

工作简报

高效液相色谱法测定桔梗中皂苷类物质

冯伟博^{1,2}, 杨光宇^{1,2}, 雷春², 胡秋芬¹, 戴云^{1*}

(1. 云南民族大学 化学与生物技术学院, 昆明 650031; 2. 中国科学院 昆明植物研究所, 昆明 650204)

摘要: 采用高效液相色谱法测定桔梗中 10 种主要的皂苷类物质, 桔梗样品经甲醇 (60 + 40) 溶液超声振荡提取后, 过 Waters Spe-Pak-C₁₈ 固相萃取柱富集浓缩, 以 10 mL · min⁻¹ 的流速, 用甲醇 (60 + 40) 溶液将皂苷类物质从固相萃取柱上洗脱下来。以 ZORBAX Stable Bound C₁₈ (4.6 mm × 100 mm, 1.8 μm) 为快速分离柱, 水和乙腈为流动相梯度洗脱, 用蒸发光散射检测器检测。峰面积与 10 种皂苷类物质的质量浓度呈线性关系, 方法检出限 (3S/N) 在 0.3 ~ 0.8 mg · L⁻¹ 之间。采用标准加入法做回收率试验, 回收率在 84 % ~ 106 % 之间, 相对标准偏差 (n = 5) 小于 5 %。

关键词: 高效液相色谱; 固相萃取; 皂苷; 桔梗

中图分类号: O657.7 文献标志码: A 文章编号: 1001-4020(2009)03-0340-03

HPLC Determination of Saponins in Roots of Balloon Flower

FEN Wei bo^{1,2}, YANG Guang-yu^{1,2}, LEI Chun², HU Qiu-fen¹, DAI Yun^{1*}

(1. College of Chemistry and Bio Techniques, Yunnan National University, Kunming 650031, China;

2. Kunming Research Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650204, China)

Abstract: HPLC was applied to the determinations of 10 main saponins in roots of balloon flower. The sample was extracted ultrasonically with a mixed solution of methanol and water (60 + 40), and enriched by passing through a Waters Spe-Pak-C₁₈ SPE column, Saponins were eluted from the column with mixed solution of methanol and water (60 + 40) at a flowrate of 10 mL · min⁻¹. The eluate was separated by gradient elution with acetonitrile solution of different concentration on ZORBAX Stable Bound C₁₈ (4.6 mm × 100 mm, 1.8 μm) rapid column, and their contents determined by evaporation light scattering detector. Linear relationships between the peak area and mass concentration of 10 saponins were obtained, with detection limits (3S/N) in range of 0.3 - 0.8 mg · L⁻¹. The values of recovery found by standard addition method were in the range of 84 % - 106 %, with value of RSD s (n = 5) less than 5 %.

Key words: High performance liquid chromatography; Solid phase extraction; Saponins; Roots of balloon flower

桔梗属桔梗科, 为多年生草本植物。全世界仅 1 种 1 变种^[1]。其根是常用中药, 具有宣肺利咽、祛痰排脓之功效。桔梗的主要成分为齐墩果酸型五环三萜皂苷, 同时含有黄酮、聚炔、甾体、酚酸、脂肪酸等类型的化合物^[2-4]。由于皂苷是桔梗中的主要活

性成分, 桔梗中皂苷类化合物含量的准确测定, 将对探索桔梗中有效成分与其疗效间的关系和中草药质量标准现代化具有一定意义。

中国药典中对桔梗总皂苷含量的测定采用重量法^[5], 也有分光光度法、电化学法和色谱法的报道^[6-11]。关于色谱法测定, 国内研究大多只限于桔梗皂苷 D, 其它皂苷测定的报道很少^[7-8]。而国外有测定多种皂苷的报道, 但样品处理复杂且分离时间长^[10-11]。本工作采用固相萃取-高效液相色谱法测定桔梗中皂苷类物质, 可一次进样同时测定桔梗中 10 种主要的皂苷类物质。且主要皂苷在 6.0 min 内

