

· 监管技术 ·

HPLC-CAD法与ELSD法用于测定蒺藜皂苷提取物中蒺藜皂苷K的对比研究

李海亮¹, 李耀磊¹, 张子安², 王莹¹, 金红宇^{1*}, 马双成¹ (1. 中国食品药品检定研究院, 北京 102629; 2. 长白山制药股份有限公司, 吉林 132021)

摘要 目的: 分别建立高效液相色谱-电雾式 (CAD) 和蒸发光散射 (ELSD) 2种通用型检测器测定蒺藜皂苷提取物中蒺藜皂苷K含量的方法。方法: 采用高效液相色谱法, Waters Symmetry Shield RP18为色谱柱, 以乙腈-水为流动相, 梯度洗脱, 体积流速为 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 柱温为 $25 \text{ }^\circ\text{C}$; 使用CAD和ELSD检测器测定, 并对样品实测结果进行比较。结果: 2种方法线性关系均良好, 精密度、重复性、稳定性及加样回收率皆符合方法学要求, CAD的检测限和定量限均比ELSD低。结论: 2种检测方法都可用于蒺藜皂苷提取物中蒺藜皂苷K的含量测定, CAD检测器比ELSD检测器具有更高的灵敏度和精密度。

关键词: 蒺藜皂苷提取物; 蒺藜皂苷K; 电喷雾检测器; 蒸发光检测器; 含量测定

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 1002-7777(2023)06-0680-07

doi:10.16153/j.1002-7777.2023.06.007

Comparative Study on Content Determination of Tribulus Terrestris Saponin K in Tribulus Teristus Saponin Extracts by HPLC-CAD and ELSD

Li Hailiang¹, Li Yaolei¹, Zhang Zian², Wang Ying¹, Jin Hongyu^{1*}, Ma Shuangcheng¹ (1. National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 102629, China; 2. Changbaishan Pharmaceutical Co., Ltd, Jilin 132021, China)

Abstract Objective: To establish two methods for the determination of Tribulusteristussaponin K in tribulus teristus saponin extract with CAD and ELSD detectors. **Methods:** HPLC was performed on Waters Symmetry Shield RP18 column with mobile phase composed of acetonitrile-water at a flow rate of $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ in gradient elution mode, the column temperature was 25°C . CAD and ELSD detectors were respectively used to detect, and the content determination results of the samples were compared. **Results:** The linear relationship between the two methods was good, and the precision, repeatability, stability and recovery rate met the methodological requirements. The detection limit and quantitation limit of CAD were lower than those of ELSD. **Conclusion:** Both methods can be used to determine the content of Tribulusterrestrissaponin K in tribulus terrestris saponin extract. CAD method has higher sensitivity and precision than ELSD method.

Keywords: tribulus terrestris saponin extract; tribulus terrestris saponin K; electrospray detector; evaporative light scattering detector; content determination

蒺藜皂苷提取物为蒺藜科植物蒺藜 (*Tribulus Terrestris* L.) 经过乙醇提取、大孔树脂精制等工艺得到的提取物, 主要活性成分为甾体皂苷类及黄酮类物质^[1-3], 其功能为活血化瘀、通经活络, 用于

中风病中经络 (轻中度脑梗死) 恢复期中医辨证属风痰瘀阻证者, 症见半身不遂、口舌歪斜、语言謇涩或不语、偏身麻木等^[4-9]。蒺藜皂苷K为蒺藜皂苷提取物中的主要有效成分之一, 结构见图1。

