

HPLC-ELSD法测定黑种草总皂苷提取物中黑种草皂苷A的含量^Δ

蔡晓翠*,贺金华,赵 军,徐 芳#,戎晓娟,毛 艳(新疆维吾尔自治区药物研究所,乌鲁木齐 830004)

中图分类号 R284.1;R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)23-2158-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.23.16

摘要 目的:建立测定黑种草总皂苷提取物中黑种草皂苷A含量的方法。方法:采用高效液相色谱-蒸发光散射检测器(HPLC-ELSD)法。色谱柱为Cosmosil C₁₈(250 mm×4.6 mm,5 μm),流动相为乙腈-水(梯度洗脱),流速为1.0 ml/min,柱温为30 ℃,进样量为10 μl,ELSD的漂移管温度为65 ℃,气体流速为2.0 L/min。结果:黑种草皂苷A的质量浓度在0.183~2.562 mg/ml范围内与其峰面积积分值呈良好的线性关系($r=0.999\ 0$);精密度、稳定性、重复性试验的RSD均<2%;平均加样回收率为99.93%,RSD=1.60%($n=6$)。结论:该方法操作简便、重复性好、准确性高,可用于黑种草总皂苷提取物中黑种草皂苷A的含量测定。

关键词 黑种草总皂苷提取物;黑种草皂苷A;含量测定;高效液相色谱-蒸发光散射检测器法

Content Determination of Nigeglanoside A in Total Saponin Extract of *Nigella glandulifera* by HPLC- ELSD

CAI Xiao-cui, HE Jin-hua, ZHAO Jun, XU Fang, RONG Xiao-juan, MAO Yan(Xinjiang Uygur Autonomous Region Institute of Materia Medica, Urumqi 830004, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the determination of nigeglanoside A in total saponin extract of *Nigella glandulifera*. METHODS: HPLC-ELSD method was adopted. The separation was performed on Cosmosil C₁₈(250 mm×4.6 mm,5 μm) column with mobile phase consisted of acetonitrile-water (gradient elution) at the flow rate of 1.0 ml/min. The column temperature was 30 ℃ and injection volume was 10 μl. The drift tube temperature of ELSD was set at 65 ℃ with the flow rate of 2.0 L/min. RESULTS: The linear range of nigeglanoside A were 0.183-2.562 mg/ml($r=0.999\ 0$) with an average recovery of 99.93% (RSD=1.60%, $n=6$). RSDs of precision, stability and reproducibility tests were all lower than 2%. CONCLUSIONS: The method is simple, reproducible and accurate, and it can be used for the content determination of nigeglanoside A in total saponin extract of *N. glandulifera*.

KEY WORDS Total saponin extract of *Nigella glandulifera*; Nigeglanoside A; Content determination; HPLC-ELSD

黑种草子^[1],又名赛拉纳赫布、赛拉纳赫布-朝格,系维吾尔族习用药材,为毛茛科植物腺毛黑种草 *Nigella glandulifera* Preyn et Sint.的干燥成熟种子,味甘、辛,性温,有补肾健脑、通经、通乳、利尿、调理胃火、助消化、固齿的功效,可用于治疗耳鸣健忘、经闭乳少、热淋、石淋等症状。黑种草子中主要含黑种草碱、挥发油等成分,其挥发油类成分主要为百里香醌、黑

种草酮、槲皮素、皂苷等^[2]。皂苷类化合物由于结构中缺少光学特征,用光学检测器不能很好地检测,因此本试验采用高效液相色谱(HPLC)-蒸发光散射检测器(ELSD)法建立了黑种草总皂苷提取物中黑种草皂苷A的含量测定方法,可为黑种草总皂苷提取物的质量控制提供理论依据。

1 材料

差异性。本方法简便易行、专属性强、准确可靠,可用于参维软胶囊的质量控制;同时也可作为以五加科药材为主药的软胶囊类复方制剂的质量标准研究提供参考。

参考文献

- [1] 毛祖林,李晓波,龚文明,等.人参皂苷提取工艺优选[J].时珍国医国药,2008,19(11):2 762.
- [2] 王辉,何伟,任军.大孔吸附树脂纯化人参皂苷类成分的工艺研究[J].中国药房,2009,20(24):1 865.

