

# HPLC-ELSD 法测定细柱五加果实中 齐墩果烷型三萜皂苷的含量

张正光<sup>1,2</sup>, 朱玲英<sup>1,2</sup>, 钱士辉<sup>1,2\*</sup>

(1. 南京中医药大学附属省中西医结合医院, 南京 210028; 2. 江苏省中医药研究院, 南京 210028)

**[摘要]** 目的: 建立 HPLC-ELSD 法同时测定细柱五加果实中的竹节参苷 IV a 和  $3\beta$ -([*O*- $\beta$ -D-glucopyranuronosyl] oxy)-olean-12-ene-28-olc acid 含量的方法。方法: 采用反相高效液相色谱-蒸发光散射检测法。色谱条件: Alltima<sup>TM</sup>-C<sub>18</sub> 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5  $\mu$ m), 流动相乙腈(A)-0.5% 乙酸水溶液(B), 柱温 35  $^{\circ}$ C。ELSD 检测器条件: 漂移管温度 106  $^{\circ}$ C, 载气氮气, 流速 2.9 L · min<sup>-1</sup>, 放大系数 1, 撞击器关闭。结果: 竹节参苷 IV a 和  $3\beta$ -([*O*- $\beta$ -D-glucopyranuronosyl] oxy)-olean-12-ene-28-olc acid 的进样量分别在 0.535 ~ 8.560  $\mu$ g ( $r = 0.9965$ ) 和 0.515 ~ 8.240  $\mu$ g ( $r = 0.9987$ ) 呈良好线性关系; 平均回收率 ( $n = 6$ ) 分别为 98.42%, 98.56%, RSD 分别为 1.47%, 1.29%。结论: 方法准确、灵敏, 可用于测定细柱五加果实中竹节参苷 IV a 和  $3\beta$ -([*O*- $\beta$ -D-glucopyranuronosyl] oxy)-olean-12-ene-28-olc acid 的含量。

**[关键词]** 细柱五加; 果实; 三萜皂苷; 高效液相色谱-蒸发光检测; 含量测定

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)18-0081-04

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20120711.1208.027.html>

**[网络出版时间]** 2012-7-11 12:08

## HPLC-ELSD Determination of Content of Oleanane-type Triterpenoidal Saponins in the Fruits of *Acanthopanax gracilistylus*

ZHANG Zheng-guang<sup>1,2</sup>, ZHU Ling-ying<sup>1,2</sup>, QIAN Shi-hui<sup>1,2\*</sup>

(1. Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine on Intergration  
of Chinese and Western Medicine, Nanjing 210028, China;

2. Jiangsu Provincial Insititute of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210028, China)

**[Abstract]** **Objective:** To establish an HPLC-ELSD method for the simultaneous determination of the content of chikusetsusaponin IV a and  $3\beta$ -([*O*- $\beta$ -D-glucopyranuronosyl] oxy)-olean-12-ene-28-olc acid in the fruits of *Acanthopanax gracilistylus*. **Method:** The RP-HPLC-ELSD method was used. Chromatographic conditions: Alltima<sup>TM</sup>-C<sub>18</sub> chromatographic column (4.6 mm × 250 mm, 5  $\mu$ m); acetonitrile (A) -0.5% acetic acid water (B) as mobile phase; column temperature at 35  $^{\circ}$ C. ELSD detector conditions: drift tube temperature: 106  $^{\circ}$ C; carrier gas (nitrogen) flow rate: 2.9 L · min<sup>-1</sup>; amplification factor: 1; impactor: close. **Result:** The calibration curves showed good linear relationship in the range from 0.535 to 8.560  $\mu$ g ( $r = 0.9965$ ) for chikusetsusaponin IV a and 0.515 to 8.240  $\mu$ g ( $r = 0.9987$ ) for  $3\beta$ -([*O*- $\beta$ -D-glucopyranuronosyl] oxy)-olean-12-ene-28-olc acid. The average recovery rates ( $n = 6$ ) were 98.42% and 98.56%, and RSDs were 1.47% and 1.29%. **Conclusion:** This method is accurate, sensitive and can be used to determine the content of chikusetsusaponin IV a and  $3\beta$ -([*O*- $\beta$ -D-glucopyranuronosyl] oxy)-olean-12-ene-28-olc acid in the fruits of *Acanthopanax gracilistylus*.

