

知母 HPLC-UVD-ELSD 指纹图谱的建立与多特征成分含量测定的质控方法研究

张烨子¹, 贺中军^{1,2}, 蒋晗^{1,3}, 邱媛^{1,3}, 龚海标^{1,2}, 陈子林^{1,2}, 林培¹, 姚志红¹

(1.暨南大学药学院, 广东 广州 510632; 2.广州市香雪制药股份有限公司, 广东 广州 510663; 3.广东东阳光药业有限公司国家中医药管理局重点实验室, 广东 东莞 523850)

摘要:目的 建立知母指纹图谱结合多特征成分含量测定的 HPLC-UVD-ELSD 分析方法, 并应用于多批次市售药材的质量控制。方法 采用 UltimateTM XB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 4.5 μm), 检测波长 258 nm, ELSD 漂移管温度 65 ℃, 载气流速 1.0 L/min, 建立知母指纹图谱与主含黄酮及皂苷类成分含量测定的 HPLC-UVD-ELSD 分析方法, 运用相似度软件结合化学计量学分析对多批次药材进行质量评价并同时完成多特征成分的含量测定。结果 建立了高效、快捷的知母 HPLC-UVD-ELSD 指纹图谱与多特征成分含量测定的方法; 18 批市售药材的指纹图谱相似度在 0.786~0.999, 并指认了 10 个色谱峰。化学计量学结果表明造成 18 批药材差异较大的成分为新芒果苷、知母皂苷 BⅡ 和知母皂苷 BⅢ; 进而建立了同时测定新芒果苷、芒果苷、知母皂苷 N、知母皂苷 BⅡ 和知母皂苷 BⅢ 5 个成分含量的方法, 结果表明知母中主含知母皂苷 BⅡ。结论 建立的指纹图谱结合多特征成分含量测定的 HPLC-UVD-ELSD 分析方法, 更全面而准确地描述了知母药材化学成分整体轮廓与各类特征成分含量贡献, 为提升市售知母药材的质量控制方法奠定了基础。

关键词: 知母; 黄酮; 皂苷; HPLC-UVD-ELSD; 指纹图谱; 含量测定; 质控方法

中图分类号: R284

文献标志码: A

文章编号: 1672-0482(2020)02-0252-07

DOI: 10.14148/j.issn.1672-0482.2020.0252

引文格式: 张烨子, 贺中军, 蒋晗, 等. 知母 HPLC-UVD-ELSD 指纹图谱的建立与多特征成分含量测定的质控方法研究[J]. 南京中医药大学学报, 2020, 36(2): 252-258.

Study on Quality Control Method for Simultaneous Analysis of Fingerprint and Multi-Characteristic Components of *Anemarrhenae Rhizoma* by HPLC-UVD-ELSD

ZHANG Ye-zi¹, HE Zhong-jun^{1,2}, JIANG Han^{1,3}, QIU Yuan^{1,3}, GONG Hai-biao^{1,2}, CHEN Zi-lin^{1,2}, LIN Pei¹, YAO Zhi-hong¹

(1. College of Pharmacy, Jinan University, Guangzhou, 510632, China; 2. Guangzhou Xiangxue Pharmaceutical Co., Ltd., Guangzhou, 510663, China; 3. Key Laboratory of State Administration of Traditional Chinese Medicine, Sunshine Lake Pharma Co., Ltd., Dongguan, 523850, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish the fingerprint and simultaneously determine the multi-characteristic components of *Anemarrhenae rhizoma* by HPLC-UVD-ELSD for conducting the quality analysis in the market. **METHODS** The chromatographic separation was conducted on an UltimateTM XB-C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 4.5 μm), the monitoring wavelength was 258 nm, the temperature of drift tube was maintained at 65 ℃, and the carrier gas flow rate was 1.0 L/min. The fingerprint and quantitative analysis methods of flavonoids and saponins in *Anemarrhenae rhizoma* were set up by HPLC-UVD-ELSD. Similarity evaluation combined with stoichiometry analysis were used to evaluate the quality of multiple batches of *Anemarrhenae rhizoma* samples, and multi-characteristic components in *Anemarrhenae rhizoma* were selected for simultaneous quantification. **RESULTS** An efficient and convenient HPLC-UVD-ELSD analysis method was used for fingerprint and quantitative analysis of multi-characteristic components in *Anemarrhenae rhizoma*. Ten main characteristic peaks were chemically identified in the established fingerprint, and the similarity ranged from 0.786 to 0.999 for 18 batches of *Anemarrhenae rhizoma*. The results of PLS-DA indicated that neomangiferin, timosaponin BⅡ and timosaponin BⅢ were shown greatly dif-

收稿日期: 2019-12-04

基金项目: 国家科技部“十二五”重大新药创制专项(2011ZX09201-201-05); 广东省科技计划项目(2015B030301005)