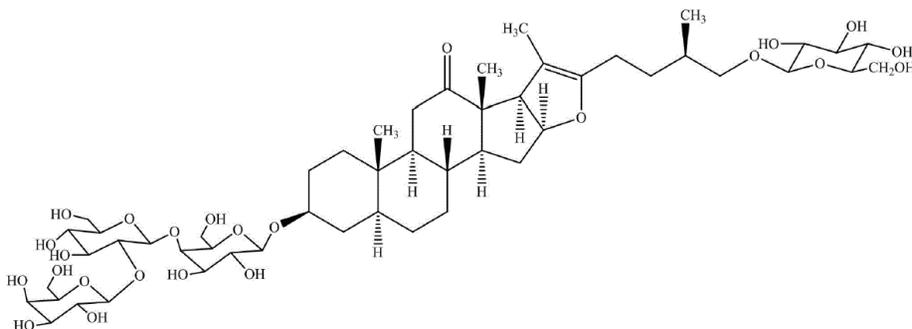


图1 蒺藜皂苷K结构

电喷雾式检测器 (Charged Aerosol Detector, CAD) 是一种新型的通用型检测器^[10-11], 其基于雾化气溶胶的原理, 雾化后的颗粒经干燥后与带电氮气碰撞, 使分析物表面带上电荷, 通过静电测定分析物表面电荷量, 测量值与被检测物质的质量成一定比例关系, 检测信号不依赖于被检测物质的化学结构和光学性质, 对不同结构的化合物具有较为统一的响应。自问世以来, CAD检测器用于直接测定氨基酸、脂类^[12]、皂苷^[13]、萜类内酯^[14]、脂肪酸、表面活性剂、糖类及氨基糖苷^[15-16]等物质, 在中药和天然产物分析等领域都有重要的应用。CAD分析方法也成为美国药典 (United States Pharmacopoeia, USP)、欧洲药典 (European Pharmacopoeia, EP) 及国际标准化组织 (International Standardization Organization, ISO) 的标准方法之一, 现在CAD已收载于2020版《中华人民共和国药典》 (以下简称《中国药典》), 适用于大部分非挥发性和半挥发性化合物的高灵敏度检测和药物全面表征。蒸发光散射检测器 (Evaporative Light Scattering Detector, ELSD) 是质量型通用检测器, 对非挥发性成分均能产生响应, 响应值与检测物质的质量成正比。方惠娟等^[17]采用ELSD测定蒺藜粗皂苷中3种甾体皂苷元; 刘巍等^[18]采用ELSD对蒺藜粗皂苷中蒺藜呋甾皂苷甲的含量进行检测。

为了提高蒺藜皂苷提取物质量控制的方法, 本文分别建立了高效液相色谱-电喷雾检测器

(HPLC-CAD) 和高效液相色谱-蒸发光散射检测器 (HPLC-ELSD) 对蒺藜皂苷K含量进行测定的方法, 并对2种方法的测定结果进行比较, 为蒺藜皂苷提取物的质量评价提供一定的依据。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

高效液相色谱仪 (Ultimate3000系列液相色谱仪, 包括进样器和四元泵, 配置CAD检测器, Thermo Fisher Scientific公司); 高效液相色谱仪 (1260系列高效液相色谱仪, 包括自动进样器和四元泵, 配置ELSD检测器, Agilent公司); 超声波清洗器 (型号KQ-500E, 昆山超声仪器有限公司); 电子天平 (型号XS 105DU, Sartorius公司); Milli-Q超纯水处理系统 (Millipore公司)。

1.2 试剂

蒺藜皂苷K对照品 (批号112023-201601) 由中国食品药品检定研究院提供; 蒺藜皂苷提取物由长白山制药股份有限公司提供, 编号分别为S1~S15。甲醇、乙腈 (色谱纯, Fisher公司), 试验用水为超纯水。

