

细柱五加叶中五加苷元的积累动态研究

邹亲朋^{1,4}, 刘向前^{1,2*}, 郑礼胜³, 冯 胜¹, 戴 玲²

1. 中南大学化学化工学院, 湖南 长沙 410083

2. 湖南中医药大学药学院, 湖南 长沙 410208

3. 天津药物研究院, 天津 300193

4. 长沙博海生物科技有限公司, 湖南 长沙 410205

摘要: 目的 采用高效液相色谱方法测定不同采收期细柱五加叶中五加苷元的量, 研究其变化趋势。方法 采用RP-HPLC法测定不同采收期(3~12月份)细柱五加叶中的五加苷元, 色谱柱为AT.lichrom ODS-C₁₈柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 以乙腈-水-醋酸(60:40:0.1)为流动相, 柱温 25 ℃, 体积流量 1.0 mL/min, 检测波长 214 nm, 进样量 10 μL。结果 细柱五加叶中的五加苷元在秋季时量最高, 春季次之, 夏季最低。五加苷元量随季节变化明显, 10月份采摘其五加苷元量最高。结论 建立稳定性好、准确性高, 适用于细柱五加叶中五加苷元的定量分析方法, 并可用于分析不同采集期细柱五加叶中的五加苷元动态变化。

关键词: 细柱五加; 五加属; 五加苷元; 不同采收期; HPLC

中图分类号: R286.022 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2012)08-1550-03

Accumulation dynamic of acankoreagenin in leaves of *Acanthopanax gracilistylus*

ZOU Qin-peng^{1,4}, LIU Xiang-qian^{1,2}, ZHENG Li-sheng³, FENG Sheng¹, DAI Ling²

1. School of Chemistry and Chemical Engineering, Central South University, Changsha 410083, China

2. School of Pharmacy, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China

3. Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

4. Broad-Ocean Bio-Science & Technique Co., Ltd., Changsha 410205, China

Key words: *Acanthopanax gracilistylus* W. W. Smith; *Acanthopanax* Miq.; acankoreagenin; different harvesting time; HPLC

细柱五加 *Acanthopanax gracilistylus* W. W. Smith为五加科五加属植物, 其干燥根皮为《中国药典》2010年版收录的五加皮, 具有祛风除湿、补益肝肾、强筋壮骨、利水消肿之功效^[1]。传统中医药研究证实, 细柱五加的根及根皮为其主要的药用部分, 含有贝壳烯酸、紫丁香苷、刺五加苷B₁、β-谷甾醇、胡萝卜素、维生素A和B₁、挥发油等成分^[2]。近年研究, 发现细柱五加叶中含有五加苷、五加苷元等多种三萜类活性成分^[3-7]。五加苷元(acankoreagenin)是从细柱五加叶中分离得到的一个新型羽扇豆烷型三萜苷元^[4], 研究证实其在抗高迁移率族蛋白-1(HMGB1)的活性试验中表现出良好的抗炎活性^[8]。而近期研究表明, HMGB1是一种重要的晚期炎症介质, 在重型乙型肝炎、肝衰竭的发展过程中起关键作用, 目前HMGB1已经成为炎症和感染性疾病

防治研究中的一个重要靶标, 抗HMGB1药物筛选具有重要意义^[9-11]。为合理利用细柱五加资源, 进一步明确细柱五加叶中具有抗炎活性的五加苷元等三萜化合物的量及其随生长季节的变化情况, 确定最佳采摘时间, 为开发新的抗HMGB1药物提供理论基础, 本实验在前期研究的基础上, 建立五加苷元的反相高效液相色谱定量分析方法, 并对不同采集期的细柱五加叶中五加苷元的量进行分析, 研究其积累动态。

1 材料

1.1 仪器

LC—10AT型高效液相色谱仪(配备SPD—10A型紫外可见检测器和CBM—102型色谱工作站, 日本岛津公司); 2100型紫外分光光度计(北京莱伯泰科仪器有限公司); AUW—120D高精度电子天平

收稿日期: 2011-12-30

基金项目: 湖南省自然科学基金重点项目(11JJ2042); 湖南中医药大学“十二五”校级重点学科“药物分析学”建设项目资助; 中南大学研究生学位论文创新基金资助(2011ssxt080)

作者简介: 邹亲朋(1986—), 男, 硕士研究生, 研究方向为中药和天然产物的活性成分研究。Tel: 13875899293 E-mail: zouqinpeng@csu.edu.cn

