

HPLC-ELSD 法测定天冬总呋甾皂苷中 AR-I 的含量

徐从立, 陈海生, 谭兴起, 宣伟东, 梁爽

(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:**测定天冬总呋甾皂苷中 AR-I 的含量。**方法:**采用高效液相色谱法, 色谱条件: Diamonsil C₁₈ (5 mm×250 mm, 5 μm) 色谱柱; 流动相: CH₃CN-H₂O(36:64); 流速: 0.8 ml·min⁻¹; 进样量 20 μl; 柱温: 室温。以 ELSD 为检测器, 气化温度 40℃, 气体(N₂)压力 2.0×10⁵ Pa。**结果:**AR-I 在 0.094~0.940 0 g·L⁻¹ 范围内呈良好线性关系($r=0.999\ 2$), 检测具有较高的灵敏度和稳定性, 平均回收率为 101.3%($n=6$), RSD=2.36%。**结论:**HPLC-ELSD 为天冬总呋甾皂苷的测定提供了简便实用的分析方法。

[关键词] 天冬总呋甾皂苷; AR-I; 色谱法, 高效液相

[中图分类号] R 282.71 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2006)04-0427-02

HPLC-ELSD in determination of AR-I content in total furostanol saponins of *Asparagus cochinchinensis*

XU Cong-li, CHEN Hai-sheng*, TAN Xing-qi, XUAN Wei-dong, LIANG Shuang (Department of Natural Medicinal Chemistry, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[ABSTRACT] **Objective:** To determine AR-I content in total furostanol saponins of *Asparagus cochinchinensis*. **Methods:** High performance liquid chromatography (HPLC) was used and the condition was: Diamonsil C₁₈ column (5 mm×250 mm, 5 μm); mobile phase: CH₃CN-H₂O (36:64); flow rate: 0.8 ml/min; injector volume: 20 μl; column temperature: room temperature. Evaporative light scattering detector (ELSD) condition was: drift tube temperature: 40℃; and nebulizer gas pressure (N₂): 2.0×10⁵ Pa. **Results:** The linearity was good when AR-I was within the range of 0.094-0.940 0 g·L⁻¹ ($r=0.999\ 2$). The test had higher sensitivity and good stability. The average recovery was 101.3% ($n=6$) and RSD was 2.36%. **Conclusion:** HPLC-ELSD is practical and reliable for the determination of the furostanol saponins of *Asparagus cochinchinensis*.

[KEY WORDS] total furostanol saponins of *Asparagus cochinchinensis*; AR-I; chromatography, high pressure liquid

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2006, 27(4): 427-428]

天冬 (*Asparagi radix*) 为百合科 (Liliaceae) 植物天门冬 [*Asparagus cochinchinensis* (Lour.) Merr.] 的干燥块根, 为传统常用中药, 现为《中华人民共和国药典》(2005 年版) 收载品种, 其标准中尚无含量测定项目。我们在前期实验研究中发现呋甾皂苷为天冬中主要活性成分, 天冬总呋甾皂苷和部分单体化合物均具有较强的改善脑血流和降低脑血管阻力的活性^[1], 因此对天冬呋甾皂苷进行质量研究既可以为天冬药材的质量控制提供依据, 又可以为天冬进一步开发提供质量控制标准。李敏等^[2]报道了用分光光度法测定天冬中总皂苷含量的测定方法, 由于甾体皂苷紫外吸收一般较弱, 且多为末端吸收, 测定有一定的困难, 本研究采用 HPLC 法为分析方法, 选择通用型检测器-蒸发光散射检测器 (ELSD) 为检测手段对天冬总呋甾皂苷中活性化合物 AR-I [(25S)-26-O-β-D-葡萄糖吡喃糖基-5β-呋甾-20(22)-烯-3β, 26-二醇-3-O-α-L-鼠李吡喃糖基(1-4)-β-D-葡萄糖吡喃糖苷] 进行了含量测定。

