

娑罗子中三萜皂苷成分的 HPLC 定量分析

郭 杰^{1,2}, 徐 菟¹, 杨秀伟^{1*}

(1. 北京大学药学院, 北京 100083; 2. 北大世佳研究中心, 北京 100084)

摘要:目的 建立娑罗子中三萜皂苷成分的高效液相色谱测定方法, 同时分析中华七叶树、天师栗和浙江七叶树等的种子及商品娑罗子药材中 5 种三萜皂苷成分(七叶树皂苷 Ia、Ib 和异七叶树皂苷 Ia、Ib 及七叶树皂苷 A)的量。方法 采用反相 Diamonsil™ C₁₈ 硅胶色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 以乙腈-水-磷酸(123:277:7)为流动相, 检测波长为 220 nm。结果 建立了同时测定娑罗子中 5 种皂苷七叶树皂苷 Ia、Ib 和异七叶树皂苷 Ia、Ib 及七叶树皂苷 A 的 HPLC 分析方法, 线性范围内 5 个皂苷化合物的标准曲线呈良好的线性关系。结论 该法简单、灵敏, 可同时定量分析娑罗子中七叶树皂苷 Ia、Ib 和异七叶树皂苷 Ia、Ib 及七叶树皂苷 A。

关键词:娑罗子; 七叶树; 三萜皂苷; 七叶树皂苷; 七叶树皂苷 A

中图分类号:R282.6 **文献标识码:**A **文章编号:**0253-2670(2007)05-0767-04

Quantified analysis of triterpenoid saponins in *Semen Aesculi* by HPLCGUO Jie^{1,2}, XU Wei¹, YANG Xiu-wei¹

(1. School of Pharmaceutical Sciences, Peking University, Beijing 100083, China; 2. Bescholor Research Center of Peking University, Beijing 100084, China)

Key words: *Semen Aesculi*; *Aesculus chinensis* Bunge; triterpenoid saponin; escins; aesculuside A

娑罗子是《中国药典》记载的传统中药之一, 为中华七叶树 *Aesculus chinensis* Bunge、天师栗 *A. wilsonii* Rehd. 和浙江七叶树 *A. chinensis* Bunge var. *chekingensis* (Hu et Fang) Fang 等的干燥成熟种子^[1], 此 3 种药用植物为我国特产。娑罗子性味甘、温, 归肝、胃经, 具有理气宽中、和胃止痛之功效, 主治胸腹胀闷、胃脘疼痛; 其主要成分为一系列结构相似的皂苷, 即七叶树皂苷, 在抗炎、抗渗出、消肿胀等方面作用显著, 能恢复毛细血管的正常通透性, 增加静脉张力, 改善微循环, 对脑外伤和外周血管疾病有很高的治疗价值^[2]。最新的研究结果表明七叶树总皂苷具有抗肿瘤作用^[3], 且七叶树总皂苷中的主要成分七叶树皂苷 Ia 经人肠内细菌转化产生的去酰基七叶树皂苷(desacylescins) I 比原形化合物的抗肿瘤活性更强^[4]。笔者曾先后报道了中华七叶树^[5-7]、天师栗^[8]、日本七叶树^[9,10]和浙江七叶树^[11]等植物种子中的化学成分研究, 在此基础上, 本实验报道应用 HPLC 方法同时定量分析中华七叶树、天师栗和浙江七叶树的干燥成熟种子及商品娑罗子中 5 种三萜皂苷成分的量, 为其质量评价提供方法。

1 仪器与试剂

1.1 仪器: 美国 TSP 公司高效液相色谱系统, P2000 型二元梯度泵, UV3000 型紫外检测器, PC1000 型工作站。

1.2 试剂: 水为重蒸馏水; 乙腈为色谱纯, 85% 磷酸为优级纯, 皆购自北京化工厂; 其余试剂皆为分析纯。D-101 大孔吸附树脂购于天津市海光化工有限公司。