第一作者: 张烨子, 女, 硕士研究生, E-mail: zhangyezi_jnu@163.com

通信作者: 姚志红, 女, 教授, 主要从事中药质量控制与中药药代动力学研究, E-mail: yaozhihong_jnu@163.com

ferent in 18 batches of *Anemarrhenae rhizoma* samples. In addition, a quantification method of neomangiferin, mangiferin, timosaponin N, timosaponin BⅡ and timosaponin BⅢ in *Anemarrhenae rhizoma* was accomplished. The quantitative results of 18 batches of samples showed that the content of timosaponin BⅢ was the highest in *Anemarrhenae rhizoma*. **CONCLUSION** The established fingerprint and quantification of multi-characteristic components based on HPLC-UVD-ELSD analysis method can more comprehensively and accurately describe the chemical profiles and contents of characteristic compounds in *Anemarrhenae rhizoma*, which lays a foundation for improving effective and overall quality control method of *Anemarrhenae rhizoma*.

KEYWORDS: *Anemarrhenae rhizoma*; flavonoids; saponins; HPLC-UVD-ELSD; fingerprint; content determination; quality control method

中药知母(*Anemarrhenae rhizoma*)为单子叶植物百合科知母属知母 *Anemarrhena asaphodeloides* Bge.的干燥根茎,在《神农本草经》中列为中品,具有清热泻火、滋阴润燥之功效^[1]。现代药理学研究表明知母具有抗抑郁^[2]、抗炎^[3]、抗血小板聚集^[4]、抗肿瘤^[5]和降糖^[6]等作用,这些药理作用被认为与知母中主含的黄酮和皂苷类成分^[7]密切相关。在此基础上开发的知母总黄酮和知母总皂苷片已作为治疗2型糖尿病^[8]和中风^[9]的中药五类新药获得国家临床批件。

中药材质量可控是保证中药功效和安全稳定的核心所在。然而现行的知母药材质量标准较低,2015版《中国药典》中未收录能反映该药材整体质量的指纹图谱法,而“含量测定”项下采用不同分析条件分别定量芒果苷、知母皂苷BⅡ 2个成分,方法相对繁琐。在质量控制研究方面,目前其指纹图谱大部分是通过单一的紫外检测器^[10]定性表征黄酮类成分或采用蒸发光散射检测器^[11]表征皂苷类成分。魏静娜等^[12]采用 HPLC-PDA-ELSD 法建立了覆盖黄酮及皂苷类成分的知母药材指纹图谱,但该方法的分析时间长达 75 min 且图谱中只明确指认了3个共有峰,不能高效快速地反映知母药材化学成分整体特征。含量测定研究大部分只针对黄酮和/或皂苷中的一两个成分^[13-14],忽视了知母中其它具有活性的黄酮和皂苷类成分,未能全面反映药材的内在质量。鉴于知母药材的多结构类型成分以及多种活性,提示在其质量控制方面,有必要建立可以表征知母化学轮廓和多种结构代表性成分,且主要成分总体上明确,活性成分含量清楚的整体质量控制方法。

本研究针对知母中富含的黄酮及皂苷类2种特征结构类型,采用 HPLC-UVD-ELSD 技术,优化分析条件,建立高效快捷,能反映知母整体化学轮廓且主要峰化学成分清楚的指纹图谱方法,并结合化学

计量学分析探寻造成知母药材相似度差异的化学成分。进而基于药典指标成分、文献报道的活性成分及吸收入血成分等与知母体内潜在药效成分密切相关性,构建知母多指标成分含量同时测定方法,应用于多批次不同来源市售知母药材的指纹图谱相似度评价和质量分析工作。

1 材料

1.1 仪器

液相色谱仪: Waters 2695 (Waters 公司, USA), 检测器为 UVD 2998 (Waters 公司, USA), Alltech 3300 ELSD (配 XWK-Ⅲ型无油空气泵), 色谱工作站为 Empower; 色谱柱: Welch UltimateTM XB-C₁₈ (4.6 mm×250 mm, 5.0 μm); Sartorius BSA 24S 万分之一天平 (德国赛多利斯公司); Mettler Toledo 十万分之一天平 (瑞士); 昆山 KQ-500DE 超声清洗仪 (昆山市超声仪器公司); 真空干燥箱 (上海一恒科学仪器有限公司); 指纹图谱相似度评价软件系统 2004A 版 (国家药典委员会)。

1.2 试剂与药品

甲醇 (分析纯, 广州化学试剂厂); 甲醇 (色谱纯, Merck 公司); 乙醇 (分析纯, 天津市永大化学试剂有限公司); 乙腈 (色谱纯, Merck 公司); 甲酸 (分析纯, 天津市富宇精细化工有限公司); 蒸馏水 (广州屈臣氏食品饮料有限公司)。

