

竹节参皂苷类化合物 HPLC 指纹图谱研究

邹海艳 刘珊珊 李 佳 马 晗 赵 晖

(首都医科大学中医药学院,北京,100069)

摘要 目的:建立竹节参药材皂苷类成分 HPLC 指纹图谱的研究方法,为竹节参药材的质量控制提供依据。方法:采用 Hibar C₁₈(4.6 mm×250 mm,5 μm)色谱柱,以乙腈-0.1%的磷酸水溶液为流动相,梯度洗脱,流速 1.0 mL·min⁻¹,检测波长 203 nm,柱温 30 ℃;测定了 7 批市售竹节参药材的 HPLC 指纹图谱。结果:竹节参的指纹图谱共检出 12 个共有峰,通过对照品比对指认了其中的 7 个共有皂苷类成分,7 批药材中有 6 批相似度均达到 0.9 以上。结论:该方法精密度、稳定性、重复性好,特征性及专属性强,可用于竹节参药材的质量控制。

关键词 竹节参;皂苷类化合物;HPLC;指纹图谱

Studies on the HPLC Fingerprints of Saponins in Rhizoma Panax Japonicus

Zou Haiyan, Liu Shanshan, Li Jia, Mahan, Zhao Hui

(School of Traditional Chinese Medicine, Capital Medical University, Beijing 100069, China)

Abstract Objective: To establish HPLC fingerprint method for quality control of saponins in Rhizoma Panax Japonicus. **Methods:** The HPLC method was conducted based on a Hibar C₁₈(4.6 mm×250 mm,5 μm) column, with acetonitrile-0.1% orthophosphoric acid as mobile phase by gradient elution. The detection wavelength was at 203 nm. The flow rate was 1.0 mL·min⁻¹ and the column temperature was 30 ℃. Seven samples from different sources were analyzed by HPLC. **Results:** Twelve main marker peaks were selected in the standard fingerprint and 7 peaks of saponins were identified. The similarity of 6 samples was over 0.9. **Conclusion:** The precision, repeatability and stability of the method were up to standard, and this method can be used for quality evaluation of Rhizoma Panax Japonicus.

Key Words Rhizoma Panax Japonicus; Saponins; HPLC; Fingerprint

中图分类号:R282 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2014.10.033

竹节参,又名竹节人参、竹节三七、白三七,是五加科人参属植物竹节参 *Panax japonicus* C. A. Mey 的干燥呈竹鞭状的根茎。竹节参收载于 1977 年以后的各版《中华人民共和国药典》,具有滋补强壮,有散瘀止痛,止血祛痰的功效,常用于治疗病后虚弱,劳嗽咯血,咳嗽痰多,跌扑损伤等证^[1-2]。竹节参中主要含有皂苷类化合物、多糖、挥发油、氨基酸等成分,现代药理研究表明,皂苷类化合物是竹节参中的主要有效成分,在中枢神经系统、消化系统、心血管系统、免疫系统等方面均有较好的活性^[3-5]。竹节参中的皂苷类成分主要为齐墩果烷型和达玛烷型三萜皂苷,其中以齐墩果烷型皂苷含量为高,包括竹节参皂苷 IV a, V, I_b, IV 等^[5]。竹节参广泛分布于我国云南、四川、湖北、贵州等省,是民间常用中草药,但迄今为止,《中华人民共和国药典》尚未建立相应的质量控制标准,本文在前期化学成分研究的基础上,针对竹节参中的皂苷类化合物,进行了 HPLC 指纹图谱的研究。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 Agilent HP 1260 高效液相色谱仪,配有自动进样器、柱温箱及 DAD 检测器;舒美双频数控超声波清洗器(KQ-500VDE,昆山市超声仪器有限公司),RT-04 高速粉碎机,赛多利斯万分之一分析天平。

1.2 试剂 乙腈(Caledon,色谱纯),娃哈哈纯净水,其余试剂均为分析纯。人参皂苷 Rb1(批号:110704~201122)、人参皂苷 Rg1(批号:110703~201027)、人参皂苷 Rd(批号:111818~2010001)、人参皂苷 Re(批号:110754~200822)、竹节参皂苷 IVa(批号:111861~201001),均为含量测定用,购于中国药品生物制品检定所;人参皂苷 R0(批号:MUST-12010503,纯度>98%,购于北京世纪奥科生物技术有限公司);巨花雪胆皂苷 B(自制)、Cynarasaponin C(自制)、竹节参皂苷 IV(自制)。