中华七叶树种子于 1997 年 9 月采自陕西省略阳县, 天师栗种子于 1998 年 8 月采自湖北省神农架森林王林场, 浙江七叶树种子于 2001 年 9 月采自浙江省杭州市灵隐寺北高峰。市售商品分别购自: 陕西宁陕(样品编号: 9711112)、陕西汉中(9711113)、西安所罗巷(971208)、河北安国(980106)、安徽亳州(9712241)和四川莲花池(9712242)等药材集散地。以上标本存放在北京大学天然药物及仿生药物国家重点实验室, 药材由北京大学药学院杨秀伟教授鉴定。七叶树皂苷(escin) Ia、Ib 和异七叶树皂苷(isoescin) Ia、Ib 及七叶树皂苷 A(aesculuside A) 从浙江七叶树种子中分离、纯化得到^[11]。

2 方法与结果

2.1 色谱条件: Diamonsil™ C₁₈ 分析柱(250 mm×

收稿日期: 2006-08-09

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(29972004)

作者简介: 郭 杰(1978—), 男, 齐齐哈尔市人, 北京大学药学院 2001 级硕士研究生, 现就职于北大世佳研究中心。

* 通讯作者 杨秀伟 Tel: (010)82805106, 62070317 Fax: (010)82802724 E-mail: xwyang@bjmu.edu.cn

4.6 mm, 5 μm), 流动相: 乙腈-水-磷酸 (123 : 277 : 7), 体积流量: 1.0 mL/min, 柱温: 室温, 检测波长: 220 nm。在此条件下, 样品中七叶树皂苷 Ia、Ib 和异七叶树皂苷 Ia、Ib 及七叶树皂苷 A 与相邻成分达到良好基线分离。娑罗子中 5 种皂苷对照品的 HPLC 色谱图见图 1, 陕西汉中市场售品娑罗子总皂苷的 HPLC 色谱图见图 2。

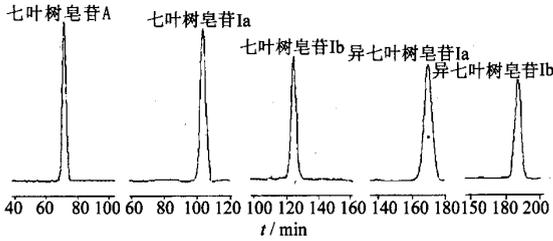


图 1 娑罗子中 5 种皂苷对照品的 HPLC 色谱图
Fig. 1 HPLC Chromatograms of five reference saponins from *Semen Aesculi*

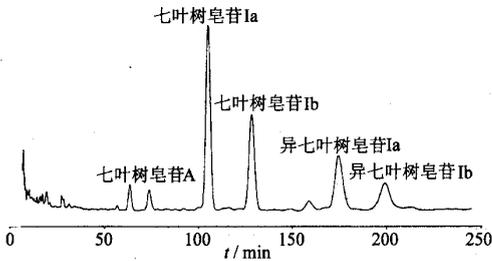


图 2 陕西汉中市场售品娑罗子总皂苷的 HPLC 色谱图
Fig. 2 HPLC Chromatograms of total saponins in commodity *Semen Aesculi* at Hanzhong crude drug market of Shaanxi Province

2.2 对照品溶液的制备: 分别精密称取七叶树皂苷 Ia、Ib 和异七叶树皂苷 Ia、Ib 及七叶树皂苷 A 适量, 用甲醇配制成每种对照品质量浓度为 2.5 mg/mL 的储备液, 放置在 4 °C 冰箱中, 备用。

2.3 供试品溶液的制备: 精密称取娑罗子粉末 (过 80 目筛) 约 2 g, 加水饱和的正丁醇 200 mL, 浸泡过夜后超声振荡 20 min。然后用滤纸滤过, 再用 50 mL 水饱和的正丁醇洗药渣一次, 弃去药渣, 合并正丁醇液并减压回收, 得提取物。将提取物用少量甲醇充分溶解, 再用甲醇定容至 10 mL, 2 500 r/min 离心 15 min, 取上清 5 mL, 放置于干净的试管中。挥干甲醇后用少量水溶解, 加载于直径 1.5 cm、高 5 cm 的 D-101 大孔吸附树脂柱 (柱顶端铺加中性氧化铝 0.2 g) 中, 依次用水 40 mL 和 95% 乙醇 40 mL 洗脱。收集 95% 乙醇洗脱液并回收溶剂, 得娑罗子总皂苷。将总皂苷用甲醇定容至 10 mL, 供 HPLC 定量分析。

