

红毛五加叶中常春藤皂苷元的高效液相色谱法测定

钟世红^{1,2}, 卫莹芳², 古锐^{2*}, 吴宇¹, 段雄²

(1. 成都医学院·药学院, 四川成都 610083; 2 成都中医药大学, 四川成都 611131)

摘要:目的 建立红毛五加叶中常春藤皂苷元的测定方法。方法 采用高效液相色谱法。色谱柱为 Welchrom C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相为甲醇-水-冰醋酸-三乙胺 (85: 15: 0.04: 0.02); 流速: 1.0 ml·min⁻¹; 柱温: 35 °C; 检测波长为 210 nm。结果 常春藤皂苷元的线性范围为 0.68 ~ 10.94 μg 平均加样回收率为 100.42%, RSD 小于 2%。结论 该方法准确、专属性强, 可为红毛五加叶的综合开发利用提供参考。

关键词: 红毛五加叶; 常春藤皂苷元; 高效液相色谱

中图分类号: R284.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1008-0805(2010)01-0006-02

HPLC Determination of Hederagenin in Leaves of *Acanthopanax giraldii* Ham s

ZHONG Shi-hong^{1,2}, WEI Ying-fang², GU Rui^{2*}, WU Yu¹, DUAN Xiong²

(1. Pharmaceutical School, Chengdu Medical College, Chengdu 610083 China; 2. Chengdu University of TCM, Chengdu 611131, China)

Abstract Objective To develop a determination method for the hederagenin in leaves of *Acanthopanax Giraldii* Ham s. **Methods** Hederagenin was determined by HPLC method. The separation was performed on a Welchrom C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) with mobile phase of methanol-water-glacial acetic acid-triethylamine (85: 15: 0.04: 0.02). The flow rate was 1.0 mL · min⁻¹. The column temperature was at 35 °C. The detection wavelength was 210 nm. **Results** The linear range of hederagenin was 0.68 ~ 10.94 μg. The average recovery was 100.42%, and the RSD was less than 2%. **Conclusion** The method is accurate and specific which is useful for the integrative exploitation of the leaves of *A. Giraldii* Ham s.

Key words Leaves of *Acanthopanax giraldii* Ham s; Hederagenin; HPLC

红毛五加 *Acanthopanax giraldii* Ham s 收载于四川省中药材标准, 传统以茎皮入药, 为四川地区五加皮的习用品种和羌族特色药材, 具祛风湿、强筋骨之功效, 主治风寒湿痹、足膝无力等证。红毛五加叶目前已受到关注, 四川省阿坝州地区将其开发为保健茶推向市场, 具有进一步开发成新药材的前景。关于红毛五加叶的研究甚少^[1,2], 结合文献及预实验, 红毛五加叶中存在以常春藤皂苷为代表的多种三萜皂苷。本文对红毛五加叶中的常春藤皂苷元进行了定性、定量分析, 以期为其进一步的开发及资源的可持续利用提供科学依据。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 高效液相色谱仪 (Dionex P680 美国戴安), 旋转蒸发器 (buchi 瑞士), 超纯水器 (Millipore 美国), 超声清洗器 (AS5150A 天津, 功率: 180W, 频率: 40KHz), 电子天平 (Sartorius BS224S 北京)。

1.2 试剂与试剂 常春藤皂苷元 (中国药品生物制品检定所, 供含量测定用, 批号 111733-200501), 齐墩果酸 (中国药品生物制品检定所, 批号 110709-200505), 甲醇 (色谱纯, Fisher), 水为超纯水及重蒸水, 其余试剂均为分析纯。

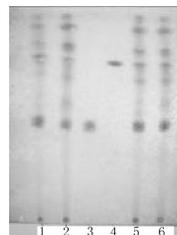
1.3 样品 采自阿坝州, 经成都中医药大学卫莹芳教授鉴定为红毛五加 *Acanthopanax giraldii* Ham s 的干燥叶。