1.3 药材 7 批竹节参药材分别购于广西(S1)、四川(S2)、云南(S3)、陕西(S4,S5)、湖北(S6)、湖北恩施

基金项目:国家自然科学基金(编号:81403095);北京市属高校青年拔尖人才培养项目(编号:CIT&TCD201404175, CIT&TCD201404184);首都中医药护理专项(编号:12ZYH08)

作者简介:邹海艳(1974—),女,副教授,博士,主要研究方向:中药质量控制,Tel:(010)83911671,E-mail:bwzhy@sina.com

通信作者:赵晖(1973—),女,副教授;硕士研究生导师;Tel:(010)83911633,E-mail:zhaohui8957@sina.com

(S7);由首都医科大学中医药学院李佳副教授鉴定。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Hibar C₁₈ 柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm);流动相:乙腈(A) - 0.1% 磷酸水溶液(B),梯度洗脱(0 ~ 30 min, 19% ~ 19% A; 30 ~ 35 min, 19% ~ 23% A; 35 ~ 63 min, 23% ~ 32% A; 63 ~ 85 min, 32% ~ 70% A);流速 1.0 mL · min⁻¹,检测波长 203 nm,柱温 30 °C,进样量 10 μL。

2.2 对照品溶液的制备 分别取人参皂苷 Rg1、Re、R0、Rb1、Rd、竹节参皂苷 IVa、IV、cynarasaponin C、巨花雪胆皂苷 B 适量,用甲醇溶解制成混合对照品溶液,备用。

2.3 供试品溶液的制备 取竹节参药材,粉碎,过 60 目筛,取样品粉末约 0.5 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,加 70% 甲醇 30 倍量,称重,超声提取 1 h,放至室温,补足失重,过滤,取续滤液用 0.45 μm 滤膜滤过,即得。

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度实验 取同一竹节参供试品溶液适量,连续进样 6 次,按上述色谱条件测定,以竹节参皂苷 IVa 为参照物,测得各共有峰的相对保留时间 RSD ≤ 0.60%,相对峰面积 RSD ≤ 1.02%,符合指纹图谱研究技术要求。

2.4.2 重复性试验 取同一竹节参药材样品 6 份,按上述方法平行制备供试品液,并进行测定,以竹节参皂苷 IVa 为参照物,测得各共有峰的相对保留时间 RSD ≤ 0.17%,相对峰面积 RSD ≤ 2.72%,符合相关要求。

2.4.3 稳定性试验 取同一竹节参供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件,分别于 0 h, 4 h, 8 h, 12 h, 16 h, 20 h 进行测定,以竹节参皂苷 IVa 为参照物,测得各共有峰的相对保留时间 RSD ≤ 0.60%,相对峰面积 RSD ≤ 2.18%,表明样品溶液 20 h 内稳定。

2.5 竹节参皂苷类成分指纹图谱的建立

2.5.1 共有峰的确定和化合物的指认 按 2.1 项下色谱条件,分别对 7 批竹节参药材样品进行 HPLC 分析,记录图谱(见图 1),采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004A)”软件进行数据处理,以平均数生成竹节参皂苷类成分的指纹图谱,经分析确定指纹图谱中有 12 个峰为共有特征峰,即 1 ~ 12 号峰(见图 2)。采用混合对照品对照(见图 3),指认了其中的 7 个共有峰,即 2 ~ 4 号、6 号、10 ~ 12 号共有峰分别为人参皂苷 Rg1、Re、Rb1、R0、竹节参皂苷 IV、人参皂苷 Rd 和竹节参皂苷 IVa,由图可知,6, 9, 10, 12 峰为主要的共有峰,峰面积平均值约为总峰面积的 90.19%。

2.5.2 不同批次竹节参药材指纹图谱相似度评价 采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004A)”软件对 7 批竹节参药材的指纹图谱进行分析,结果 7 批竹节参药材(S1 ~ S7)相似度分别为 0.999, 0.986, 0.966, 0.997, 0.958, 0.959, 0.702。除购于湖北恩施的样品外,其余批次药材的相似度均大于 0.9,相似度良好。

