

HPLC 测定绞股蓝中七叶胆苷 XLVI 和人参皂苷 Rb₃ 含量

黄盼盼¹, 马临科², 唐登峰², 赵维良^{2*} (1.浙江中医药大学, 杭州 310053; 2.浙江省食品药品检验研究院, 杭州 310052)

摘要: 目的 建立 HPLC 测定绞股蓝中七叶胆苷 XLVI 和人参皂苷 Rb₃ 含量的方法。方法 采用 Ultimate XB-C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 以乙腈(A)-水(B)线性梯度洗脱, 检测波长 203 nm, 流速 1 mL·min⁻¹, 柱温 30 °C。结果 七叶胆苷 XLVI 在 3.30~39.62 μg·mL⁻¹ 范围内线性良好($r^2=0.9997$), 平均回收率为 113%, RSD 为 1.84%; 人参皂苷 Rb₃ 在 3.27~39.26 μg·mL⁻¹ 范围内线性良好($r^2=0.9997$), 平均回收率为 102%, RSD 为 2.82%。结论 该方法有较好的分离效果, 准确性、精密度和重复性良好, 为绞股蓝的研究和质量控制提供了科学依据。

关键字: 绞股蓝; 七叶胆苷 XLVI; 人参皂苷 Rb₃

中图分类号: R284.1

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2019)12-1529-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2019.12.015

引用本文: 黄盼盼, 马临科, 唐登峰, 等. HPLC 测定绞股蓝中七叶胆苷 XLVI 和人参皂苷 Rb₃ 含量[J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(12): 1529-1532.

Determination of Gypenoside XLVI and Ginsenoside Rb₃ in *Gynostemma pentaphyllum* by HPLC

HUANG Panpan¹, MA Linke², TANG Dengfeng², ZHAO Weiliang^{2*} (1.Zhejiang Chinese Medicine University, Hangzhou 310053, China; 2.Zhejiang Institute of Food and Drug Control, Hangzhou 310052, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a reversed phase HPLC for simultaneous determination of gypenoside XLVI and ginsenoside Rb₃ in *Gynostemma pentaphyllum*. **METHODS** The separation of gypenoside XLVI and ginsenoside Rb₃ were performed on a Ultimate XB-C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) with methanol(A)-water(B) as mobile phase in a gradient elution program at a flow rate of 1 mL·min⁻¹. The column temperature was maintained at 30 °C. The detection wavelength was 203 nm.

RESULTS Gypenoside XLVI and ginsenoside Rb₃ showed a good linearity range in 3.30–39.62 μg·mL⁻¹ ($r^2=0.9997$) and 3.27–39.26 μg·mL⁻¹ ($r^2=0.9997$), respectively. The average recoveries were 113% and 102%, RSD were 1.84% and 2.82%, respectively. **CONCLUSION** This method is accurate with high simplify, stability, and reliability, and can be used for quality research of *Gynostemma pentaphyllum*.

KEYWORDS: *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Mak.; gypenoside XLVI; ginsenoside Rb₃

绞股蓝 [*Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Mak.] 是葫芦科 (Cucurbitaceae) 绞股蓝属 (*Gynostemma*) 的干燥地上部分, 主要分布于我国陕西南部 and 长江以南各省区, 生于山坡疏林、灌丛中或路旁草丛中, 本种入药, 有消炎解毒、止咳祛痰等功效^[1]。目前绞股蓝仅收载于《浙江省中药炮制规范》《福建省中药材标准》《四川省中药材标准》等地方标准, 尚未被中国药典收载。竹本常松^[2]从绞股蓝中分离出七叶胆苷 XLVI、人参皂苷 Rb₃ 等多种皂苷, 现代药理学研究表明绞股蓝中富含的多种皂苷有增强免疫力、抗氧化、抗肿瘤、延缓衰老等作用^[3-6], 其中绞股蓝皂苷 XLVI 和人参皂苷 Rb₃ 具有降血糖、抗肿瘤、抗血栓等作用, 对神经系统、心脑血管和血液等系统也有重要的药理活性^[7-9]。目前关于绞股蓝中人参皂苷 Rb₃ 含

量测定的研究已有报道^[10-11], 但未见关于 HPLC 测定绞股蓝中七叶胆苷 XLVI 含量的研究报道。因此, 本实验建立了 HPLC 同时测定绞股蓝中七叶胆苷 XLVI 和人参皂苷 Rb₃ 含量的方法, 可为绞股蓝质量标准的控制评价提供科学依据。

