

HPLC-ELSD 法测定刺蒺藜中甾体皂苷 TTS-12 含量

HPLC-ELSD method in determination of steroidal saponin TTS-12 in *Tribulus terrestris*

宣伟东, 陈海生*, 谭兴起, 徐从立

(第二军医大学药学院天然药物化学教研室, 上海 200433)

[摘要] **目的:**对刺蒺藜全草中的替告皂苷元 3-O- β -D-吡喃木糖(1 \rightarrow 2)-[β -D-吡喃木糖(1 \rightarrow 3)]- β -D-吡喃葡萄糖(1 \rightarrow 4)-[α -L-吡喃鼠李糖(1 \rightarrow 2)]- β -D-吡喃半乳糖苷(TTS-12)进行含量测定。**方法:**对刺蒺藜全草 70%乙醇提取物经前处理后采用 HPLC-ELSD 法测定 TTS-12 含量。测定条件为 C18 柱(5 mm \times 250 mm, 5 μ m), 甲醇:水=90:10(V/V)为流动相, 流速 1 ml \cdot min⁻¹; 漂移管温度:40 $^{\circ}$ C; 气体(N₂)压力:2 \times 10⁵ Pa, 进样量 20 μ l。**结果:**线性范围为 0.103 3~1.033 mg \cdot ml⁻¹, 回归方程: $\ln c = 0.669 0 \ln A - 3.058 1$ ($r = 0.999 9$), 精密度、稳定性和重现性试验的 RSD 分别为 0.15% ($n = 6$)、0.24% ($n = 9$)、1.43% ($n = 6$), 加样回收率为 95.07%, RSD 为 3.02%。刺蒺藜全草中 TTS-12 的平均含量为 0.068 94% (质量百分数)。**结论:**该法为蒺藜中甾体皂苷 TTS-12 的含量测定提供了简便、快速的方法。

[关键词] 刺蒺藜; 甾体皂苷; TTS-12; HPLC-ELSD

[中图分类号] R 282.710.3

[文献标识码] B

[文章编号] 0258-879X(2005)02-0222-02

刺蒺藜为蒺藜科蒺藜属植物蒺藜(*Tribulus terrestris* L.)的果实,为传统中药,中国药典把刺蒺藜的果实列为正品刺蒺藜供药用,其根、苗、花也有药用记载。刺蒺藜的化学成分主要有皂苷、生物碱、氨基酸和黄酮等^[1-3],其中的皂苷成分具有抗动脉硬化、强心、抗菌、抗真菌、抗肿瘤等药理活性。我们发现其中 1 个螺甾烷型皂苷具有较强的抗真菌活性,命名为 TTS-12,其化学名为:替告皂苷元 3-O- β -D-吡喃木糖(1 \rightarrow 2)-[β -D-吡喃木糖(1 \rightarrow 3)]- β -D-吡喃葡萄糖(1 \rightarrow 4)-[α -L-吡喃鼠李糖(1 \rightarrow 2)]- β -D-吡喃半乳糖苷,分子式: C₅₅H₉₀O₂₅, 相对分子质量 1 150。本文采用 HPLC-ELSD (蒸发光散射检测)法测定蒺藜全草中 TTS-12 的含量,为原药材的质量控制及 TTS-12 原料药的质量标准的建立提供方法学基础。

1 仪器和试剂

岛津 LC-10A 高效液相色谱仪; SEDEX 55 蒸发光散射检测器(法国); LXJ-II 离心沉淀机(上海医用分析仪器厂); 三锐色谱工作站(三锐科技有限公司)。原药材为河南安阳产刺蒺藜全草,经本院生药学教研室郑汉臣教授鉴定为蒺藜科蒺藜属植物蒺藜(*Tribulus terrestris* L.)。TTS-12 对照品为本教研室从刺蒺藜中分离纯化制备,纯度 > 99.6%。乙醇、甲醇、乙酸乙酯均为分析纯,水为注射用蒸馏水。

2 方法和结果

2.1 色谱条件 C18 ODS 色谱柱(5 mm \times 250 mm, 5 μ m, Dima), 柱温 25 $^{\circ}$ C; 流动相: 甲醇:水 90:10(V/V); 流速: 1 ml \cdot min⁻¹; ELSD 检测器漂移管温度: 40 $^{\circ}$ C; 气体(N₂)压力: 2 \times 10⁵ Pa, 进样量 20 μ l。TTS-12 的保留时间约为 8.9 min, 测试样品中的其他成分对 TTS-12 无干扰, 实现了较好的基线分离, 分离度 > 1.5, 理论塔板数 > 2 000, 最低检测限为 0.206 6 μ g。

2.2 对照品贮备液的配制 精密称取 TTS-12 对照品

10.33 mg, 加适量甲醇热溶, 转移至 10 ml 容量瓶, 冷却至室温后以甲醇定容即得对照品贮备液。

2.3 样品提取分离 取干燥蒺藜全草粉末 5.0 g, 精密称定, 置 100 ml 圆底烧瓶, 依次加 50、30、20 ml 70%乙醇水浴加热回流提取 3 次, 每次 1 h, 提取液用棉花过滤后, 合并滤液, 减压浓缩至干。向残留物中加入蒸馏水 10 ml, 超声使混匀, 将混悬液转移至 15 ml 离心管, 超声振荡 5 min 后以 3 000 r \cdot min⁻¹ 转速离心 20 min, 倾出上清液, 沉淀中加乙酸乙酯 10 ml, 超声振荡 5 min 后以 3 000 r \cdot min⁻¹ 离心 20 min, 倾出上清液, 沉淀中加甲醇适量, 超声使溶, 溶液转移至 10 ml 容量瓶, 加甲醇至刻度定容, 混匀后用 0.22 μ m 微孔滤膜过滤, 弃去初滤液, 取续滤液即得供试品溶液。

2.4 方法学考察

2.4.1 线性关系 精密量取对照品贮备液 0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 ml, 分别置于 5 ml 容量瓶, 加甲醇至刻度, 摇匀, 得系列对照品溶液。每个浓度的对照品溶液均进样 3 次, 以对照品浓度的自然对数值 $\ln c$ 为横坐标, 峰面积平均值的自然对数值 $\ln A$ 为纵坐标, 求得回归方程: $\ln c = 0.669 0 \ln A - 3.058 1$, $r = 0.999 9$, 显示在 0.103 3~1.033 mg \cdot ml⁻¹ 范围内呈良好的线性关系。

2.4.2 精密度与稳定性实验 取浓度为 0.206 6 mg \cdot ml⁻¹ 的对照品溶液连续进样 6 次, 计算峰面积 RSD 为 0.15% ($n = 6$)。另取同样浓度的对照品溶液, 在 16 h 内每隔 2 h 进样 1 次, 计算峰面积相对标准偏差(RSD)为 0.24% ($n = 9$), 结果表明对照品在 16 h 内稳定。

2.4.3 重现性实验 取同一批号(批号: 20021012)原药材粉末 6 份, 精密称定, 按 2.3 项下方法提取分离得供试品溶

[基金项目] 上海市科委重点项目基金(02DJ1406); 上海市科委重大项目基金(02DZ19120)。

[作者简介] 宣伟东(1971-), 男(汉族), 博士生。

* Corresponding author. E-mail: haishengc@hotmail.com