1 仪器、试剂和样品

高效液相色谱仪 (LC-10A, 日本岛津)、ELSD (SEDEX 55, 法国)、SR 色谱数据工作站 (上海); 水为双蒸水, 乙腈为

色谱纯, 其余试剂为分析纯。天冬药材购自安徽亳州中药材市场 (产地为湖北黄石), 经本院生药学教研室郑汉臣教授鉴定为百合科植物天门冬的干燥块根。总呋甾皂苷按如下方法制备: 天冬药材粗粉, 以 75% 乙醇渗漉提取, 提取液减压浓缩至无乙醇味加水稀释后, 溶液经 ZTC-1 型大孔树脂柱层析, 依次以水、30% 和 80% 乙醇-水溶液洗脱, 收集 80% 乙醇-水洗脱部分, 减压回收至干得总呋甾皂苷。对照品 AR-I 由本室自制, HPLC-ELSD 法检测纯度超过 99%, 并通过光谱 (IR, ¹H NMR, ¹³C NMR, DEPT, HMBC, HMQC, TOCSY, ESI-MS) 及糖脂乙酸酯-GC 分析鉴定为: (25S)-26-O-β-D-葡萄糖吡喃糖基-5β-呋甾-20(22)-烯-3β, 26-二醇-3-O-α-L-鼠李吡喃糖基(1-4)-β-D-葡萄糖吡喃糖苷。

2 方法和结果

2.1 色谱条件 Diamonsil C₁₈ (5 mm×250 mm, 5 μm) 色谱柱 (Dikma 公司); 流动相: CH₃CN-H₂O(36:64); 流速:

[基金项目] 国家自然科学基金 (20472113)。Supported by National Natural Science Foundation of China (20472113)。

[作者简介] 徐从立, 硕士。

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

0.8 ml · min⁻¹;进样量 20 μl;柱温为室温;气化温度 40℃;气体(N₂)压力 2.0 × 10⁵ Pa。在此条件下样品中的 AR-I 达到基线分离(图 1)。理论塔板数以 AR-I 计算不低于 4 000。

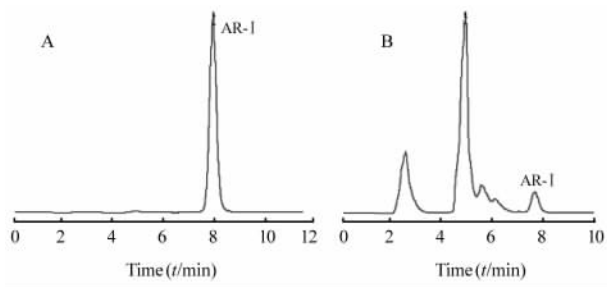


图 1 对照品(A)和样品(B)HPLC图

Fig 1 HPLC spectrum of reference standard (A) and sample(B)

2.2 溶液配制

2.2.1 对照品溶液的制备 准确称取经 P₂O₅减压干燥 48 h 的 AR-I 23.50 mg 置于 25 ml 容量瓶中,以甲醇溶解并稀释至刻度,配成浓度为 0.94 mg/ml 的溶液,精确量取 5.0、2.5、2.0、1.0、0.50 ml 放入 10 ml 容量瓶,以甲醇定容,分别配成浓度为 0.470 0、0.235 0、0.188 0、0.094、0.047 0 g · L⁻¹ 的对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备 分别称取批号为 20020825、20031102、20031108 的总皂苷 50.0 mg 置于 50 ml 容量瓶,加甲醇溶解,定容,以 0.2 μm 滤膜过滤,备用。

2.3 方法学考察

2.3.1 最低检测限 取浓度为 0.047 0 g · L⁻¹ 的标准溶液 0.1 ml 稀释至 1 ml,当信噪比约为 3 : 1 时,测定最低检测限为 9.4 × 10⁻⁵ mg。