*通讯作者 刘向前 Tel: (0731)88995848 E-mail: lxq0001cn@163.com

(日本岛津公司); AS3120A 超声波清洗器(天津奥特塞恩斯仪器有限公司); DZF—6020 型真空干燥箱(上海金鹏分析仪器有限公司); FZ102 粉碎机(天津市泰斯特仪器有限公司)。

1.2 试药

细柱五加叶分别于 2010 年 3~12 月份的每月 5、15、25 日采自湖南省长沙市不同地区随机标记的 50 株实验用野生植株, 每次均对标记的 50 株细柱五加全株随机采样, 自然阴干, 经韩国庆熙大学陆昌洙教授鉴定为细柱五加 *Acanthopanax gracilistylus* W. W. Smith 叶, 将相同月份不同时间采集的样品混合均匀, 得每月的测定样品; 五加苷元对照品为自制, 质量分数 $\geq 98\%$ 。色谱用甲醇、乙腈为湖南鸿跃化工有限公司生产的一级色谱纯试剂, 甲醇、氯仿、正己烷及醋酸、磷酸、冰醋酸均为成都科龙化工试剂厂生产的分析纯试剂; 水为双蒸水。

2 方法与结果

2.1 五加苷元的 RP-HPLC 测定

2.1.1 对照品溶液的制备 精密称取五加苷元对照品 50.5 mg, 用甲醇定容至 50 mL, 超声 10 min, 配制成质量浓度为 1.01 mg/mL 的对照品溶液。

2.1.2 供试品溶液的制备 精密称定细柱五加叶干粉约 2.0 g。加 50 mL 甲醇浸泡, 25 °C 闪式提取 2 次, 每次 3 min, 滤过。滤液浓缩至约 30 mL, 浓缩液用等量石油醚萃取, 直至石油醚部分无色, 甲醇部分转移至 50 mL 量瓶中, 超声 10 min, 加甲醇定容, 0.45 μ L 微膜滤过, 取续滤液, 得供试品溶液。

2.1.3 色谱条件 色谱柱为 AT.lichrom ODS-C₁₈ 柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m); 流动相为乙腈-水-醋酸 (60:40:0.1); 柱温 25 °C; 体积流量 1.0 mL/min; 检测波长 214 nm; 进样量 10 μ L。

2.1.4 线性关系考察 分别取对照品溶液 1.00、2.00、4.00、8.00、10.00 μ L, 进样测定, 记录色谱图。以五加苷元对照品进样量为横坐标 (X), 色谱峰峰面积为纵坐标 (Y) 绘制标准曲线, 得其回归方程为 $Y=35\,771X-328.8$ ($r=0.999\,8$, $n=6$), 表明五加苷元在 1.01~10.10 μ g 内线性良好。

2.1.5 精密度试验 精密吸取对照品溶液, 按照“2.1.3”项色谱条件测定, 连续进样 6 次, 每次 10 μ L, 得五加苷元的峰面积的 RSD 为 0.78%。

2.1.6 重复性试验 取 6 月份采集的细柱五加叶干粉 5 份, 每份 2.0 g, 精密称定, 按照“2.1.2”项下

方法平行制备供试品溶液, 进样 10 μ L, 测定五加苷元峰面积, 计算五加苷元质量分数的 RSD 为 0.65%。

2.1.7 稳定性试验 取 6 月份采集的细柱五加叶, 制备供试品溶液, 在 25 °C 下放置, 在“2.1.3”项色谱条件下分别于 0、2、4、6、8、10 h 进样, 每次 10 μ L, 测定五加苷元的峰面积的 RSD 为 0.26%。

2.1.8 加样回收率试验 取 6 月份采集的细柱五加叶粉 6 份, 每份 1.0 g, 精密称定。分别加入对照品溶液 3.0、3.0、7.0、7.0、10.0、10.0 mL, 按“2.1.2”项制备供试品溶液, 进样 10 μ L, 记录色谱峰参数, 五加苷元低、中、高 3 种加入量的回收率 ($n=3$) 分别为 98.51% (RSD=0.64%)、97.62% (RSD=1.10%)、97.41% (RSD=0.76%), 平均回收率为 97.85%, RSD 为 0.83%。

2.2 不同采收期细柱五加叶五加苷元的测定

按照“2.1.1”项及“2.1.2”项方法制备对照品及 3 份供试品, 分别取对照品溶液与不同采收期细柱五加叶供试品溶液 10 μ L, 在“2.1.3”项下进行定量分析, 分别进样 3 次, 测定峰面积, 色谱图见图 1。根据标准曲线计算五加苷元的量, 具体结果见表 1。不同月份细柱五加叶的测定结果显示, 春秋季节细柱五加叶中的五加苷元量较高, 秋季