- [3] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2010年版.北京:中国医药科技出版社,2010:8.
- [4] 刘志宝,王爱民,苏红,等.HPLC-ELSD法测定心脉通软胶囊中三七皂苷R₁和人参皂苷Rg₁,Rb₁的含量[J].中国中药杂志,2008,33(2):198.
- [5] 崔红华,李超英,张大方,等.用苯酚-硫酸法测定人参多糖含量的研究[J].中国中医药信息杂志,1999,6(2):24.
- [6] 宋利华,萧伟,鹿丽丽,等.正交试验优选人参多糖的提取工艺[J].中草药,2012,43(2):283.
- [7] 吴建梅,林宏英,赵李宏,等.同仁堂红参与高丽红参品质的初步比较研究:人参皂苷和人参多糖的含量测定[J].中国中药杂志,2007,32(7):573.

(收稿日期:2012-08-02 修回日期:2012-12-26)

^Δ 基金项目:新疆维吾尔自治区科技计划资助项目(No.201033121)
* 研究实习员。研究方向:药物分析及质量标准的建立。电话:0991-2326572。E-mail:xcmaro@sina.com

通信作者:副研究员,硕士。研究方向:天然产物有效成分分析及药物制剂。电话:0991-2320227。E-mail:xufangxj@163.com

1.1 仪器

LC2010C 型 HPLC 仪(日本 Shimadzu 公司);化学工作站(美国 Agilent 公司);3300 型 ELSD(美国 Alltech 公司);BP211D 型电子天平(德国 Sartorius 公司, $d=0.01\text{ mg}$);SK3300H 型超声波清洗仪(上海科导超声仪器有限公司)。

1.2 药品与试剂

黑种草总皂苷提取物(批号:20111121、20111202、20111212)由新疆维吾尔自治区药物研究所自制(制备方法见“2.1”项);黑种草皂苷 A 对照品(新疆维吾尔自治区药物研究所植化室制备,纯度 $\geq 98\%$);D101 型大孔吸附树脂(天津兴南允能高分子技术有限公司,批号:9-2);乙腈(色谱纯,美国 Fisher 公司);水为蒸馏水,其余试剂均为分析纯。

1.3 药材

黑种草子购自乌鲁木齐市维吾尔药材市场,产地为新疆阿克苏地区,由新疆维吾尔自治区药物研究所何江副研究员鉴定为毛茛科植物腺毛黑种草 *N. glandulifera* Freyn et Sint. 的干燥成熟种子。

2 方法与结果

2.1 黑种草总皂苷提取物的制备

取一定量的黑种草子,粉碎,加入 8 倍量的 30% 乙醇,70℃ 水浴提取 3 次,每次 1 h,合并提取液,滤过,滤液浓缩至适量。将浓缩液加水稀释后上 D101 型大孔吸附树脂,先用蒸馏水洗去杂质,再用 50% 乙醇洗脱,收集 50% 乙醇洗脱液,减压浓缩,真空干燥,即得。

2.2 溶液的制备^[3-4]

2.2.1 对照品贮备液的制备 取黑种草皂苷 A 对照品适量,精密称定,加甲醇制成每 1 ml 含 3.66 mg 的溶液,作为对照品贮备液。

2.2.2 供试品溶液的制备 取黑种草总皂苷提取物粉末约 0.2 g,精密称定,置 50 ml 量瓶中,精密加入 70% 乙醇 25 ml,超声(功率:250 W,频率:50 kHz)处理 15 min,放冷,加 70% 乙醇至刻度,摇匀,精密量取 2 ml,置 10 ml 量瓶中,加 70% 乙醇至刻度,摇匀,即得。

2.3 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱:Cosmosil C₁₈(250 mm $\times$ 4.6 mm,5 μ m);流动相:乙腈-水,梯度洗脱(洗脱程序见表 1);流速:1.0 ml/min;柱温:30℃;进样量:10 μ l。ELSD 漂移管温度:65℃;气体流速:2.0 L/min。在此色谱条件下,黑种草皂苷 A 峰与相邻色谱峰的分度 >1.5 ;理论板数按黑种草皂苷 A 色谱峰计算应不低于 8 000。色谱见图 1。