对照品: 芒果苷、异芒果苷、新芒果苷、2,6,4'-Trihydroxy-4-methoxy-benzophenone、知母皂苷 BⅡ、Anemarrhenasaponin I、知母皂苷 BⅢ、知母皂苷 N、Nyasol、知母皂苷 AⅢ均为本课题组前期从知母中提取分离和鉴定,经 HPLC 检测,对照品的纯度均大于 98%。

1.3 样品采集

本实验收集了来自河北和安徽共 18 批知母药材,均采购于广州市各大药店,来源及批次见表 1。

表 1 18 批次知母药材样品来源信息

批次	产地	收集地点	收集时间	鉴定结果
S1	河北	祥安药店	201601	知母
S2	河北	同仁堂	201601	知母
S3	河北	慈济堂	201601	知母
S4	安徽	二天堂	201601	知母
S5	安徽	二天堂	201601	知母
S6	河北	百济堂	201601	知母
S7	河北	清平药材市场	201601	知母
S8	安徽	清平药材市场	201601	知母
S9	河北	老百姓大药房	201601	知母
S10	河北	寿生堂	201601	知母
S11	河北	康乐药店	201601	知母
S12	河北	大参林	201601	知母
S13	河北	同健大药房	201609	知母
S14	河北	康乐药店	201609	知母
S15	河北	祥安药店	201609	知母
S16	河北	二天堂	201609	知母
S17	河北	康乐药店	201609	知母
S18	河北	寿生堂	201609	知母

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Ultimate™ XB - C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5.0 μm); 流动相: 乙腈(A)-0.1%甲酸水(B); 梯度洗脱程序: 0 ~ 10 min, 12% A; 11 ~ 15 min, 15% A; 16 ~ 33 min, 25% A; 34 min, 35% A; 41 min, 45% A; 42 min, 60% A; 43 ~ 48 min, 90% A; 52 ~ 55 min, 12% A。柱温: 30 ℃; 流速: 1.0 mL/min; 检测波长: 258 nm; ELSD 气体流速: 1.0 L/min; 漂移管温度: 65 ℃。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的配制 取新芒果苷、芒果苷适量,精密称定之后用 70% 甲醇溶解,定容,制成质量浓度分别为 433.15、334.46 μg/mL 的混合对照品溶液 1。取知母皂苷 N、知母皂苷 BⅡ、知母皂苷 BⅢ适量,分别精密称定,之后以 70% 甲醇溶解,定容,制成质量浓度分别为 211.88、1779.19、318.16 μg/mL 的混合对照品溶液 2。

2.2.2 供试品溶液的配制 知母药材粉碎,过 50 目筛,取约 0.5 g 药材粉末,精密称定,置于 50 mL 具塞锥形瓶,加 70% 甲醇 40 mL,称定质量,超声 30 min(功率 250 W,频率 40 kHz),取出,放冷,再称定质量,以 70% 甲醇补足损失的质量,离心,吸取上清液过 0.22 μm 微孔滤膜,取续滤液,即得。

2.3 指纹图谱方法学考察

2.3.1 精密度试验 取同一批次知母药材(S13),按“2.2.2”项下方法制备供试液,按“2.1”项下色谱条件,连续进样 6 针,记录色谱图。UVD 检测条件下以芒果苷为参照峰,ELSD 检测条件下以知母皂苷 BⅡ为参照峰,计算主要色谱峰相对保留时间和相对峰面积,结果显示,HPLC-UVD 及 HPLC-ELSD 指纹图谱中各共有峰相对保留时间的 RSD 值不大于 0.48%,相对峰面积的 RSD 值不大于 3.32%,表明仪器的精密度良好。

2.3.2 重复性试验 取同一批次知母药材(S13)6 份,按“2.2.2”项下方法平行制备 6 份供试液,按“2.1”项下色谱条件测定,记录色谱图。UVD 检测条件下以芒果苷为参照峰,ELSD 检测条件下以知母皂苷 BⅡ为参照峰,计算主要色谱峰相对保留时间和相对峰面积,结果显示,HPLC-UVD 及 HPLC-ELSD 指纹图谱各共有峰相对保留时间的 RSD 值不大于 0.44%,相对峰面积的 RSD 值不大于 3.32%,表明该方法的重复性符合要求。