收稿日期: 2007-12-11

基金项目: 国家高技术研究发展计划 (2003AA219142); 国家自然科学基金 (No. 20402016) 资助课题。

作者简介: 冯伟博 (1981 -), 男, 重庆市人, 硕士研究生, 从事植物化学和分析化学研究工作。

* 联系人

可达到基线分离,与文献[7-11]方法相比缩短了分析时间,同时样品前处理也得到简化。

1 试验部分

1.1 仪器与试剂

Waters 2695 Alliance 高效液相色谱系统,包括四元梯度泵,Empower 色谱工作站,ELSD 2000 蒸发光散射检测器。

桔梗皂苷由本课题组从植物样品中分离得到,由质谱、核磁共振¹H NMR 和¹³C NMR 确定结构,并用高效液相色谱-蒸发光散射检测器和高效液相色谱-质谱法作了纯度检验。峰面积归一化主峰均 96%,所得皂苷用甲醇(60+40)溶液配制成 $1.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 标准储备液(20℃保存至少可稳定1个月),使用时用甲醇(60+40)溶液稀释成所需标准工作液。

甲醇为高效液相色谱专用;水为超纯石英亚沸蒸馏水。

1.2 色谱条件

ZORBAX Stable Bound C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 100 mm,1.8 μm);Waters Sep-Pak-C₁₈ 固相萃取小柱(柱腔容积为1.0 mL,萃取容量为30 mg,粒度为30 μm);流动相为水(A)和乙腈(B),梯度洗脱:0~2 min(10%~14% B),3~4 min(14%~25% B),5~8 min(25%~45% B),每一个样分析完后回到10% B,平衡10 min后进入下一个样,流速为 $1.5\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 。蒸发光散射检测器的漂移管温度85℃,氮气作载气,流速 $2.0\text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$,进样体积5.0 μL。

1.3 试验方法

桔梗样品粉碎后过150 μm筛,称取粉碎后样品0.5000 g,加入甲醇(60+40)溶液40 mL超声振荡浸取45 min,冷却,过滤,并用8 mL的甲醇分两次洗涤滤渣,定容至50 mL。移取样品溶液10 mL,用水稀释10倍,以 $10\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 流速通过Waters Sep-Pak-C₁₈固相萃取小柱(小柱先用甲醇5 mL过柱,再用水10 mL过柱置换出甲醇预活化),过完柱后小柱离心脱水,用甲醇(60+40)溶液5 mL洗脱,洗脱液准确调整为5.0 mL,用0.45 μm针头过滤器过滤,按色谱条件进行分析。

2 结果与讨论

2.1 样品前处理条件的选择

2.1.1 提取剂

皂苷类物质在极性有机溶剂中具有较大的溶解

度,在甲醇水溶液中溶解性最好。试验结果表明:用甲醇(60+40)溶液作提取剂提取最完全,试验选用甲醇(60+40)溶液40 mL。

2.1.2 提取方式

考察了用超声振荡浸取和加热回流提取对皂苷提出率的影响,两种提取方法没有显著差异,但超声振荡浸取操作比加热回流提取更方便,选择用超声振荡浸取,浸取时间为45 min。

2.1.3 洗脱剂

桔梗中除含有皂苷类物质外,还含有脂类、蜡质、色素、多酚等物质。这些物质会影响皂苷类物质的检测,并且在本试验的流动相条件下脂类、蜡质、色素不能完全被洗脱,在C₁₈柱上残留积累,使色谱系统的反压增大,并降低柱效,故样品分析前需作预处理。本试验选用固相萃取法,用Waters SPE真空提取装置,每次可同时处理20个样,小柱活化和样品富集的流速均为 $10\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 。小柱先用甲醇5 mL活化,再用水10 mL洗去小柱上残留的甲醇。如果用甲醇(60+40)浸出液直接通过小柱,会因溶剂强度过大而使皂苷不能在C₁₈固相萃取小柱上充分保留,故样品萃取前需用水稀释降低溶剂强度以降低溶剂对皂苷的洗脱能力。结果表明:样品溶液中甲醇比例小于10%时,皂苷可完全保留在小柱上。因此试验中将甲醇(60+40)浸出液稀释10倍再过柱。结果表明:用甲醇(60+40)溶液洗脱可使皂苷完全洗下,试验选用甲醇(60+40)溶液5.0 mL洗脱。