表 1 流动相梯度洗脱程序

Tab 1 Gradient elution progress of mobile phase

时间,min	乙腈,%	水,%
0	20	80
15	40	60
20	40	60
22	20	80
25	20	80

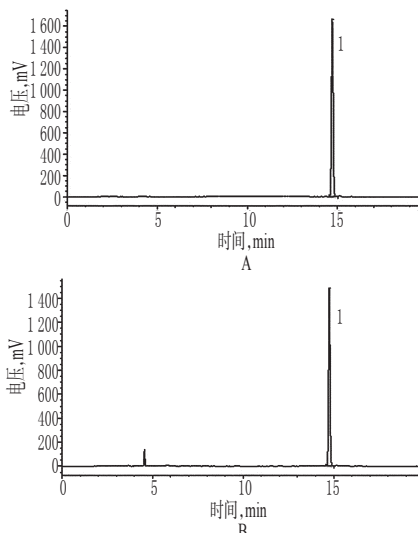


图 1 高效液相色谱图

A. 黑种草皂苷 A 对照品;B. 黑种草总皂苷提取物;1.黑种草皂苷 A

Fig 1 HPLC chromatograms

A. nige-glanoside A control; B. total saponins of *N. glandulifera*; 1.nig-e-glanoside A

2.4 线性关系考察

分别精密吸取黑种草皂苷 A 对照品贮备液 0.5、1.0、2.0、2.5、3.0、4.0、6.0、7.0 ml,置 10 ml 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,制成系列对照品溶液,按上述色谱条件分别进样测定,记录峰面积。以黑种草皂苷 A 质量浓度的对数值(x)为横坐标,峰面积的对数值(y)为纵坐标,进行线性回归,得回归方程为 $y=1.3008x+3.9837(r=0.9990,n=8)$ 。结果表明,黑种草皂苷 A 的质量浓度在 0.183~2.562 mg/ml 范围内与其峰面积积分值呈良好的线性关系。

2.5 精密度试验

取同一对照品溶液,按上述色谱条件重复进样 6 次,每次 10 μ l,记录峰面积。结果,RSD=1.02%($n=6$),表明仪器精密程度良好。

2.6 重复性试验

取同一批黑种草总皂苷提取物粉末适量,共 6 份,分别按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,照上述色谱条件进样测定,记录峰面积,计算样品含量。结果,样品中黑种草皂苷 A 的平均质量分数为 57.84%,RSD=1.75%($n=6$),表明本方法重复性良好。

2.7 稳定性试验

取同一供试品溶液适量,分别于 0、2、4、6、8、12 h 按上述色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,RSD=1.62%($n=6$),表明供试品溶液在 12 h 内稳定。

2.8 加样回收率试验

取已知含量的黑种草总皂苷提取物粉末约 0.1 g,共 6 份,精密称定,分别加入适量黑种草皂苷 A 对照品溶液,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,照上述色谱条件分别进样 10 μ l 测定,记录峰面积,计算加样回收率,结果见表 2。

2.9 样品含量测定

表2 加样回收率试验结果($n=6$)Tab 2 Results of recovery tests($n=6$)

编号	称样量,g	样品含量,mg	加入量,mg	测得量,mg	回收率,%	$\bar{x}$,%	RSD,%
1	0.107 1	61.303 1	76.860 0	137.355 1	98.95	99.93	1.60
2	0.112 4	64.372 3	76.860 0	142.543 5	101.71		
3	0.100 0	57.277 7	76.860 0	133.097 1	98.65		
4	0.102 1	58.468 7	76.860 0	134.211 8	98.55		
5	0.107 1	61.303 1	76.860 0	139.821 5	102.16		
6	0.107 1	61.303 1	76.860 0	137.820 4	99.55		

取3批黑种草总皂苷提取物各适量,分别按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,照上述色谱条件进样10 μ l测定,记录峰面积,计算样品中黑种草皂苷A的质量分数,结果见表3。

表3 3批黑种草总皂苷提取物中黑种草皂苷A的含量测定结果

Tab 3 Content determination of nigeclanoside A in total saponins extract from 3 batches of *N. glandulifera*