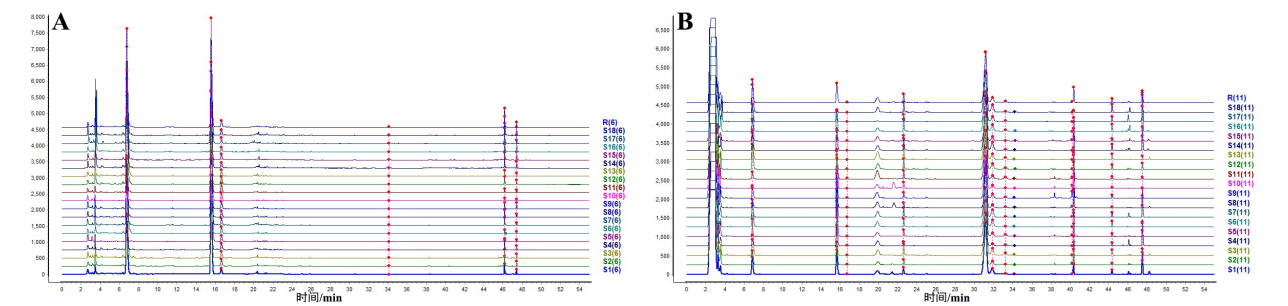
2.3.3 稳定性试验 取一份知母药材(S13),按“2.2.2”项下方法制备供试液,按“2.1”项下色谱条件,分别在 0、2、4、8、12、24 h 进样分析,记录色谱图。UVD 检测条件下以芒果苷为参照峰,ELSD 检测条件下以知母皂苷 BⅡ为参照峰,计算主要色谱峰相对保留时间和相对峰面积,结果显示,HPLC-UVD 及 HPLC-ELSD 指纹图谱各共有峰相对保留时间的 RSD 值不大于 0.49%,相对峰面积的 RSD 值不大于 2.98%,表明供试液常温下在 24 h 内稳定性良好。

2.4 市售知母药材的相似度分析及特征峰的化学指认

将所收集的 18 批次知母药材按“2.2.2”项下方法制备供试液,按“2.1”项下色谱条件测定,记录色谱图,以 AIA 格式依次导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004A 版)》,以 S1 批次药材图谱作为参照进行指纹匹配,建立了知母药材 HPLC-UVD-ELSD 指纹图谱。18 批次知母药材在 UVD 检测条件下的指纹图谱叠加图及对照指纹图谱分别如图 1A 和图 2A 所示,相似度范围在 0.786~0.999 之间(表 2),其中 S5、S10 和 S16 的相似度较低;18 批知母药材在 ELSD 检测条件下的指纹图谱叠加图及对照指纹图谱分别如图 1B 和图 2B 所示,相似度范围在 0.903~0.997 之间(表 2)。利用化学对照品对 UVD 和 ELSD 条件下的 15 个共有峰进行了指

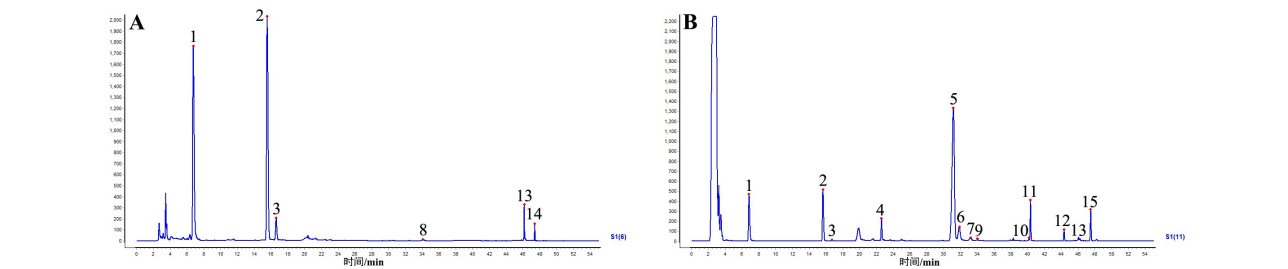
认,共准确指认 10 个色谱峰,结果如图 2 所示,其主要结构类型包含黄酮类(化合物 1、2、3)、皂苷类(化

合物 4、5、11、12、15)、二苯甲酮类(化合物 8)及苯丙素类(化合物 13)。



注:A.UVD 检测;B.ELSD 检测

图 1 18 批知母药材在不同检测器下的指纹图谱叠加图



注:A.UVD 检测;B.ELSD 检测;1.新芒果苷;2.芒果苷;3.异芒果苷;4.知母皂苷 N;5.知母皂苷 B II;

8.2,6,4'-Trihydroxy-4-methoxy-benzophenone;11.知母皂苷 B III;12.Anemarrhenasaponin I;13.Nyasol;15.知母皂苷 A III