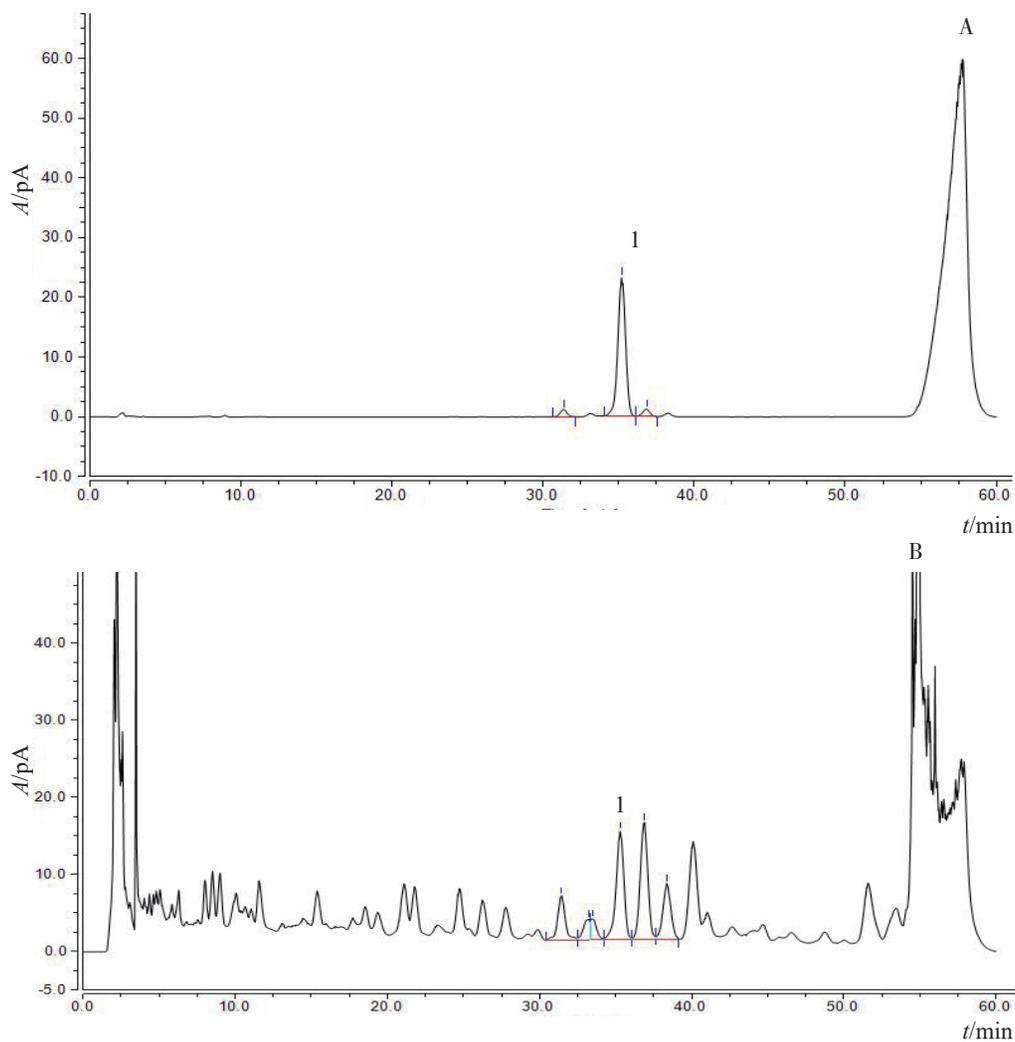
2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适用性

色谱柱为Waters Symmetry Shield RP18 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 以乙腈为流动相A, 以水为流动相B, 洗脱梯度 (0~50 min, 20%A→25%A; 50~655 min, 25%A→80%A), 柱温为25 °C, 流速为1.0 mL · min⁻¹; 对照品溶

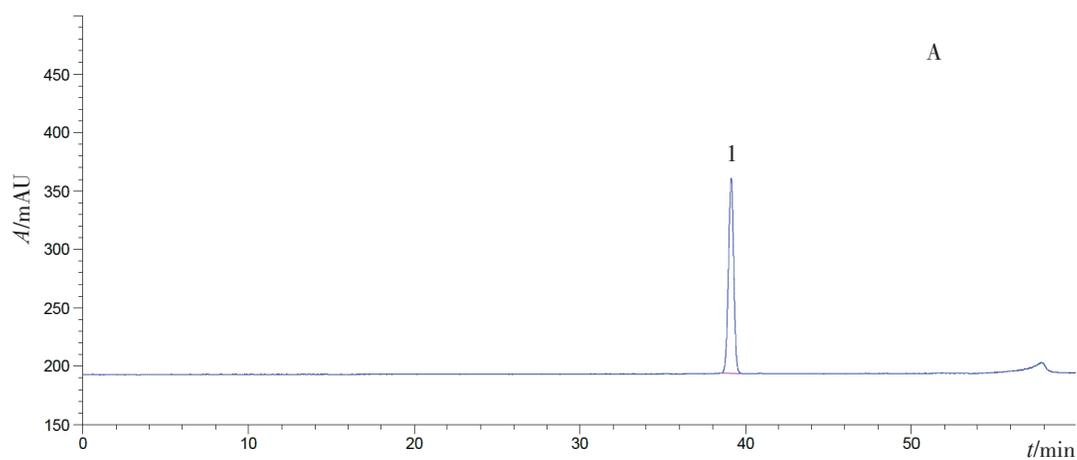
液和供试品溶液进样量均为 $10\ \mu\text{L}$ ；CAD检测器检测，雾化温度为 $35\ ^\circ\text{C}$ ，PF值为1.0，采样频率 $10\ \text{Hz}$ ；ELSD检测器漂移管温度 $105\ ^\circ\text{C}$ ，载气流速

