

HPLC 法同时测定苦丁茶冬青中 7 个三萜皂苷成分的量

杨 滔, 谭庆龙, 朱锦萍, 周劲松, 张 蕾, 杨 宝, 赵钟祥*

广州中医药大学中药学院, 广东 广州 510006

摘要: 目的 建立 HPLC 法同时测定苦丁茶冬青 *Ilex kudingcha* 中大叶冬青苷 G、大叶冬青苷 H、苦丁冬青苷 G、大叶冬青苷 C、苦丁冬青苷 A、苦丁冬青苷 E、苦丁冬青苷 D 7 个三萜皂苷类成分的量。方法 采用 YMC C₁₈ 色谱柱(YMC-pack ODS-A, 250 mm×4.6 mm, 5 μm), 以乙腈-水为流动相进行梯度洗脱, 体积流量为 1.0 mL/min, 检测波长为 210 nm, 柱温为 30 ℃。结果 7 个三萜皂苷化合物均有良好的分离度, 具有良好的线性范围和线性关系 ($r > 0.999\ 5$), 平均加样回收率在 99.25%~100.80%, RSD<2%。结论 该方法简单准确, 具有良好的重复性和稳定性, 可为苦丁茶冬青质量控制提供科学依据。

关键词: 苦丁茶冬青; 大叶冬青苷 G; 大叶冬青苷 H; 苦丁冬青苷 G; 大叶冬青苷 C; 苦丁冬青苷 A; 苦丁冬青苷 E; 苦丁冬青苷 D; HPLC

中图分类号: R286.6

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2015)07-1052-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.07.021

Simultaneous determination of seven triterpenoid saponins in *Ilex kudingcha* with HPLC

YANG Tao, TAN Qing-long, ZHU Jin-ping, ZHOU Jin-song, ZHANG Lei, YANG Bao, ZHAO Zhong-xiang

School of Chinese Materia Medica, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China

Abstract: **Objective** To establish an HPLC method for simultaneously determining latifolioside G, latifolioside H, kudinoside G, latifolioside C, kudinoside A, kudinoside E, and kudinoside D in *Ilex kudingcha*. **Methods** The separation was performed on a YMC C₁₈ column (YMC-pack ODS-A, 250 mm × 4.6 mm, 5 μm) with water-acetonitrile as the mobile phase in a gradient elution at a flow rate of 1.0 mL/min. The detection wavelength was 210 nm and the column temperature was 30 ℃. **Results** Seven triterpenoid saponins all have good separating degree, good linear range, and linearity ($r > 0.999\ 5$). The average sample recovery rates were 99.25%—100.8%, RSD < 2%. **Conclusion** The established method is rapid, accurate, and with has repeatability and stability, which could provides the scientific evidence for the quality control of *I. kudingcha*.

Key words: *Ilex kudingcha* C. J. Tseng; latifolioside G; latifolioside H; kudinoside G; latifolioside C; kudinoside A; kudinoside E; kudinoside D; HPLC

苦丁茶 *Ilicis Folium* 主要来源冬青科 (Aquifoliaceae) 苦丁茶冬青 *Ilex kudingcha* C. J. Tseng 干燥的叶子, 具有散风热、清头目、止头痛等功效^[1-2]。现代药理研究也表明, 苦丁茶冬青具有改善心血管系统、调血脂、降血压、抗氧化、降血糖、抗菌、抗炎和提高免疫力等作用。苦丁茶冬青化学成分丰富, 主要有皂苷类、黄酮类、多酚类和挥发油等^[3-8], 其中三萜皂苷类化合物是最重要的活性成分, 目前针对苦丁茶冬青中三萜皂苷类成分的量测定还少有文献报道^[9-10]。本实验在前期化学成

分研究基础上, 建立了同时测定苦丁茶冬青中 7 个三萜皂苷类成分的测定方法, 可以较为全面地反映苦丁茶冬青的品质, 为其质量控制和临床应用提供基础研究资料。

1 仪器与材料

LC-20AT 高效液相色谱仪、SIL-20A 自动进样器、LC solution 色谱工作站 (日本岛津); KQ3200B 超声波清洗机 (昆山市超声仪器有限公司); AEG-220 型电子分析天平 (日本岛津)。色谱乙腈 (瑞典 Oceanpak 色谱溶剂); 水为超纯水; 其他试剂