1 材料

1.1 仪器

LC-20AT 高效液相色谱仪(DGU-20A5 在线脱气机, LC-20AT 泵, SIL-20AT 自动进样器, SPD-M20A 检测器, CDT-20AC 柱温箱, 色谱工作站 LC Solution)来自岛津; Ultimate XB-C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); XPE-205 电子天平 (METTLER TOLEDO); USC-802 型超声波清洗器 (上海波龙); Milli Q Advantage A10 超纯水仪 (Millipore 公司); 5810R 型台式大容量冷冻离心机

基金项目: 浙江省食品药品安全“十三五”规划-中药材数字标本馆(浙食检 z-2016001)

作者简介: 黄盼盼, 女, 硕士生 Tel: 15757176440 E-mail: 6233112712@qq.com

*通信作者: 赵维良, 男, 硕士, 主任中药师 Tel:

(0571)86452373 E-mail: zwl@zjyj.cn

(德国 EPPENDORF 公司)等。

1.2 样品与试药

绞股蓝浸膏(编号: JG01、JG02、JG03 等 15 批样品), 其中 JG01、JG08~JG15 的原药材采收期为 2017 年 7 月, JG02~JG07 原药材采收期为 2017 年 10 月, 绞股蓝药材经浙江省食品药品检验研究院主任中药师郭增喜鉴定为葫芦科植物绞股蓝 [*Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Mak.] 的干燥地上部分。绞股蓝浸膏是由药材加倍量的饮用水, 浸泡, 加热煎煮, 趁热过滤, 再进行减压浓缩的绞股蓝浓缩液。绞股蓝药材及绞股蓝浸膏均由浙江寿仙谷药业有限公司提供。七叶胆苷 XLVI 对照品(成都德思特生物技术有限公司, 批号: DST180630-111; 含量 $\geq 98\%$); 人参皂苷 Rb₃(中国食品药品检定研究院, 批号: 111686-201203; 含量 $\geq 94.3\%$)。乙腈为色谱纯, 其他试剂均为分析纯; 水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适应性试验

色谱柱为 Ultimate XB-C₁₈ 色谱柱(250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m); 流动相: 乙腈(A)-水(B)梯度洗脱: 0~5 min, 30% A; 5~10 min, 30% \rightarrow 33%A, 10~25 min, 33% \rightarrow 35% A; 25~35 min, 35% \rightarrow 40% A; 35~50 min, 40% \rightarrow 60% A; 流速: 1 mL \cdot min⁻¹; 检测波长: 203 nm; 柱温: 30 $^{\circ}$ C; 进样量: 20 μ L。在此色谱条件下对照品溶液和样品均能达到较好的分离, 色谱图见图 1。

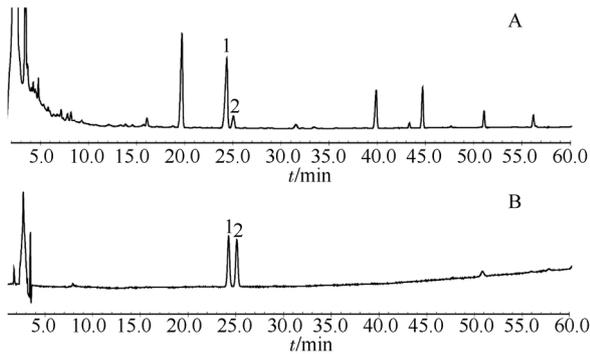


图 1 高效液相色谱图

A-供试品溶液; B-对照品溶液; 1-七叶胆苷; 2-人参皂苷 Rb₃。

Fig. 1 HPLC chromatograms

A-sample solution; B-control solution; 1-gypenoside XLVI; 2-ginsenoside Rb₃。

2.2 对照品溶液的制备

精密称取七叶胆苷 XLVI、人参皂苷 Rb₃ 对照品适量, 加 70% 甲醇制成含七叶胆苷 XLVI

39.62 μ g \cdot mL⁻¹、人参皂苷 Rb₃ 39.26 μ g \cdot mL⁻¹ 的混合对照品溶液, 用封口膜封口, 放入冰箱, 待用。

2.3 供试品溶液的制备

取绞股蓝浸膏约 0.92 g, 置 100 mL 具塞锥形瓶中, 加入 70% 甲醇 25 mL, 超声处理(功率 250 W, 80 kHz, 温度 40 $^{\circ}$ C) 35 min, 待放置室温后用 70% 甲醇补足丢失重量, 取 2 mL 供试品上清液于离心管中离心(13 000 r \cdot min⁻¹, 5 min), 取离心后的上清液用 0.22 μ m 微孔滤膜过滤即得供试品溶液。