$2.5\ \text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ ，蒺藜皂苷k对照品及蒺藜皂苷提取物HPLC-CAD色谱图及HPLC-ELSD色谱图见图2、图3。



A: 蒺藜皂苷 K 对照品; B: 供试品; 1: 蒺藜皂苷 K。

图2 蒺藜皂苷 k 对照品及蒺藜皂苷提取物 HPLC-CAD 色谱图



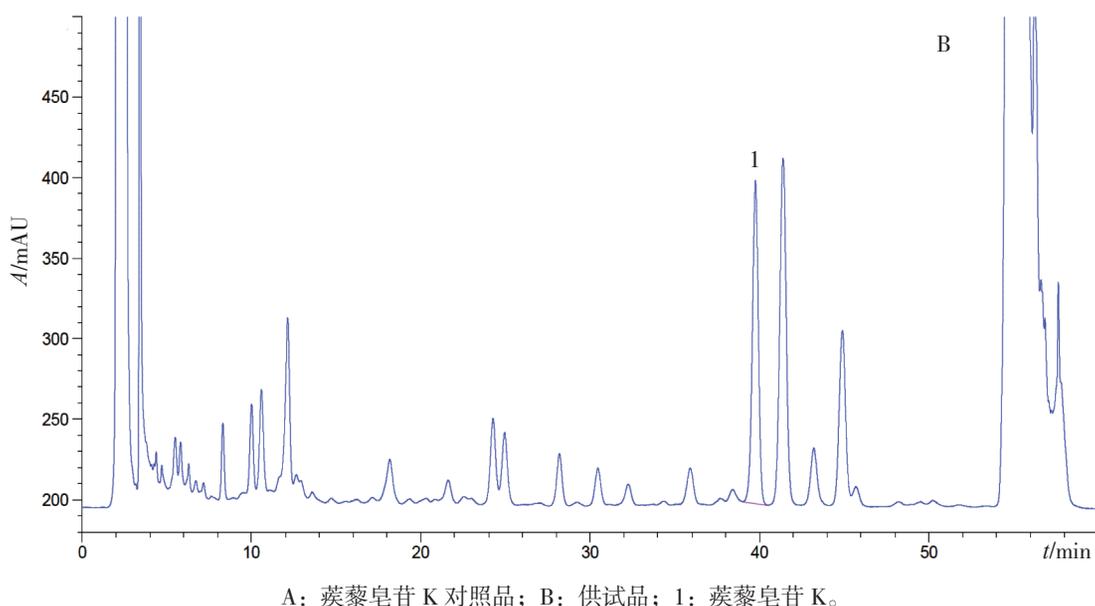


图3 蒺藜皂苷提取物k对照品及蒺藜皂苷 HPLC-ELSD 色谱图

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备

精密称量蒺藜皂苷K对照品适量，置10 mL量瓶中，加70%甲醇稀释至刻度，摇匀，制成每1 mL含0.3 mg的对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备

取供试品约60 mg，精密称定，置10 mL量瓶中，用70%甲醇稀释至5 mL，摇匀，滤过，取续滤液，即得。

2.3 CAD检测方法学考察

2.3.1 线性关系考察

分别精密吸取蒺藜皂苷K对照品溶液1、2、5、10、15、20 μ L，注入液相色谱仪，测定峰面积。以峰面积为纵坐标（Y），进样量为横坐标（X），绘制标准曲线，计算一次线性回归方程为 $Y=2.6526X+0.5427$ ， $R^2=0.9991$ ；线性范围为0.301~6.016 μ g。

