

不同产地和不同采收期辽东槲木叶中两种皂苷的含量测定

李百美, 孙宜春, 王秋红, 王知斌, 匡海学*

(黑龙江中医药大学, 教育部北药基础与应用研究重点实验室, 哈尔滨 150040)

[摘要] 目的:测定并比较不同产地和不同采收期辽东槲木叶中3-O- β -D-葡萄糖吡喃糖基-(1 \rightarrow 3)- β -D-葡萄糖吡喃糖基-(1 \rightarrow 3)- β -D-葡萄糖吡喃糖基-齐墩果酸-28-O- β -D-吡喃葡萄糖苷(槲木皂苷TTP)和3-O-[β -D-葡萄糖吡喃糖基(1 \rightarrow 2)]-[β -D-葡萄糖吡喃糖基(1 \rightarrow 3)]- β -D-葡萄糖吡喃糖基-齐墩果酸-28-O- β -D-葡萄糖吡喃糖酯(槲木皂苷V)的含量。方法:采用高效液相色谱蒸发光散射检测(HPLC-ELSD)法,使用Diamonsil C₁₈(2)色谱柱(4.6 mm \times 250 mm, 5 μ m),流动相乙腈-水(31:69),流速1.0 mL \cdot min⁻¹,柱温30 $^{\circ}$ C,蒸发光散射检测器漂移管温度110 $^{\circ}$ C,载气(N₂),流速3.2 mL \cdot min⁻¹。结果:槲木皂苷TTP和槲木皂苷V分别在进样量0.51~2.55 μ g和0.50~4.00 μ g线性关系良好,相关系数分别为0.999 8和0.999 2。结果表明,不同产地和不同采收期辽东槲木叶中槲木皂苷TTP和槲木皂苷V的含量有所差异,可能与辽东槲木分布区域、生长季节及叶片生理状态有关,由实验结果可以看出,两种皂苷类成分大多在7,8月的含量相对较高,部分地区9月含量较高。结论:该方法简单、快捷、准确,可以同时测定辽东槲木叶中槲木皂苷TTP和槲木皂苷V的含量,为辽东槲木叶质量控制提供实验依据。

[关键词] 高效液相色谱-蒸发光检测; 辽东槲木叶; 槲木皂苷TTP; 槲木皂苷V; 含量测定

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)11-0059-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017110059

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170309.1012.030.html>

[网络出版时间] 2017-03-09 10:12

Determination of Two Saponins in *Aralia elata* Leaves from Different Habitats and Gathering Periods

LI Bai-mei, SUN Yi-chun, WANG Qiu-hong, WANG Zhi-bin, KUANG Hai-xue*

(Key Laboratory of Chinese Materia Medica Under Ministry of Education, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China)

[Abstract] **Objective:** To determine and compare the contents of congmunoside TTP and congmunoside V in *Aralia elata* leaves from different habitats and gathering periods. **Method:** HPLC-ELSD was carried out on a Diamonsil C₁₈(2) column (4.6 mm \times 250 mm, 5 μ m) at a column temperature of 30 $^{\circ}$ C. The mobile phase was acetonitrile and water (31:69) at flow rate of 1.0 mL \cdot min⁻¹. The detector was ELSD, with the temperature of drift tube set at 110 $^{\circ}$ C, and the flow rate of carrier gas (N₂) was 3.2 mL \cdot min⁻¹. **Result:** The linear ranges of congmunoside TTP and congmunoside V were 0.51-2.55 μ g ($r=0.999\ 8$) and 0.50-4.00 μ g ($r=0.999\ 2$), respectively. According to the results, the contents of congmunoside TTP and congmunoside V in *A. elata* leaves from different habitats and gathering periods were different. This may be related to distribution areas, growing seasons and physiological state of leaves. On the basis of the experimental results, the content of two kinds of ingredients was high mostly in July and August, and partially in September. **Conclusion:** The method is simple,

[收稿日期] 20160614(007)

[基金项目] 国家“重大新药创制”科技重大专项(2011ZX09102-001-18)

[第一作者] 李百美,在读硕士,从事中药及天然药物药效物质基础的研究工作, Tel:13633608250, E-mail:1107314181@qq.com

[通讯作者] *匡海学,博士,教授,从事中药及天然药物药效物质基础及中药药性理论研究工作, Tel:0451-82110803, E-mail:hxkuang@163.com

rapid and accurate for determining simultaneously the contents of congnunoside TTP and congnunoside V in *A. elata* leaves, and can provide a basis for the quality control of *A. elata* leaves.