2.2 分离条件的选择

为了显著缩短分离时间,试验采用ZORBAX Stable Bound C₁₈快速分离柱为固定相分离样品中的皂苷,考察了3种规格的色谱柱,其中(4.6 mm × 20 mm,1.8 μm)和(4.6 mm × 50 mm,1.8 μm)柱均不能使10种皂苷达到完全分离,而用(4.6 mm × 100 mm,1.8 μm)柱可使实际样品中10种皂苷达到完全分离。试验选用ZORBAX Stable Bound C₁₈(4.6 mm × 100 mm,1.8 μm)色谱柱分离,分离时间缩短70%左右。

2.3 检测器的选择及工作参数

蒸发光散射检测器是通过柱洗脱液进行喷雾,流动相溶剂蒸发,留下的不挥发成分用光照射,检测成分的散射光的检测器,可分析任何挥发性低于流动相的化合物。由于试验中分析的大部分皂苷没有明显紫外吸收信号,也没有明显的荧光信号,因此选

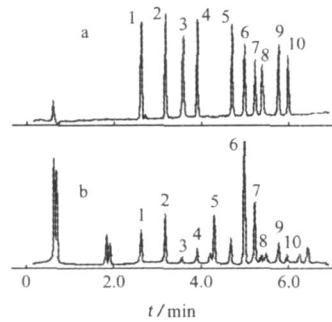
择蒸发光散射检测器进行检测。

漂移管温度和载气流速是蒸发光散射检测器的重要参数。漂移管温度影响检测器的响应,漂移管温度升高,流动相蒸发趋于完全,信噪比上升,但温度过高,会导致部分组分汽化,信号响应值变小。雾化载气流速影响雾化器中液滴的形成,从而影响检测器的响应。信噪比随载气流速增加而升高。选择漂移管温度为 85,氮气作载气,流速 2.0 L · min⁻¹,此时噪声信号最小,色谱图基线平稳。

2.4 工作曲线及检出限

按试验方法对 1.0 ~ 150 mg · L⁻¹ 系列标准溶液进样 50 μL 进行测定。根据测得的峰面积 A (mV · s) 与皂苷的质量浓度 (mg · L⁻¹) 进行线性回归,再将最小浓度的标准溶液逐级稀释,进样 50 μL,当信噪比为 3 时,测得的检出限和线性回归方程结果见表 1。桔梗皂苷标样和桔梗样品的色谱

图见图 1 所示。



- 1. 去芹菜糖-桔梗甘 E
- 2. 桔梗甘 E
- 3. 去芹菜糖-桔梗皂苷 D₃
- 4. 桔梗皂苷 D₃
- 5. 去芹菜糖-桔梗皂苷 D
- 6. 桔梗皂苷 D
- 7. 远志皂苷 D
- 8. 3-σ 乙酰基-远志皂苷
- 9. 桔梗皂苷 A
- 10. 2-σ 乙酰基-远志皂苷

图 1 皂苷标准(a)及样品中皂苷(b)的色谱图

Fig. 1 Chromatograms of saponin standards (a) and saponins in sample (b)

表 1 工作曲线的线性回归方程和相关系数以及方法的检出限

Tab. 1 Linear regression equations with correlation coefficients of the working curves and detection limits of the method