图 2 知母药材在不同检测器下的的对照指纹图谱

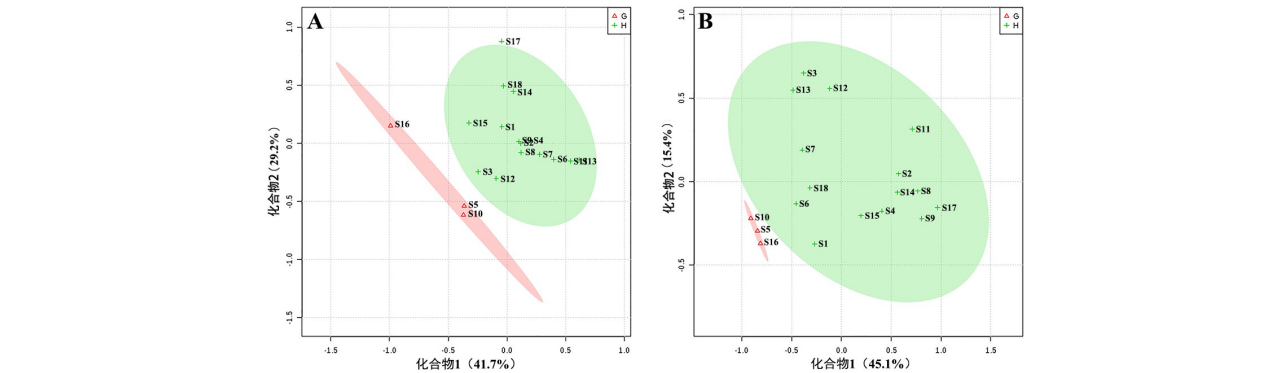
表 2 18 批知母药材的相似度值

批次	UVD	ELSD	批次	UVD	ELSD
S1	0.998	0.997	S10	0.829	0.943
S2	0.997	0.983	S11	0.953	0.977
S3	0.957	0.977	S12	0.911	0.983
S4	0.964	0.985	S13	0.956	0.974
S5	0.846	0.968	S14	0.999	0.996
S6	0.933	0.979	S15	0.972	0.983
S7	0.995	0.997	S16	0.786	0.903
S8	0.969	0.981	S17	0.999	0.994
S9	0.996	0.970	S18	0.995	0.994

2.5 化学计量学分析

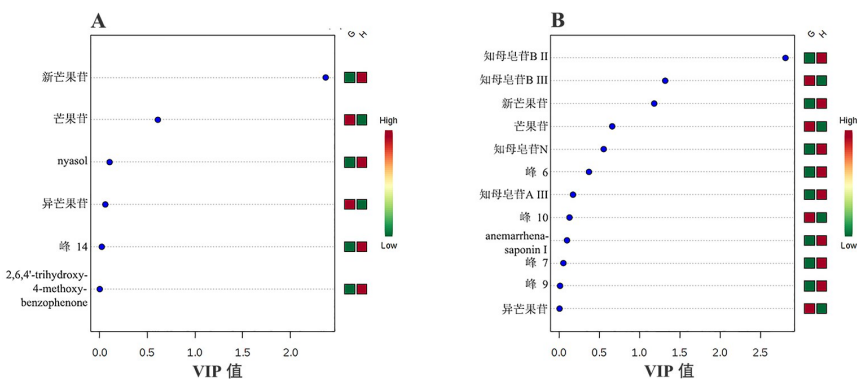
采用 MetaboAnalyst 4.0 分析软件对 18 批知

母药材进行偏最小二乘法判别 (PLS-DA) 分析^[15-16]。分别以 UVD 条件下 6 个共有峰与 ELSD 条件下 12 个共有峰的峰面积作为变量,绘制 PLS-DA 得分图(图 3)。在 UVD 和 ELSD 条件下,S5、S10 和 S16 与其他 15 批次药材聚为 2 类,其中相似度最低的 S16 聚类差异明显,此结果与相似度结果一致。进一步基于变量重要性投影法(VIP)筛选造成知母药材差异的贡献成分(图 4)。在 UVD 条件下,差异成分主要为新芒果苷($VIP = 2.36$),在 ELSD 条件下,差异成分主要为知母皂苷 B II ($VIP = 2.81$)、知母皂苷 B III ($VIP = 1.32$) 和新芒果苷 ($VIP = 1.18$)。



注:A.UVD 检测;B.ELSD 检测;G.S5、S10、S16 批次;H.除 S5、S10、S16 外的 15 个批次

图 3 18 批知母药材的 PLS-DA 得分图



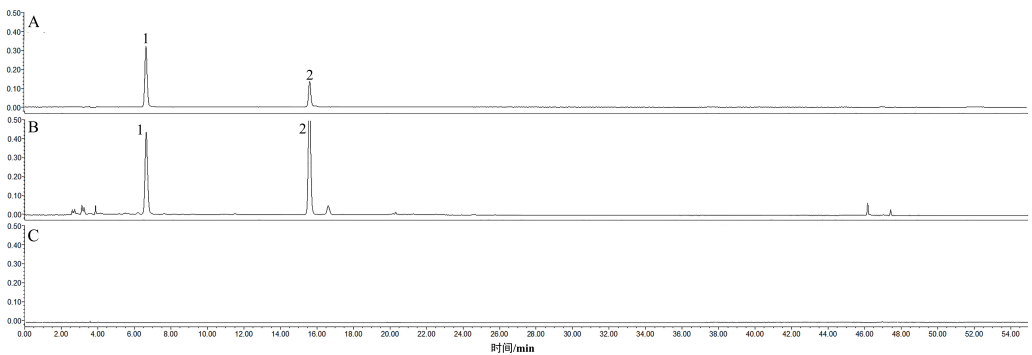
注:A.UVD 检测;B.ELSD 检测;G.S5、S10、S16 批次;H.除 S5、S10、S16 外的 15 个批次