2.3.2 定量限与检测限

分别取蒺藜皂苷K对照品溶液逐级稀释至合适的浓度，按照“2.1”项下CAD检测方法进样测定。以信噪比（S/N）为3:1时测得检测限为0.030 μ g，以信噪比（S/N）为10:1时测得定量限为0.101 μ g。

2.3.3 精密度试验

分别取蒺藜皂苷K对照品溶液10 μ L，按照“2.1”项下色谱条件连续进样6次，记录峰面积。结果峰面积的RSD（ $n=6$ ）为0.35%，表明仪器精密度良好。

2.3.4 重复性试验

取同一批蒺藜皂苷提取物（S1）6份，精密称定，按照“2.2.2”项下方法制备供试品溶液，按照“2.1”项下色谱条件进样，计算蒺藜皂苷K的含量（ $n=6$ ）为1.45%，RSD为1.86%，表明方法重复性良好。

2.3.5 稳定性试验

取同一批蒺藜皂苷提取物（S1）供试品溶液，放置于室温，分别于0、2、4、8、12、24、36、48 h进样测定，记录峰面积。结果蒺藜皂苷K峰面积的RSD（ $n=8$ ）为1.89%，表明方法稳定性良好。

2.3.6 加样回收率试验

取已知含量的6份蒺藜皂苷提取物（S1）约60 mg，精密称定，分别加入蒺藜皂苷K对照品溶液3 mL，按照“2.2.2”方法制备供试品溶液，按照“2.1”项下色谱条件进样10 μ L，计算蒺藜皂苷K的回收率，蒺藜皂苷提取物的平均回收率（ $n=6$ ）为96.5%，RSD为2.76%，表明测定方法的准确性均好。

2.4 ELSD检测方法学考察

2.4.1 线性关系考察

分别精密吸取蒺藜皂苷K对照品溶液1、2、5、10、15、20 μL ，注入液相色谱仪，测定峰面积。以峰面积的对数值为纵坐标(Y)，进样量的对数值为横坐标(X)，绘制标准曲线，计算对数线性回归方程为 $Y=1.824X+2.6338$ ， $R^2=0.9981$ ；线性范围为0.301~6.016 μg 。

2.4.2 定量限与检测限

分别取蒺藜皂苷K对照品溶液逐级稀释至合适的浓度，按照“2.1”项下ELSD检测方法进样测定。以信噪比(S/N)为3:1时测得检测限为0.091 μg ，以信噪比(S/N)为10:1时测得定量限为0.301 μg 。

2.4.3 精密度试验

分别取蒺藜皂苷K对照品溶液10 μL ，按照“2.1”项下色谱条件连续进样6次，记录峰面积。结果峰面积的RSD($n=6$)为1.79%，表明仪器精密度良好。

2.4.4 重复性试验

取同一批蒺藜皂苷提取物(S1)6份，精密称定，按照“2.2.2”项下方法制备供试品溶液，按照

“2.1”项下色谱条件进样，计算蒺藜皂苷K的含量($n=6$)为1.41%，RSD为1.41%，表明方法重复性良好。

2.4.5 稳定性试验

取同一批蒺藜皂苷提取物(S1)供试品溶液，放置于室温，分别于0、2、4、8、12、24、36、48 h进样测定，记录峰面积。结果蒺藜皂苷K峰面积的RSD($n=8$)为1.90%，表明方法稳定性良好。

2.4.6 加样回收率试验

取已知含量的6份蒺藜皂苷提取物(S1)约60 mg，精密称定，分别加入蒺藜皂苷K对照品溶液3 mL，按照“2.2.2”方法制备供试品溶液，按照“2.1”项下色谱条件进样10 μL ，计算蒺藜皂苷K的回收率，蒺藜皂苷提取物的平均回收率($n=6$)为97.4%，RSD为1.90%，表明测定方法的准确性良好。

