

# HPLC-ELSD 法测定桔梗中桔梗皂苷 D 的含量

朱丹妮, 舒 变, 郅 慧, 高山林

(中国药科大学, 江苏 南京 210038)

**摘要:** 首次采用高效液相-蒸发光散射检测器色谱法测定桔梗 [*Platycodon grandiflorum* (Jacq.) A. DC.] 中桔梗皂苷 D 含量, 以  $C_{18}$  ( $5 \mu\text{m}$ ,  $4.6 \text{ mm} \times 250 \text{ mm}$ ) 为色谱柱,  $V(\text{乙腈}):V(\text{水}) = 28:72$  为流动相, 流速  $0.7 \text{ mL/min}$ , 以 ELSD-500 为检测器, 外标法定量。结果表明: 桔梗皂苷 D 在  $0.3 \sim 2.4 \mu\text{g}$  范围内呈线性, 回收率为  $99.57\%$  ( $n=5$ ), RSD 为  $1.10\%$ 。对 8 种不同来源的桔梗材料和 20 个四倍体株系桔梗皂苷 D 含量的测定说明, 此法是测定桔梗皂苷 D 的较佳方法, 可作为我国桔梗质量控制和评价的一种可靠的技术。

**关键词:** 桔梗; 桔梗皂苷 D; 高效液相-蒸发光散射

中图分类号: S657.7<sup>+</sup>2; S567.23<sup>+</sup>9; Q946.83 文献标识码: A 文章编号: 1004-0978(2001)04-0011-03

**Determination of platycodin D in *Platycodon grandiflorum* by HPLC-ELSD method** ZHU Dan-ni, SHU Luan, ZHI Hui, GAO Shan-lin (China Pharmaceutical University, Nanjing 210038, China), *J. Plant Resour. & Environ.* 2001, 10(4): 11-13

**Abstract:** This paper established a new HPLC-ELSD method to determine the content of platycodin D in different samples of *Platycodon grandiflorum* (Jacq.) A. DC. Alltech  $C_{18}$  column ( $5 \mu\text{m}$ ,  $4.6 \text{ mm} \times 250 \text{ mm}$ ) was used, mobile phase was  $V(\text{acetonitrile}):V(\text{water}) = 28:72$  at  $0.7 \text{ mL/min}$  speed. ELSD-500 detector was used for qualitative and quantitative analysis in external standard method. Obtained results indicated that within  $0.3 \sim 2.4 \mu\text{g}$  platycodin D had a good linearity. The average recovery was  $99.57\%$  ( $n=5$ ) with RSD  $1.10\%$ . In order to evaluate the reliability of this new method, the content of platycodin D in seven different original samples and 20 induced tetraploid lines in tissue culture were determined. The obtained results indicated that this is first time to report an advanced and effective method for the quality control and evaluation for raw materials of *P. grandiflorum*.

**Key words:** *Platycodon grandiflorum* (Jacq.) A. DC.; platycodin D; polyploid; HPLC-ELSD

中药桔梗为桔梗科植物桔梗 [*Platycodon grandiflorum* (Jacq.) A. DC.] 的干燥根, 在我国药用历史悠久, 有宣肺、利咽、祛痰和排脓之效<sup>[1]</sup>。桔梗皂苷为桔梗中主要有效成分, 桔梗皂苷 D 是桔梗皂苷中的主要皂苷<sup>[2]</sup>。中国药典中对桔梗总皂苷含量的测定用重量法<sup>[1]</sup>, 无桔梗皂苷 D 含量测定方法的记录。韩国学者采用反相 HPLC 测定桔梗皂苷 D, 测得韩国国内桔梗根中的皂苷 D 含量为  $0.050\% \sim 0.090\%$ <sup>[3]</sup>。日本学者<sup>[4,5]</sup>用 HPLC 法以 TSK-GEL 酰胺-80 为分析柱, 以  $V(\text{乙腈}):V(\text{水}) = 82:18$  为洗脱液, 检测波长  $203 \text{ nm}$ , 定量或定性分析桔梗皂苷 D; 我国学者许传莲等采用 RP-HPLC 法测定不同产地桔梗中皂苷 D 的含量, 选择以  $C_{18}$  柱为色谱分析柱, 检测波长为  $210 \text{ nm}$ <sup>[6]</sup>。由于桔梗皂苷 D 无 C=C 双键和共轭结构, 无强的发色基团, 末端吸收 ( $203 \text{ nm}$ ,  $210 \text{ nm}$ ) 检测干扰较大。作者首次采用 HPLC-