组分	线性回归方程	线性范围 / (mg · L ⁻¹)	相关系数	检出限 / (mg · L ⁻¹)
去芹菜糖-桔梗甘 E	A = 1.92 × 10 ³ + 136	1.2 ~ 120	0.998 5	0.4
桔梗甘 E	A = 2.14 × 10 ³ - 99	1.0 ~ 100	0.999 2	0.3
去芹菜糖-桔梗皂苷 D ₃	A = 1.76 × 10 ³ + 112	1.6 ~ 120	0.999 4	0.5
桔梗皂苷 D ₃	A = 1.89 × 10 ³ + 117	1.4 ~ 100	0.998 6	0.4
去芹菜糖-桔梗皂苷 D	A = 1.83 × 10 ³ + 126	1.5 ~ 120	0.999 4	0.3
桔梗皂苷 D	A = 1.42 × 10 ³ + 117	1.6 ~ 160	0.999 2	0.6
远志皂苷 D	A = 1.28 × 10 ³ + 125	1.8 ~ 120	0.999 1	0.8
3-σ 乙酰基-远志皂苷 D	A = 1.12 × 10 ³ + 108	1.4 ~ 120	0.999 4	0.8
桔梗皂苷 A	A = 1.58 × 10 ³ - 147	1.5 ~ 110	0.999 2	0.6
2-σ 乙酰基-远志皂苷	A = 1.48 × 10 ³ - 109	1.5 ~ 150	0.999 3	0.8

2.5 精密度试验

准确称取桔梗样品 5 份,按试验方法重复测定 5 次,得到 10 种皂苷类物质结果的相对标准偏差小于 5%。

2.6 回收试验

准确称取桔梗样品,分别加入 0.2, 0.9, 1.0 mg 皂苷标准品,按试验方法进行样品处理,按色谱条件平行测定 5 次,得到 10 种皂苷类物质的回收率在 84% ~ 106% 之间。

2.7 样品分析

按试验方法测定了不同桔梗样品中皂苷类物质,每份样品平行测定 5 次,结果见表 2。

表 2 样品分析结果(n = 5)

Tab. 2 Analyt. results of samples

组分	不同产地样品的结果 w / (mg · g ⁻¹)				
	云南	河南	湖南	广西	湖北
去芹菜糖-桔梗甘 E	0.633	0.675	0.869	0.733	0.525
桔梗甘 E	0.877	0.885	1.015	0.831	0.712
去芹菜糖-桔梗皂苷 D ₃	0.175	0.184	0.197	0.222	0.209
桔梗皂苷 D ₃	0.316	0.266	0.319	0.329	0.237
去芹菜糖-桔梗皂苷 D	0.664	0.621	0.797	0.733	0.549
桔梗皂苷 D	2.86	2.42	3.11	2.86	2.14
远志皂苷 D	1.97	1.52	1.68	1.74	1.58
3-σ 乙酰基-远志皂苷 D	0.124	0.135	0.141	0.152	0.118
桔梗皂苷 A	0.318	0.384	0.339	0.287	0.314
2-σ 乙酰基-远志皂苷	0.106	0.124	0.115	0.147	0.125

(下转第 345 页)

的 Ag^+ 、 NO_2^- 、 Ge^{2+} (80), 55 倍的 Ba^{2+} 、 Ti (), 40 倍的 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Na^+ , 22 倍的 Al^{3+} , 8 倍的 Zn^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Cr^{3+} 、 Co^{2+} 、 Sb^{2+} 、 V (), 0.5 倍的 Ni^{2+} 。

2.5 工作曲线与检出限

按试验方法绘制工作曲线, 铁() 的质量浓度在 $7.2 \sim 1800 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内与 A 呈线性关系, 其线性回归方程 $A = 5.425 \times 10^{-4} + 0.0329$, 相关系数为 0.9972。根据 11 次空白试验的标准偏差 ($3S/N$) 及工作曲线斜率, 求得方法的检出限为 $6.8 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.6 样品分析

吸取水样 50 mL 于 100 mL 小烧杯中, 于电热板上加热浓缩至干, 加入盐酸(1+3)溶液 1.00 mL, 水 2~3 mL, 缓慢加热 2~3 min, 使固体物完全溶解。再加 3% (体积分数) 过氧化氢溶液 5 滴, 将样品溶液转入 25 mL 比色管中, 定容, 备用。

移取一定量样品溶液按试验方法进行测定, 每

表 1 样品分析及回收率试验 (n=6)

