

HPLC-ELSD 法测定绞股蓝中 绞股蓝皂苷 A 的含量^①

乐圆^{a,c} 肖娅萍^{②a,b,c} 张宁^{a,c} 洪叶岚^{a,c} 薛婧^{a,c}

^a 教育部药用植物资源及天然药物化学重点实验室 西安市长安南路 199 号 710062)

^b (西部濒危药材开发国家工程实验室 西安市长安南路 199 号 710062)

^c (陕西师范大学生命科学学院 西安市长安南路 199 号 710062)

摘要 采用 HPLC-ELSD 法测定绞股蓝中绞股蓝皂苷 A 的含量。色谱柱为 Hibar C₁₈ (250×4.6mm, 5μm), 流动相为乙腈-水梯度洗脱, 流速 0.5mL/min, 柱温为 20℃, 绞股蓝皂苷 A 在 0.0425—1.995mg/mL 范围内线性关系良好 ($r^2=0.9962$), 并通过正交法优化其提取工艺。该方法简便、有效, 为绞股蓝的质量控制提供一种准确可行的检测方法。

关键词 绞股蓝; 绞股蓝皂苷 A; 高效液相色谱-蒸发光散射检测器; 正交实验

中图分类号: O657.7⁺2 **文献标识码:** B **文章编号:** 1004-8138(2010)05-1734-04

1 引言

绞股蓝为葫芦科植物绞股蓝 [*Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino] 的全草, 《中药大辞典》中名为七叶胆, 味苦、寒、归肺、肝、脾经^[1], 现代药理学研究表明绞股蓝能够增强机体免疫能力, 改善心、脑、血管系统的功能^[2], 具有通过抑制肿瘤细胞生长增殖或直接细胞毒性来发挥抗肿瘤防癌等作用^[3]。绞股蓝中主要活性成分为达玛烷型皂苷类物质, 目前主要是 UV 法检测绞股蓝皂苷 A^[4], 但该类物质紫外吸收性差, 本实验建立了 HPLC-ELSD 法用于绞股蓝中绞股蓝皂苷 A 的检测, 为绞股蓝质量标准的制定提供一定的参考。

2 材料与仪器

2.1 材料

绞股蓝采自陕西省安康市平利县及湖北省十堰市房县, 经陕西师范大学生命科学学院任毅教授鉴定为葫芦科绞股蓝 [*Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino]。标本保存于陕西师范大学生命科学学院标本室。绞股蓝清洗后、阴干、粉碎、过 65 目筛备用。

2.2 仪器与试剂

LC-2010 高效液相色谱仪 (日本岛津公司); Sedex 75 型蒸发光散射检测器 (法国 Sedere 公司, 北京迪马科技有限公司代理); KQ-300DE 型数控超声波清洗器 (昆山超声仪器有限公司); RE-52AA 旋转蒸发器 (上海亚荣生化仪器厂)。

甲醇、乙腈为色谱纯 (美国 Fisher 公司), 实验用水为超纯水, 其他试剂均为分析纯。绞股蓝皂苷

① “十一五”科技支撑计划项目 (2006BA106A12)

② 联系人, 手机: (0) 13809196228; E-mail: yapingxiao@snnu.edu.cn

作者简介: 乐圆 (1984—), 女, 西安市人, 硕士, 主要从事药用植物资源研究工作。

收稿日期: 2009-11-24; 接受日期: 2010-01-16

A 对照品(安康北医大制药有限公司提供,含量为 91.2%)。

3 方法与结果

3.1 色谱条件

色谱柱: Hibar C₁₈(250×4.6mm, 5μm); 流动相为乙腈(A)-水(B); 采用梯度洗脱: 0min 30% A, 30min 50% A; 流速: 0.5mL/min; 柱温 20℃; 进样量 20μL; ELSD 雾化温度: 40℃; 氮气气压: 0.35MPa。结果见图 1。

