



娑罗子中主要活性物质的检测方法

柴莎莎, 徐 圣

(武汉职业技术学院 生物工程学院, 湖北 武汉 430074)

摘 要:建立娑罗子中主要活性物质的快速检测方法。娑罗子中的主要活性成分为皂苷类中的七叶皂苷,七叶皂苷的主要存在形式为七叶皂苷 A、B、C、D。将样品用乙醚回流提取后,离心取上清定容后过滤备用。采用高效液相色谱分析法测定七叶皂苷 A、B、C、D 含量,色谱条件:柱温 30℃,流速 1 mL/min,流动相为 0.1% 磷酸水溶液和乙腈(V/V=36:64),等梯度洗脱,检测波长 220 nm。七叶皂苷 A、B、C、D 在检测范围内有良好的线性,相关系数均在 0.9995 以上,检测限在 0.05~0.2 μg/mL 之间,定量限在 0.2~0.8 μg/mL 之间,加标回收率在 86.27%~97.21% 之间。此方法适用于天然产物娑罗子中七叶皂苷的含量测定。

关键词:娑罗子;高效液相;快速检测

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

文章编号: 1671-931X (2022) 05-0110-05

DOI: 10.19899/j.cnki.42-1669/Z.2022.05.018

娑罗子为七叶树科植物七叶树、浙江七叶树或天师栗的干燥成熟种子,具有和胃止痛,理气、疏肝的功效^[1~2];临床常用于治疗肝胃气滞,胃脘疼痛,胸腹胀满等病症^[3~4]。娑罗子收载在《中华人民共和国药典》中,最早出现在《本草纲目》之中,李时珍曾云:“天师栗惟西蜀青城山中有之,他处无有也,张天师学道于此所遗而故名。似栗味美,惟独房若橡为异耳”^[5]。我国有丰富的娑罗子资源,云南、贵州、浙江、广西等多地均有分布^[6]。

娑罗子中含有多种成分,其中最主要活性成分为皂苷类中的七叶皂苷^[7~8],七叶皂苷有明显的抗炎消肿、抗氧化、降低神经损伤、抗肿瘤等药理作用,

并且多以钠盐的形式应用于临床,可以用来治疗术后水肿、慢性静脉功能不全、脑溢血、颅脑损伤等疾病^[9]。七叶皂苷的主要存在形式为七叶皂苷 A、B、C、D。七叶皂苷 A、B 合称为 β-七叶皂苷,七叶皂苷 C、D 合称为 α-七叶皂苷^[10]。α-七叶皂苷和 β-七叶皂苷互为同分异构体。当温度超过 100℃后,β-七叶皂苷会转化为 α-七叶皂苷^[11~12]。

娑罗子中化学成分复杂,为了更好控制其质量,需要对其主要活性成分进行分析,本文建立了一种快速检测娑罗子中主要活性成分的方法,以期对娑罗子药材质量控制提供思路参考和依据。

收稿日期:2021-12-02

基金项目:湖北教育厅百校联百县——高校服务乡村振兴科技支撑行动计划项目“娑罗子中皂苷类物质制备及成分分析”(项目编号: BXLBX1188)。

作者简介:柴莎莎(1988—),女,湖北广水人,武汉职业技术学院生物工程学院工程师,研究方向:分析检测;徐圣(1983—),男,湖北咸宁人,武汉职业技术学院生物工程学院讲师,研究方向:生物健康。

一、材料与方法

(一) 材料与试剂

七叶皂苷 A 对照品(纯度 33.5%)、七叶皂苷 B 对照品(纯度 31.4%)、七叶皂苷 C 对照品(纯度 17.8%)、七叶皂苷 D 对照品(纯度 14.2%), 成都曼思特生物科技有限公司; 乙腈(色谱纯), Merck 公司; 甲醇(色谱纯), Merck 公司; 磷酸(色谱纯), Merck 公司; 水为娃哈哈纯净水, 超市购买。