**[收稿日期]** 20111223(006)

**[基金项目]** 江苏省公益研究项目(BM2010610)

**[第一作者]** 张正光, 在读硕士研究生, 从事中药资源开发研究, Tel: 13815878627, E-mail: zzwang1221@sina.com

**[通讯作者]** \* 钱士辉, Tel: 025-85639644, E-mail: njqsh2005@126.com

[ **Key words** ] *Acanthopanax gracilistylus*; fruits; triterpenoidal saponins; HPLC-ELSD; determination of content

细柱五加果实为五加科植物细柱五加的干燥成熟果实。其味甘、微苦,性温,归肝、肾经,具有补肝肾、强筋骨的功效,在临床上用于治疗肝肾亏虚,小儿行迟、筋骨痿软等症状<sup>[1]</sup>。目前国内对细柱五加的研究主要集中在根皮上<sup>[2-9]</sup>,而有关于果实的研究却鲜有报道。为了加强对细柱五加资源的综合开发利用,近几年来作者对细柱五加茎、叶以及果实进行了较为系统的研究<sup>[10-15]</sup>。本文采用 HPLC-ELSD 法测定了来自江苏省盱眙县的 10 个批次细柱五加果实中的竹节参苷 IV a 和  $3\beta$ -([ *O*- $\beta$ -D-glucopyranuronosyl] oxy)-olean-12-ene-28-olc acid 的含量,为细柱五加果实的质量标准提供参考。

### 1 材料

Waters 2695 高效液相色谱仪, Alltech ELSD 2000 蒸发光散射检测器, Empower 化学工作站(美国沃特世公司), Alltima<sup>TM</sup>-C<sub>18</sub> 柱(4.6 mm × 250 mm, 5  $\mu$ m); METTLER TOLEDO AT-201 型 1/10 万电子天平(梅特勒-托利多仪器上海有限公司), 旋转蒸发器(瑞士步琪公司), 乙腈(色谱纯, 美国 TEDIA 试剂公司), 冰乙酸(分析纯, 天津市博迪化工有限公司), 重蒸馏水(Milli-Q 纯水器)等。

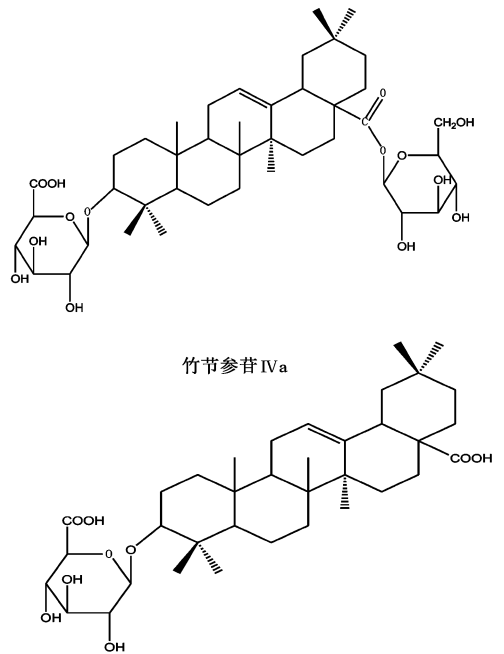
细柱五加果实药材采购于江苏省盱眙县, 经江苏省中医药研究院钱士辉研究员鉴定为五加科植物细柱五加的干燥成熟果实。

竹节参苷 IV a 和  $3\beta$ -([ *O*- $\beta$ -D-glucopyranuronosyl] oxy)-olean-12-ene-28-olc acid 的对照品均从果实提取物中分离得到, 并由<sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR, MS, IR 和 UV 等光谱手段鉴定了其化学结构(图 1)。用归一化法测得两种对照品的纯度均 >98%。