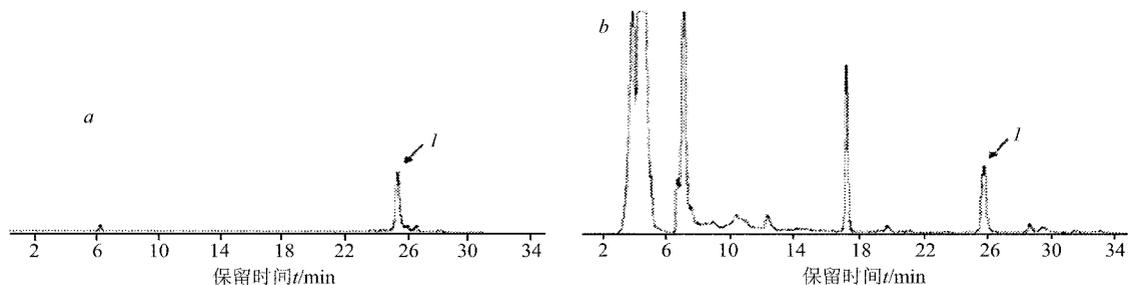


图 1 绞股蓝皂苷 A 对照品(a)和绞股蓝(b)HPLC-ELSD 检测图

1——绞股蓝皂苷 A, 保留时间= 25.4min。

3.2 对照品溶液的制备

准确称取绞股蓝皂苷 A 对照品适量, 加甲醇溶解, 制成 0.625mg/mL 的溶液, 即绞股蓝皂苷 A 含量为 0.57mg/mL 的对照品溶液。

3.3 供试品溶液的制备

准确称取绞股蓝粉末 0.5000g, 通过超声提取法以甲醇为提取溶剂对绞股蓝皂苷 A 进行提取, 提取液抽滤, 滤液以水饱和正丁醇萃取 2 次, 合并萃取液, 减压蒸干, 以色谱甲醇定容至 10mL 容量瓶, 摇匀, 用微孔滤膜(0.22μm)过滤, 待测。

超声提取法按 $L_9(3^4)$ 正交设计表对提取的 4 个因素和 3 个水平进行考察, 重复 3 次。正交方案及结果见表 1。

表 1 $L_9(3^4)$ 正交试验结果

(n=3)

	甲醇浓度(%)	甲醇用量(mL)	提取时间(min)	提取次数	绞股蓝皂苷 A 含量
	A	B	C	D	(mg/g)
1	60(1)	20(1)	20(1)	1(1)	6.092
2	60(1)	30(2)	30(2)	2(2)	6.394
3	60(1)	40(3)	40(3)	3(3)	6.647
4	80(2)	20(1)	30(2)	3(3)	7.029
5	80(2)	30(2)	40(3)	1(1)	7.599
6	80(2)	40(3)	20(1)	2(2)	6.979
7	100(3)	20(1)	40(3)	2(2)	6.452
8	100(3)	30(2)	20(1)	3(3)	6.399
9	100(3)	40(3)	30(2)	1(1)	6.550
k_1	6.378	6.524	6.490	6.747	
k_2	7.203	6.798	6.658	6.608	
k_3	6.467	6.725	6.899	6.692	
R	0.825	0.273	0.409	0.139	

注: 1—3——各个因素的不同水平。

表 2 方差分析

因素	平方和	自由度	F 值	显著性
甲醇浓度	1.229	2	41.755	*
甲醇用量	0.120	2	4.087	
提取时间	0.254	2	8.618	
提取次数(误差)	0.029	2	1	

注: $F_{0.05}(2, 2) = 19.000$, * 表示因素在 0.05 水平上影响显著。

从极差(表 1)和方差分析(表 2)可知, 采用以甲醇为溶剂的超声提取法提取绞股蓝中绞股蓝皂苷 A, 甲醇浓度对提取效果具有显著影响, 各因素影响的主次顺序是: 甲醇溶剂浓度(A) > 提取时间(C) > 溶剂用量(B) > 提取次数(D)。最佳的提取条件组合为 $A_2B_2C_3D_1$, 即用 80% 甲醇 30 mL (固液比为 1:60) 超声提取 40 min, 提取 1 次。

在上述最优条件下, 进行最佳条件的验证, 供试品中绞股蓝皂苷 A 平均含量为 7.649 mg/g, RSD = 0.69% ($n = 3$), 选取的工艺为最佳工艺。

3.4 线性关系考察

准确吸取对照品 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 μ L 注入液相色谱仪, 记录绞股蓝皂苷 A 峰面积, 以对照品的质量浓度为横坐标(A), 峰面积为纵坐标(y), 得回归方程: $y = 5 \times 10^8 A - 1000000$ ($r^2 = 0.9962$), 线性范围: 0.0425—1.995 mg/mL。

3.5 精密度考察

取上述对照品溶液重复测定 6 次, 测得其峰面积的 RSD 为 1.13%, 精密度良好。

3.6 重现性考察

取同一份样品共 5 份, 按“3.3”下最优提取条件制备供试品溶液, 测得绞股蓝皂苷 A 的含量的 RSD 值为 1.64%。

3.7 稳定性考察

取同一样品溶液, 按上述色谱条件, 分别在提取后的 0, 3, 9, 12, 24h 进行检测, 绞股蓝皂苷 A 峰面积积分值基本稳定, RSD 值为 1.87%, 表明样品溶液在 24h 内稳定性良好。