收稿日期: 2014-10-13

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81270054, 30901954); 广州市珠江科技新星专项 (2011J2200047); 广东省优秀青年教师培养计划 (Yq2013045); 广东省自然科学基金资助项目 (9451040701003203)

*通信作者 赵钟祥 (1979—), 男, 教授。Tel: (020)39358072 E-mail: zzx37@163.com

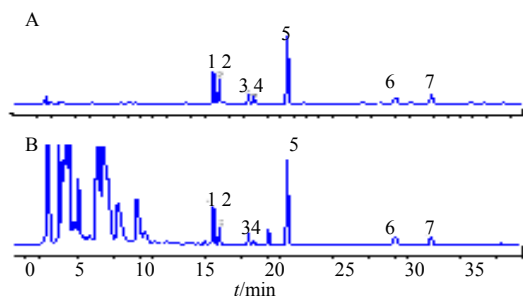
均为分析纯。

实验药材(共10批)购买自广西、广东两省药材市场或药房,由广州中医药大学周劲松副教授鉴定为冬青科冬青属植物苦丁茶冬青 *Ilex kudingcha* C. J. Tseng 干燥的叶子。大叶冬青苷 G、大叶冬青苷 H、苦丁冬青苷 G、大叶冬青苷 C、苦丁冬青苷 A、苦丁冬青苷 E、苦丁冬青苷 D 对照品由本实验室自制,经 HPLC 检测均为单一化合物,质量分数在 98.0% 以上。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

YMC C₁₈ 色谱柱(YMC-pack ODS-A, 250 mm×4.6 mm, 5 μm);柱温 30 ℃;流动相为乙腈(A)-水(B),梯度洗脱(0~15 min, 25%~33% A; 15~25 min, 33% A; 25~30 min, 33%~40% A; 30~40 min, 40% A);体积流量 1 mL/min;检测波长 210 nm。混合对照品与样品的 HPLC 色谱图见图 1。



1-大叶冬青苷 G 2-大叶冬青苷 H 3-苦丁冬青苷 G 4-大叶冬青苷 C 5-苦丁冬青苷 A 6-苦丁冬青苷 E 7-苦丁冬青苷 D
1-latifolioside G 2-latifolioside H 3-kudinoside G 4-latifolioside C 5-kudinoside A 6-kudinoside E 7-kudinoside D

图 1 混合对照品 (A) 与样品 (B) 的 HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC of a mixed reference substances (A) and *I. kudingcha* samples (B)

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液制备 分别精密称取上述 7 个对照品适量,用色谱甲醇溶解,配成大叶冬青苷 G、大叶冬青苷 H、苦丁冬青苷 G、大叶冬青苷 C、苦丁冬青苷 A、苦丁冬青苷 E、苦丁冬青苷 D 质量浓度分别为 0.51、0.48、0.12、0.10、0.59、0.15、0.11 mg/mL 的混合对照品储备液。

2.2.2 供试品溶液的制备 取药材粉末约 1.0 g,精密称定,置 100 mL 具塞锥形瓶中,精密加入 40 mL 甲醇,称定质量,密塞超声提取 40 min,放冷,再称定质量,用甲醇补足差量,摇匀,0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,作为供试品溶液。

2.3 线性关系考察

在“2.1”项色谱条件下,分别精密吸取 7 种三萜皂苷混合对照品溶液 2、5、10、20、35、45 μL 进样测定,以进样三萜皂苷对照品质量(X)对峰面积(Y)作图,求得回归方程,见表 1。结果表明各化合物在各自质量浓度范围内线性关系良好。

2.4 精密度试验

在“2.1”项色谱条件下对混合对照品溶液重复进样 6 次,每次 10 μL,记录峰面积,计算 7 个化合物的 RSD 值分别为 1.14%、1.03%、1.20%、1.17%、0.80%、1.42%、1.15%。

2.5 稳定性试验

精密称定苦丁茶冬青药材粉末 1.0 g,按供试品溶液制备方法制备供试品溶液,按“2.1”项色谱条件操作,分别在室温下放置 0、2、4、8、12、24 h 后进样分析,测定各组分的峰面积。按峰面积计算大叶冬青苷 G、大叶冬青苷 H、苦丁冬青苷 G、大叶冬青苷 C、苦丁冬青苷 A、苦丁冬青苷 E、苦丁冬青苷 D 的 RSD 分别为 0.97%、1.88%、1.79%、0.99%、1.01%、1.80%、1.74%,表明供试品溶液在

表 1 7 个三萜皂苷的线性关系考察结果

Table 1 Regression equations with correlation coefficients of seven triterpenoid saponins