2.3.2 线性关系 取系列标准溶液进样,记录峰面积。以峰面积的自然对数对浓度(μg · ml⁻¹)的自然对数进行回归^[1],回归方程为 lnA = 4.338 6 + 1.497 4 lnC, r = 0.999 2。线性范围:0.094 ~ 0.940 0 g · L⁻¹。

2.3.3 精密度 精密吸取浓度为 0.470 g · L⁻¹ 的标准溶液,按 2.1 项下条件测定, RSD = 0.57% (n = 6)。

2.3.4 重现性 取批号为 20020825 的总皂苷 6 份,分别按 2.2.2 项下条件制备供试品溶液,按 2.1 项下条件测定,计算含量,天冬总皂苷中 AR-I 的含量为 (5.60 ± 0.03)% , RSD = 2.3% (n = 6)。

2.3.5 稳定性 称取批号为 20020825 的总皂苷制成供试品溶液,分别于 2、8、16、24、48 h 进样,峰面积 RSD =

1.68%,表明样品溶液在 48 h 内稳定。

2.3.6 加样回收率 取已知含量为 5.60%,批号为 20020825 样品 6 份,各约 4.0 mg,分别精密加入对照品 0.235 mg,加甲醇溶解,定容至 1.0 ml,以 0.2 μm 滤膜过滤,取续滤液进样,记录峰面积,同时取浓度为 0.470 0 g · L⁻¹ 的对照品溶液,进样 20 μl 作为对照,记录峰面积,计算含量,计算回收率,平均回收率为 101.3%, RSD = 2.4% (n = 6)。

2.4 样品测定 取批号为 20020825、20031102、20031108 的供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件分析, AR-I 含量的测定结果分别为 (5.80 ± 0.12)%、(5.62 ± 0.04)%、(5.28 ± 0.11)% (n = 3)。

3 讨论

ELSD 的响应取决于被分析颗粒的数量和大小^[3],尤其对于紫外吸收较弱的化合物的测定显示较高灵敏度,近来朱德领等^[4]用 HPLC-ELSD 法测定了黄芪注射液中黄芪甲苷的含量;沈岚等^[5]用 RP-HPLC-ELSD 法测定了知母药材及含知母制剂中菝葜皂苷元的含量;汤俊等^[6]用 HPLC-ELSD 法测定了西洋参中拟人参皂苷 F₁₁ 的含量,结果均表明用 ELSD 检测基线稳定,重现性和灵敏度均较好。

由于本实验所测定的呋甾皂苷类化合物只有较弱的紫外吸收,紫外检测器难以准确定量分析,因此本研究采用 ELSD 为检测器,对天冬总皂苷中活性化合物 AR-I 进行了测定。结果表明,本方法对紫外吸收较弱的天冬总皂苷的测定具有回收率良好,稳定性、灵敏度和重现性较高,分析快速的优点。

[参考文献]

[1] 陈海生,刘建国,徐从立.天冬中总皂苷皂苷制备方法及其用于制备心脑血管药物的用途[P].中国专利:200410018180.2.
 [2] 李敏,费曜,李丽霞,等.天冬中总皂苷含量测定方法的探讨[J].成都中医药大学学报,2004,27:46-48.
 [3] 冯埃生,邹汉法.影响高效液相色谱/挥发激发光散射检测器检测性能基本因素的考察[J].药物分析杂志,1996,16:414-417.
 [4] 朱德领,毛黎静,杨根元.HPLC-ELSD法测定黄芪注射液中黄芪甲苷的含量[J].中国中药杂志,2003,28:778-779.
 [5] 沈岚,朱沪平,宋崎,等.RP-HPLC-ELSD法测定知母药材及含知母制剂中菝葜皂苷元的含量[J].中草药,2001,32:889-891.
 [6] 汤俊,鲁静.应用HPLC/ELSD法测定西洋参中拟人参皂苷F₁₁的含量[J].药物分析杂志,1999,19:241-243.

[收稿日期] 2005-12-20

[修回日期] 2006-03-07

[本文编辑] 尹茶