Tab. 1 Analytical results of water samples and test for recovery

样品	AAS 测定值 ($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	本法 测定值	标准 加入量 ($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	测得总量	回收率 / %
延河水	8.3	7.6	22.4	29.6	98.2
延大泉水	7.4	7.3	22.4	29.8	100.4
自来水	7.1	7.0	22.4	28.4	95.5

(上接第 342 页)

参考文献:

- [1] 周荣汉. 中药资源学[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 1994: 486-489.
- [2] Choi C Y, Kim J Y, Kim Y S. Aqueous extract isolated from platycodon grandiflorum elicits the release of nitric oxide and tumor necrosis factor- α from murine macrophages[J]. Int Immunopharmacol, 2001, 1(6): 1141-1152.
- [3] 王颖, 石俊英. 近十年中药桔梗研究进展[J]. 食品与药品, 2006, 8(12A): 22-24.
- [4] 付文卫, 龚德强, 裴月湖. 桔梗的化学成分和生物活性研究进展[J]. 沈阳药科大学学报, 2006, 23(3): 184-191.
- [5] 中华人民共和国药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 北京: 化学工业出版社, 2000: 225-226.
- [6] 李喜凤, 薛秋萍, 董诚明. 桔梗中总皂苷的含量测定[J]. 中医药学刊, 2006, 24(12): 2232-2234.
- [7] 朱丹妮, 舒雯. HPLC-ELSD 法测定桔梗中桔梗皂苷 D

的含量[J]. 植物资源与环境学报, 2001, 10(4): 11-13.

参考文献:

- [1] 白昕, 吴静, 张景欣. 微波前处理火焰原子吸收法测定人发中铁、锌、钙[J]. 哈尔滨理工大学学报, 2003, 8(2): 97-101.
- [2] 付芝, 金莲, 张力, 等. 酸性品红褪色光度法测定痕量铁() [J]. 光谱实验室, 2006, 23(5): 972-974.
- [3] 曹永林, 邱凤仙. 催化褪色光度法测定痕量 Fe () [J]. 理化检验-化学分册, 1999, 35(7): 331-334.
- [4] 李占灵, 李艳霞, 王金中. 阻抑甲基橙褪色动力学光度法测定痕量铁[J]. 分析试验室, 2006, 25(10): 59-61.
- [5] 赵能武, 杜薇. 萃取分光光度法测定生血铁灵颗粒剂中的亚铁含量[J]. 微量元素与健康研究, 2003, 20(5): 50-51.
- [6] 梁维安, 张震宇, 邹时复. 磺基水杨酸紫外导数分光光度法测定微量铁[J]. 分析科学学报, 1997, 13(2): 145-146.
- [7] Feng S L, Guo Z J, Fan J, et al. Kinetic spectrophotometric determination of total Iron in natural water by flow injection analysis using on-line preconcentration [J]. Microchim Acta, 2005, 149, 61-65.
- [8] 张根成. 氧氟沙星荧光光度法测定痕量铁[J]. 江南大学学报: 自然科学版, 2003, 2(6): 636-638.

- [8] 许传莲, 郑毅男, 杨腊虎, 等. 应用 RP-HPLC 法测定不同产地中桔梗皂苷 D [J]. 吉林农业大学学报, 2001, 23(1): 58-60.
- [9] Saeki T, Koike K, Nikaido T. A comparative study on commercial, botanical gardens and wild samples of the roots of Platycodon grandiflorum by HPLC analysis [J]. Planta Med, 1999, 65(2): 428-432.
- [10] Tsuyoshi Saeki, Tamotsu Nikaido. Evaluation of saponin properties of HPLC analysis of platycodon grandiflorum A. DC [J]. Yakugakuzasshi, 2003, 123(6): 431-441.
- [11] Young W H, Yun C Na, Jung J S, et al. Qualitative and quantitative determination of ten major saponins in platycodi radix by high performance liquid chromatography with evaporative light scattering detection and mass spectrometry [J]. J Chromatogr A, 2006, 1135(1): 27-35.