化合物	回归方程	<i>r</i>	线性范围/μg
大叶冬青苷 G	$Y=1.100\ 6\times 10^5 X+1.551\ 1\times 10^3$	0.999 9	1.02~22.95
大叶冬青苷 H	$Y=9.051\ 4\times 10^4 X-5.889\ 9\times 10^3$	0.999 9	0.96~21.60
苦丁冬青苷 G	$Y=1.165\ 6\times 10^5 X+3.706\ 2\times 10^3$	0.999 5	0.24~5.40
大叶冬青苷 C	$Y=1.325\ 6\times 10^5 X-1.747\ 8\times 10^3$	0.999 6	0.20~4.50
苦丁冬青苷 A	$Y=2.393\ 2\times 10^5 X+3.807\ 8\times 10^3$	0.999 9	1.18~26.55
苦丁冬青苷 E	$Y=1.610\ 3\times 10^5 X+3.220\ 0\times 10^3$	0.999 9	0.30~6.75
苦丁冬青苷 D	$Y=2.488\ 1\times 10^5 X-5.965\ 1\times 10^3$	0.999 9	0.22~4.95

24 h 内稳定。

2.6 重复性试验

精密称取同一批供试品药材 1.0 g, 按供试品溶液制备方法平行制备 6 份供试品溶液, 在“2.1”项色谱条件下测定 7 个化合物的色谱峰面积, 计算大叶冬青苷 G、大叶冬青苷 H、苦丁冬青苷 G、大叶冬青苷 C、苦丁冬青苷 A、苦丁冬青苷 E、苦丁冬青苷 D 质量分数的 RSD 分别为 1.32%、1.70%、0.75%、1.64%、1.24%、1.89%、1.94%。

2.7 加样回收率试验

取已知量的苦丁茶冬青药材粉末 6 份, 每份 0.5 g, 精密称定。加入等同于药材样品中相应量的 7

种对照品。按供试品溶液制备方法制备, 按“2.1”项下色谱条件进行测定, 计算大叶冬青苷 G、大叶冬青苷 H、苦丁冬青苷 G、大叶冬青苷 C、苦丁冬青苷 A、苦丁冬青苷 E、苦丁冬青苷 D 的加样回收率分别为 99.59%、99.81%、100.5%、99.49%、99.25%、100.8%、100.0%, RSD 分别为 0.68%、0.40%、0.60%、0.87%、1.02%、0.43%、1.47%。

2.8 样品测定

取广东和广西不同产地的苦丁茶冬青药材, 精密称定 1.0 g, 按“2.2.2”项下操作, 每个批号药材平行制备 3 份, 再按“2.1”项下色谱条件进行测定, 并计算样品中 7 种成分的量。结果见表 2。

表 2 苦丁茶冬青药材中 7 个三萜皂苷的测定结果 ($n=3$)

Table 2 Determination of seven triterpenoid saponins in *I. kudingcha* ($n=3$)

编号	来源	质量分数/(mg·g ⁻¹)							总量
		大叶冬青苷 G	大叶冬青苷 H	苦丁冬青苷 G	大叶冬青苷 C	苦丁冬青苷 A	苦丁冬青苷 E	苦丁冬青苷 D	
1	广西	33.81	16.40	11.48	3.47	42.79	8.51	5.12	121.57
2	广西	25.04	12.41	12.58	3.19	32.29	6.65	7.00	99.16
3	广西	38.25	27.30	6.46	3.06	72.50	18.79	8.78	175.15
4	广西	7.71	11.04	7.77	6.22	46.66	27.08	7.07	113.55
5	广西	21.07	17.18	20.58	3.94	19.96	16.88	8.74	108.35
6	广西	43.36	25.85	15.90	5.78	61.96	17.02	8.78	178.66
7	广东	37.88	25.46	9.52	3.70	61.28	14.00	9.08	160.90
8	广东	24.21	13.02	7.30	2.65	33.25	8.18	4.33	92.94
9	广东	22.60	12.51	11.55	3.67	34.60	9.33	7.67	101.92
10	广东	22.14	12.44	7.02	2.56	30.93	8.15	5.79	89.03

