

知母中菝葜皂苷元前处理方法探讨

朱东亮,李翔,娄子洋,董昕,柴逸峰*

(第二军医大学药学院药物分析学教研室,上海 200433)

[摘要] **目的:**对《中国药典》2005 版一部中知母药材的菝葜皂苷元含量测定的前处理条件进行改进。**方法:**采用 $L_9(3^3)$ 正交设计表,对超声时间、提取溶剂乙醇的比例以及超声次数等因素进行优化。为确保色谱方法的沿用性,还做了加样回收率考察。**结果:**最终确立了 70% 乙醇超声 20 min 提取 2 次作为最优的提取条件,再进行水解得到皂苷元进行含量测定。**结论:**与药典方法比较,改进后的方法测定的含量结果有了较大提高,能够反映出样品中真实的菝葜皂苷元含量。

[关键词] 知母;菝葜皂苷元;提取法

[中图分类号] R 284.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2006)07-0790-02

Pretreatment of sarsasapogenin in *Rhizoma Anemarrhenae*: a research of methodology

ZHU Dong-liang, LI Xiang, LOU Zi-yang, DONG Xin, CHAI Yi-feng* (Department of Drug Analysis, School of Pharmacy Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[ABSTRACT] **Objective:** To improve the pretreatment method described in ChP (2005 Edition, Vol I) for the determination of sarsasapogenin in *Rhizoma Anemarrhenae*. **Methods:** According to orthogonal design $L_9(3^3)$, the extraction time, alcohol concentration, extraction frequency, etc. were modified to achieve the best extraction outcome with ultrasonic wave extraction. **Results:** The optimal extraction condition included 70% alcohol and twice ultrasonic wave extraction, 20 min each time. Finally hydrolization was applied to obtain sarsasapogenin for determination. **Conclusion:** Compared with the pretreatment method in ChP, this improved extraction method shows a higher sarsasapogenin content in determination and is more accurate in reflecting the true content of sarsasapogenin in *Rhizoma Anemarrhene*.

[KEY WORDS] *Rhizoma Anemarrhene*; sarsasapogenin; extraction

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2006, 27(7): 790-791]

《中国药典》2005 版一部中知母(*Anemarrhena asphodeloides* Bge.)的含量测定,以菝葜皂苷元作为指标成分,采用高效液相色谱法,蒸发光散射检测方式进行测定^[1],笔者在实验中发现药典方法中药材的前处理中存在的不合理,没有充分提取药材中的菝葜皂苷元,有待进一步改进。本研究主要对知母药材中菝葜皂苷元的提取方法进行考察和改进。

1 仪器和试剂

WATERS 510 双泵(美国 WATERS);7725i 手动进样器(美国 RHEODYNE);SEDEX 75 型蒸发光散射检测器(法国 SEDRE);Sr3dv 色谱数据工作站(上海军锐)。

知母药材由本校药学院生药学教研室陈万生副教授分别采集自安徽亳州、山东济南、湖南长沙和浙江温州,通过鉴定均为百合科植物知母的干燥根茎,并按照《中国药典》2005 版一部要求干燥,切片,粉碎并过 3 号筛。菝葜皂苷元购自中国药品生物制品检定所(批号:0744-990)。乙醇、乙腈均为色谱纯,水为纯净水。

2 方法和结果

2.1 色谱条件 采用《中国药典》2005 版方法^[1]。

2.2 提取方法改进

2.2.1 正交实验设计 采用超声波提取,选取对超声提取有影响的 3 个因素,即超声时间(A)、乙醇比例(体积比)(B)以及提取次数(C),每个因素选择了 3 个水平,采用 $L_9(3^3)$ 正交表进行正交实验设计。

2.2.2 样品液的制备与测定 精密称取药材粉末 0.5 g,置 25 ml 量瓶中,按正交设计方案加入不同比例的乙醇适量,超声提取,用少量乙醇洗涤残渣,合并提取液并过滤,精密量取续滤液 10 ml,水浴蒸干,加水 10 ml,盐酸 1 ml,水浴回流 2 h,冷至室温,用氯仿萃取 2 次,每次 30 ml,合并氯仿提取液,蒸干,残渣加甲醇溶解,转移至 10 ml 量瓶中,并稀释至刻度,摇匀,即得。按“2.1 色谱条件”项下试验,进样 20 μ l,外标曲线法计算菝葜皂苷元的含量。

以菝葜皂苷元的含量作为指标成分,优选提取条件,测定结果见表 1,方差分析结果见表 2,3 个因素对提取结果影

[基金项目] 上海市科委重大项目(2403DZ19548);上海市科委科技攻关项目(02419125)。Supported by Key Program of Shanghai Science and Technology Committee(2403DZ19548), Grants for Tackling Key Program of Shanghai Science and Technology Committee(02419125)。

[作者简介] 朱东亮,硕士。

* Corresponding author. E-mail: YfChai2003c@163.com

响大小的顺序为 $B > C > A$, 其中 B 是影响提取结果的主要因素。最佳的提取条件为: $A_2 B_2 C_2$, 即 70% 乙醇超声提取 2 次, 每次 20 min。方差分析结果表明: 乙醇浓度对结果影响最为显著 ($P < 0.05$)。

