

DOI:10.3724/SP.J.1008.2012.00549

• 研究快报 •

加速溶剂萃取-HPLC-TOF/MS 法同时测定重楼中 6 种甾体皂苷类成分

王本伟, 赵亮, 张海, 吕磊, 李悦悦, 张国庆*

第二军医大学东方肝胆外科医院药材科, 上海 200438

[摘要] **目的** 引入加速溶剂萃取(accelerated solvent extraction, ASE)技术,并结合 HPLC-TOF/MS 法同时测定重楼中 6 种甾体皂苷类成分的含量。**方法** 加速溶剂萃取仪在 120℃、1.17 MPa (1 700 psi)压力下,用 70% 的乙醇静态萃取样品 6 min;6 种重楼皂苷的含量用 HPLC-TOF/MS 同时测定,色谱柱: MGC₁₈ 柱(3.0 mm×100 mm, 3.0 μm);流动相: 乙腈与 0.1% (V/V)甲酸水,梯度洗脱;流速: 0.8 ml/min;柱温: 25℃;进样量: 3 μl;离子源: ESI 正离子模式;雾化气压力: 275.85 kPa(40 psi);干燥气流速: 10 L/min;干燥气温度: 350℃。**结果** 重楼皂苷 I、重楼皂苷 II、重楼皂苷 VI、重楼皂苷 VII、薯蓣皂苷和纤细薯蓣皂苷的线性范围(μg/ml)分别为: 0.500 0~50.00($r=0.999\ 8$)、0.422 3~42.23($r=0.999\ 7$)、0.612 0~61.20($r=0.999\ 9$)、0.714 0~71.40($r=0.999\ 5$)、0.448 0~44.80($r=0.999\ 9$)和 0.436 0~43.60($r=0.999\ 7$);各成分的平均回收率($n=6$)分别为 98.9%、98.0%、102.5%、101.9%、103.1%和 97.9%。**结论** 该法溶剂消耗少、耗时短、便于自动化,可实现高通量分析,可用于重楼中皂苷类成分的含量测定。

[关键词] 重楼;甾体皂苷;加速溶剂萃取;高效液相飞行时间质谱

[中图分类号] R 927.2 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2012)05-0549-04

Simultaneous determination of 6 steroidal saponins in *Paris Polyphylla* by accelerated solvent extraction-HPLC-TOF/MS

WANG Ben-wei, ZHAO Liang, ZHANG Hai, LÜ Lei, LI Yue-yue, ZHANG Guo-qing*

Department of Pharmacy, Eastern Hepatobiliary Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438, China

[Abstract] **Objective** To introduce an accelerated solvent extraction (ASE) -HPLC-TOF/MS method for simultaneous determination of Polyphyllin I, Polyphyllin II, Polyphyllin VI, Polyphyllin VII, Dioscin and Gracillin in *Paris Polyphylla*. **Methods** The extraction was performed by ASE under the following conditions: extracting solvent 70% ethanol; extracting temperature 120℃; pressure 1.17 MPa (1 700 psi); and static time 6 min. The separation was carried out on a MGC₁₈ column (3.0 mm×100 mm, 3.0 μm). Elution was done with a linear gradient mobile phase system consisting of 0.1% formic acid (V/V) water and acetonitrile. The flow rate was set at 0.8 ml/min, the sample injection volume was 3 μl, the column temperature was kept constant at 25℃, nebulizer gas pressure was 275.8 kPa (40 psi), drying gas flow rate was 10 L/min, and gas temperature was 350℃. **Results** The calibration curves for Polyphyllin I, Polyphyllin II, Polyphyllin VI, Polyphyllin VII, Dioscin and Gracillin were linear within the range of 0.500 0-50.00 μg/ml ($r=0.999\ 8$), 0.422 3-42.23 μg/ml ($r=0.999\ 7$), 0.612 0-61.20 μg/ml ($r=0.999\ 9$), 0.714 0-71.40 μg/ml ($r=0.999\ 5$), 0.448 0-44.80 μg/ml ($r=0.999\ 9$) and 0.436 0-43.60 μg/ml ($r=0.999\ 7$), respectively; and the average recoveries ($n=6$) were 98.9%, 98.0%, 102.5%, 101.9%, 103.1% and 97.9%, respectively. **Conclusion** The introduced method is solvent-saving and time-saving; it can also be used for high-throughput analysis and determination of steroidal saponins in *Paris Polyphylla*.