试验采用的娑罗子原料共 5 批, 来自不同地区, 见表 1。经武汉生物制品检定所鉴定均为娑罗子。

表 1 娑罗子原料信息

序号	原料批号	来源
1	2009261	浙江
2	2010211	浙江
3	2010251	浙江
4	2010261	广西
5	2011242	广西

(二) 主要仪器与设备

1260 高效液相色谱仪: 美国安捷伦公司, 紫外检测器; JP-020S 超声波清洗机: 洁盟科技有限公司; ME104E 万分之一电子天平: 美国梅特勒公司; ES225SM-DR 十万分之一天平: 瑞士普利赛斯; DJ-04B 小型破碎机: 上海鼎广机械设备有限公司; LC-LX-L40B 低速离心机: 上海力辰邦西仪器科技有限公司; LC-RE-2000A 旋转蒸发仪: 上海力辰邦西仪器科技有限公司。

(三) 方法

1. 溶液配制

(1) 标准溶液

分别精密称取七叶皂苷 A 对照品、七叶皂苷 B 对照品、七叶皂苷 C 对照品、七叶皂苷 D 各 15mg 置于 10mL 棕色容量瓶中, 甲醇溶液定容至刻度, 即得各标准溶液储备液。分别取各标准溶液储备液适量于容量瓶中, 用甲醇溶液定容至刻度, 即得标准混合溶液。

(2) 样品溶液

娑罗子样品粉碎后, 过 3 号筛, 精密称取 1g, 置于索氏提取器中, 45℃ 加热回流 1 小时后, 取出, 蒸发除去乙醚后, 将样品转置于 150ml 具塞锥形瓶

中, 加入甲醇 50ml 后称重, 超声 30min, 取出补足重量, 将样品放入低速离心机中离心, 取上清液 25ml, 40℃ 浓缩后转移到 10ml 棕色容量瓶中, 以甲醇定容至刻度, 充分混合, 过 0.45 μm 滤膜, 取滤液为待测溶液。

2. 色谱条件

以 0.1% 磷酸水溶液为流动相 A, 乙腈为流动相 B, A:B(体积比)=36:64, 进样量: 10 μL, 柱温: 30℃, 流速: 1.0 mL/min, 检测波长为 220nm, 运行时间 45min。

(一) 流动相条件的优化

1. 流动相的选择

实验分别比较甲醇-水、乙腈-水、甲醇-磷酸水和乙腈-磷酸水系统溶液对 4 种目标物的分离效果, 结果表明, 在相同色谱条件下, 不加磷酸, 各组峰形较差, 有明显的拖尾现象; 采用甲醇-0.1% 磷酸水溶液体系时, 各组分的峰出现较密集, 而使用乙腈-0.1% 甲磷酸水溶液体系洗脱时, 4 种七叶皂苷成分均可获得良好的分离度和峰形。因此采用乙腈-0.1% 磷酸水溶液作为流动相对 4 种七叶皂苷成分进行色谱分离。

比较 0.1% 磷酸水-乙腈不同比例 30:70、32:68、34:66、36:64、38:62、40:60 对 4 种目标物的分离效果, 结果表明, 当 0.1% 磷酸水:乙腈=36:64 时, 分离度最好, 因此采用此比例作为流动相的比例。