2.4 线性关系考察

分别精密称取七叶胆苷 XLVI 和人参皂苷 Rb₃ 适量, 加 70% 甲醇采用稀释倍数法制成含七叶胆苷 XLVI 39.62, 19.81, 9.91, 6.60, 4.95, 3.96, 3.30 μ g \cdot mL⁻¹ 和含人参皂苷 Rb₃ 39.26, 19.63, 9.82, 6.54, 4.91, 3.93, 3.27 μ g \cdot mL⁻¹ 的混合溶液, 精密吸取以上混合溶液各 20 μ L, 注入高效液相色谱仪, 以色谱峰峰面积(Y)和浓度(X)进行线性回归计算, 七叶胆苷 XLVI 在 3.30~39.62 μ g \cdot mL⁻¹ 内线性良好, 回归方程为 $Y=4\ 963\ 937.42X-1\ 477.35$, $r^2=0.999\ 7$; 人参皂苷 Rb₃ 在 3.27~39.26 μ g \cdot mL⁻¹ 内线性良好, 回归方程为 $Y=4\ 666\ 674.95X-1\ 005.63$, $r^2=0.999\ 7$ 。

2.5 仪器精密度试验

取“2.2”项下的七叶胆苷 XLVI 和人参皂苷 Rb₃ 的混合对照品溶液, 按“2.1”项下色谱条件连续进样 6 次, 进样量 20 μ L, 记录色谱峰面积, 计算得七叶胆苷 XLVI 和人参皂苷 Rb₃ 峰面积的 RSD 分别为 0.49% 和 0.33%, 表明仪器精密度良好。

2.6 重复性试验

精密称取 6 份同一批次绞股蓝浸膏(编号: JG08) 0.92 g, 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件连续进样, 计算七叶胆苷 XLVI 和人参皂苷 Rb₃ 含量, 其 RSD 值分别为 0.93% 和 1.66%, 表明重复性良好。

2.7 稳定性试验

取同一供试品溶液(编号: JG08), 按“2.1”项下色谱条件分别在 0, 2, 4, 6, 8, 12, 24 h 进样, 分别测定七叶胆苷 XLVI 和人参皂苷 Rb₃ 含量, 计算七叶胆苷 XLVI 和人参皂苷 Rb₃ 的 RSD 分别为 0.26% 和 1.26%, 表明供试品溶液在 24 h 内保持稳定。

2.8 加样回收率试验

精密称取 6 份同一批次绞股蓝浸膏(编号: JG08) 0.46 g, 精密加入等量的对照品溶液, 按

“2.3”项下方法制备供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件连续进样,计算绞股蓝中七叶胆苷 XLVI 和人参皂苷 Rb₃ 的回收率 RSD 值分别为 1.84% 和 2.82%, 结果见表 1。

表 1 加样回收率试验结果

Tab. 1 Result of recovery test

成分	称样量/	原有量/	加入量/	测得量/	回收率/	平均值/	RSD/
	g	μg	μg	μg	%	%	%
七叶胆 苷 XLVI	0.467	1.297	0.991	2.426	114	113	1.84
	0.460	1.277	0.991	2.425	116		
	0.465	1.292	0.991	2.385	110		
	0.470	1.306	0.991	2.412	112		
	0.472	1.311	0.991	2.424	112		
	0.473	1.315	0.991	2.416	111		
人参皂 苷 Rb ₃	0.467	0.199	0.196	0.404	104	102	2.82
	0.460	0.196	0.196	0.406	107		
	0.465	0.198	0.196	0.395	100		
	0.470	0.200	0.196	0.400	102		
	0.472	0.201	0.196	0.401	102		
	0.473	0.202	0.196	0.397	100		

2.9 样品含量测定

精密称取 15 批不同采收时间的绞股蓝提取的浸膏,按“2.3”项下方法制备供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件进样测定,分别测定 15 批绞股蓝浸膏中七叶胆苷 XLVI 和人参皂苷 Rb₃ 的含量,结果见表 2。

表 2 绞股蓝含量测定结果

Tab. 2 Results of the determination of *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Mak.