[Key words] *Paris Polyphylla*; steroidal saponins; accelerated solvent extraction; HPLC-TOF/MS

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2012, 33(5): 549-552]

中药重楼为百合科植物云南重楼 *Paris polyphylla* Smith Var. *yunnanensis* (Franch.) Hand-Mazz 或七叶一枝花 *Paris polyphylla* Smith Var. *chinensis* (Franch.) Hara 的干燥根茎^[1]。以蚤休之名始载于《神农本草经》,为我国南方地区少

数民族常用的中草药之一^[2],苦,微寒,有小毒,归肝经,具有清热解毒、消肿止痛、凉肝定惊之功效,临床上主要用于治疗毒蛇咬伤、惊风抽搐、跌打损伤等^[1]。现代药理研究表明重楼还具有良好的抗肿瘤、抗炎、免疫调节等作用^[3]。一般认为甾体皂苷为

[收稿日期] 2012-02-13 [接受日期] 2012-03-19

[作者简介] 王本伟, 硕士. E-mail: wangweistcm@126.com

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 021-81875571, E-mail: gqzhang@smmu.edu.cn

其主要活性成分。有关重楼皂苷的定量研究已有报道,但主要采用的都是常规的超声法、回流提取法等,普遍存在着溶剂消耗多、耗时长等缺点^[4-5]。因此有必要寻求一种新的前处理方法,从根本上解决传统方法所不能解决的难题。加速溶剂萃取(accelerated solvent extraction, ASE)是早在1995年提出的一种在高温、高压的条件下从基质中提取分析物的自动萃取技术。高温能增加目标物在溶剂中的溶解度,同时也能降低溶剂的黏度,有利于溶剂分子向基质扩散,提高了目标物的溶出率;高压能提高溶剂的沸点,使溶剂在高于正常沸点的温度下仍处于液体状态^[6-7]。ASE的整个过程都处于密闭的环境,避免了有机溶剂对环境的污染和对人体的危害;且具有提取效率高、溶剂消耗少、耗时短和便于自动化等优点。因此,本研究引入了ASE,并结合高灵敏度的HPLC-TOF/MS法对中药重楼中6种甾体皂苷类成分进行系统研究。

1 仪器和试剂

1.1 仪器 ASE350加速溶剂萃取仪(美国Dionex公司);Agilent 1100 HPLC液相色谱仪,包括四元泵、自动进样器、柱温箱和Masshunt色谱工作站(美国Agilent);Agilent 6220飞行时间质谱仪(美国Agilent公司);MGC₁₈色谱柱(3.0 mm×100 mm, 3.0 μm);电子天平(美国梅特勒公司);DFT-200粉碎机(浙江温岭市林大机械有限公司);力康超纯水净化仪。

1.2 试剂 重楼药材购于云南和四川,经第二军医大学药学院生药学教研室孙莲娜副教授鉴定为百合科植物云南重楼 *Paris polyphylla* Smith Var. *yunnanensis* (Franch.) Hand-Mazz 或七叶一枝花 *Paris polyphylla* Smith Var. *chinensis* (Franch.) Hara 的干燥根茎;标准品重楼皂苷 I、重楼皂苷 II、重楼皂苷 VI、重楼皂苷 VII、薯蓣皂苷、纤细薯蓣皂苷和木通皂苷(内标)均购于中国药品生物制品检定所,纯度均大于98%;乙腈为色谱纯;水为超纯水;其他试剂为分析纯。

2 方法和结果

2.1 ASE 条件 萃取温度:120℃;压力:1.17 MPa (1 700 psi);静态萃取时间:6 min;循环次数:1次;冲洗体积:70%;氮气吹扫时间:60 s;萃取溶剂:70%乙醇;萃取池:10 ml。

2.2 HPLC-TOF/MS 条件 色谱柱:MGC₁₈柱(3.0 mm×100 mm,3.0 μm);流动相:乙腈(A)与

0.1%(V/V)甲酸水(B);洗脱梯度:0~5 min, 20%~30% A;5~15 min,30%~41% A;15~20 min,41%~45% A;20~25 min,45%~50% A。流速:0.8 ml/min;柱温:25℃;进样量:3 μl;离子源:ESI正离子模式;雾化气压力:275.8 kPa(40 psi);干燥气流速:10 L/min;干燥气温度:350℃;毛细管电压:4 000 V;碎片电压:180 V;质谱扫描范围:m/z 400~1 100。离子流图见图1。