3 讨论

在选择波长方面, 上述 7 个三萜皂苷类成分的紫外扫描图谱显示, 大叶冬青苷 G、大叶冬青苷 H、苦丁冬青苷 G、大叶冬青苷 C、苦丁冬青苷 A 的最大吸收波长在 205~210 nm, 苦丁冬青苷 E 和苦丁冬青苷 D 的最大吸收波长均为 261 nm。虽然苦丁冬青苷 E 和苦丁冬青苷 D 的最大吸收波长不为 210 nm, 但是在该波长下也有较强吸收, 而大叶冬青苷 G、大叶冬青苷 H、苦丁冬青苷 G、大叶冬青苷 C、苦丁冬青苷 A 在波长 261 nm 附近均无吸收。因此, 采用 261 nm 作为检测波长只能检出苦丁冬青苷 E 和苦丁冬青苷 D, 而以 210 nm 作为检测波长则可同时测定 7 个化合物。考虑到采用单波长检测时, 操作更为简便、检测方法适用性更好, 而且采用 210 nm 波长检测时, 各化合物的线性、精密度、加样回收率等方法学考察均符合定量测定要求, 完全能

满足苦丁茶冬青药材测定的要求, 因此最终选择 210 nm 作为检测波长。

在供试品溶液制备方法考察时, 比较了甲醇、75%甲醇、水 3 种提取溶剂, 结果显示, 甲醇为最佳溶媒; 比较了超声提取和回流提取方法, 结果显示, 用超声提取方法操作简单、提取完全、制备的供试品干扰少; 最后考察了用甲醇超声提取 30、40、50、60 min 的效果, 结果显示, 30 min 的提取率低于 40 min 的提取率, 而 40、50、60 min 的提取量没有明显差别, 所以最后选用甲醇超声提取 40 min 作为制备供试品溶液的方法。

在选择流动相方面, 分别用了甲醇-水、乙腈-水、乙腈-水 (含 0.02%三氟乙酸) 3 个不同系统进行了分析, 结果显示, 乙腈-水系统对 7 个三萜皂苷成分的分离度优于甲醇-水系统, 而且乙腈-水比乙腈-水 (含 0.02%三氟乙酸) 系统的信噪比高, 且分

离度相差不大,所以流动相选择了乙腈-水系统。

实验结果显示广东、广西两地的苦丁茶冬青中的三萜皂苷总量没有明显差异,但是不同批次药材之间差异显著,可能与药材采收时间、加工工艺和储藏时间有关。本实验建立了 HPLC 法同时测定苦丁茶药材中 7 个三萜皂苷类成分的量,该方法简单、有效、准确,因此可以考虑作为苦丁茶冬青药材质量优劣的控制标准。根据实验结果,苦丁茶冬青药材三萜皂苷类成分量的限度暂定为以干燥品计算,每克药材中各化合物的总量不低于 85 mg。

参考文献

- [1] 方 鼎. 广西药用植物名录 [M]. 南宁: 广西人民出版社, 1986.
- [2] 俸宇星, 陈书坤. 中国冬青属苦丁茶名实辨证 [J]. 植物分类学报, 1998, 36(4): 353-358.
- [3] 文永新, 陈秀珍, 金静兰, 等. 苦丁茶化学成分的研究 [J]. 广西植物, 1990, 10(4): 364-368.
- [4] 周 欣, 赵 超. 贵州苦丁茶挥发油化学成分的研究 [J]. 中草药, 2002, 33(3): 214-215.
- [5] Tang L, Jiang Y, Tian X M, *et al.* Triterpene saponins from the leaves of *Ilex kudingcha* [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2009, 11(6): 554-561.
- [6] Ouyang M A, Yang C R, Chen Z L, *et al.* Triterpenes and triterpenoid glycosides from the leaves of *Ilex kudincha* [J]. *Phytochemistry*, 1996, 41(3): 871-877.
- [7] Zuo W J, Dai H F, Zeng Y B, *et al.* Two new triterpenoid saponins from the leaves of *Ilex kudingcha* [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2012, 14(4): 308-313.
- [8] Che Y Y, Li N, Zhang L, *et al.* Triterpenoid Saponins from the leaves of *Ilex kudingcha* [J]. *Chin J Nat Med*, 2011, 9(1): 22-25.
- [9] 李宏杨, 刘 飞, 张凤琴, 等. RP-HPLC 法测定苦丁茶中熊果酸和齐墩果酸的量 [J]. 贵州科学, 2010, 28(2): 41-44.
- [10] 谢惜媚, 李瑞英, 李晓燕, 等. 苦丁茶中总皂苷量测定用对照品的筛选 [J]. 分析实验室, 2009, 11(28): 291-293.