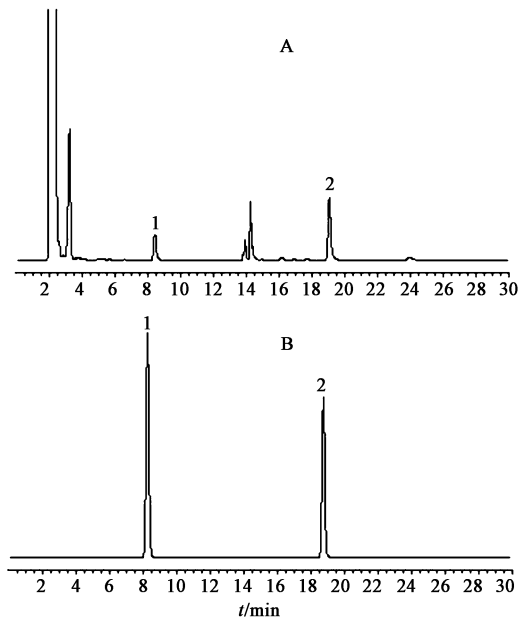
### 2 方法

**2.1 色谱条件** Alltima<sup>TM</sup>-C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5  $\mu$ m), 流动相选择为乙腈(A)-0.5% 乙酸水溶液(B) (采用梯度洗脱, 0~10 min 为 40%~60% A, 11~21 min 为 60%~40% A, 22~37 min 为 40% A), 流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 柱温 35℃。ELSD 检测器条件为: 漂移管温度 106℃, 载气(氮气), 流速 2.9 L·min<sup>-1</sup>, 放大系数 1, 撞击器关闭。图 2。

**2.2 对照品溶液的制备** 分别精密称取竹节参苷 IV a 和  $3\beta$ -([ *O*- $\beta$ -D-glucopyranuronosyl] oxy)-olean-



3 $\beta$ -([ *O*- $\beta$ -D-glucopyranuronosyl] oxy)-olean-12-ene-28-olc acid  
图 1 竹节参苷 IV a 和  $3\beta$ -([ *O*- $\beta$ -D-glucopyranuronosyl] oxy)-  
olean-12-ene-28-olc acid 结构式



1. 竹节参苷 IV a; 2.  $3\beta$ -([ *O*- $\beta$ -D-glucopyranuronosyl] oxy)-  
olean-12-ene-28-olc acid

图 2 对照品(B)及细柱五加果实样品(A)的 HPLC  
12-ene-28-olc acid 对照品适量, 放置于同一 5 mL 量瓶中。用纯甲醇溶解稀释并定容至刻度, 配置成竹节参苷 IV a 和  $3\beta$ -([ *O*- $\beta$ -D-glucopyranuronosyl] oxy)-olean-12-ene-28-olc acid 质量浓度分别为 0.107,

0.103 g · L<sup>-1</sup>的混合对照品溶液。

**2.3 供试品溶液的制备** 取干燥成熟的细柱五加果实粉末(过40目筛)1.0 g精密称定,置索式提取器中,加(60~90℃)石油醚100 mL加热回流提取3 h至无色。弃去石油醚液。药渣挥干石油醚液后,再加甲醇100 mL加热回流提取4 h至无色。回收甲醇,浓缩提取液并加甲醇定容至50 mL量瓶中,

表1 2种对照品的线性关系

成分	回归方程	r	线性范围/μg
竹节参苷IV a	$Y = 1.62X + 5.52$	0.996 5	0.535 ~ 8.560
3β-([O-β-D-glucopyranuronosyl]oxy)-olean-12-ene-28-olc acid	$Y = 1.24X + 5.71$	0.998 7	0.515 ~ 8.240

**2.5 精密度试验** 精密吸取混合对照品溶液10 μL,连续进样6次,测定峰面积。得出竹节参苷IV a和3β-([O-β-D-glucopyranuronosyl]oxy)-olean-12-ene-28-olc acid峰面积的RSD分别为0.231%,0.201%。表明仪器精密度良好。

**2.6 稳定性试验** 取同一批次(江苏省盱眙县091029)供试品溶液分别于0,2,4,8,12 h进样20 μL,测定竹节参苷IV a和3β-([O-β-D-glucopyranuronosyl]oxy)-olean-12-ene-28-olc acid的峰面积。结果得出竹节参苷IV a和3β-([O-β-D-glucopyranuronosyl]oxy)-olean-12-ene-28-olc acid峰面积的RSD分别为1.888%,1.488%,说明供试品溶液在12 h内稳定性良好。