编号	绞股蓝皂苷 XLVI		人参皂苷 Rb ₃	
	含量/mg·g ⁻¹	RSD/%	含量/mg·g ⁻¹	RSD/%
JG01	1.32	0.98	0.19	0.60
JG02	2.30	1.02	0.54	2.53
JG03	2.82	1.02	0.66	1.88
JG04	3.51	1.10	0.79	2.14
JG05	3.21	1.46	0.41	0.40
JG06	5.90	0.62	0.84	1.92
JG07	4.35	0.45	1.03	1.05
JG08	2.85	0.88	0.43	0.40
JG09	2.18	1.00	0.34	1.84
JG10	1.62	0.61	0.23	0.44
JG11	1.32	0.98	0.19	0.60
JG12	1.79	0.58	0.25	0.12
JG13	2.91	0.20	0.39	0.36
JG14	1.62	0.30	0.21	0.33
JG15	1.97	1.00	0.26	1.25

3 提取方法比较

绞股蓝中皂苷含量丰富,为了使指标成分更多地提取出来,本实验分别考察了提取时间、提取方式、提取溶剂等对七叶胆苷 XLVI 和人参皂苷 Rb₃ 含量的影响。

3.1 提取溶剂的比较

取同批次绞股蓝浸膏(编号: JG10),混匀后精

密称取 3 份 0.92 g 样品,分别精密加入 50%甲醇、70%甲醇、甲醇各 25 mL,超声 35 min,放冷,称定重量,用溶剂补足减失重量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。计算出 50%甲醇、70%甲醇和甲醇提取的七叶胆苷 XLVI 的含量分别为 1.422, 1.602, 1.636 mg·g⁻¹, 人参皂苷 Rb₃ 的含量分别为 0.254, 0.323, 0.300 mg·g⁻¹, 故确定提取溶剂为 70%甲醇。

3.2 提取方式的比较

取同批次绞股蓝浸膏(编号: JG10),混匀后精密称取 2 份 0.92 g 样品,精密加入 70%甲醇 25 mL,超声或回流 35 min,放冷,称定重量,用溶剂补足减失重量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。计算出超声和回流 2 种提取方法提取的七叶胆苷 XLVI 的含量分别为 1.893, 1.602 mg·g⁻¹, 人参皂苷 Rb₃ 的含量分别为 0.354, 0.323 mg·g⁻¹, 由结果可看出两者差别较小,考虑到样品的稳定性,故确定提取方式为超声提取。

3.3 提取时间的比较

取同批次绞股蓝浸膏(编号: JG10),混匀后精密称取 3 份 0.92 g 样品,分别精密加入 70%甲醇 25 mL,分别超声 25, 35, 60 min,放冷,称定重量,用溶剂补足减失重量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。计算 25, 35, 60 min 提取的七叶胆苷 XLVI 的含量分别为 1.551, 1.602, 1.623 mg·g⁻¹, 人参皂苷 Rb₃ 的含量分别为 0.269, 0.323, 0.317 mg·g⁻¹, 由计算结果可看出 35 min 与 60 min 的含量相差不大,说明 2 个成分在 35 min 左右已提取完全,故确定提取时间为 35 min 为宜。

4 讨论

在参考文献^[10-11]基础上,为了浸膏提取更完全,本实验考察了不同浓度溶剂、不同溶剂和不同提取时间等因素,结果表明 70%甲醇超声提取 35 min 的提取效果最好;色谱条件考察了流动相组成(甲醇-水、甲醇-0.4%磷酸、甲醇-0.1%磷酸、乙腈-水、乙腈-0.4%磷酸、乙腈-0.1%磷酸),检测波长(203, 254 nm)和不同流速,结果显示,乙腈-水的洗脱能力较强且分离度、峰型较好,203 nm 检测波长、柱温 30 °C、流速 1 mL·min⁻¹ 时色谱峰基线平稳、分离度好,同时为了让七叶胆苷 XLVI 和人参皂苷 Rb₃ 更好地分离,采用梯度洗脱方式进行分析。通过 HPLC 对方法学进行考察,显示方法的精密度、稳定性、重复性良好,表明此方法稳定可靠,对以后绞股蓝的质量控制提供了一定

的理论基础。

绞股蓝中的七叶胆苷 XLVI 和人参皂苷 Rb₃ HPLC 色谱峰较接近,不容易分开,本实验在对比了几十种洗脱梯度后确定的洗脱条件可增加 2 种成分的分度,对绞股蓝的研究提供了科学依据。

本实验建立的同时测定七叶胆苷 XLVI 和人参皂苷 Rb₃ 含量的方法可以在无法用外观性状鉴别绞股蓝时对绞股蓝及其饮片的质量控制提供科学依据,同时对绞股蓝皂苷成分的研究提供科学基础。