2. 波长的确定

通过紫外吸收光谱对 4 种七叶皂苷成分进行全波长扫描, 发现七叶皂苷成分在 220nm 处有最大吸收, 故确定本实验的测定波长为 220nm。

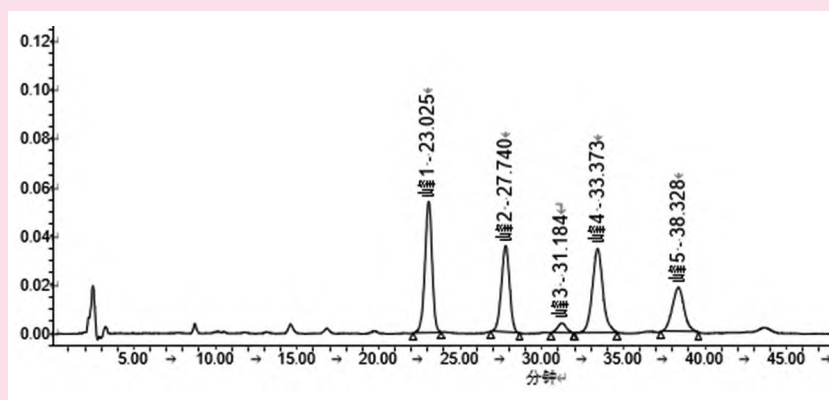
3. 柱温的选择

比较了 20℃、30℃、40℃ 柱温条件下, 对 4 种七叶皂苷成分的分离效果, 结果表明在相同色谱条件下, 30℃ 时分离效果最好, 确定本实验的柱温为 30℃。对照品及样品的各成分 HPLC 色谱图见图 1、图 2。

(二) 线性方程、线性范围和检出限

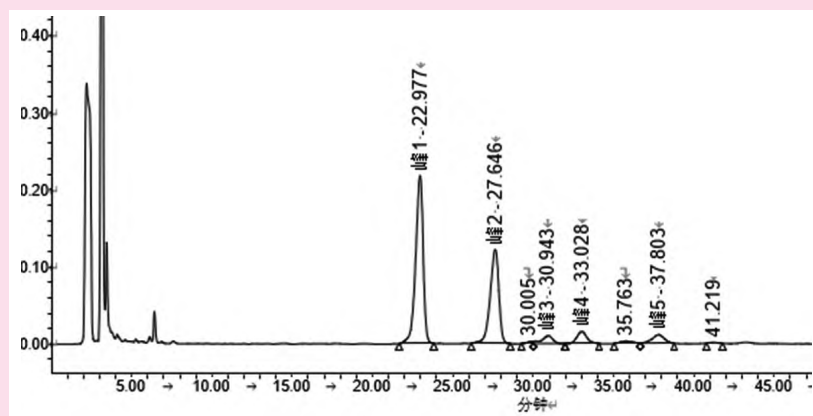
按照 2. 色谱条件, 依次对 4 种七叶皂苷的系列标准工作溶液进样分析, 以保留时间作为定性标准, 色谱峰面积作为定量标准。以质量浓度作为横坐标, 色谱峰的峰面积作为纵坐标, 进行线性回归, 绘制标准曲线。将信噪比等于 3 时的 4 种七叶皂苷成分对应的浓度作为检测限, 信噪比等于 10 时对应的 4 种七叶皂苷成分浓度作为定量限, 得到 4 种七叶皂苷

成分的线性回归方程、相关系数、检出限和定量限, 结果见表3。



峰1:七叶皂苷 A,峰2:七叶皂苷 B,峰3:七叶皂苷 C;峰4:七叶皂苷 D

图1 对照品各成分 HPLC 色谱图



峰1:七叶皂苷 A,峰2:七叶皂苷 B,峰4:七叶皂苷 C;峰5:七叶皂苷 D

图2 样品各成分 HPLC 色谱图

表3 4种七叶皂苷成分的线性回归方程、相关系数、检出限和定量限

对照品	标准曲线	R ²	检测限 ($\mu\text{g/mL}$)	定量限 ($\mu\text{g/mL}$)
七叶皂苷 A	$Y = 1148X + 221.452$	0.9997	0.2	0.5
七叶皂苷 B	$Y = 808X + 234.1361$	0.9998	0.2	0.8
七叶皂苷 C	$Y = 993X - 35.6842$	0.9999	0.2	0.8
七叶皂苷 D	$Y = 612X + 201.423$	0.9996	0.05	0.2

由表3可知,4种七叶皂苷成分在各自线性范围内与色谱峰面积线性关系良好。4种七叶皂苷成分的检测限在 $0.05 \sim 0.2 \mu\text{g/mL}$ 之间,定量限在 $0.2 \sim 0.8 \mu\text{g/mL}$ 之间。

(三)精密度实验

吸取同一混合标准品溶液,上机验证精密度,

分别重复测定6次,记录4种七叶皂苷成分的峰面积,并计算相对标准偏差,结果列于表4。结果表明4种七叶皂苷成分的峰面积对应的RSD值分别为0.75%、0.68%、1.19%、1.30%,表明该方法精密度良好。