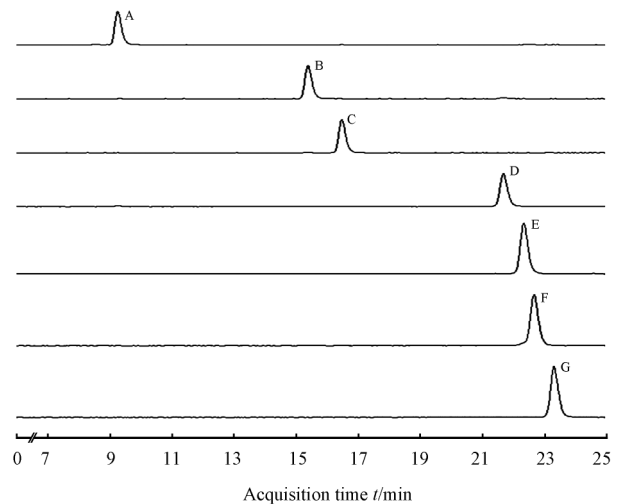


图1 内标及6种重楼皂苷的提取离子流图

Fig 1 Extract ion current chromatograms of 6 steroidal saponins and internal standard

A: Akeboside D (internal standard); B: Polyphyllin VII; C: Polyphyllin VI; D: Polyphyllin II; E: Polyphyllin I; F: Dioscin; G: Gracillin

2.3 标准品溶液的制备 精密称取重楼皂苷 I 2.50 mg、重楼皂苷 II 1.21 mg、重楼皂苷 VI 3.06 mg、重楼皂苷 VII 3.57 mg、薯蓣皂苷 2.24 mg 和纤细薯蓣皂苷 2.18 mg,置10 ml量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀备用。精密称取木通皂苷(内标) 5.96 mg,置25 ml量瓶中,加甲醇溶解至刻度,备用。

2.4 供试品溶液的制备 精密称取重楼药材粉末(20~40目)1.0 g,置10 ml不锈钢的萃取池(下端加装纤维滤膜)中,把萃取池放在固定装置上,设置提取参数(包括静态萃取时间、萃取温度、循环次数和冲洗体积等),然后用70%的乙醇进行ASE,萃取液置50 ml量瓶中,用70%的乙醇定容至刻度,最后过0.22 μm的微孔滤膜,取续滤液作为供试品溶液。

2.5 标准曲线的制备 分别精密吸取2.3项下的储备液,配制成系列混合对照品溶液,按上述HPLC-TOF/MS条件,连续进样7次,记录峰面积。以标准品和内标的浓度之比(X)为横坐标,峰面积之比(Y)为纵坐标,进行线性回归。回归方程见表1。

2.6 精密度试验 分别取 6 种重楼皂苷高、中、低 3 种浓度的标准溶液, 在 2.2 项下所列条件下, 24 h 内连续进样 5 次, 考察日内精密度 (RSD); 连续检测 3 d, 考察日间 RSD。结果见表 2。

表 1 回归方程结果

Tab 1 Results of regression equation

Component	Regression equation	Linear range $\rho_B/(\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1})$	r
1	$Y=1.211X-0.00619$	0.500 0-50.00	0.999 8
2	$Y=0.6979X-0.02910$	0.422 3-42.23	0.999 7
3	$Y=1.062X-0.04121$	0.612 0-61.20	0.999 9
4	$Y=0.8323X-0.1740$	0.714 0-71.40	0.999 5
Dioscin	$Y=0.9566X-0.01780$	0.448 0-44.80	0.999 9
Gracillin	$Y=1.642X-0.06937$	0.436 0-43.60	0.999 7

 $n=7$

1: Polyphyllin I; 2: Polyphyllin II; 3: Polyphyllin VI; 4: Polyphyllin VII

表 2 精密度试验结果

Tab 2 Results of precision test

Component	Concentration $\rho_B/(\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1})$	Intra-day RSD ($n=5, \%$)	Inter-day RSD ($n=3, \%$)
Polyphyllin I	50	2.4	2.0
	5	2.3	2.9
	0.5	2.2	3.2
Polyphyllin II	42.2	2.8	2.1
	4.22	2.8	2.4
	0.422	2.6	2.4
Polyphyllin VI	61.2	1.4	2.0
	6.12	2.6	1.6
	0.612	2.5	2.6
Polyphyllin VII	71.4	0.9	1.5
	7.14	1.6	2.0
	0.714	2.0	3.6
Dioscin	44.8	2.4	1.0
	4.48	2.5	2.7
	0.448	3.5	2.4
Gracillin	43.6	1.8	1.0
	4.36	2.2	2.8
	0.436	2.2	3.5

RSD: Relative standard deviation

2.7 稳定性试验 取同一份供试品溶液分别于 0、6、12、24、30、36 和 48 h 重复进样, 测得 6 种重楼皂苷的 RSD 值分别为 1.3%、2.4%、2.2%、1.7%、1.9% 和 2.7%, 表明供试品溶液在 48 h 内稳定性良好。