2.4 线性关系考察: 分别精密吸取各对照品储备液适量, 配制成含七叶树皂苷 Ia、Ib 和异七叶树皂苷 Ia、Ib 及七叶树皂苷 A 为 0.02、0.4、1.2、1.8、2.4 mg/mL 的质量浓度梯度, 各进样 10 μL, 依次注入高效液相色谱仪, 按上述色谱条件测定峰面积。以峰面积 (Y) 为纵坐标, 质量浓度 (X) 为横坐标, 绘制标准曲线。回归方程、相关系数和线性范围见表 1。

表 1 5 种三萜皂苷成分的标准曲线
Table 1 Calibration curve of five kinds of triterpenoid saponins

化合物	回归方程	r	线性范围 / (mg · mL ⁻¹)
七叶树皂苷 Ia	Y=476 201 X-134 505	0.999 5	0.034~2.481
七叶树皂苷 Ib	Y=345 625 X+173 380	0.999 6	0.116~2.877
异七叶树皂苷 Ia	Y=447 139 X+175 852	0.999 6	0.024~2.400
异七叶树皂苷 Ib	Y=272 200 X+126 482	0.999 8	0.070~2.500
七叶树皂苷 A	Y=386 926 X+123 947	0.999 6	0.018~2.400

2.5 精密度试验: 分别精密吸取 0.72 mg/mL 的七叶树皂苷 Ia、0.48 mg/mL 的七叶树皂苷 Ib、0.46 mg/mL 的异七叶树皂苷 Ia、0.44 mg/mL 的异七叶树皂苷 Ib 及 0.087 mg/mL 的七叶树皂苷 A 对照品溶液 10 μL, 重复进样 6 次, 测得其峰面积, 计算得相应的 RSD 分别为 1.04%、1.18%、1.32%、1.68% 和 1.34%。

2.6 稳定性试验: 精密吸取同一供试品溶液 10 μL, 分别于 0、4、8、12、16、20 h 进样, 测得其峰面积, 分别计算七叶树皂苷 Ia 和 Ib、异七叶树皂苷 Ia 和 Ib 及七叶树皂苷 A 的质量分数, 结果其 RSD 分别为 1.97%、1.90%、2.16%、1.93% 和 1.82%。表明供试品溶液在 20 h 内稳定。

2.7 重现性试验: 按照前述供试品溶液的制备方法, 精密称取同一批号样品, 分别制备 5 份供试品溶液, 每次进样 10 μL, 按上述色谱条件测定七叶树皂苷 Ia、Ib 和异七叶树皂苷 Ia、Ib 及七叶树皂苷 A 的质量分数, 结果平均质量分数分别为 5.61%、4.07%、2.30%、2.52%、0.25 mg/g 生药, RSD 分别为 2.0%、1.3%、3.7%、2.1% 和 1.3%。

2.8 样品测定: 按“2.3 供试品溶液的制备”项所述方法分别制得中华七叶树、天师粟、浙江七叶树等的干燥成熟种子和 6 种商品娑罗子的总皂苷, 按 2.1 项进行总皂苷中七叶树皂苷 Ia、Ib 和异七叶树皂苷 Ia、Ib 及七叶树皂苷 A 的 HPLC 分析, 各进样 10 μL, 测得峰面积, 由标准曲线计算 5 种皂苷的量, 结果见表 2。

表 2 不同来源的娑罗子中 5 种三萜皂苷成分的定量分析 (n=3)

Table 2 Quantified analysis of five kinds of triterpenoid saponins in *Semen Aesculi* from various sources (n=3)