表 1 正交实验结果

Tab 1 Results of orthogonal experimental design

No.	Extraction time (A, t/min)	Ethanol% (B, V/V, %)	Extraction frequency (C)	Content of sarsasapogenin (mg/g)
1	1(10)	1(40)	1(1)	1.19
2	1	2(70)	2(2)	2.06
3	1	3(95)	3(3)	1.37
4	2(20)	1	2	1.85
5	2	2	3	2.21
6	2	3	1	0.94
7	3(30)	1	3	1.33
8	3	2	1	1.62
9	3	3	2	1.13
T1k	4.62	4.37	3.75	-
T2k	5.00	5.89	5.04	-
T3k	4.08	3.44	4.91	-
R	0.92	2.45	1.29	-

表 2 方差分析表

Tab 2 Analysis of variance

Source	Sum of Squares	f	Mean Square	F	P
Extraction time(A)	0.116	2	0.058	1.930	> 0.05
Ethanol%(B)	1.363	2	0.682	22.710	< 0.05
Extraction frequency(C)	0.104	2	0.052	1.738	> 0.05
R	0.060	2	0.030	-	-

2.3 加样回收率试验 精密称取知母药材粉末 5 份各 0.5 g, 分别精密加入菝葜皂苷元对照品, 按供试液制备方法制备得 5 个加样回收的样品溶液。分别在上述色谱条件下进行检测。实验测得平均加样回收率为 106.4%, $RSD = 2.61\%$ ($n = 5$)。

2.4 2 种方法测定结果比较 取 4 个产地的知母药材, 分别按上述供试液制备方法和《中国药典》2005 版一部知母前处理方法制备样品溶液, 色谱条件同前, 测定结果见表 3。

3 讨论

药典前处理方法: 取本品粉末(过 3 号筛)约 0.5g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加乙醇 25 ml, 称定质量, 浸泡过夜, 超声处理(功率 200 W, 频率 30 kHz)40 min, 放冷, 再称定质量, 用乙醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过; 精密量取续滤

表 3 样品含量测定结果

Tab 3 Result of sarsasapogenin contents determination

(n=3, $\bar{x} \pm s$, mg/g)

Source of <i>Rhizoma Anemarrhenae</i>	Method in ChP	Improved method
Anhui Bozhou	0.93±0.11	1.32±0.09
Shandong Ji'nan	1.86±0.13	2.35±0.14
Hu'nan Changsha	1.12±0.13	2.18±0.19
Zhejiang Wenzhou	1.54±0.17	2.95±0.18

液 10 ml, 置水浴中蒸尽乙醇, 加水 10 ml, 盐酸 1 ml, 置水浴中回流 2 h, 取出, 冷至室温, 边振荡边滴加 40% 氢氧化钠溶液至溶液颜色由橙黄突变为橙红, 用氯仿萃取 2 次, 每次 30 ml, 合并氯仿提取液, 蒸干, 残渣加甲醇溶解, 转移至 10 ml 量瓶中, 并稀释至刻度, 摇匀, 即得。

知母药材中菝葜皂苷元并不是最主要的存在形式^[2~4], 通常与糖结合形成皂苷, 单纯采用乙醇为提取溶剂, 采用超声方法提取皂苷类成分, 难以提取完全^[5]。本文为优化提取条件进行了正交设计, 得到的最优的提取方法为 70% 乙醇超声 20 min 2 次提取知母皂苷, 再用水解方式得到苷元, 可以充分提取出菝葜皂苷元。

加样回收率试验结果表明, 改进后的方法可以继续沿用药典中的色谱条件, 准确性能够得到保证。

本法简化了药典方法, 删减了 40% 氢氧化钠调节 pH 值的步骤, 对含量测定结果并无影响。

从 4 个产地的知母药材含量测定结果看出, 采用改进后方法提取菝葜皂苷元, 可以更好地反映药材中菝葜皂苷元的真实含量。

[参考文献]

- [1] 中华人民共和国药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[S]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 148.
- [2] 陈万生, 刘垣升, 乔传卓, 等. 不同产地知母的化学成分及萨尔萨皂苷元的含量[J]. 第二军医大学学报, 1997, 18: 84-86.
- [3] 沙东旭, 陈桂范, 张满来. 高效液相色谱-蒸发光散射检测法测定知母中菝葜皂苷元的含量[J]. 药物分析杂志, 2005, 25: 952-954.
- [4] 廖洪利, 王伟新, 赵福胜, 等. 知母化学成分研究进展[J]. 药学实践杂志, 2005, 23: 12-14.
- [5] 韩丽萍, 赵树进, 李俭洪. 大孔树脂法提取知母总皂苷[J]. 中药材, 2004, 27: 288-289.

[收稿日期] 2006-04-21

[修回日期] 2006-05-25

[本文编辑] 尹 茶