[**Key words**] HPLC-ELSD; *Aralia elata* leaves; congnunoside TTP; congnunoside V; content determination

辽东楸木为五加科楸木属植物,用于治疗神经衰弱、风湿性关节炎、糖尿病、胃炎、胃溃疡、肾炎水肿等。国内外学者对辽东楸木根皮和茎皮的化学成分、药理作用和药用价值的研究较多^[1-3],近年来才对叶的研究逐渐深入,前期研究显示,辽东楸木叶中含有丰富的皂苷类成分,具有抑制肿瘤细胞增长和提高免疫功能的作用^[4-11],而总皂苷是辽东楸木叶抗肿瘤活性的主要成分^[12-13]。楸木皂苷 V^[14]和楸木皂苷 TTP^[15]经研究显示均具有明显的体外抗肿瘤作用。不同产地和不同采收期辽东楸木叶中皂苷类成分含量有所差异,选择合适的采收地区及采收期,是目前控制辽东楸木叶药材质量的前提条件。本文采用 HPLC-ELSD 法对 20 批不同产地和不同采收期的辽东楸木叶中楸木皂苷 TTP 和楸木皂苷 V 进行含量测定,该方法可以同时测定辽东楸木叶中楸木皂苷 TTP 和楸木皂苷 V 的含量,为辽东楸木叶质量评价提供实验依据。

1 材料

L-6200 型高效液相色谱仪(日本 Hitachi 公司),2000ES 型蒸发光散射检测器(美国奥泰公司),娃哈哈纯净水,乙腈为色谱纯,甲醇为色谱纯。其余试剂为分析纯。

楸木皂苷 V 和楸木皂苷 TTP 由黑龙江中医药大学中药化学实验室自制(经 HPLC 峰面积归一化法检测,纯度均 >98%)。

20 批辽东楸木叶药材分别于 5,6,7,8,9 月于黑龙江、吉林和辽宁不同产地购买。经黑龙江中医药大学药用植物学教研室苏连杰教授鉴定为五加科楸木属植物辽东楸木 *Aralia elata* 的干燥叶。见表 1。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的制备 精密称取楸木皂苷 TTP 对照品 4.08 mg 和楸木皂苷 V 对照品 4.00 mg,置于 10 mL 量瓶中,分别加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,得质量浓度为 0.408 g·L⁻¹和 0.400 g·L⁻¹的对照品溶液。

2.2 供试品溶液的制备 取辽东楸木叶粉末(过三号筛)约 0.5 g,精密称定,置 50 mL 具塞锥形瓶中,加 50% 乙醇 25 mL,密塞,称定质量,超声处理

表 1 辽东楸木叶样品信息

Table 1 Information of *Aralia elata* leaves

No.	产地	采收时间
S1	黑龙江五常市	6 月
S2	黑龙江五常市	7 月
S3	黑龙江五常市	8 月
S4	黑龙江五常市	9 月
S5	辽宁抚顺市	5 月
S6	辽宁抚顺市	6 月
S7	辽宁抚顺市	7 月
S8	辽宁抚顺市	8 月
S9	辽宁抚顺市	9 月
S10	黑龙江尚志市	5 月
S11	黑龙江尚志市	6 月
S12	黑龙江尚志市	7 月
S13	黑龙江尚志市	8 月
S14	黑龙江尚志市	9 月
S15	黑龙江齐齐哈尔	6 月
S16	黑龙江齐齐哈尔	7 月
S17	黑龙江齐齐哈尔	8 月
S18	吉林通化市	6 月
S19	吉林通化市	7 月
S20	吉林通化市	8 月

(功率 250 W,频率 50 kHz) 30 min,放冷,再称定质量,用 50% 乙醇补足减失的质量,摇匀,滤过,精密量取续滤液 10 mL 置于蒸发皿中浓缩至干,残渣加水 5 mL 溶解,用水饱和正丁醇振摇提取 3 次,每次 5 mL,合并正丁醇液,蒸干,残渣加甲醇溶解,转移至 5 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,即得。

2.3 色谱条件 Diamonsil C₁₈ (2) 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相 乙腈-水 (31:69), 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 30 °C, Alltech ELSD 2000ES 型蒸发光散射检测器, 漂移管温度 110 °C, 载气 (N₂) 流速 3.2 mL·min⁻¹, 对照品及样品 HPLC 色谱见图 1。

2.4 标准曲线的绘制 精密吸取楸木皂苷 TTP 对照品溶液 51.0, 101.9, 153.2, 204.0, 255.0 mg·L⁻¹, 楸木皂苷 V 对照品溶液 50.0, 100.2, 200.1, 300.1,

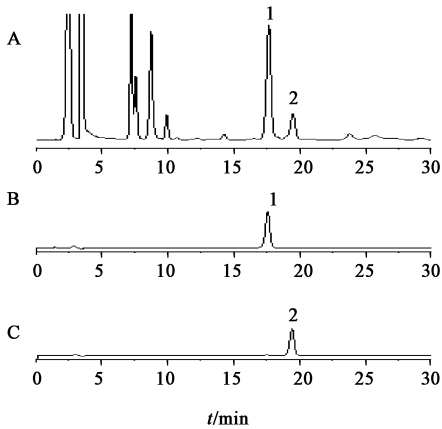


图 1 辽东楤木叶样品(A), 楤木皂苷 TTP 对照品(B)和楤木皂苷 V 对照品(C)的 HPLC

Fig. 1 HPLC chromatograms of *Aralia elata* leaves sample and reference substances