样品	质量分数/(mg·g ⁻¹ 生药)					合计
	七叶树皂苷 Ia	七叶树皂苷 Ib	异七叶树皂苷 Ia	异七叶树皂苷 Ib	七叶树皂苷 A	
确定种子样品						
中华七叶树	8.99	6.07	2.94	3.23	trace	21.23
天师栗	3.27	2.43	1.81	2.22	0.05	9.77
浙江七叶树	3.12	5.56	0.69	2.06	trace	11.43
市场样品						
陕西宁陕	6.08	4.15	1.97	2.14	0.08	14.41
陕西汉中	5.23	4.50	2.22	3.05	0.51	15.51
西安索罗巷	1.62	1.48	2.28	2.95	0.29	8.62
河北安国	9.42	7.85	2.45	3.85	0.52	24.09
安徽亳州	2.49	2.43	2.11	3.28	0.54	10.83
四川莲花池	5.10	4.21	2.41	2.93	0.46	15.10

3 讨论

3.1 流动相系统的选择: 本项研究对 HPLC 流动相进行了探讨, 选择了甲醇-水-甲酸、甲醇-水-冰醋酸、乙腈-水-甲酸和乙腈-水-磷酸等流动相系统, 结果以乙腈-水-磷酸(123 : 277 : 7)为流动相系统时 5 种皂苷达到了良好分离。本项研究亦探讨了流动相中磷酸的比例, 以该比例为最佳, 低于该比例达不到良好分离。见图 2。

3.2 提取方法的考察: 取娑罗子试验样品, 分别以水饱和的正丁醇、95%乙醇和 70%乙醇为溶剂, 经索氏回流或超声处理, 进行了最佳提取方法的探讨。用索氏回流提取时, 精密称取样品粉末(过 80 目筛) 2 g(平行样 3 份), 以相应溶剂浸泡过夜后经索氏回流 3 h, 然后用滤纸滤过除去药渣, 回收溶剂得到提取物。超声处理提取时, 称取同样和同样量的样品粉末, 以相应溶剂浸泡过夜后经超声处理 20 min, 然后用滤纸过滤除去药渣, 回收溶剂得到 18 份提取物。总皂苷的精制参考文献方法^[12](如上“2.3 样品的处理”), 得到娑罗子总皂苷。将总皂苷用甲醇定容至 10 mL, 各进样 10 μL, 依次注入高效液相色谱仪, 按上述色谱条件测定峰面积, 由标准曲线计算七叶树皂苷 Ia、Ib 和异七叶树皂苷 Ia、Ib 的量。结果表明 3 种提取方法按总皂苷的收率评价, 以超声处理提取收率较高。如果按七叶树皂苷 Ia、Ib 和异七叶树皂苷 Ia、Ib 的合计量评价, 亦以水饱和的正丁醇为溶剂、超声处理提取为佳。

3.3 由以上测定结果(表 2)可知, 在确定种的 3 种七叶树属植物中, 中华七叶树种子中的七叶树皂苷 Ia

和 Ib、异七叶树皂苷 Ia 和 Ib 的量皆为最高, 且 5 种皂苷合计量亦最高; 对于七叶树皂苷 A 来说, 在天师栗的种子中量显著, 而在中华七叶树和浙江七叶树种子中却几乎检测不到。对于市场品娑罗子而言: 在河北安国市场品中, 七叶树皂苷 Ia、Ib 和异七叶树皂苷 Ia、Ib 的量皆最高, 且 5 种皂苷合计量亦最高, 其生药基源可能为中华七叶树种子; 在西安索罗巷市场品娑罗子中, 七叶树皂苷 Ia、Ib 的量明显低于另外 5 种市场品, 且 5 种皂苷合计量亦最低; 在 6 种市场品娑罗子中, 皆有效地检测到了七叶树皂苷 A。对于中华七叶树种子而言, 4 种主成分, 即七叶树皂苷 Ia、Ib 和异七叶树皂苷 Ia、Ib 的量比值近似为 3 : 2 : 1 : 1, 而购自陕西宁陕的市场品中, 相应的比例也近似为 3 : 2 : 1 : 1。另外, 购自陕西汉中和四川莲花池的市场品中, 相应的比例接近 3 : 2 : 1 : 1。因此, 初步判断陕西宁陕、陕西汉中和四川莲花池的市场品娑罗子为中华七叶树的种子。从 5 种主要皂苷的相对量比例上来看, 河北安国市场品娑罗子亦可能为中华七叶树的种子。从化学结构上来看, 当七叶树皂苷 Ib 和异七叶树皂苷 Ib 分子结构中的乙酰基水解掉之后即成为七叶树皂苷 A。由于市场品娑罗子中七叶树皂苷 A 的量有不同程度的提高, 推测娑罗子在储藏过程中可能会发生这种转化, 有待深入研究。从中华七叶树、天师栗、浙江七叶树的分布量及其娑罗子的产量并结合本文的研究结果, 推测市场上主流生药娑罗子来源于中华七叶树。