2.5 样品含量测定

分别使用CAD法的一次线性回归方程、CAD法的对数回归方程及ELSD法的对数回归方程分别计算样品中蒺藜皂苷K的含量，如表1所示。

表1 不同方法计算含量结果比较

批号	CAD法一次线性回归/%	CAD法对数回归/%	ELSD法对数回归/%	RSD/%
S1	1.49	1.46	1.43	2.05
S2	3.10	3.14	3.12	0.64
S3	3.24	3.29	3.31	1.10
S4	3.21	3.26	3.18	1.26
S5	1.42	1.39	1.39	1.24
S6	2.42	2.41	2.53	2.71
S7	2.43	2.42	2.42	0.24
S8	2.67	2.71	2.75	1.48
S9	2.16	2.14	2.21	1.66
S10	2.36	2.35	2.45	2.31
S11	3.09	3.13	3.29	1.60
S12	3.08	3.11	3.05	0.97
S13	2.75	2.76	2.80	0.96
S14	3.09	3.13	3.18	1.44
S15	2.46	2.45	2.43	0.62

3 讨论

3.1 色谱条件的选择

本试验对流动相梯度条件进行了优化, 最终选用乙腈-水系统梯度洗脱对蒺藜皂苷提取物进行分离。同时考察了3根不同品牌及型号的色谱柱, 最终发现Waters Symmetry Shield RP18 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱对各峰分离效果优于其他色谱柱, 故选择其用于含量测定方法的建立。

3.2 不同提取溶剂的考察

考察了不同溶剂制备供试品溶液对含量测定的影响。分别使用甲醇、50%甲醇、70%甲醇、甲醇-三氯甲烷(2:1) 4种不同溶剂对同一批蒺藜皂苷提取物进行供试品溶液的制备, 并测定蒺藜皂苷K的含量, ELSD法结果表明, 4种溶剂制备供试品溶液的含量测定结果分别为1.36%、1.37%、1.43%、1.07%。同时, 考虑到样品的溶解性和溶剂效应等因素, 最终选用70%甲醇作为供试品制备溶剂。

3.3 检测器的参数优化

3.3.1 CAD参数优化

CAD检测器的关键参数包括雾化温度和幂率(Power Function Value, PF)值。本研究对雾化温度Low(35℃)档和High(50℃)档进行考察, 发现信号响应并无显著差异, 故选用雾化温度为Low档。分别采用1.0、1.1、1.2共3个不同PF值, 进行线性拟合, 所获得的回归方程线性相关系数均大于0.997, 因此, 选用仪器默认值1.0进行测定。

3.3.2 ELSD参数优化

主要对气体流速、漂移管温度进行优化, 最终选择漂移管温度105℃, 载气流速2.5 L·min⁻¹。

3.4 CAD法不同回归方式比较

上述CAD测定法的结果均采用一次线性回归方程进行计算。本研究同时考察了对数线性回归, 并对2种计算结果进行了对比。以峰面积的对数值为纵坐标(Y), 进样量的对数值为横坐标(X), 绘制标准曲线, 计算对数回归方程为 $Y=0.8877X+0.5063$, $R^2=0.9998$ 。采用对数线性回归对15批样品进行计算, 并与一次线性计算结果进行比较(见表1), 结果无明显差异, 表明CAD法在低浓度或一定浓度范围的情况下, 校正曲线接近线性, 一次线性回归方程的计算方法可用于实际检测的含量计算。

3.5 CAD与ELSD检测器结果比较

CAD法的一次线性计算结果与ELSD法对数线性计算结果无明显差异, 且方法学验证均满足试验要求, 表明2种检测器均可用于蒺藜皂苷K的含量测定。

3.6 CAD与ELSD检测器方法适用性比较

CAD与ELSD均为通用型检测器, 适用检测的化合物类型相近。目前, 在皂苷成分含量测定方面以蒸发光检测器使用较多。在稳定性方面, CAD检测器需要平衡时间较短, 基线较为稳定, 而ELSD检测器基线漂移较为明显; 在灵敏度方面, 通过本试验发现, CAD的灵敏度约为ELSD的3~4倍, 且在重现性方面CAD表现较好; 在结果计算方面, CAD可采用一次线性回归方程和对数线性方程进行计算, 经验证, 2种计算方式无显著差异, 而ELSD检测器需采用对数线性方程计算, 计算过程较为繁琐。针对本研究品种, 对2种方法的性能比较见表2。