ELSD 法测定桔梗皂苷 D 含量, 旨在为控制桔梗药材质量提供科学的分析方法。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料来源

供试的桔梗药材购自安徽省亳州药材公司, 经余伯阳教授鉴定; 桔梗四倍体株系由中国药科大学遗传育种教研室经组织培养人工诱导培育<sup>[7]</sup>; 对照品桔梗皂苷 D 由吉林农业大学刘墨祥教授惠赠。

### 1.2 仪器与试剂

Shimadzu 10A 高效液相色谱仪 (配备 Shimadzu C-R6A 数据处理机, Alltech ELSD-500 型蒸发光散射

收稿日期: 2001-07-23

作者简介: 朱丹妮 (1946-), 女, 上海市人, 学士, 副研究员, 长期从事中药复方化学和物质基础研究。

检测器)。乙腈(色谱纯),水为二次重蒸水。

### 1.3 色谱条件

色谱柱为  $C_{18}$  柱(5  $\mu\text{m}$ , 4.6mm  $\times$  250mm); 流动相:  $V(\text{乙腈}):V(\text{水})=28:72$ ; 流速 0.7 mL/min; 柱温为室温; 进样量: 20  $\mu\text{L}$ ; ELSD 检测器检测参数: 漂移管温度 111 $^{\circ}\text{C}$ ; 载气( $\text{N}_2$ )流速 2.75 L/min。理论塔板数据按桔梗皂苷 D 峰计算, 应不低于 3 000。

### 1.4 供试品提取方法比较

1.4.1 回流提取 精密称取干燥粉碎过 50 目筛的桔梗药材 200 mg, 加入 50 mL 甲醇于索氏提取器中回流提取 4 h, 过滤, 滤液回收至干, 残渣加入 25 mL 水溶解, 以乙醚萃取 3 次, 水液以水饱和正丁醇萃取 5 次, 合并正丁醇液, 回收至干, 残渣以甲醇溶解并定容 5 mL 作为供试品。

1.4.2 超声提取 精密称取干燥粉碎过 50 目筛的桔梗药材 200 mg, 加入 25 mL 甲醇超声提取 30 min, 过滤, 滤渣再加入 25 mL 甲醇超声提取 30 min, 过滤, 用少量甲醇洗涤滤渣, 合并 2 次滤液, 回收甲醇至干, 将残渣以甲醇溶解并定容于 5 mL 容量瓶中。

以上 2 种供试液按上述色谱条件注入液相色谱仪, 测定峰面积, 试验表明两种方法制备的供试品中桔梗皂苷 D 的含量无显著性差异, 因此以下供试品溶液的制备采用操作简便的超声提取法。

### 1.5 对照品溶液的制备

精密称取桔梗皂苷 D 对照品 1.2 mg, 置 10 mL 容量瓶中加适量甲醇溶解, 用流动相稀释至刻度, 摇匀, 即得对照品溶液(0.12 mg/mL)。

### 1.6 测定方法

按超声提取法制备供试品溶液。精密吸取对照品溶液和供试品溶液各 20  $\mu\text{L}$ , 注入液相色谱仪, 按以上色谱条件测定峰面积, 峰面积及浓度均取自然对数后用标准曲线计算桔梗皂苷 D 含量。