References :

[1] Ch P (中国药典) [S]. Vol. 1. 2005.
 [2] Yang X W, Hao M R, Hattori M. *Metabolite Analysis for Chemical Constituents of Traditional Chinese Medicines* (中药成分代谢分析) [M]. Beijing: China Medico-Pharmaceutical Science and Technology Publishing House, 2003.
 [3] Guo W, Xu B, Yang X W, et al. Preliminary studies of effect sodium aescinate against cancer *in vitro* and *in vivo* [J]. *Chin Pharm Bull* (中国药理学通报), 2003, 19(3): 351-352.
 [4] Yang X W, Zhao J, Cui J R, et al. Studies on the biotransformation of escin Ia by human intestinal bacteria and the anti-tumor activities of desacylescin [J]. *J Peking Univ; Health Sci* (北京大学学报: 医学版), 2004, 36(1): 31-35.
 [5] Yang X W, Zhao J, Cui Y X, et al. Anti-HIV-1 protease triterpenoid saponins from the seeds of *Aesculus chinensis* [J]. *J Nat Prod*, 1999, 62(11): 1510-1513.
 [6] Zhao J, Yang X W, Hattori M. Three new triterpene saponins from the seeds of *Aesculus chinensis* [J]. *Chem Pharm Bull*, 2001, 49(5): 626-628.
 [7] Zhao J, Yang X W. Four new triterpene saponins from the seeds of *Aesculus chinensis* [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2003, 5(3): 197-203.
 [8] Yang X W, Zhao J, Ouyang S H. Studies on triterpenoid saponins from seeds of *Aesculus wilsonii* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2002, 33(5): 389-391.
 [9] Zhao J, Yang X W. Studies on the chemical constituents of Japanese buckeye seed (*Aesculus turbinata*), Part I. Isolation and identification of escins Ia and Ib [J]. *Chin*

- Tradit Herb Drugs* (中草药), 1999, 30(5): 327-332.
- [10] Yang X W, Zhao J, Hattori M. Studies on the chemical constituents of Japanese buckeye seed (*Aesculus turbinata*), Part 1. Isolation and identification of escin IVc and isoescins Ia, Ib [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2000, 31(9): 648-651.
- [11] Guo J, Yang X W. Studies on the triterpenoid saponins of the seeds of *Aesculus chinensis* Bunge var. *chekiangensis* (Hu et Fang) Fang [J]. *J Chin Pharm Sci*, 2004, 13(2): 87-91.
- [12] Institute of Materia Medica of Chinese Academy of Medical Science. *Modern Study of Chinese Traditional and Herbal Drugs* (I) (中草药现代研究) [M]. Beijing: Beijing Medical University and Peking Union Medical College Press, 1996.

东北红豆杉内生真菌的分离及产紫杉醇菌的鉴定

金涛¹, 王伟², 刘军¹, 平文祥¹, 周东坡^{1*}

(1. 黑龙江大学生命科学学院 微生物黑龙江省高校重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150080;

2. 东北农业大学食品学院, 黑龙江 哈尔滨 150030)