表4 精密度实验结果

组分	七叶皂苷 A	七叶皂苷 B	七叶皂苷 C	七叶皂苷 D
峰面积	1628390	1247169	1532793	922822
	1629980	1247140	1545410	936289
	1653741	1262634	1568871	934010
	1654561	1265401	1570924	939591
	1651460	1260818	1575726	959290
	1652594	1264853	1578923	945861
平均值	1645121	1258002	1562107	939643
RSD/%	0.75	0.68	1.19	1.30

(四) 稳定性试验

取中间浓度的混合标准品溶液 10 μ L, 分别于 0、2、4、6、12、24h 上机进行测定, 分别重复测定 3 次, 记录各特征峰的相对保留时间及相对峰面积, 计算 RSD 值。结果表明七叶皂苷 A、七叶皂苷 B、七叶皂苷 C、七叶皂苷 D 特征峰的相对保留时间的 RSD<0.5%, 峰面积的 RSD 值分别为 1.27%、0.89%、1.54%、1.26%, 峰面积的 RSD<2%, 故 4 种七叶皂苷

成分于 24h 内测定结果稳定。

(五) 回收率实验

对 4 种七叶皂苷成分在 1、5、20mg/kg 3 个水平下进行加标回收实验, 平行测定 6 次, 计算加标回收率和相对标准偏差, 结果见表 5。4 种七叶皂苷成分的回收率在 86.27%~97.21% 之间, 相对标准偏差 RSD 均低于 5%, 由此可以看出表明该方法精密度良好, 结果稳定。

表 5 4 种七叶皂苷方法回收率和相对标准偏差

对照品	1mg/kg				5mg/kg				20mg/kg			
	样品含量 (mg/kg)	添加后含量 (mg/kg)	回收率 /%	RSD/%	样品含量 (mg/kg)	添加后含量 (mg/kg)	回收率 /%	RSD/%	样品含量 (mg/kg)	添加后含量 (mg/kg)	回收率 /%	RSD/%
七叶皂苷 A	3.52	3.35	95.26	1.16	3.46	3.20	92.5	0.89	3.43	3.14	91.50	0.98
七叶皂苷 B		3.42	97.20	1.25		3.31	95.6	2.12		3.26	95.14	1.24
七叶皂苷 C		3.21	91.45	0.98		3.36	97.21	4.08		3.23	94.25	1.14
七叶皂苷 D		3.11	88.54	1.42		3.19	92.15	2.24		2.96	86.27	1.54

(六) 实际样品的测定

分别按方法制备待测样品, 上机测定出对应的色谱峰面积, 由标准曲线计算 4 种七叶皂苷成分含

量。测定 5 个批次的样品, 每个样品重复测定 3 次, 结果见表 6。

表 6 含量测定结果及相对标准偏差

样品	七叶皂苷 A		七叶皂苷 B		七叶皂苷 C		七叶皂苷 D	
	平均含量(%)	平均 RSD (%)	平均含量(%)	平均 RSD (%)	平均含量(%)	平均 RSD (%)	平均含量(%)	平均 RSD (%)
1	4.602	1.56	0.144	1.05	0.245	1.45	0.286	2.14
2	4.621	0.85	0.443	0.84	0.286	1.24	0.272	2.42
3	4.521	1.12	0.331	0.71	0.247	1.18	0.295	1.94
4	3.845	0.984	0.166	1.125	0.195	1.42	0.341	1.54
5	4.965	1.142	0.256	0.651	0.241	1.24	0.312	1.36

由表中可看出, 5 批娑罗子中, 均含有方法中的七叶皂苷 A、B、C、D, 但不同批次之间, 七叶皂苷 A、B、C、D 含量有明显的差异, 说明娑罗子的质量确实存在差异。对同一批次的娑罗子原料来说, 七叶皂苷 A、七叶皂苷 B 含量较高, 含量在 0.195%~4.965% 之间, 七叶皂苷 C、七叶皂苷 D 含量略低, 含量在 0.195%~0.341% 之间。