**2.7 重复性试验** 精密称取同一批次(江苏省盱眙县091029)细柱五加果实药材6份,每份1.0 g。按2.3项方法进行操作,制得6份供试品溶液。分别取20 μL注入液相色谱仪,测定竹节参苷IV a和3β-([O-β-D-glucopyranuronosyl]oxy)-olean-12-ene-28-olc acid的含量。结果得出竹节参苷IV a和3β-([O-β-D-glucopyranuronosyl]oxy)-olean-12-ene-28-olc acid含量的平均值分别为0.389%,0.554%,RSD分别为1.911%,0.996%。表明该方法重复性良好。

**2.8 加样回收率试验** 取已知含量(竹节参苷IV a和3β-([O-β-D-glucopyranuronosyl]oxy)-olean-12-ene-28-olc acid的含量分别为0.389%和0.554%)的细柱五加果实药材(江苏省盱眙县091029)6份。每份0.5 g。分别向其中加入竹节参苷IV a和3β-([O-β-D-glucopyranuronosyl]oxy)-olean-12-ene-28-olc acid的对照品1.95 mg,2.78 mg。按2.3项方法进行操作,最后浓缩提取液并加甲醇定容至25 mL量瓶中,制得6份加标溶液。分别进样20 μL,计算

0.45 μm微孔滤膜滤过,即制得供试品溶液。

**2.4 线性关系的考察** 依次精密吸取混合对照品溶液5,10,20,30,50,80 μL注入高效液相色谱仪,测定峰面积。以峰面积的常用对数(Y)对进样量(μg)的常用对数(X)进行线性回归,所得线性关系见表1。

回收率。结果得出竹节参苷IV a和3β-([O-β-D-glucopyranuronosyl]oxy)-olean-12-ene-28-olc acid的平均回收率分别为98.42%,98.56%,RSD分别为1.47%,1.29%。见表2,3。

表2 竹节参苷IV a加样回收率

样品含量 /mg	加入量 /mg	测得总量 /mg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
1.95	1.95	3.91	100.26		
1.95	1.95	3.86	98.97		
1.95	1.95	3.87	99.23	98.42	1.47
1.95	1.95	3.75	96.15		
1.95	1.95	3.80	97.44		
1.95	1.95	3.84	98.46		

表3 3β-([O-β-D-glucopyranuronosyl]oxy)-olean-12-ene-28-olc acid加样回收率

样品 含量 /mg	加入量 /mg	测得 总量 /mg	回收率 /%	平均 回收率 /%	RSD /%
2.78	2.78	5.50	98.92		
2.78	2.78	5.58	100.36		
2.78	2.78	5.48	98.56	98.56	1.29
2.78	2.78	5.41	97.30		
2.78	2.78	5.52	99.28		
2.78	2.78	5.39	96.94		

**2.9 样品含量测定** 取不同批次的细柱五加果实药材(江苏省盱眙县)。按2.3项方法进行操作,分别制成供试品溶液,同一批次平行2份。在2.1项色谱条件下各进样20 μL,测定细柱五加果实药材中竹节参苷IV a和3β-([O-β-D-glucopyranuronosyl]oxy)-olean-12-ene-28-olc acid的平均含量,结果见表4。

表 4 10 批细柱五加果实药材中竹节参苷 IV a 和 3β-([O-β-D-glucopyranuronosyl]oxy)-olean-12-ene-28-olc acid 的含量 %

No.	批次	竹节参苷 IV a	3β-([O-β-D-glucopyranuronosyl]oxy)-olean-12-ene-28-olc acid
1	091025	0.362	0.576
2	091027	0.353	0.554
3	091029	0.364	0.572
4	091107	0.366	0.582
5	101104	0.263	0.472
6	101105	0.261	0.525
7	111028	0.266	0.490
8	111030	0.271	0.474
9	111102	0.272	0.492
10	111104	0.275	0.482

### 3 讨论

3.1 提取方法及提取溶剂的选择 分别考察了索氏提取法、热回流提取法和超声提取法。结果表明索氏提取法提取效果最好。又通过比较甲醇、乙醇、80% 甲醇、80% 乙醇、60% 甲醇、60% 乙醇对竹节参苷 IV a 和 3β-([O-β-D-glucopyranuronosyl]oxy)-olean-12-ene-28-olc acid 提取效率的影响,得出以甲醇作为提取溶剂的提取效率最高。