图 4 18 批知母药材的 VIP 图

2.6 多种特征成分含量测定方法

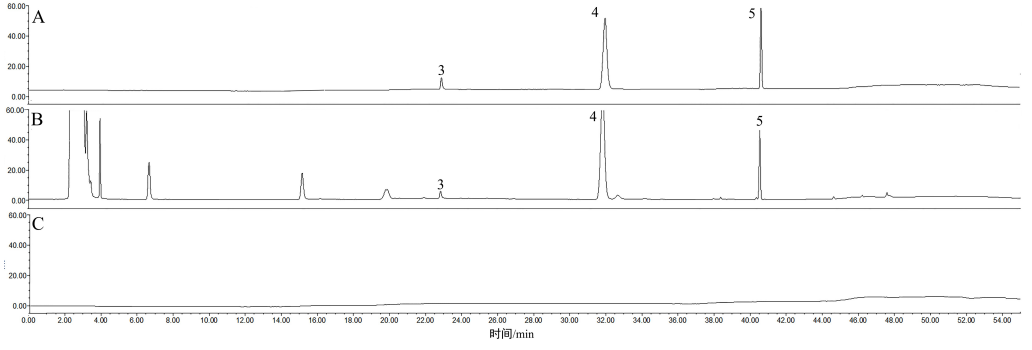
本实验在如上建立知母药材的 HPLC-UVD-ELSD 指纹图谱方法的基础上,采用同样色谱条件同步建立了知母中新芒果苷、芒果苷、知母皂苷 N、知母皂苷 B II、知母皂苷 B III 这 5 个特征成分的同时含量测定方法,并对多批次药材进行了含量测定。

2.6.1 专属性考察 取空白溶液、混合对照品溶液及供试品溶液,按照“2.1”项下色谱条件分别进样分析。结果表明,空白溶液不干扰新芒果苷、芒果苷、知母皂苷 N、知母皂苷 B II 和知母皂苷 B III 这 5 个特征成分,说明该方法专属性良好,结果见图 5~6。



注:1.新芒果苷;2.芒果苷

图 5 混合对照品(A)、供试品(B)及空白(C)溶液 HPLC-UVD 色谱图



注:3.知母皂苷 N;4.知母皂苷 B II;5.知母皂苷 B III

图 6 混合对照品(A)、供试品(B)及空白(C)溶液 HPLC-ELSD 色谱图

2.6.2 线性及范围 分别将“2.2.1”项下混合对照品溶液进行等比稀释,按“2.1”项下色谱条件依次测定分析并记录上述 5 个成分的色谱峰面积。以对照品质量浓度($X, \mu\text{g/mL}$)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归计算,结果表明,新芒果苷在

$4.33 \sim 433.50 \mu\text{g/mL}$ 内呈良好的线性关系,回归方程为 $Y = 27\,614X - 9\,890 (r = 0.999\,8)$;芒果苷在 $8.36 \sim 334.46 \mu\text{g/mL}$ 内呈良好的线性关系,回归方程为 $Y = 45\,196X + 177\,646 (r = 0.999\,6)$ 。以对照品质量浓度的对数值为横坐标(X)、峰面积的对数

值为纵坐标(Y)进行线性回归计算,结果表明,知母皂苷 N 在 5.30~211.88 μg/mL 呈良好的线性关系,回归方程为 $Y = 1.726\ 0X + 1.745\ 6$ ($r = 0.999\ 8$);知母皂苷 BⅡ在 44.48~1 779.19 μg/mL 内呈良好的线性关系,回归方程为 $Y = 1.726\ 0X + 1.745\ 6$ ($r = 0.998\ 5$);知母皂苷 BⅢ在 5.30~211.88 μg/mL 内呈良好的线性关系,回归方程为 $Y = 1.726\ 0X + 1.745\ 6$ ($r = 0.996\ 0$)。

将最低浓度的对照品溶液进行逐级稀释以信噪比为 10 的浓度作为定量限,测得这 5 个成分的定量限分别为 0.23、0.37、5.85、10.88、2.73 μg/mL。

2.6.3 仪器精密度试验 取批次为 S13 的知母药材粉末,按照“2.2.2”项下制备供试液,按“2.1”项下色谱条件连续测试 6 次,结果显示,5 个成分峰面积的 RSD 值分别为 0.71%、0.60%、2.68%、1.77% 和 3.04%,表明该方法的仪器精密度良好。