通过含量测定结果可看出,采收季节不同七叶胆苷 XLVI 和人参皂苷 Rb₃ 的皂苷含量差别较大,10 月份的绞股蓝制成的浸膏(编号: JG02~JG07)的中七叶胆苷 XLVI 和人参皂苷 Rb₃ 含量在 2~6 mg·g⁻¹,而 7 月份的绞股蓝(编号: JG01、JG08~JG15)的含量只有 1~3 mg·g⁻¹,在同一提取条件下含量差别大,建议绞股蓝原药材可在 10 月份进行采收,在评价绞股蓝药材时在采收季节方面要加强控制。

20 世纪 70 年代竹本常松从绞股蓝中分离出多种皂苷并为其命名,也有学者^[12-13]从绞股蓝中分离出七叶胆苷 XLVI,但未见七叶胆苷 XLVI 含量测定的研究报道。为了更好地控制绞股蓝的质量标准,本实验建立的 HPLC 同时测定绞股蓝中七叶胆苷 XLVI 和人参皂苷 Rb₃ 的含量,对绞股蓝进一步的开发和研究提供科学依据,为绞股蓝质量标准的建立提供可靠依据。

REFERENCES

[1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志-第三十九卷[M]. 北京: 科学出版社, 1999.
[2] TAKEMOTO T, ARIHARA S, NAKAJIMA T, et al. Studies on the constituents of *Gynostemma pentaphyllum* MAKINO. II. structures of gypenoside XV-XXI [J]. Yakugaku Zasshi, 1983,

103(10): 1015-1023.
[3] WANG Z J, LUO D H. Antioxidant activities of different fractions of polysaccharide purified from *Gynostemma Pentaphyllum* Makino [J]. Carbohydr Polym, 2007, 68(1): 54-58.
[4] LI X L, WANG Z H, ZHAO Y X, et al. Isolation and antitumor activities of acidic polysaccharide from *Gynostemma pentaphyllum* Makino [J]. Carbohydr Polym, 2012, 89(3): 942-947.
[5] 杜小燕, 侯颖, 覃华, 等. 绞股蓝多糖的抗肿瘤作用及其机制研究[J]. 科学技术与工程, 2009, 9(20): 5968-5972.
[6] YAO D D, HUANG S H. Study on the anti-aging function of *Gynostemma pentaphyllum* Makino on sub-aging rats [J]. Mod J Integr Tradit Chin West Med(现代中西医结合杂志), 2007, 16(28): 4112-4113.
[7] ZHANG L H, LIN Y F, GUAN H S, et al. Simultaneous determination of gypenoside LVI, gypenoside XLVI, 2 α -OH-protopanaxadiol and their two metabolites in rat plasma by LC-MS/MS and its application to pharmacokinetic studies [J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2015(1005): 9-16.
[8] WANG F, ZHOU Y B. Research progress on pharmacology of ginsenoside Rb₃ [J]. Acta Chin Med Pharmacol(中医学报), 2012, 40(1): 93-95.
[9] 崔秀明, 徐璐珊, 王强. 人参皂苷 Rb₃ 的抗血小板和抗血栓作用[J]. 中成药, 2006, 28(10): 1526-1528.
[10] SHI M R, LI H, BAI G, et al. Quantification of five saponins in *Gynostemma Pentaphyllum*(Thunb.)Makino by HPLC [J]. Sci Technol Food Ind(食品工业科技), 2015, 36(2): 49-51, 56.
[11] JIANG H X, CHEN C W, XU M B, et al. Simultaneous determination of eight saponins in *Gynostemma pentaphyllum*(thunb.) makino by HPLC [J]. J Guangzhou Univ Tradit Chin Med(广州中医药大学学报), 2018, 35(2): 324-328.
[12] LIU H M, YANG J, CHEN D J, et al. Isolation and characterization of gypenosides from *Gynostemma pentaphyllum* [J]. J Food Saf Qual(食品安全质量检测学报), 2013, 4(1): 283-288.
[13] ZHANG L, LIN Y, GUAN H, et al. Simultaneous determination of gypenoside LVI, gypenoside XLVI, 2 α -OH-protopanaxadiol and their two metabolites in rat plasma by LC-MS/MS and its application to pharmacokinetic studies [J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2015(1005): 9-16.

收稿日期: 2018-12-04
(本文责编: 沈倩)