### 1.7 不同产地及桔梗多倍体样品桔梗皂苷 D 含量测定

取河南、广西、安徽、山西、湖南、湖北和江苏产桔梗药材及 20 个四倍体株系试管苗, 依上法测定桔梗皂苷 D 含量。

## 2 实验结果

### 2.1 桔梗皂苷 D 浓度和峰面积线性关系的考察

分别取上述对照品溶液 2.5、5、10、15 和 20  $\mu\text{L}$

进样, 按上述色谱条件测定峰面积, 以色谱峰峰面积的自然对数为纵坐标, 以桔梗皂苷 D 对照品进样量的自然对数为横坐标, 绘制标准曲线, 计算回归方程:  $Y=1.7858X+4.8797$ ,  $r=0.9991$ , 线性范围为 0.3~2.4  $\mu\text{g}$ 。表明线性关系良好。

### 2.2 精密度试验

精密吸取桔梗皂苷 D 对照品溶液 20  $\mu\text{L}$ , 重复进样 5 次, 测定其峰面积积分值分别为 44 191、44 980、44 069、44 784 和 43 806, 平均 44 366, RSD 为 1.12% ( $n=5$ ), 表明进样精密度良好。

### 2.3 稳定性试验

将同一供试品溶液分别在 0、2、4、6 和 8 h 进样, 测得桔梗皂苷 D 的峰面积分别为 24 384、24 775、24 803、24 773 和 24 468, 均值 24 641, RSD 为 0.81%, 表明样品溶液在 8 h 内稳定。

### 2.4 重现性试验

取同一产地桔梗药材 5 份, 按 1.4.2 项下制得供试品, 按以上色谱条件测得桔梗皂苷 D 的含量分别为 0.247 0%、0.244 2%、0.247 5%、0.242 7% 和 0.244 7%, 平均 0.245 2%, RSD = 0.82%, 表明用此方法测定桔梗皂苷 D 重现性较好。

### 2.5 回收率试验

采取加样回收测定方法, 精密称取已知含量同批药材粉末(其中含桔梗皂苷 D 0.245%) 5 份, 每份约 100 mg, 加入对照品溶液 2 mL(含桔梗皂苷 D 0.24 mg), 按 1.4.2 项下制备, 进样 20  $\mu\text{L}$ , 测定桔梗皂苷 D 峰面积, 计算回收率, 结果见表 1。可以看出 5 份样品的平均回收率为 99.57%, 表明此法的回收率较高。

### 2.6 不同产地桔梗药材中桔梗皂苷 D 含量

采自河南、广西、安徽、山西、湖南、湖北和江苏的桔梗药材中桔梗皂苷 D 的含量(mg/g)分别为 2.65、2.68、2.49、2.86、2.80、2.68 和 2.78, 变动于 2.49 mg/g ~ 2.86 mg/g(0.249% ~ 0.286%)之间, 但均显著高于采用反相 HPLC 法测得的韩国产桔梗根中的桔梗皂苷 D 含量(0.050% ~ 0.090%)<sup>[3]</sup>。

### 2.7 桔梗多倍体样品桔梗皂苷 D 含量

根据本研究建立的方法, 以桔梗二倍体为对照测定了 20 个多倍体株系(称样量均为 200 mg)桔梗皂苷 D 含量, 结果见表 2。

表1 桔梗皂苷 D 加样回收率试验结果

Table 1 Results of recovery test of platycodin D

编号 No.	样品中桔梗 皂苷 D 的量 Content of platycodin D in sample (mg)	加入桔梗 皂苷 D 量 Added weight of platycodin D (mg)	测得桔梗 皂苷 D 量 Found amount of platycodin D (mg)	回收率 Recovery (%)	平均 回收率 Average recovery (%)	RSD (%)
1	0.240 2	0.24	0.483 2	101.25		
2	0.249 7	0.24	0.485 7	98.33		
3	0.244 2	0.24	0.481 7	98.96	99.57	1.10
4	0.244 8	0.24	0.284 5	99.87		
5	0.250 3	0.24	0.489 0	99.46		

表2 桔梗四倍体株系及亲本二倍体试管苗桔梗皂苷 D 含量

Table 2 The content of platycodin D in tetraploid and diploid of *Platycodon grandiflorum* (Jacq.) A. DC.