2.6.4 方法重复性试验 取批次为 S13 的知母药材粉末,按照“2.2.2”项下平行制备 6 份供试液,按“2.1”项下色谱条件进样分析,结果显示,5 个成分的峰面积 RSD 分别为 2.24%、2.13%、2.87%、1.90%、3.15%,表明该方法的重复性符合要求。

2.6.5 样品稳定性试验 取批次为 S13 的知母药材粉末,按照“2.2.2”项下制备供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件分别在 0、2、4、8、12、24 h 进样分析,结果显示,5 个成分的峰面积 RSD 值分别为 0.93%、0.89%、2.60%、2.01% 和 2.02%,表明供试液在 24 h 内稳定性良好。

2.6.6 方法准确度试验 取已测定的知母药材粉末(S13)9 份,精密称定,以 80%、100% 和 120% 的比例,加入对照品适量,按照“2.2.2”项下平行制备供试液,按“2.1”项下色谱条件依次进样分析并计算回收率。结果显示,低、中、高 3 个浓度下 5 个成分的平均加样回收率分别为 97.44%~100.27%、98.05%~99.19%、102.00%~104.25%、95.48%~98.30% 和 99.61%~104.13%,RSD 值不大于 2.86%,这表明所建立方法的准确度良好。

2.6.7 多批次知母药材质量评价 取 18 批知母药材粉末,按照“2.2.2”项下制备供试液,以“2.1”色谱条件分别进样分析,记录峰面积,采用所建立的标准曲线法对 18 批知母药材的 5 个成分进行含量测定,结果见表 3,18 批知母药材中 5 个成分的含量分别在 1.42~17.19、3.69~16.36、2.96~5.96、48.10~75.53、0.81~11.17 mg/g 内,表明知母中主含知母

皂苷 BⅡ,且不同批次间新芒果苷和知母皂苷 BⅢ的含量波动较大。

表 3 18 批知母药材 5 个成分含量测定试验结果(mg·g⁻¹)

批次	新芒果苷	芒果苷	知母皂苷 N	知母皂苷 BⅡ	知母皂苷 BⅢ
S1	10.57	12.41	4.03	58.67	2.66
S2	9.30	9.53	3.38	48.10	5.85
S3	1.42	15.28	4.90	50.18	6.82
S4	5.82	12.71	2.96	67.13	1.59
S5	14.44	4.84	5.49	63.31	1.99
S6	1.81	16.36	3.81	57.17	5.13
S7	9.55	13.99	4.93	65.70	2.05
S8	7.67	14.82	5.20	58.95	5.47
S9	7.61	10.81	3.31	50.26	11.17
S10	16.51	7.02	4.74	75.53	1.42
S11	5.45	14.49	5.26	60.20	5.97
S12	14.50	4.75	5.64	63.17	1.31
S13	17.19	7.85	5.56	65.90	1.86
S14	12.73	11.99	5.96	73.50	1.06
S15	11.43	7.12	3.31	48.48	3.64
S16	17.14	3.69	5.13	69.71	0.81
S17	14.67	10.32	5.80	66.62	1.07
S18	11.02	10.05	4.72	61.51	1.41
RSD/%	46.47	37.29	20.59	13.39	81.81

3 讨论

本实验以对照品指认的 10 个色谱峰总峰面积为评价指标,对药材提取溶剂(50%、70%、90% 甲醇,50%、70%、90% 乙醇)、提取方式(超声处理、加热回流)和提取时间(超声处理 15、30、45、60 min)分别进行考察,最终以 70% 甲醇超声提取 30 min 的前处理方法最优。

为了建立可以同时进行知母的指纹图谱分析与多指标成分含量测定的高效便捷的方法,寻找最佳色谱条件,本实验对不同品牌色谱柱(Innoval AQ-C₁₈、XBridge™-C₁₈、Venusil ASB-C₁₈、Cosmosil-C₁₈、Ultimate™XB-C₁₈)、不同流动相体系(乙腈-水、乙腈-0.1% 乙酸水溶液、乙腈-0.1% 甲酸水溶液)、不同流速(0.8、1.0、1.2 mL/min)、不同柱温(25、30、35 ℃)、ELSD 不同气体流速(1.0、1.5、2.0 L/min)和漂移管不同温度(60、65、70 ℃)分别进行考察,最终选择 Ultimate™XB-C₁₈ 色谱柱、流动相为乙腈-水(0.1% 甲酸)、流速为 1.0 mL/min、柱温为 30 ℃、ELSD 载气流速为 1 L/min、漂移管温度为 60 ℃,结果显示各色谱峰的峰形和分离程度均较好。

多批次市售知母药材的 HPLC-UVD-ELSD 指

纹图谱的化学计量学分析发现,新芒果苷、知母皂苷 BⅡ 和知母皂苷 BⅢ 是影响批间相似度差异的主要成分,提示在知母的质量控制中有必要关注这 3 个差异成分并将其列入含量测定指标成分。

