HPLC 测定丝瓜根药材中常春藤皂苷元的含量

李才堂,谢欢,张娣,宋友昕*
(江西省中医药研究院,南昌 330046)

[摘要] **目的**:测定丝瓜根药材中常春藤皂苷元的含量。**方法**:采用 HPLC,Dikma Diamonsil C_{18} 色谱柱(钻石)(4.6 mm×250 mm,5 μm),甲醇-水-冰醋酸-三乙胺(85∶15∶0.04∶0.02)为流动相,流速 1 mL·min^{-1},检测波长 210 nm,柱温 35 ℃。**结果**:常春藤皂苷元在 0.563 2 ~ 5.632 μg 线性关系良好(r = 0.999 9),加样回收率 97.49%,RSD 1.86%(n = 6),重复性 RSD 1.73%(n = 6)。**结论**:方法简便可行,重复性好,可用于丝瓜根药材的质量控制。

[关键词] 丝瓜根;常春藤皂苷元;含量测定;高效液相色谱
[中图分类号] R284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2013)18-0145-03
[doi] 10.11653/syfj2013180145

Determination of Hederagenin in Root of *Luffa cylindrica*

LI Cai-tang, *XIE Huan*, *ZHANG Di*, *SONG You-xin**
(*Jiangxi Institution of Trational Chinese Medical and Pharmaceutical Science*, *Nanchang* 330046, *China*)

[**Abstract**] **Objective**: To determine the content of hederagenin in root of *Luffa cylindrica*. **Method**: HPLC was performed with chromatographic conditions as follows: Dikma Diamonsil C_{18} column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) with column temperature at 35 ℃, the mobile phase of methanol-water-glacial acetic acid-triethylamine (85∶15∶0.04∶0.02), flow rate at 1 mL·min^{-1}, and the detection wavelength at 210 nm. **Result**: The linearity of hederagenin was good in the range of 0.563 2-5.632 μg (r = 0.999 9). The average recovery was 97.49%, RSD was 1.86%. RSD of repeatability was 1.73% (n = 6) **Conclusion**: The method is simple,

[收稿日期] 20111128(002)
[第一作者] 李才堂,副研究员,硕士学位,从事天然产物活性成分研究,Tel:0791-88594852,E-mail:Lict963@sina.com
[通讯作者] *宋友昕,副主任药师,从事中药新药开发研究,E-mail:youxin-song@163.com

了提取时间 30 min。

[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:化学工业出版社, 2005:171.
[2] 张金莲,何敏,谢一辉,等,高效液相色谱法测定枳壳饮片中柚皮苷、橙皮苷和新橙皮苷的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(6):68.
[3] 潘隽丽,杨翠平,苏薇薇,等. 枳壳类药材的研究概况[J]. 中药材,2003, 26(10):768.
[4] 杨胜,张定堃,苏柘僮, 等. 中药复方制剂质量控制的研究[J]. 中国医药生物技术,2010, 5(5):387.
[5] 杨林,徐铤,唐尧. RP-HPLC 测定首乌藤中大黄素的含量[J]. 华西药学杂志,2005, 20(6):554.
[6] 刘祖贞, 谭朝阳. 安乐片质量标准研究[J]. 中医药导报,2007, 13(9):73.
[7] 朱艳容,李媛媛,李先荣, 等. RP-HPLC 法测定扶正固本颗粒中大黄素[J]. 中国实验方剂学杂志,2010, 16(7):69.
[8] 郭允,张琨,洪博, 等. RP-HPLC 法同时测定坎离砂中阿魏酸和川芎嗪的含量[J]. 河南职工医学院学报,2010,22(2):115.
[9] 滕建业,孟宪生,韩凌, 等. 枳壳中柚皮苷提取工艺的研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2011, 17(3):34.
[10] 季忆,陈建真,陈建明, 等. 枳壳黄酮类成分的研究进展[J]. 中国中医药信息杂志,2010,17(11):105.

[责任编辑 顾雪竹]

feasible and reproducible, which can be used to control the quality of root of *L. cylindrica*.