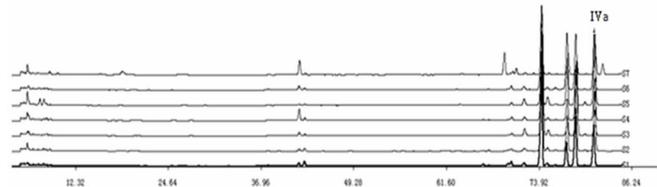
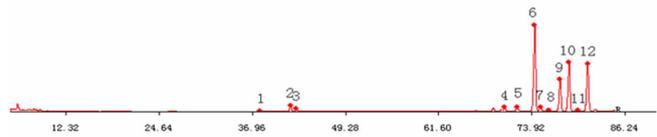


图 1 7 个批次竹节参药材的 HPLC 指纹图谱



1. 人参皂苷 Rg1; 2. 人参皂苷 Re; 3. 巨花雪胆皂苷 B; 4. 人参皂苷 Rb1; 5. 人参皂苷 R0; 6. 竹节参皂苷 IV; 7. 人参皂苷 Rd; 8. 竹节参皂苷 IVa; 9. cynarasaponin C

图 2 竹节参药材 HPLC 指纹图谱

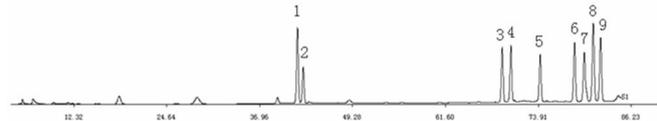


图 3 混合对照品溶液的 HPLC 图谱

3 讨论

1) 实验中对色谱条件进行了优化,分别比较了甲醇-水、乙腈-水、乙腈-0.1% 甲酸水、乙腈-0.1% 磷酸水为流动相的分离效果,结果以乙腈-0.1% 磷酸水为流动相时,基线漂移小,色谱峰峰形较好。试验还比较了 203 nm, 220 nm, 254 nm, 280 nm, 320 nm, 360 nm 各检测波长下的色谱图,发现检测波长为 203 nm 时,色谱峰数目最多,响应值高,同时考虑到皂苷类成分主要为末端吸收,并参考相关文献^[7],故选择 203 nm 为检测波长。

2) 实验中考察了供试品液的制备方法,以竹节参皂苷 IVa 的峰面积为指标,分别对药材的提取方法(回流、浸渍、超声),提取溶剂(95%、70%、35% 甲醇和乙醇),以及提取时间(30 min, 1 h, 2 h)进行了考察,结果显示,70% 甲醇回流 1 h 和超声 1 h 效果接近,超声提取 1 h 和 2 h 无统计学意义,因此选择 70% 甲醇超声 1 h 进行提取。

3) 近年来,竹节参药材需求量不断增涨,竹节参药材产地较多,市场上野生和家种药材并存,本实验曾收集了 10 个不同批次的竹节参药材,其中有 3 批样品外

形与竹节参相似,但 HPLC 谱图中不含有上述特征峰,经显微鉴别发现这些批次药材粉末中无草酸钙簇晶,不属于人参属植物,应为伪品;7 批竹节参药材检测结果表明,湖北恩施(S7)所产竹节参药材样品出峰较多,含有巨花雪胆皂苷 B、cynarasaponin C 等皂苷,其主要色谱峰的峰面积也与其他样品相差较大,相似度较低(0.702),可能与竹节参产地的生态环境、栽培年限、采收加工等因素有关^[8-10]。以上结果说明市售的竹节参药材存在一定的质量差异和掺伪情况,因此,亟需建立相应的质量控制方法。

4) 本实验建立了竹节参药材皂苷类成分的 HPLC 指纹图谱分析方法,并对其主要色谱峰进行了指认,结果表明竹节参药材中主要皂苷类成分在色谱图中分离度良好,方法的稳定性、重复性、精密度符合要求,特征性及专属性强,可用于竹节参药材的质量控制。

参考文献

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 2010 年版一部[S]. 北京: 化学工业出版社, 2010: 129.

[2] 林先明, 谢玲玲, 由金文, 等. 竹节参名称及基原考[J]. 中药材, 2007, 30(6): 742 - 743.

[3] 王林, 何宗琴, 郑在, 等. 酶法提取虎杖中白藜芦醇的工艺优化[J]. 安徽农业科学, 2013, 41(8): 3339 - 3340.

[4] 彭源德, 朱作华, 刘正初, 等. 酵母发酵虎杖提取白藜芦醇技术初步研究[J]. 湖北农业科学, 2011, 50(23): 4929 - 4931.