东北红豆杉 *Taxus cuspidata* Sieb. et Zucc. 又名紫杉、赤皮松、紫柏松,《本草推陈》记载有利尿、通经作用,现代研究表明含有二萜类化合物,如紫杉宁 (taxinine)、紫杉宁 A、紫杉宁 H、紫杉宁 K、紫杉宁 L 等^[1],另外还含有包括紫杉醇在内的紫杉烷类化合物。紫杉醇 (paclitaxel, 商品名 Taxol) 是提取自红豆杉植物的能够治疗多种癌症的有效药物^[2]。目前已在临床上作为乳腺癌、卵巢癌和非小细胞肺癌的一线用药,其作用机制是抑制微管蛋白的解聚,破坏细胞微管的功能,从而影响纺锤体的形成,抑制肿瘤细胞的有丝分裂^[3]。由于红豆杉天然资源十分有限,通过各种生物工程方法生产紫杉醇已经成为国内外研究和规模开发紫杉醇的热点。通过微生物发酵法生产紫杉醇不仅有利于保护珍稀濒危的红豆杉树种,而且可以完全解决紫杉醇的药源问题,所以说微生物发酵法生产紫杉醇具有十分巨大的经济效益和广阔的开发空间。本实验主要对东北红豆杉内生真菌的分离方法及产紫杉醇菌的鉴定进行了研究。

1 材料和方法

1.1 标本:东北红豆杉树皮采样自黑龙江省穆稜林业局。采集时注意树皮带有木质部并迅速放入无菌材料袋,保存于实验室 4℃ 冰箱。

1.2 培养基:固体培养基包括 PDA 培养基^[4]、查氏培养基^[4]、马丁氏琼脂培养基^[4]。液体发酵培养基是由添加维生素、金属离子的改良培养基组成^[5]。

1.3 仪器与试剂:日本岛津 LC-10ATvp 高效液相色谱仪,岛津 SPD-10ATvp 检测器,20 μL 进样定量环,日本岛津 SIL-10AD 自动进样器。Waters 2695

液相色谱仪,ZQ2000 质谱检测器(配有电喷雾电离源)。具有显微摄影功能的 Olympus BX51 显微镜。

乙腈为液相色谱纯;高效液相色谱仪用水为双蒸水;其他药品为分析纯;紫杉醇对照品购于 Sigma 公司,质量分数大于 99.8%,配制成质量浓度为 1.079 mg/mL 的对照品保存,使用时适当稀释。

1.4 方法

1.4.1 内生菌分离方法:所采集红豆杉的树皮切成约 0.5 cm×0.5 cm 的小块,经 75% 酒精表面消毒 2 min,然后用无菌水冲洗 3 遍左右,按 3 点接种法接种于 PDA 培养基平皿上,于恒温箱中 28℃ 倒置培养。3 d 后,经无菌操作挑取新长出的菌丝,划线转接于 PDA 培养基平皿上,经数次划线分离,得到形态完全一致的单菌落即纯化的内生真菌。

1.4.2 液体发酵培养:菌株在 28℃,120 r/min 的摇床上进行培养。500 mL 三角瓶中培养基装置为 200 mL,接种量为 3%,培养周期为 14 d。

1.4.3 发酵液中紫杉醇的薄层色谱初步鉴定:将东北红豆杉内生真菌发酵液滤过,得到的菌丝体研磨破壁,按质量与体积 1:5 的比例用醋酸乙酯萃取,滤去菌丝的澄清滤液用同等体积的醋酸乙酯萃取 3 次,将醋酸乙酯萃取液合并,50℃ 减压蒸干,用 5 mL 甲醇溶解再浓缩至 0.5 mL 得样品液。

取硅胶适量加合适比例水研磨至均匀,倾倒在薄层色谱板(20 cm×20 cm)上,阴干 24 h 后,于干燥箱中 105℃ 活化 30 min 备用。取 50 μL 样品和 5 μL 紫杉醇对照品点样于薄层色谱板上,每个样品间距 2 cm,放入展层剂已饱和的色谱缸中,展层剂为

收稿日期:2006-08-17

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30570025);黑龙江省“十五”重大攻关课题(GA02C101);黑龙江省教育厅资助项目(10533013)

作者简介:金涛,男,博士,主要研究方向为生物制药和微生物学。Tel:13766969566 E-mail:jintaoliu8@yahoo.com.cn

* 通讯作者 周东坡 Tel:13936163985 E-mail:zhoudp@yahoo.com.cn