[**Key words**] root of *Luffa cylindrica*; hederagenin; content determination; HPLC

丝瓜根为葫芦科植物丝瓜的根。丝瓜在我国各地均有栽培,其果实供蔬菜食用。丝瓜络及丝瓜藤、叶、根及种子等均有药用记载。民间用丝瓜根治疗慢性气管炎、鼻炎、鼻窦炎均具有较好的疗效[1]。四川省中药所药理室初步药理实验证明,丝瓜叶总皂苷有促进小鼠增长,耐温、耐缺氧、抗辐射、耐疲劳作用及增强机体非特异免疫和体液免疫的作用[2]。唐桂兴等[3]通过药理实验证明丝瓜根提取物对豚鼠的破损皮肤和完整皮肤均无急性毒性和刺激性作用;灌胃给与小鼠最大耐受量,动物无全身中毒症状,亦无动物死亡;丝瓜根提取物能明显抑制二甲苯致小鼠耳廓肿胀和角叉菜胶致大鼠足跖肿胀。实验的结论为丝瓜根提取物外用和口服安全性强,有一定的抗炎作用。唐爱莲等[4]从丝瓜根中首次分离得到 11 种成分,经理化及光谱鉴定为三萜皂苷类,其中确定了以常春藤皂苷元为苷元的常春藤皂苷等 4 种成分的结构。本文对丝瓜根中的常春藤皂苷元采用高效液相法进行了定量测定,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 材料

HP-1100 型高效液相色谱仪(美国:包括 1322A 在线脱气机,G1311A 四元梯度泵,DAD 检测器,HP 化学工作站),AG-135 型电子天平(梅特勒-托利多),AL-204 型电子天平(梅特勒-托利多)。

常春藤皂苷元(中国药品生物制品检定所,批号 ll1733-200904,供含量测定用),甲醇、乙腈(色谱纯),水为重蒸水,其他试剂均为分析纯。

丝瓜根药材分别来源于江西、湖南、安徽,经江西中医学院杨武亮教授鉴定为葫芦科植物丝瓜 *Luffa cylindrica* (L.) Roem 的根。

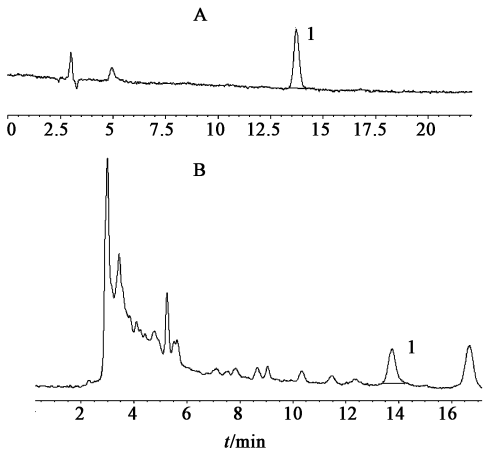
2 方法与结果

2.1 药材中常春藤皂苷元含量测定方法学研究

2.1.1 对照品溶液的制备 精密称取常春藤皂苷元对照品 6.55 mg,置 50 mL 量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀。吸取上述溶液以微孔滤膜(0.45 μm)滤过,即得常春藤皂苷元对照品溶液(0.131 g·L^{-1})。

2.1.2 供试品溶液的制备 取本品,粉碎(过 40 目筛),取约 5 g,置 100 mL 平底烧瓶中,精密称定,精密加入甲醇 50 mL,回流提取 45 min,放冷,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 15 mL 使溶解,用水饱和正丁醇萃取 3 次,每次 20 mL,合并萃取液,蒸干。残渣加甲醇 20 mL,盐酸 2 mL,加热水解 4 h。水解物加水 10 mL,用三氯甲烷萃取 2 次,每次 20 mL,合并三氯甲烷萃取液,回收溶剂至干,残渣加甲醇使溶解并全部转移至 25 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,滤过。取续滤液通过微孔滤膜(0.45 μm),即得。

2.1.3 色谱条件及系统适用性试验 Dikma Diamonsil C_{18} 色谱柱(钻石)(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相甲醇-水-冰醋酸-三乙胺(85∶15∶0.04∶0.02),流速 1 mL·min^{-1},检测波长 210 nm,柱温 35 ℃。理论板数按常春藤皂苷元记不低于 3 000。在上述条件下,供试品溶液中常春藤皂苷元色谱峰与其他峰分离良好,峰形对称,色谱图见图 1。



A. 对照品;B. 丝瓜根药材;1. 常春藤皂苷元

图 1 丝瓜根 HPLC

2.1.4 线性关系的考察 精密称定常春藤皂苷元对照品 14.08 mg,置 25 mL 棕色量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,即得(质量浓度为 0.563 2 g·L^{-1})。取对照品适量,分别稀释成以下质量浓度 56.32, 112.64, 168.96, 225.28, 281.6 mg·L^{-1}。分别吸取 10 μL,注入液相色谱仪中,测定常春藤皂苷元对照品峰面积,将样品浓度与峰面积进行回归处理,回归方程为 $Y = 4\,564.1X - 21.94$ ($r = 0.999\,9$),结果表明常春藤皂苷元对照品在 0.563 2 ~ 5.632 μg 样品质量浓度与峰面积呈良好的线性关系。