2.8 检测限和定量限 将重楼皂苷标准品溶液进行逐级稀释, 以信噪比 $S/N=10$ 确定其最低定量限; 以信噪比 $S/N=3$ 确定其最低检测限。6 种重楼皂苷的最低定量限分别为 0.066 67、0.056 31、0.081 60、0.095 20、0.059 73 和 0.058 13 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 最低检测限分别为 0.025 00、0.033 79、0.024 48、0.057 12、0.035 84 和 0.043 60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

2.9 重复性试验 取同一批重楼药材粉末按 2.4 项下提取方法平行制备供试品溶液 7 份, 在上述 HPLC-TOF/MS 条件下测定。6 种重楼皂苷的平均含量分别为 2.563、1.943、8.405、3.841、1.201 和 0.972 8 $\mu\text{g}/\text{mg}$; RSD 值分别为 2.0%、3.4%、2.2%、2.8%、1.9% 和 3.2%。结果表明所优选的提取方法具有较高的可靠性和重现性。

2.10 回收率试验 精密称取已知含量的重楼药材粉末 6 份, 每份约 1.0 g, 置 10 ml 不锈钢萃取池中, 分别精密加入 6 种重楼皂苷标准品, 按 2.4 项下制备供试品溶液, 在上述液-质条件下分别测定重楼皂苷 I、重楼皂苷 II、重楼皂苷 VI、重楼皂苷 VII、薯蓣皂苷和纤细薯蓣皂苷的含量, 6 种重楼皂苷的平均回收率为 98.9%、98.0%、102.5%、101.9%、103.1% 和 97.9%, RSD 值分别为 1.2%、1.7%、2.6%、1.8%、1.0% 和 1.8%。

2.11 样品测定 分别取云南和四川两个产地共 5 个批次的重楼药材粉末约 1.0 g, 精密称定, 按 2.4 项下制备供试品溶液, 在上述液-质条件下分别测定重楼皂苷 I、重楼皂苷 II、重楼皂苷 VI、重楼皂苷 VII、薯蓣皂苷和纤细薯蓣皂苷的含量, 发现 2 个批次药材 (090824, 110913) 符合《中华人民共和国药典》(2010 年版) 中重楼作为药用的标准, 结果见表 3。

表 3 样品含量测定结果

Tab 3 Results of sample determination

 $m_B/(\mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}), n=3, \bar{x} \pm s$

Batch number	Source	Polyphyllin I	Polyphyllin II	Polyphyllin VI	Polyphyllin VII	Dioscin	Gracillin
090824	Yunnan	2.395 ± 0.031	1.482 ± 0.033	8.379 ± 0.182	3.788 ± 0.062	1.304 ± 0.023	0.826 ± 0.024
110219	Yunnan	0.453 ± 0.011	0.332 ± 0.009	0.082 ± 0.001	1.003 ± 0.010	0.280 ± 0.007	0.147 ± 0.003
110731	Yunnan	0.276 ± 0.006	0.195 ± 0.004	0.024 ± 0.001	0.984 ± 0.015	0.210 ± 0.002	0.257 ± 0.002
2009050072	Sichuan	0.319 ± 0.010	0.252 ± 0.006	0.039 ± 0.001	0.632 ± 0.023	0.094 ± 0.002	0.137 ± 0.005
110913	Sichuan	7.020 ± 0.202	1.475 ± 0.036	0.136 ± 0.002	0.973 ± 0.019	2.637 ± 0.071	10.110 ± 0.280

3 讨论

3.1 ASE 提取参数的优化 由于影响 ASE 的因素很多,选择合理的提取工艺参数显得尤为重要。本研究选择对实验结果影响较大的 4 个参数(萃取温度、静态萃取时间、冲洗体积和循环次数)进行四因素三水平 $L_9(3^4)$ 的正交试验设计(表 4),并以《中华人民共和国药典》(2010 年版)中规定的 4 种重楼皂苷的含量为指标,来优选最佳试验参数。最终优选出的最佳试验条件为 $A_3B_1C_3D_1$,即萃取温度为 120℃,静态萃取时间 6 min,冲洗体积 70%,循环次数 1 次。