2 方法与结果

2.1 红毛五加叶的薄层鉴别 文献报道, 红毛五加中含有常春藤皂苷及齐墩果酸皂苷^[2], 因此, 本研究对常春藤皂苷元和齐墩果

酸进行了定性鉴别。

取常春藤皂苷元对照品、齐墩果酸对照品, 加甲醇制成每毫升各含 0.4 mg 的混合溶液, 作为对照品溶液。取本品粉末 (过 4 号筛) 约 2 g 精密称定, 加甲醇 50 ml 超声处理 30 min, 滤过, 残渣用甲醇适量洗涤, 合并滤液与洗液, 回收溶剂至干, 残渣加水 10 ml 溶解, 用水饱和正丁醇振摇提取 3 次, 20 ml/次, 合并提取液, 蒸干, 残渣加甲醇 20 ml 盐酸 1 ml 加热水解 4 h, 水解物加水 10 ml 用三氯甲烷振摇提取 2 次, 20 ml/次, 合并提取液, 回收溶剂至干, 残渣加甲醇 2 ml 溶解, 即得供试品溶液。吸取供试品溶液、对照品溶液各 2~5 μl 点于同一硅胶 G 薄层板上, 以环己烷-醋酸乙酯-冰醋酸 (6:4:0.25) 为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 喷以 10% 硫酸乙醇溶液, 在 105 °C 加热至斑点显色清晰, 置日光下检视。供试品色谱中, 在与常春藤皂苷元对照品色谱相应的位置上, 显相同颜色的深蓝色斑点; 在与齐墩果酸对照品色谱相应的位置上, 显相同颜色的蓝紫色斑点。见图 1。



1. 2. 5. 6 红毛五加叶样品
3 常春藤皂苷元 4 齐墩果酸
图 1 红毛五加叶的薄层色谱图

2.2 红毛五加叶中常春藤皂苷元含量测定

2.2.1 色谱条件 色谱柱为 Welchrom-C₁₈ 柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm)。流动相为甲醇-水-冰醋酸-三乙胺 (85: 15: 0.04: 0.02)。检测波长 210 nm, 柱温 35 °C, 体积流量 1.0 ml·min⁻¹, 进样量 10 μl。色谱柱理论塔板数以常春藤皂苷元峰计

收稿日期: 2009-05-06 修订日期: 2009-09-10

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目 (No. 30701087)

作者简介: 钟世红 (1980-), 女 (汉族), 四川隆昌人, 现任成都医学院讲师, 博士学位, 主要从事中药材品种、质量及资源研究工作。

* 通讯作者简介: 古锐 (1979-), 男 (汉族), 四川简阳人, 现任成都中医药大学助理研究员, 硕士学位, 主要从事民族药可持续开发与利用研究工作。

算, 不得低于 2 000。

2.2.2 对照品溶液的制备 精密称取减压真空干燥至恒重的常春藤皂苷元对照品 34.2 mg 置于 100 ml 容量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 制成 0.342 mg/ml 的对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液的制备 取本品粉末(过 4 号筛)约 2 g, 精密称定, 加甲醇 50 ml 回流提取 30 min, 滤过, 残渣用甲醇适量洗涤, 合并滤液和洗液, 回收溶剂至干, 残渣加水 10 ml 溶解, 用水饱和正丁醇振摇提取 3 次, 20 ml/次, 合并提取液, 蒸干, 残渣加甲醇 20 ml 盐酸 1 ml 加热水解 4 h 水解物加水 10 ml 用三氯甲烷振摇提取 2 次, 20 ml/次, 合并提取液, 回收溶剂至干, 残渣加甲醇溶解并转移至 25 ml 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.2.4 标准曲线的绘制 精密吸取对照品溶液 2.4 8 16 32 μ l 进样分析, 测定常春藤皂苷元的峰面积, 以进样量 (μ g) 为横坐标, 峰面积积分为纵坐标, 绘制标准曲线, 得常春藤皂苷元的回归方程为 $Y = 7.2284X - 0.0232$ ($r = 1.0000$), 其进样量在 0.68 ~ 10.94 μ g 范围内呈良好的线性关系。

2.2.5 精密度实验 精密吸对照品溶液 10 μ l 进样, 连续进样 5 次, 记录峰面积, 计算峰面积的 RSD 值为 1.07%, 表明仪器精密度较好。

2.2.6 重复性实验 取本品粉末(过 4 号筛), 按“2.2.3”项下制备供试品溶液 6 份, 进样分析, 测得样品中常春藤皂苷元平均含量为 10.17 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, RSD 为 1.14%, 表明方法重复性良好。

2.2.7 稳定性实验 精密吸取同一供试品溶液 10 μ l 分别于 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 进样分析, 测得峰面积的 RSD 值为 0.97%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.2.8 加样回收率实验 取已测定含量的样品粉末约 0.5 g 精密称定 6 份, 分别精密加入对照品溶液 14.9 ml 和甲醇 10.1 ml 制备方法参照“2.2.3”项下, 试剂均减半, 残渣加甲醇溶液溶解, 转移至 25 ml 容量瓶中, 定容, 即得。进样分析, 计算得常春藤皂苷元的平均回收率为 100.42%, RSD 值为 1.71%。