[5] 邓梦茹, 刘韶, 朱周颢, 等. 酶法提取虎杖中的白藜芦醇[J]. 中南药学, 2011, 9(9): 669 - 672.

[6] 许南儿, 罗榴彬, 梅建凤, 等. 生物转化法提高虎杖中白藜芦醇的含量[J]. 药物生物技术, 2012, 19(5): 411 - 413.

[7] 张明, 鞠楷, 孙琴, 等. 西南 5 个产区虎杖中虎杖苷和白藜芦醇含量比较[J]. 中国药房, 2012, 23(39): 3723 - 3725.

[8] 邢琪昌, 卢昊, 付晓, 等. 高效液相色谱法测定虎杖中白藜芦醇和白藜芦醇苷的含量[J]. 湖北中医药大学学报, 2013, 15(3): 33 - 35.

[9] 周雅琴, 樊溪源, 周小雷, 等. 不同产地虎杖中白藜芦醇与白藜芦醇苷含量测定[J]. 医药导报, 2012, 31(5): 632 - 634.

[10] 刘丹, 唐海峰, 张三七, 等. 虎杖中有效成分提取方法的研究[J]. 中药材, 2007, 29(4): 516 - 521.

[11] 王彦春, 许汉林, 傅琴, 等. 虎杖白藜芦醇及其脂质体剂型对帕金森

病模型大鼠黑质细胞保护作用的研究[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(8): 1060.

[12] 李春艳, 张杰, 李劲平, 等. 竹节参化学成分与药理活性研究进展[J]. 中医药导报, 2012, 18(4): 68 - 70.

[13] 欧阳丽娜, 向大位, 吴雪, 等. 竹节参化学成分及药理活性研究进展[J]. 中草药, 2010, 41(6): 1023 - 1025.

[14] 贺海波, 许佳, 王洪武, 等. 竹节参不同提取部位预处理对冠脉结扎诱导大鼠急性心肌缺血损伤的影响[J]. 第三军医大学学报, 2011, 33(14): 1462 - 1466.

[15] 吴兵, 陈新, 张长春, 等. 竹节参化学成分研究[J]. 天然产物研究与开发, 2012, 24(8): 1051 - 1054.

[16] 贾放, 陈平, 王如锋, 等. 竹节参药材不同部位皂苷成分的分析研究[J]. 时珍国医国药, 2012, 23(7): 1682 - 1684.

[17] 童学飞, 尹文仲, 陈科力. 栽培和野生竹节参中人参皂苷含量比较[J]. 时珍国医国药, 2006, 17(10): 1919 - 1920.

[18] 李玉洲, 何毓敏, 孙志伟, 等. 不同栽培年限竹节参中主要成分含量的动态变化[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(33): 20411 - 20413.

[19] 关乔, 张海滨, 毛帅, 等. 鄂西竹节参野生品与栽培品的比较研究[J]. 中药材, 2013, 36(2): 171 - 175.

(2014 - 04 - 14 收稿 责任编辑: 曹柏)

(上接第 1363 页)

[20] 刘树兴, 程丽英, 高连周, 等. 大孔吸附树脂法分离纯化白藜芦醇的研究[J]. 食品科学, 2005, 26(9): 265 - 268.

[21] 向海燕, 周春山, 杜邵龙, 等. 大孔吸附树脂法分离纯化虎杖中白藜芦醇的研究[J]. 中草药, 2005, 36(2): 207 - 210.

[22] 李燕, 刘军海. 大孔树脂对虎杖白藜芦醇的静态吸附动力学研究[J]. 食品与机械, 2011, 27(5): 82 - 86.

[23] 田娜, 周达力, 曹佩琴, 等. 大孔吸附树脂对虎杖中白藜芦醇的分离纯化研究[J]. 中国农学通报, 2013, 29(22): 147 - 151.

[24] 田凤, 徐德生, 冯怡, 等. 虎杖药渣中白藜芦醇的提取和纯化[J]. 中国医药工业杂志, 2012, 43(10): 824 - 826.

[25] 周建军, 曹亮. 大孔树脂分离纯化虎杖中蒽醌类化合物工艺研究[J]. 中成药, 2011, 33(7): 1267 - 1269.

[26] 王辉, 董悦生, 秦建全, 等. 虎杖发酵液中白藜芦醇的分离纯化工艺研究[J]. 中草药, 2010, 41(2): 223 - 227.

(2013 - 11 - 12 收稿 责任编辑: 曹柏)