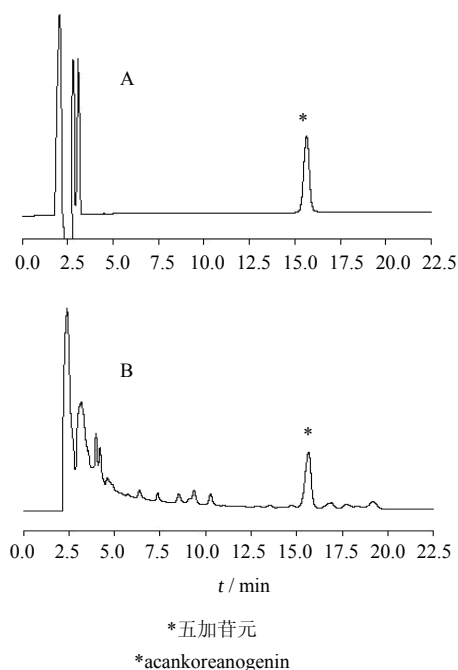


图 1 五加苷元对照品 (A) 和细柱五加叶样品 (B) 的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of acankoreanogenin reference substance (A) and sample (B)

表 1 不同采集期细柱五加叶中五加苷元测定结果 ($n=3$)
Table 1 Determination of acankoreanogenin in leaves of *A. gracilistylus* collected at different harvesting time ($n=3$)

采收期	五加苷元 / ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)	采收期	五加苷元 / ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)
3 月	7.456 7	8 月	6.415 5
4 月	10.610 8	9 月	9.378 2
5 月	13.420 4	10 月	16.046 3
6 月	7.655 7	11 月	13.083 6
7 月	8.383 0	12 月	12.019 4

采摘细柱五加叶可以获得更多的五加苷元, 以 10 月份为最高可达 1.6%, 而夏季则偏低。

3 讨论

本研究建立的五加苷元定量分析方法, 经方法学验证, 仪器精密性、试验稳定性、方法重现性及加样回收率均达到 HPLC 分析要求, 结果证明该方法简便快捷, 准确性高, 适用于细柱五加叶中五加苷元的定量分析, 为扩大利用细柱五加资源提供可参考的质量控制指标和方法。

对不同采收期细柱五加叶中五加苷元测定结果表明, 春秋季采收细柱五加叶可获得较高量的五加苷元。影响细柱五加叶中二次代谢产物五加苷元的因素可从光照、温度、水分等方面进行分析, 光照强度过强和温度过高, 均会对细柱五加叶中三萜类物质积累量产生消极影响, 而其生物合成和积累需要充足的雨水作为保障, 干旱胁迫会对其产生消极影响。进一步说明植物次生代谢产物量变化是一种生物学适应性结果。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [2] 倪娜, 刘向前. 五加科五加属植物的研究进展 [J]. 中草药, 2006, 37(12): 1895-1900.
- [3] 倪娜. 细柱五加叶及其同属植物活性成分研究 [D]. 长沙: 中南大学, 2008.
- [4] 刘向前, Chang S Y, Yook C S. 细柱五加叶中羽扇豆烷型三萜成分 [J]. 兰州大学学报: 自然科学版, 2006, 42(4): 86-91.
- [5] Liu X Q, Chang S Y, Park S Y, et al. A new lupane triterpene glycosides from the leaves of *Acanthopanax gracilistylus* [J]. *Arch Pharm Res*, 2002, 25(6): 831-836.
- [6] Yook C S, Liu X Q, Chang S Y, et al. Lupane triterpene glycosides from the leaves of *Acanthopanax gracilistylus* [J]. *Chem Pharm Bull*, 2002, 50(10): 1383-1385.
- [7] 刘向前, 邹亲朋, 冯胜, 等. 五加苷对大鼠脑梗死的保护作用 [J]. 药物评价研究, 2010, 33(2): 95-97.
- [8] Zhang B X, Li N, Zhang Z P, et al. Protective effect of *Acanthopanax gracilistylus*-extracted acankoreanogenin A on mice with fulminant hepatitis [J]. *Int Immunopharmacol*, 2011, 11(8): 1018-1023.
- [9] 虞莹, 姜红, 葛均波. 高迁移率族蛋白 1 在炎症和心血管疾病中的作用 [J]. 中国分子心脏病学杂志, 2010, 10(4): 245-248.
- [10] Gauley J, Pisetsky D S. The translocation of HMGB1 during cell activation and cell death [J]. *Autoimmunity*, 2009, 42(4): 299-301.
- [11] Yang H, Tracey K J. Targeting HMGB1 in inflammation [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2010, 1799(1/2): 149-156.