在知母的含量指标测定成分选择时,为表征各类特征成分的含量贡献,应该尽可能覆盖知母中主要化学结构类型黄酮类和皂苷类成分,其中黄酮类成分中的芒果苷、皂苷类成分中的知母皂苷 BⅡ 亦是药典规定的指标成分。课题组在前期研究发现,知母皂苷 BⅡ 和知母皂苷 BⅢ 是知母吸收入血的主要成分^[17],并表现出抗血小板聚集活性^[4],提示其与知母的药效可能密切相关,是知母整体质量控制中不可忽视的成分。进一步结合考虑指纹图谱化学计量学分析的差异成分,最终选择新芒果苷、芒果苷、知母皂苷 BⅡ、知母皂苷 BⅢ 和知母皂苷 N 这 5 个成分作为知母含量测定的指标成分。对 18 批知母药材的含量测定发现,不同批次间新芒果苷和知母皂苷 BⅢ 的含量波动较大,此结果与指纹图谱的化学计量学分析结果基本一致。

本文建立的知母药材 HPLC-UVD-ELSD 指纹图谱结合多指标含量测定方法,更全面、准确地描述了知母药材化学成分的整体轮廓与各类特征成分的含量贡献,并实现了一次进样即可同时便捷地实现知母药材的定性和定量分析,为整体控制知母药材的质量提供了科学的实验依据。此外,鉴于知母对照品不容易获得,后续可考虑进一步建立知母药材一测多评的含量测定方法。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].北京:中国医药科技出版社,2015:212.
- [2] 龚林,邱彦,刘静,等.知母总皂苷对血管性抑郁小鼠抑郁行为和脑组织病理学的影响[J].中国药物应用与监测,2017,14(2):88-92.
- [3] LU WQ, QIU Y, LI TJ, et al. Timosaponin B-Ⅱ inhibits pro-in-

flammatory cytokine induction by lipopolysaccharide in BV2 cells[J]. Arch Pharm Res, 2009, 32(9): 1301-1308.

- [4] 丛悦,柳晓兰,余祖胤,等.知母皂苷抑制血小板聚集的活性成分筛选及构效关系分析[J].解放军医学杂志,2010,35(11):1370-1373.
- [5] 吴薛明,许婷婷,潘扬,等.知母中具抑瘤活性的芒果苷的微波辅助提取工艺[J].南京中医药大学学报,2011,27(3):260-262.
- [6] 钟艳梅,钟静君,石忠峰,等.知母总皂苷干预 T2DM 大鼠的药效学研究[J].时珍国医国药,2017,28(1):71-74.
- [7] SHAN L, WU Y, YUAN L, et al. Rapid screening of chemical constituents in *Rhizoma anemarrhenae* by UPLC-Q-TOF/MS combined with data postprocessing techniques[J]. Evid Based Complement Altern Med, 2017, 2017: 1-14.
- [8] 许费昀.知母总黄酮片治疗阴虚热盛证 2 型糖尿病Ⅲ期临床研究[D].南京:南京中医药大学,2009.
- [9] 原源.知母防治缺血性脑中风的物质基础及品质评价[D].上海:第二军医大学,2005.
- [10] 朱建新,冯亭亭,罗飞,等.张家口地区知母药材 UPLC 指纹图谱研究[J].河北北方学院学报(自然科学版),2018,34(4):11-17.
- [11] 张洪坤,黄玉瑶,路丽,等.基于 HPLC-ELSD 指纹图谱的亳州和河北知母的聚类 and 判别研究[J].时珍国医国药,2017,28(11):2670-2673.
- [12] 魏静娜,刘征辉,赵琳琳,等.知母药材的 HPLC/PDA/ELSD 指纹图谱研究[J].天津中医药,2015,32(10):618-621.
- [13] 李春兰,毛春芹,陆兔林,等.不同产地知母饮片中原萹皂苷元及芒果苷的含量测定[J].南京中医药大学学报,2010,26(1):59-61.
- [14] 陈素娟,张艳秋,聂静,等.不同产地知母药材的含量测定及指纹图谱研究[J].西北药学杂志,2019,34(3):285-288.
- [15] CHONG J, SOUFAN O, LI C, et al. MetaboAnalyst 4.0: Towards more transparent and integrative metabolomics analysis[J]. Nucleic Acids Res, 2018, 46: W486-W494.
- [16] CHONG J, WISHART DS, XIA J. Using MetaboAnalyst 4.0 for comprehensive and integrative metabolomics data analysis[J]. Curr Protoc Bioinform, 2019, 68(1): e86.
- [17] GENG JL, DAI Y, YAO ZH, et al. Metabolites profile of Xian-Ling-Gu-Bao capsule, a traditional Chinese medicine prescription, in rats by ultra performance liquid chromatography coupled with quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry analysis[J]. J Pharm Biomed Anal, 2014, 96: 90-103.

(编辑:杨巍敏)