400.0 mg·L⁻¹, 分别注入液相色谱仪, 进样 10 μL, 测定峰面积, 分别以进样量的对数值 (X) 为横坐标, 峰面积的对数值 (Y) 为纵坐标绘制标准曲线, 得回归方程, 楤木皂苷 TTP $Y = 1.52X + 5.48$ ($r = 0.9998$); 楤木皂苷 V $Y = 1.53X + 5.45$ ($r = 0.9992$), 结果表明楤木皂苷 TTP 在 0.51 ~ 2.55 μg, 楤木皂苷 V 在 0.50 ~ 4.00 μg 线性关系良好。

2.5 精密度试验 精密吸取对照品溶液 10 μL, 按 2.3 项下色谱条件连续进样 6 次, 结果楤木皂苷 TTP 和楤木皂苷 V 峰面积的 RSD 分别为 1.5%, 0.8%, 表明仪器的精密度良好。

2.6 重复性试验 精密称取同一批药材粉末 (黑龙江尚志市 8 月) 6 份, 每份 0.5 g, 分别按 2.2 项下方法制备供试品溶液, 按 2.3 项下色谱条件进样 10 μL 测定含量。结果楤木皂苷 TTP 和楤木皂苷 V 的质量分数分别为 0.65%, 0.73%; RSD 分别为 0.8%, 1.3%, 表明本方法重复性良好。

2.7 稳定性试验 取同一批供试品 (黑龙江尚志市 8 月) 溶液, 按 2.3 项下色谱条件分别于 0, 4, 8, 12, 16, 24 h 进行测定, 结果楤木皂苷 TTP 和楤木皂苷 V 的峰面积 RSD 分别为 1.2%, 1.9%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.8 加样回收率试验 精密称取已知含量的辽东楤木叶粉末 0.25 g, 共 6 份, 分别置于 50 mL 具塞锥形瓶中, 分别精密加入楤木皂苷 TTP (0.543 g·L⁻¹) 和楤木皂苷 V (0.608 g·L⁻¹) 对照品溶液各 3 mL, 按 2.2 项下方法制备供试品溶液, 进行测定, 计算回收率, 结果楤木皂苷 TTP 和楤木

皂苷 V 的平均回收率分别为 98.03%, 97.70%; RSD 分别为 1.9%, 2.3%。见表 2。

表 2 楤木皂苷 TTP 和楤木皂苷 V 加样回收率试验

Table 2 Results of recovery tests of congmunoside TTP and ongmunoside V

成分	称样量 /g	样品中量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 (RSD) /%
楤木皂苷 TTP	0.250 2	1.626	1.629	3.253	99.87	98.03 (2.0)
	0.249 8	1.623	1.629	3.237	99.08	
	0.249 6	1.622	1.629	3.198	96.75	
	0.250 1	1.625	1.629	3.256	100.12	
	0.249 2	1.619	1.629	3.174	95.45	
	0.249 6	1.622	1.629	3.201	96.93	
楤木皂苷 V	0.250 2	1.826	1.824	3.657	100.38	97.70 (2.3)
	0.249 8	1.823	1.824	3.569	95.72	
	0.249 6	1.822	1.824	3.611	98.08	
	0.250 1	1.825	1.824	3.654	100.27	
	0.249 2	1.819	1.824	3.558	95.34	
	0.249 6	1.822	1.824	3.580	96.38	

2.9 样品含量测定 取不同产地和不同采收期辽东楤木叶药材样品, 按 2.2 项下方法制备供试品溶液。按 2.3 项下色谱条件测定楤木皂苷 TTP 和楤木皂苷 V 的含量, 结果见表 3。

3 小结与讨论

本实验在楤木皂苷 TTP 和楤木皂苷 V 的超声提取过程中, 分别对乙醇体积分数、提取时间和溶剂用量进行正交试验考察, 结果表明, 50% 乙醇溶液, 提取 0.5 h, 溶剂用量 25 mL, 提取效率较高。

由于皂苷类成分无紫外吸收或仅有末端吸收, 若用 DAD 检测器, 干扰严重, 峰形差。蒸发光散射检测器是一种质量型通用检测器, 适用于挥发性低于流动相成分的检测, 其响应不依赖于样品的光学性质, 本实验采用 HPLC-ELSD 法, 灵敏度高, 重复性好, 因此选择该法对楤木皂苷 TTP 和楤木皂苷 V 进行含量测定。