2.1.5 精密度试验 精密吸取供试品溶液 10 μL,重复进样 6 次,测定供试品溶液中常春藤皂苷元峰面积,经统计学处理,日内精密度 RSD 1.05%、日间

精密度 RSD 1.77%。

2.1.6 稳定性试验 取供试品溶液于 0,0.5,1.0,2.0,4.0,8.0,12.0 h 进样,分别测定常春藤皂苷元峰面积,结果 RSD 2.08%。结果表明供试品溶液在室温下放置 12 h 基本稳定。

2.1.7 重复性试验 取丝瓜根药材粉末(过 40 目筛)各 5 g,共 6 份,按 **2.1.2** 制备方法处理,按上述方法和色谱条件操作,测定各供试品中常春藤皂苷元的峰面积值,计算含量,结果 RSD 1.73%,表明此方法重复性良好。

2.1.8 加样回收率试验 取丝瓜根药材粉末(过 40 目筛)约 2.5 g,共 6 份,精密称定后,分别精密加入常春藤皂苷元对照品溶液(34.26 $mg \cdot L^{-1}$)50 mL,照 **2.1.2** 方法操作。按上述色谱条件进样分析,测常春藤皂苷元含量,计算回收率,结果见表 1。

表 1 丝瓜根中常春藤皂苷元加样回收率试验

取样量/g	样品中含量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
2.576 3	1.764 5	3.496 2	101.09		
2.523 8	1.728 6	3.395 1	97.29		
2.513 9	1.721 8	3.377 7	96.67	97.49	1.86
2.520 1	1.726 0	3.388 3	97.04		
2.500 9	1.712 9	3.357 2	95.99		
2.501 9	1.713 6	3.372 9	96.87		

注:加入量均为 1.713 mg。

2.2 样品含量测定 取本品,按 **2.1.2** 方法制成供试品溶液,在上述色谱条件下测定,按外标法计算常春藤皂苷元的含量。结果见表 2。

表 2 丝瓜根中常春藤皂苷元的含量测定($n=3$) $mg \cdot g^{-1}$

来源	常春藤皂苷元
江西东乡	0.68
江西湖口	0.72
湖南醴陵	0.059
安徽亳州	0.83

3 讨论

丝瓜根中所含的三萜皂苷类如常春藤皂苷元和齐墩果酸等成分,都是解热抗炎作用的活性成分[5],并且常春藤皂苷已证实具有抗炎、溶血、细胞毒性、诱导细胞凋亡等生物活性[6-7]。故常春藤皂苷元可作为丝瓜根含量测定的主要指标。

分别对提取溶剂(甲醇、50% 甲醇、乙醇、70% 乙醇)、提取方法(超声和回流)、提取时间(30,45,60,90 min)以及水解时间(1,2,4 h)、盐酸用量(1,2,3 mL)等条件进行考察,结果表明以 50 mL 甲醇回流提取 45 min,提取液加盐酸 2 mL 水解 4 h 为优。

不同产地丝瓜根药材中常春藤皂苷元的含量相差较大,这可能与不同产地的土质、气候等生态环境密切相关。

[参考文献]

[1] 《全国中草药汇编》编写组. 全国中草药汇编. 上册[M]. 北京:人民卫生出版社,1976.

[2] 中国保健食品协会抗衰老学会. 保健饮食医药文集[C]. 1990:23.

[3] 唐桂兴,廖伟明,唐爱莲,等. 丝瓜根提取物的安全性及抗炎作用研究[J]. 中国现代药物应用,2010,4(2):8.

[4] 唐爱莲,刘笑甫,陈旭,等. 丝瓜根化学成分研究(Ⅰ)[J]. 中草药,2001,32(9):773.

[5] 马双成,刘燕,毕培曦,等. RP-HPLC 法测定金银花药材中常春藤皂苷元及齐墩果酸的含量[J]. 药物分析杂志,2006, 26(7):885.

[6] A Gepdiremen, V Mshvildadze, H Stleyman, et al. Acute anti-inflammatory activity of four saponins isolated from ivy. alpha-hederin, hederasaponin C, hederacolchiside E and hederacolchiside F in carrageenan-induced rat paw edema [J]. Phyto medicine, 2005(12):440.

[7] Martin Chwalek, Nathalie Lalun, Hélène Bobichon, et al. Structure-activity relationships of some hederagenin diglycosides: Haemolysis, cytotoxicity and apoptosis induction[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2006(1760):1418.

[8] 刘德峰. 丝瓜藤治疗慢性鼻窦炎 78 例[J]. 中国民间疗法,2001,9(4):48.

[9] 吴成善. 丝瓜根绿豆汤治疗慢性鼻炎 270 例[J]. 中国中西医结合杂志,1992(12):757.

[10] 王大娟. 丝瓜藤治疗慢性鼻炎 78 例[J]. 中国民间疗法,2002,10(7):63.

[责任编辑 顾雪竹]