2.2.9 样品测定 按上述方法对不同来源样品进行测定, 外标法计算常春藤皂苷元的含量。色谱图见图 2 样品测定结果见表 1。

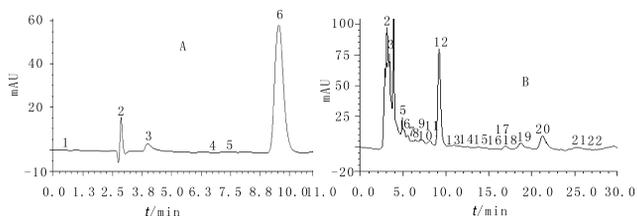


图 2 常春藤皂苷元(A)和红毛五加叶(B)的 HPLC 色谱图

3 讨论

经预试验, 红毛五加叶水解后常春藤皂苷元含量较高, 而齐墩果酸含量较低且色谱峰存在干扰。因此本试验对红毛五加叶中的常春藤皂苷元进行了定性定量鉴别, 对齐墩果酸进行了定性鉴别。流动相条件参照《中国药典》^[3] 木通项下规定, 略作调整。《中国药典》流动相条件为: 甲醇-水-冰醋酸-三乙胺 (87: 13: 0.04: 0.02), 考察发现该条件下常春藤皂苷元分离不理想。

遂降低甲醇比例, 比较了甲醇-水-冰醋酸-三乙胺 (85: 15: 0.04: 0.02); 甲醇-水-冰醋酸-三乙胺 (83: 17: 0.04: 0.02), 前者出峰时间合适且分离良好, 选择作为流动相条件。

表 1 样品测定结果

样品来源	采集时间	常春藤皂苷元 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$
茂县石大关乡阳雀寨	2007-05	5.40
茂县石大关乡阳雀寨	2008-07	10.17
茂县石大关乡阳雀寨	2008-10	27.15
小金县达维乡木尔寨沟	2007-06	4.58
小金县达维乡红军坪	2008-08	2.96
小金县达维乡红军坪	2008-08	5.87
小金县达维乡红军坪	2008-08	4.74
小金县达维乡木尔寨沟	2008-08	5.82
小金县日隆乡双桥沟	2008-08	5.00
小金县日隆乡双桥沟	2008-08	5.33
小金县科牛村香路堂沟	2008-08	9.87
小金县科牛村香路堂沟	2008-08	8.85
小金县科牛村小太子坡	2008-08	7.00
马尔康县梭磨乡坎竹沟	2008-08	7.28
红原县刷经寺镇 329 沟	2008-08	6.02
红原县刷经寺镇 2 队	2008-08	7.22

$n = 2$

对样品提取方法进行了考察。分别比较了超声和回流提取; 盐酸和硫酸的水解效果; 水解时加入的不同酸体积。结果表明, 回流提取常春藤皂苷元含量较高; 盐酸的水解效果较好; 盐酸与甲醇比例为 (1: 20) 时水解效果最好。

对 15 批红毛五加叶样品进行了测定, 常春藤皂苷元的含量在 2.96 ~ 27.15 mg/g 之间。在同一地点采集的样品, 随生长时间的增长, 常春藤皂苷元含量有逐渐增高的趋势。亦对红毛五加叶茎皮中的常春藤皂苷元进行了测定, 共测定了 12 批不同来源样品, 其含量均在 0.02% 以下, 有的样品甚至无, 茎皮中的齐墩果酸含量亦甚低。

常春藤皂苷元为红毛五加叶中三萜皂苷元的主要类型, 含量较高。常春藤皂苷元已证实具抗炎、溶血、细胞毒性、诱导细胞凋亡等生物活性^[4, 5], 常春藤皂苷元可作为红毛五加叶含量测定的主要指标。

参考文献:

- [1] 张莅峡, 刘泓. 红毛五加茎皮、叶及果实挥发油的 GC-MS 比较分析 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2001, 7(5): 24
- [2] 程东亮, 邵宇, 杨立. 红毛五加叶的三萜皂苷 [J]. 植物学报, 1994, 36(1): 75.
- [3] 国家药典委员会. 中国药典, 1 部 [S]. 北京: 化学工业出版社, 2005.
- [4] A. Gøpdren, V. Mshvidadze, H. Selman, R. Elias. A cute anti-inflammatory activity of four saponins isolated from ivy: alpha-hederin, hederasaponin-C, hederacolkhisid-E and hederacolkhisid-F in carrageenan-induced rat paw edema [J]. Phytomedicine, 2005, 12: 440.
- [5] Martin Chwalek, Nathalie Lalun, H. Ine Bobichon, et al. Structure-activity relationships of some hederagenin diglycosides: Haemolysis, cytotoxicity and apoptosis induction [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2006, 1760: 1418.