表2 2种方法性能比较

方法	定量限/μg	检测限/μg	精密度 RSD/%	重复性 RSD/%	稳定性 RSD/%	回收率/%
CAD法	0.030	0.101	0.35	1.86	1.89	96.5
ELSD法	0.091	0.301	1.79	1.41	1.90	97.4

4 讨论

本研究分别采用CAD与ELSD2种检测器对蒺藜皂苷提取物中蒺藜皂苷K进行含量测定,对2种方法进行优化,分别对方法学进行了考察。通过对样品测定及方法学的比较,研究认为,在本提取物测定中,CAD检测器比ELSD检测器具有较高的灵敏度和较低的检测限,重现性与稳定性均较好,且操作较为简便,同时比较了不同计算方法对检测结果的影响。经过验证表明,2种方法经优化后均符合试验要求,可用于蒺藜皂苷提取物中蒺藜皂苷K的含量测定。

参考文献:

- [1] 任洁,周慧,王晨.蒺藜果实的化学成分研究[J].中草药,2019,50(4):808-813.
- [2] 孙国珍,张洁,马百平.蒺藜中甾体皂苷类化学成分及其药理活性研究进展[J].中草药,2007,38(7):1111-1115.
- [3] 李瑞海,李君玲,杨松松.蒺藜总皂苷提取工艺研究[J].中国实验方剂学杂志,2006,12(8):1-2.
- [4] 吴克磊,康利平,熊呈琦,等.蒺藜全草中甾体皂苷类化学成分研究[J].天津中医药大学学报,2012,31(4):225-228.
- [5] 齐建红.蒺藜皂苷的药理作用研究新进展[J].西安文理学院学报(自然科学版),2013,16(3):26-29.
- [6] 许丹丹,杨洋,宝艳儒,等.蒺藜化学成分及体内外代谢的研究进展[J].中华中医药杂志,2019(4):1594-1598.
- [7] 赵外荣,施雯婷,郁丘婷,等.蒺藜化学成分分析及其皂苷类成分对心血管疾病作用的实验研究进展[J].上海中医药大学学报,2018,32(4):105-108.
- [8] 候爽,陈长军,杨博,等.蒺藜成分及主要药理作用研究进展[J].中国医药导报,2014,11(35):156-159.
- [9] 陈永志,姜月华,孟宪卿,等.刺蒺藜及其有效成分治疗心血管疾病研究进展[J].吉林中医药,2016,36(3):316-319.
- [10] Vehovec T, Obreza A. Review of Operating Principle and Applications of the Charged Aerosol Detector[J]. J Chromatogr A, 2010, 1217(10):1549-1556.
- [11] 刘路,高旋,杨永健.HPLC-电雾式检测器的应用[J].中国医药工业杂志,2012,43(3):227-231.
- [12] Moreau RA. The Analysis of Lipids via HPLC with a Charged Aerosol Detector[J]. Lipids, 2006, 41(7):727-734.
- [13] 白长财,柴兴云,王海龙,等.利用电雾式检测器建立三七药材液相色谱指纹图谱[J].中国药科大学学报,2009,40(1):54-58.
- [14] 刘丽娜,金红宇,潘媛媛,等.高效液相色谱-电雾式检测器法测定银杏叶提取物中萜类内酯含量[J].药物分析杂志,2018,38(7):1269-1274.
- [15] Shinsuke I, Jun ZM, Toshimasa T. Direct Detection Method of Oligosaccharides by High Performance Liquid Chromatography with Charged Aerosol Detection[J]. Biomed Chromatogr, 2010, 21(4):338-342.
- [16] Dixon RW, Baltzell G. Determination of Levoglucosan in Atmospheric Aerosols Using High Performance Liquid Chromatography with Aerosol Charge Detection[J]. J Chromatogr A, 2006, 1109(2):214-221.
- [17] 方惠娟,李清,关潇滢,等.HPLC-ELSD法测定蒺藜粗皂苷中3种甾体皂苷元[J].中草药,2012,43(12):2417-2419.
- [18] 刘巍,朱天全,曾艳,等.HPLC法测定蒺藜粗皂苷中蒺藜呋甾皂苷甲的含量[J].中国药师,2012,15(9):1353-1354.

(收稿日期 2022年9月20日 编辑 李亚徽)