表 4 正交试验设计及其结果

Tab 4 Factors and levels of the orthogonal test and its results

No.	A $\theta/^\circ\text{C}$	B t/min	C (%)	D	Extraction ratio of four Paris saponins ($n=3, \bar{x}\pm s, \%$)
1	1(80)	1(6)	1(50)	1(1)	1.562±0.031
2	1	2(8)	2(60)	2(2)	1.408±0.026
3	1	3(10)	3(70)	3(3)	1.464±0.032
4	2(100)	1	2	3	1.522±0.032
5	2	2	3	1	1.420±0.022
6	2	3	1	2	1.339±0.013
7	3(120)	1	3	2	1.625±0.015
8	3	2	1	3	1.598±0.030
9	3	3	2	1	1.421±0.028
K_1	5.543	5.887	5.625	5.504	
K_2	5.351	5.532	5.438	5.465	
K_3	5.805	5.281	5.637	5.430	

A: Temperature; B: Static time; C: Rinse volume; D: Cycles

3.2 色谱柱的选择 本实验选择了 Agilent XDB C_{18} 柱(4.6 mm×150 mm, 5.0 μm)、Agilent XDB C_8 柱(4.6 mm×150 mm, 5.0 μm)和 MGC $_{18}$ 柱(3.0 mm×100 mm, 3.0 μm)进行了预实验,发现 MGC $_{18}$ 柱不但具有很好的分离度和柱效,而且还能明显缩短分析时间,6 种重楼皂苷在 25 min 内均能完全出峰,并具有好的分离度。因此最终选择 MG C_{18} 柱作为实验用色谱柱。

3.3 流动相的选择 分别用甲醇-0.1%甲酸水、乙腈-水和乙腈-0.1%甲酸水进行了流动相选择试验。结果表明甲醇-0.1%甲酸水洗脱能力较弱,分析时间明显延长;乙腈-水洗脱出峰的分离度和对称性较差;而乙腈-0.1%甲酸水为流动相能够获得良好的分离度和对称性。因而最终选择乙腈-0.1%甲酸水为流动相进行梯度洗脱。

3.4 质谱条件的优化 本实验对 ESI 源正负离子模式分别进行监测,发现正离子模式具有很好的质谱响应;同时也考察了不同的雾化气压力、干燥气流

速和碎片电压对实验结果的影响。结果表明:雾化气压力为 275.8 kPa(40 psi),干燥气流速为 10 L/min,碎片电压为 180 V 时,质谱信号最好。

3.5 HPLC-TOF/MS 联用 中药重楼是个非常复杂的体系,很多组分在色谱柱上具有相似的保留行为,紫外检测不能满足对分离度的要求,而且重楼皂苷的紫外吸收也比较弱,用 DAD 检测器会降低灵敏度,而 TOF/MS 在分析复杂体系具有明显的优势,分析速度也非常快,能够满足对多组分的同时分析。本研究采用 HPLC-TOF/MS 法同时测定重楼药材中 6 种甾体皂苷类成分,获得满意结果。

本实验基于 ASE-HPLC-TOF/MS 建立了一整套中药的提取分离分析方法,并对 5 个批次的重楼药材中 6 种重楼皂苷类成分进行了含量测定,该法溶剂消耗少、分析速度快、分离度好、便于自动化,能够同时测定重楼皂苷 I、重楼皂苷 II、重楼皂苷 VI、重楼皂苷 VII、薯蓣皂苷和纤细薯蓣皂苷的含量。通过对 5 个批次的重楼药材进行检测,发现其品质存在很大的差异,仅有 2 批次药材符合《中华人民共和国药典》(2010 年版)中重楼作为药用的标准。该法可以为制定新的重楼药材质量标准提供借鉴。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 一部. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 243-244.
- [2] 刘圆, 张浩. 中国民族药物学概论[M]. 成都: 四川民族出版社, 2007: 246-250.
- [3] 周宜强, 范竹雯, 杨建宇. 抗癌中草药[M]. 北京: 化学工业出版社, 2008: 186-188.
- [4] Zhang T, Liu H, Liu X T, Xu D R, Chen X Q, Wang Q. Qualitative and quantitative analysis of steroidal saponins in crude extracts from *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* and *P. polyphylla* var. *Chinensis* by high performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry[J]. J Pharm Biomed Anal, 2010, 51: 114-124.
- [5] Man S, Gao W, Zhang Y, Wang J, Zhao W, Huang L, et al. Qualitative and quantitative determination of major saponins in *Paris* and *Trillium* by HPLC-ELSD and HPLC-MS/MS[J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2010, 878: 2943-2948.
- [6] Bruce E R, Brian A J, John L E, Nathan L P. Accelerated solvent extraction: a technique for sample preparation[J]. Anal Chem, 1996, 68: 1033-1039.
- [7] Lou X W, Hans G J, Carel A C. Parameters affecting the accelerated solvent extraction of polymeric samples[J]. Anal Chem, 1997, 69: 1598-1603.

[本文编辑] 尹茶