3.2 流动相的选择 分别考察了甲醇-水、乙腈-水、甲醇-0.5% 乙酸水、乙腈-0.5% 乙酸水 4 个溶剂系统。结果表明乙腈-0.5% 乙酸水梯度洗脱分离效果比其他 3 个溶剂系统好,能够使供试品中所求组分在 20 min 内实现很好的分离。

3.3 ELSD 条件的选择 由于多数三萜皂苷类成分无紫外吸收或仅在近紫外区有末端吸收,应用紫外检测器检测该成分时往往灵敏度偏低,因此选用 ELSD 检测器对该成分的含量进行检测<sup>[16]</sup>。经过反复试验,确定了 ELSD 的 2 个关键性参数:漂移管温度 106 ℃,载气流速 2.9 L · min<sup>-1</sup>。在该检测条件下,竹节参苷 IV a 和 3β-([O-β-D-glucopyranuronosyl]oxy)-olean-12-ene-28-olc acid 分离效果较好。

3.4 不同批次药材的含量分析 对采自江苏省盱眙县的 10 批药材进行含量测定后发现,所有批次的药材中均含有竹节参苷 IV a 和 3β-([O-β-D-glucopyranuronosyl]oxy)-olean-12-ene-28-olc acid 2

种成分。但是由于采收时间不同,导致不同批次中 2 种成分的含量有差异。同时贮存方法、种植条件等也会对 2 种成分的含量产生影响。

### [参考文献]

[1] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草. 第 5 册[M]. 上海:上海科学技术出版社,1999:758.

[2] 刘爱静,崔景明,王本祥. 南五加皂苷药理作用的研究[J]. 中成药,1985,33(4):41.

[3] 王家冲,水新薇,王冠福. 南五加根皮正丁醇提取物的抗炎镇痛作用[J]. 中国药理通报,1986,2(2):21.

[4] 刘礼意,姚素华,郭曦蓉. 扶正固本药南五加的药理作用[J]. 中成药,1987,36(1):171.

[5] 袁文学,伍湘瑾,韩玉洁,等. 细柱五加的药理作用研究[J]. 沈阳药学院学报,1988,5(3):192.

[6] 张守仁,韩超,於毓文. 南五加萜酸对大鼠实验性溃疡的作用[J]. 中国医学科学院学报,1990,12(3):198.

[7] 朱彩凤,朱铨,李凤龙,等. 细柱五加皮根皮水提液减肥作用的实验研究[J]. 延边大学医学学报,1997,20(3):152.

[8] 苏佩清,傅俊贞. 五加皮的研究现状[J]. 承德医学院学报,1998,15(3):243.

[9] 高月来,沈烈行. 五加皮成分和药理作用研究进展[J]. 山东中医药大学学报,2000,24(5):392.

[10] 钱士辉,袁丽红,曹鹏,等. 细柱五加叶提取物抗肿瘤和抗血管生成活性[J]. 中药材,2009,32(12):1889.

[11] 安士影,钱士辉,蒋建勤. 细柱五加叶化学成分研究[J]. 中草药,2009,40(10):1528.

[12] 咸丽娜,钱士辉,李振麟. 细柱五加茎的化学成分研究[J]. 中药材,2010,33(4):538.

[13] 咸丽娜,李振麟,钱士辉. 细柱五加茎中的一个新的贝壳杉烷型二萜苷[J]. 中草药,2010,41(11):1761.

[14] ZHANG Jing-Yan, Pu She-Ban, Qian Shi-Hui, et al. New cerebrosides from *Acanthopanax gracilistylus* [J]. 中国天然药物,2011,9(2):105.

[15] 张静岩,濮社班,钱士辉,等. 细柱五加果实化学成分的研究[J]. 中药材,2011,34(2):226.

[16] 陈娟,师彦平. 天然产物皂苷类化合物的高效液相色谱分析[J]. 药物分析杂志,2005,25(1):123.

[责任编辑 顾雪竹]