批号	黑种草皂苷A的质量分数,%	RSD,%
20111121	60.48	0.84
20111202	61.20	
20111212	59.41	

3 讨论

3.1 检测方法的选择及ELSD条件的优化

ELSD作为一种通用检测器,可以检测任何挥发性低于流动相的组分,弥补了紫外检测器和荧光检测器的不足,特别是对无紫外吸收、无荧光或紫外末端吸收的大分子有机化合物的检测,显示出了极大的优越性;此外,ELSD与梯度洗脱有良好的相容性,它所能检测的化合物对流动相组分的变化和温度的浮动均不很敏感,克服了紫外检测器梯度洗脱时的基线漂移和溶剂峰干扰,因而被广泛应用于皂苷、内酯、生物碱、有机酸、氨基酸等成分的分析以及中药指纹图谱和药动学的研究中。黑种草子中主要含黑种草碱、挥发油、皂苷等成分,皂苷类化合物由于结构中缺少光化学特征,用光学检测器不能

很好地检测,因此ELSD适用于黑种草总皂苷提取物的含量测定研究。

对于ELSD,漂移管温度和气体流速是很重要的两个参数,它们对优化待测物质的响应值有重要的影响。根据ELSD建议值,设置气体流速为1.5 L/min,漂移管温度分别为50、65、70、80、85 $^{\circ}$ C,观察基线噪声和样品峰个数及峰面积积分值。结果发现,低于60 $^{\circ}$ C时,流动相中的水相得不到充分挥发,基线噪声较大;在65 $^{\circ}$ C时,样品峰个数最多,峰形最佳;70、80、85 $^{\circ}$ C时,色谱峰峰形较65 $^{\circ}$ C时无明显差异,因此确定漂移管温度为65 $^{\circ}$ C。

根据ELSD建议值,设置漂移管温度为65 $^{\circ}$ C,气体流速分别为1.5、2.0、2.5、3.0 L/min,观察气体流速对响应值、峰面积及基线的影响情况。结果发现,气体流速>2.0 L/min时响应值变小,因此确定最佳气体流速为2.0 L/min。

3.2 流动相洗脱条件的考察

在仪器建议的ELSD条件下,采用不同体积比(分别为40:60、70:30、95:5、99:1)的流动相(乙腈-水)等度洗脱时,对照品及供试品均未出峰;后采用流动相梯度洗脱,对照品及供试品色谱峰的峰形和分离度效果均达到要求,且分析时间短。

综上,本方法操作简便、重复性好、准确性高,可用于黑种草总皂苷提取物中黑种草皂苷A的含量测定。

参考文献

- [1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2010年版.北京:中国医药科技出版社,2010:324.
- [2] 艾尼娃尔·艾克木,热娜·卡斯木.新疆黑种草子的化学成分研究[J].中药材,2006,30(10):1 259.
- [3] 刘晓芳,党向红,任永凤.黑种草子的质量标准研究[J].中国民族医药杂志,2007,3(3):47.
- [4] 黄丽霞,贾晓斌,陈彦,等.HPLC法测定不同产地夏枯草中熊果酸的含量[J].中国药房,2008,19(12):910.

(收稿日期:2012-08-01 修回日期:2012-10-22)

中国建议确保“卫生”在国际发展议题中的地位

本刊讯 中国国家卫生和计划生育委员会主任李斌20日在日内瓦举行的第66届世界卫生大会上说,中国建议确保“卫生”在2015年后国际发展议题中的地位,呼吁全球为实现“人人享有卫生保健”而共同努力。

随着联合国千年发展目标实现日期的临近,国际社会正在对2015年后国际发展议题的内容和形式展开热烈讨论。为此,本届世界卫生大会将一般性辩论主题设定为“如何在未来全球发展议程中确保‘卫生’的地位”。

李斌在进行一般性辩论发言时说,中国建议要确保“卫生”在全球发展议程中的地位,强调“在从生至死的生命全程促进健康”的概念,支持将糖尿病、心血管疾病、癌症和精神疾

病等慢性非传染性疾病的控制指标纳入2015年后国际发展议题中的卫生主题。

李斌认为,各国应注重加强卫生系统能力建设,今年中国防控禽流感 and 地震灾后防疫的实践经验证明“事预则立、不预则废”,完备的卫生服务、应急救援响应机制和保障系统是妥善应对突发公共卫生事件的必要条件。

她说,中国政府一贯高度重视人们健康,提出到2020年实现“人人享有基本医疗卫生服务”,全面建成小康社会,这也是实现“中国梦”的重要内容。2009年以来,中国政府全面启动深化医药卫生体制改革,逐步建设覆盖城乡居民的基本医疗卫生制度,有力地促进了千年发展目标的全面、均衡实现。