样品含量测定结果显示, 不同产地和不同采收期辽东楤木叶中楤木皂苷 TTP 和楤木皂苷 V 的含量范围分别为 0.36% ~ 3.49% 和 0.15% ~ 2.54%, 含量差异较大。两种皂苷的含量与辽东楤木分布区域、生长季节及叶片生理状态有关, 由实验结果可以看出, 两种皂苷类成分大多在 7, 8 月的含量相对较高, 部分地区 9 月含量较高, 但由于部分北方地区 9 月温度较低, 叶片可能落下, 因此暂定 7, 8 月为辽东楤木叶的最佳采收期, 但是不同地区由于气候温度

表 3 辽东槲木叶样品中 2 种成分的含量测定

Table 3 Results of congmunoside TTP and ongmunoside V content determination in samples %

No.	槲木皂苷 TTP	槲木皂苷 V
S1	1.47	1.45
S2	1.56	1.52
S3	1.31	1.61
S4	2.36	1.48
S5	0.83	0.18
S6	1.50	0.40
S7	0.49	0.50
S8	3.01	1.81
S9	0.92	0.85
S10	0.62	0.15
S11	0.36	0.24
S12	0.68	0.81
S13	0.64	0.73
S14	0.45	0.28
S15	0.62	0.43
S16	1.08	0.48
S17	3.49	2.54
S18	0.42	0.39
S19	1.27	1.09
S20	2.21	1.39

不同也可能适当延后。

本文采用 HPLC-ELSD 法同时测定辽东槲木叶中槲木皂苷 TTP 和槲木皂苷 V 的含量,方法简便快捷、准确、稳定性和重复性好,为辽东槲木叶质量评价提供依据。

[参考文献]

[1] 宋少江,李丽,马志强,等. HPLC 法测定辽东槲木根皮中槲木皂苷 C 的含量[J]. 沈阳药科大学学报, 2006,23(3):162-164.

[2] SONG S J, Norio N K, MA C M, et al. Four new saponins from the root bark of *Aralia elata*[J]. Chem Phum Bull, 2000,48(6):838-842.

[3] Yoshikawa M, Murakami T, Harada E. Bioactive

saponins and glycosides. VII on the hypoglycemic principles from the root cortex of *Aralia elata* Seem: structure related hypoglycemic activity of oleanolic acid oligoglycoside [J]. Chem Pharm Bull; Tokyo, 1996, 44 (10):1923-1927.

[4] 张艳,胡燕,赵雷,等. 辽东槲木叶化学成分的分离与鉴定[J]. 沈阳药科大学学报,2012,29(1):5-8.

[5] 李凤金,肖洪彬. 辽东槲木化学成分和药理作用研究进展[J]. 中国中医药科技,2015,22(3):353-354.

[6] KUANG H X, SUN H, ZHANG N, et al. Two new saponins, congmunosides A and B, from the leaves of *Aralia elata*, collected in Heilongjiang, China [J]. Chem Pharm Bull, 1996,44(1):2183-2185.

[7] 姜永涛,徐绥绪. 龙牙槲木化学组成及药理活性[J]. 沈阳药学院学报,1990,7(4):290-294.

[8] 李凤金,毕明刚,武爽,等. 辽东槲木叶总皂苷抗人乳腺癌作用的研究[J]. 中国药理学通报,2013,29(12):1663-1666.

[9] 尹丽颖,李凤金,边晓燕,等. 辽东槲木叶总皂苷对结肠癌 HT-29 细胞的生长抑制作用及机制研究[J]. 中国药理学通报 2013,29(11):1545-1548.

[10] 尹丽颖,仲丽丽,边晓燕,等. 辽东槲木叶总皂苷对人胃癌 BGC 细胞凋亡的影响[J]. 中医药学报,2012,40(3):12-14.

[11] 张秀萍,尹丽颖,牛雯颖,等. 辽东槲木叶总皂苷体外抗肿瘤作用的研究[J]. 时珍国医国药,2012,23(12):2966-2968.

[12] 肖洪彬,匡海学. 龙牙槲木叶抗肿瘤作用机制的实验研究[J]. 中药药理与临床,2000,30(增刊):6-9.

[13] 王春梅,张广美. 龙牙槲木叶总皂苷对卵巢癌细胞的抑制作用及其对线粒体凋亡途径的影响[J]. 中医药学报,2011,39(1):17-19.

[14] SONG S J, Nakamura N, MA C M, et al. Five saponins from the root bark of *Aralia elata* [J]. Phytochemistry, 2000,56(5):491-497.

[15] MA Z Q, ZHANG Y, CAI C K, et al. Two new triterpenoid saponins from the leaves of *Aralia elata* [J]. J Asian Nat Prod Res,2013,15(8):849-854.

[责任编辑 顾雪竹]