株系 Lines	总量 Total amount ( $\mu\text{g}$ )	含量 Content (mg/g)	与二倍体相比较 As compared with diploid %
二倍体 Diploid	522	2.61	100.00
四倍体 Tetraploid			
C-8	546	2.73	104.59
12-1	502	2.51	96.17
C-5	612	3.06	117.24
C-7	488	2.44	93.48
C-1	528	2.64	101.15
A-1	518	2.59	99.23
12-5	512	2.56	98.08
9-3	558	2.79	106.90
9-4	462	2.31	88.51
15-3	524	2.62	100.38
12-4	550	2.75	105.36
C-6	488	2.44	93.49
C-26	404	2.02	77.39
15-8	434	2.17	83.14
C-52	518	2.59	99.23
15-7	518	2.59	99.23
9-6	554	2.77	106.13
C-23	494	2.47	94.64
B-2	516	2.58	98.85
C-10	538	2.69	103.07

表2表明:20个四倍体株系的桔梗皂苷 D 含量在 2.02 mg/g ~ 3.06 mg/g 之间,有 8 个株系高于二倍体,C-5 株系含量最高达 3.06 mg/g,比二倍体高 17.6%,余均与二倍体接近,桔梗四倍体、二倍体株系测得的桔梗皂苷 D 含量大多在 2.5 mg/g(0.25%)以上,与 7 省区采集的桔梗根的桔梗皂苷 D 含量相近。四倍体的田间农艺性状及根部产量优于二倍体,因此为进一步选育产量高及皂甙含量高的优良

桔梗品种展示了较好的前景。

### 3 讨论

蒸发光散射检测器 ELSD 是一种通用质量型检测器,流动相由热气流使之气化喷雾,再进入加热管,溶剂在此挥发,所得分析检测的物质颗粒通过一狭窄光束散射,由光电倍增管收集,ELSD 的响应取决于被分析物质颗粒的数量和大小,不受溶剂的干扰,已成功用于皂苷、生物碱、萜类内酯、氨基酸和糖类分析,是分析无紫外吸收和紫外吸收弱成分的有力工具。本实验的条件是经过反复实验后,综合评价而得出的。

作者首次采用 HPLC-ELSD 法测定桔梗皂苷 D 的含量,并通过对 7 个不同来源的桔梗材料和 20 个四倍体株系桔梗皂苷 D 的含量测定,验证此方法用于桔梗皂苷 D 含量测定是可行的。

供试样品溶液的制备采用 2 种方法,一种为超声提取法;另一种为传统提取法。经过测定,得出两种方法制备的供试品中桔梗皂苷 D 的含量无显著性差异,因此选择采用步骤少,操作简便的超声提取法作为供试品的制备方法。

2000 年版中华人民共和国药典未收载桔梗皂苷 D 的含量测定方法,仅用重量法测定正丁醇部位的量,比较粗糙,HPLC-ELSD 法的建立,为控制桔梗的质量和试管苗的早期筛选提供了新的方法。

#### 参考文献:

- [1] 中华人民共和国药典委员会. 中华人民共和国药典 2000 年版(一部)[M]. 北京:化学工业出版社,2000. 225.
- [2] 肖崇厚. 中药化学[M]. 上海:上海科学技术出版社,1997. 419-421.
- [3] Kim T J, Lee S I. Isolation and determination of platycodin D from platycodi radix [J]. Anal Sci Technol, 1990, 3(3): 339-341.
- [4] 小木曾弘尚. 桔梗皂苷的 HPLC 定量分析[J]. 国外医学中医中药分册,1995,17(5):33.
- [5] 原田正敏. 常用生药成分定量[M]. 东京:东京广川书店,1989. 120-133.
- [6] 许传莲,杨腊虎,郑毅男,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,1999,21(4):35-38.
- [7] 舒 雯,高山林. 桔梗组织培养技术的研究[J]. 植物资源与环境学报,2001,10(3):63-64.

(责任编辑:宗世贤)