三、结论

基于 HPLC 建立了一种简单、快速、准确定性定量分析娑罗子中七叶皂苷 A、B、C、D 的方法。结果显示, 七叶皂苷 A、B、C、D 的质量浓度与

色谱峰面积之间具有良好的线性关系, 相关系数均大于 0.9995, 检出限为 0.05~0.2 μ g/mL 之间, 定量限为 0.2~0.8 μ g/mL。样品的加标回收率为 86.27%~97.21%, RSD 均低于 5%, 表明本方法具有良好的精确度和准确度, 可在 45min 内完成娑罗子中七叶皂苷 A、B、C、D 的快速分离并实现准确的定性、定量分析。检测娑罗子中最主要的活性物质七叶皂苷 A、B、C、D 的含量可以为控制娑罗子质量提供有力支持和有效保障。

参考文献:

[1] 石召华. 七叶树属植物资源及品质研究[D]. 武汉: 湖北中医药

- 大学,2013:7-8.
- [2] 梁景露.疏肝和胃方治疗肝胃不和型胃溃疡临床疗效研究[D].广东:广州中医药大学,2016:14-15.
- [3] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:2015年版一部[S].北京:中国医药科技出版社,2015:292-293.
- [4] 杜文杰,石召华,叶利春,等.娑罗子本草考证[J].中成药,2018(2):425-428.
- [5] 赵丹萍,张建军,费文婷,等.基于中、英文文献数据库的欧洲七叶树种子和娑罗子的对比研究[J].世界中医药,2019(2):368-373.
- [6] 边静静,付娟,赵桦.娑罗子多糖的提取、含量测定及生物学活性研究[J].食品工业科技,2010(10):72-74
- [7] 马玲云,马双成,魏锋,等.中药娑罗子的化学成分分析[J].亚太传统医药,2010(9):13-15.
- [8] 杨名,裴晓华.娑罗子中有效成分的药理学及临床应用[J].世界中医药,2017(12):3138-3141.
- [9] 李珊,马玲云,李向日,等.中药娑罗子的现代研究进展[J].亚太传统医药,2012(8):178-181.
- [10] 高菁,丁楠,陈丹阳,等.娑罗子中七叶皂苷乙醇提取工艺研究[J].现代中药研究与实践,2018(2):34-36.
- [11] 刘湘.欧洲七叶树的化学、药理作用和临床[J].国外医药(植物药分册),1999(2):47-52.
- [12] 边静静.不同产地娑罗子主要成分分析比较研究[D].兰州:甘肃农业大学,2010:3-4.

[责任编辑:鞠守勇]

Detection Method of Main Bioactive Compounds in Aesculi Semen

Chai Sha-sha, Xu Sheng

(School of Biological Engineering, Wuhan Polytechnic, Wuhan 430074, China)

Abstract: A rapid detection method for the main bioactive compounds in Aesculi Semen is established. The main bioactive compounds in Aesculi Semen were the aescins of saponins. The basic form of beings were aescin A, aescin B、aescin C and aescin D. After being refluxed and extracted with ether, the supernatant was centrifuged to obtain a constant volume, and then filtered for later use. To establish an HPLC method for the simultaneous content determination of aescin A, aescin B、aescin C and aescin D. HPLC method: Column temperature 30℃, gradient elution manne.The analysis of methanol extract of the aescins was performed on 30℃ of Column temperature, the mobile phase comprising of 0.1% phosphoric acid-water and acetonitrile flowing at 1.0 mL / min in a isocratic elution manner, and the detection wavelength was set at 220 nm.The 4 aescins showed good linearity in the range of determination, the correlation coefficients were all above 0.9995. The limits of detection were 0.05-0.2 μg/mL, and the limits of quantification were 0.2-0.8 μg/mL.The recoveries of samples at 3 levels were 85.12%~97.21%.This method is simple, rapid and accurate, which is suitable for the detection of aescins in Aesculi Semen.

Key words: Aesculi Semen,HPLC, Rapid method