3.8 加样回收率试验

取已知样品 0.5000g, 加入适量标准品, 按“3.3”项下方法最优提取条件制备成供试品溶液 5 份, 按“3.1”项下色谱条件操作及测定, 回收率为 96.4%, RSD 值为 2.21%。

3.9 样品测定

按上述方法对不同产地的绞股蓝中绞股蓝皂苷 A 的含量进行测定, 结果见表 3。

表 3 样品含量测定

(n = 3)

样品号	样品来源	含量(mg/g)	RSD(%)
1	陕西安康	25.221	0.628
2	陕西安康	14.796	1.076
3	陕西安康	12.165	1.105
4	湖北房县	7.109	0.666
5	湖北房县	8.775	0.834
6	湖北房县	6.014	0.973

4 结论

(1) 检测方法的选择: 绞股蓝中绞股蓝皂苷 A 仅在紫外末端吸收, 因此采用 HPLC-UV 检测时

噪音对结果影响大,灵敏度较低,而蒸发光散射检测器为质量型通用检测器,其响应值取决于被分析物颗粒的质量和大小,更适用于绞股蓝中皂苷类物质的检测^[5,6]。

(2) 流动相的选择: 比较了甲醇-水、甲醇-乙腈-水、乙腈-磷酸水等体系进行等度、梯度洗脱,以乙腈(A)-水(B)梯度洗脱,分离效果较好。

(3) 提取溶剂的选择: 实验中考察了甲醇、乙醇、水饱和正丁醇为提取溶剂,结果表明,甲醇的提取效果较好。

(4) 对来源于两个省的绞股蓝进行检测,实验结果显示陕西安康产绞股蓝中绞股蓝皂苷 A 含量较高,这是否与气候、土壤等因素的影响有关,有待进一步深入研究。

(5) 本实验采用 HPLC-ELSD 法对绞股蓝中绞股蓝皂苷 A 的含量进行测定,方法简便、准确、重现性好,可作为绞股蓝药材中绞股蓝皂苷 A 测定的有效方法。

参考文献

- [1] 全国中草药汇编编写组. 全国中草药汇编下册[M]. 北京: 人民卫生出版, 1978. 467—468.
- [2] 齐刚, 张莉. 绞股蓝的药理作用研究进展[J]. 武警医学院学报, 2003, 12(3): 239—241.
- [3] Chen J C, Lu K W, Tsai M L *et al.* Gypenosides Induced G0/G1 Arrest Via CHK2 and Apoptosis Through Endoplasmic Reticulum Stress and Mitochondria-Dependent Pathways in Human Tongue Cancer SCC-4 Cells[J]. *Oral Oncology*, 2009, 45(3): 273—283.
- [4] 张转平, 王新权, 胥道宝等. HPLC 法测定绞股蓝中绞股蓝皂苷 A 的含量[J]. 西北药学杂志, 2008, 23(2): 87—88.
- [5] 卢金清, 田耀平, 曹阳等. HPLC-ELSD 法测定绞股蓝中人参皂苷 Rb1 的含量[J]. 中药材, 2006, 29(11): 1190—1191.
- [6] Kao T H, Huang S C, Stephen Inbaraj B *et al.* Determination of Flavonoids and Saponins in *Gynostemma Pentaphyllum* (Thunb.) Makino by Liquid Chromatography-Mass Spectrometry analysis[J]. *Tica Chimica Acta*, 2008, 626(2): 200—211.

Determination of Gypenoside A in *Gynostemma Pentaphyllum* (Thunb.) Makino by HPLC-ELSD

LE Yuan^{a,c} XIAO Ya-Ping^{a,b,c} ZHANG Ning^{a,c} HONG Ye-Lan^{a,c} XUE Jing^{a,c}

a (Key Laboratory of Ministry of Education for Medicinal Plant Resource and Natural Pharmaceutical Chemistry, Xi'an 710062, P. R. China)

b (National Engineering Laboratory for Resource Development of Endangered Crude Drugs in Northwest of China, Xi'an 710062, P. R. China)

c (College of Life Science, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, P. R. China)

Abstract Gypenoside A in *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino was determined by HPLC-ELSD. The separation was performed on Hibar C₁₈ column (250 × 4.6 mm, 5 μm), by gradient elution using acetonitrile-H₂O as the mobile phase at the flow rate of 0.5 mL/min, and the temperature of column was 20 °C. The linear range of gypenoside A was 0.0425—1.995 mg/mL ($r^2 = 0.9962$). Also, the extraction was studied by the orthogonal experiment. This method was simple, effective and feasible, and can be used to control the quality of *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino.

Key words *Gynostemma Pentaphyllum* (Thunb.) Makino; Gypenoside A; HPLC-ELSD;

Orthogonal Experiment