的液滴(气溶胶),气体流量越低,形成的液滴越大,散射光越多,分析灵敏度增加,反之越小。但是较低的气体流量会造成溶剂难以蒸发,因此本研究考察了氮气流速分别为 1.5、2.0、2.5 L/min 时各待测物质的响应值,结果显示,当氮气流速为 2.0 L/min 时待测物质响应值最大,信号噪音比率最大,适合分析。

3.3 漂移管温度考察

漂移管温度的设置主要取决于流动相的构成、样品的挥发性以及流动相的流速。一般来讲,对于有机溶剂含量比例高、流速低的流动相,其要求的漂移管温度也低。本研究使用含新芒果苷 386 $\mu\text{g/ml}$ 、芒果苷 371 $\mu\text{g/ml}$ 、知母皂苷 B II 867.2 $\mu\text{g/ml}$ 、宝藿苷 I 84.8 $\mu\text{g/ml}$ 、知母皂苷 A III 160 $\mu\text{g/ml}$ 的混合对照品溶液,考察了漂移管温度分别为 80、90、100 $^{\circ}\text{C}$ 时各待测物质的响应值,结果表明当漂移管温度为 90 $^{\circ}\text{C}$ 时各物质峰面积响应值均较大,信号噪音比率最大,适合分析,因此最终漂移管温度采用 90 $^{\circ}\text{C}$ 。结果如图 3 所示。

本研究建立了一种同时测定知母药材中包括芒果苷、知母皂苷 B II 在内的 5 种活性成分含量的 HPLC-ELSD 方法。该法快速、简便、准确度高,可为知母的质量评价和质量标准的提升提供科学依据,为知母有效成分的体内动态变化研究提供测定方法。

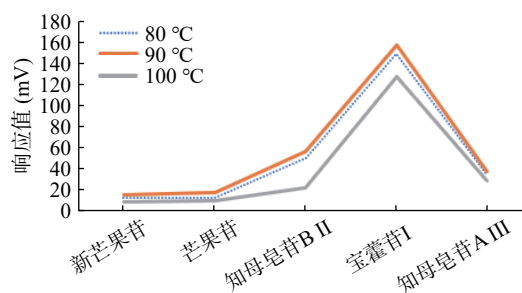


图 3 漂移管温度对待测物质响应值的影响

【参考文献】

- [1] 朱建新,李旺. 知母的研究进展[J]. 河北北方学院学报(自然科学版), 2018, 34(2): 56-60.
- [2] 蔡飞,王维泓,高守红,等. 知母皂苷及其苷元的药理作用研究进展[J]. 药学实践杂志, 2011, 29(5): 331-335.
- [3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(2020年版)一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 222.
- [4] 朱岩. HPLC-ELSD同时测定知母药材中3种主要皂苷含量[J]. 化学工程师, 2018, 32(2): 32-34, 48.
- [5] 黄彬彬. 知母化学成分的研究[D]. 长春: 吉林大学, 2015.
- [6] 钟可,王文全,靳风云,等. HPLC-ELSD法同时测定河北产地药材不同物候期知母中知母皂苷A III和知母皂苷B II的含量[J]. 中华中医药杂志, 2013, 28(6): 1710-1713.
- [7] 苏晓楠,季德,周亚萍,等. HPLC-DAD-ELSD同时测定知母中黄酮和皂苷类成分的含量[J]. 中国中药杂志, 2015, 40(1): 108-111.

【收稿日期】 2021-09-13 【修回日期】 2022-01-05

【本文编辑】 崔俐俊

(上接第 5 页)

- [42] 杨晓娟. 苦参碱通过p38/JNK信号通路对肝癌细胞增殖及凋亡的影响[D]. 兰州: 甘肃中医药大学, 2020: 1-53.
- [43] LIU J S, HUO C Y, CAO H H, et al. Aloperine induces apoptosis and G2/M cell cycle arrest in hepatocellular carcinoma cells through the PI3K/Akt signaling pathway[J]. *Phytomedicine*, 2019, 61: 152843.
- [44] WANG B, XU J, WANG H, et al. Effect and Mechanism of So-

phoridine to suppress Hepatocellular carcinoma *in vitro* and *vivo*[J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 95: 324-330.

- [45] ZHANG P P, WANG P Q, QIAO C P, et al. Differentiation therapy of hepatocellular carcinoma by inhibiting the activity of AKT/GSK-3 β /catenin axis and TGF- β induced EMT with sophocarpine[J]. *Cancer Lett*, 2016, 376(1): 95-103.

【收稿日期】 2021-05-11 【修回日期】 2021-06-22

【本文编辑】 李睿旻