

## HPLC 法同时测定大叶冬青中 6 种三萜皂苷成分的量

关 玥<sup>1,2</sup>, 冯琳琳<sup>2,3</sup>, 于 敏<sup>2</sup>, 赵春芳<sup>3</sup>, 张 晶<sup>1\*</sup>, 焦连庆<sup>1,2\*</sup>

1. 吉林农业大学中药材学院, 吉林 长春 130118

2. 吉林省中医药科学院, 吉林 长春 130012

3. 吉林大学药学院, 吉林 长春 130021

**摘 要:** 目的 在大叶冬青 *Ilex latifolia* 化学成分研究基础上, 建立测定大叶冬青中大叶冬青皂苷 F (latifoloside F)、大叶冬青皂苷 H (latifoloside H)、大叶冬青皂苷 C (latifoloside C)、大叶冬青皂苷 D (latifoloside D)、苦丁冬青皂苷 F (kudinoside F)、苦丁茶冬青皂苷 E (ilekudinoside E) 6 种三萜皂苷的 HPLC 测定方法。方法 采用 Wonda Cract ODS-2 (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 以水为流动相, 梯度洗脱, 体积流量 1 mL/min, 检测波长为 210 nm, 柱温 35 ℃。结果 6 个皂苷分离度良好, 具有良好的线性关系 ( $r>0.999\ 2$ ), 平均加样回收率在 99.52%~100.96%, RSD<2%。结论 该方法简单、准确, 具有良好的重复性和稳定性, 可为大叶冬青药材质量控制提供实验依据。

**关键词:** 大叶冬青; 大叶冬青皂苷 C; 大叶冬青皂苷 F; 大叶冬青皂苷 H; 大叶冬青皂苷 D; 苦丁冬青皂苷 F; 苦丁茶冬青皂苷 E; HPLC

中图分类号: R286.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2017)11-2296-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.11.024

## Simultaneous quantification of six saponins in *Ilex latifolia* by HPLC

GUAN Yue<sup>1,2</sup>, FENG Lin-lin<sup>2,3</sup>, YU Min<sup>2</sup>, ZHAO Chun-fang<sup>3</sup>, ZHANG Jing<sup>1</sup>, JIAO Lian-qing<sup>1,2</sup>

1. Jilin Agricultural University, Chang Chun 130118, China

2. Jilin Provincial Academy of traditional Chinese Medicine, Changchun 130012, China

3. College of Pharmacy Jilin University, Changchun 130021, China

**Abstract: Objective** Based on the study of chemical composition research of *Ilex latifolia*, to develop an HPLC method for the simultaneous determination of latifoloside F, latifoloside H, latifoloside C, latifoloside D, kudinoside F and ilekudinoside E. The purity of the six saponins was confirmed by LC-MS. **Methods** Chromatographic separation was performed on a Wonda Cract ODS-2 column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) with linear gradient elution of acetonitrile and water at a flow rate of 1 mL/min, and the detection wavelength was 210 nm. The mass spectrum was negative ion mode, the capillary temperature was 250 ℃, the solvent gas was nitrogen, the flow rate was 0.75 L/min, the spray voltage was 4.0 kV, and the lens voltage was 125V. **Results** The six saponins were well separated and all calibration curves showed good linearity within the test ranges ( $r > 0.999\ 2$ ). The average recoveries were between 99.52% and 100.96%, and RSD values were less than 2%. **Conclusion** An accurate and simple method is first established for the qualification and quantification of six saponins in *I. latifolia*. The results demonstrate that the method could be applied as a reliable quality control method for the seed of *I. latifolia*.

**Key words:** *Ilex latifolia* Thunb.; latifoloside C; latifoloside F; latifoloside H; latifoloside D; kudinoside F; ilekudinoside E; HPLC

大叶冬青 *Ilex latifolia* Thunb. 为冬青科 (Aquifoliaceae) 冬青属 *Ilex* L. 常绿乔木, 作为苦丁茶基原植物之一, 药用其叶, 俗称大叶茶, 具有清热解毒、止咳化痰、健胃消积、明目益思等功效<sup>[1]</sup>。药理学研究表明, 大叶冬青叶具有调血脂、降血糖、

降血压、抗炎杀菌、抗氧化、抗生育等药理作用<sup>[2-3]</sup>。大叶冬青中含有丰富的化学成分, 主要有三萜及三萜皂苷、黄酮类、甾体、氨基酸、多糖及核苷等类成分<sup>[4]</sup>, 其中以三萜皂苷量最为丰富。但目前有关大叶冬青三萜皂苷类成分的测定报道较少<sup>[5-6]</sup>, 尚未

收稿日期: 2017-03-31

基金项目: 吉林省科技发展计划项目 (20150311037YY); 吉林省卫生计生科研计划项目 (2014Z206); 吉林省中医药科技项目 (2014-ZD28)

作者简介: 关 玥, 女, 硕士, 研究方向为天然产物化学。Tel: 18612425511 E-mail: selenamaw@126.com

\*通信作者 张 晶, 女 (汉族), 博士, 教授, 研究方向为天然药物研究与开发。E-mail: zhjing0701@163.com

焦连庆, 男, 博士, 研究员, 研究方向为天然药物研究与开发。E-mail: jlq51@tom.com

有对大叶冬青中多种三萜皂苷类成分进行测定的报道。

我国苦丁茶商品基原较为复杂,包括不同属多种植物<sup>[7]</sup>,检测单一成分无法对苦丁茶进行充分的质量控制和评价,本实验基于大叶冬青化学成分研究基础,建立了同时测定 6 个三萜皂苷大叶冬青皂苷 F、大叶冬青皂苷 H、大叶冬青皂苷 C、大叶冬青皂苷 D、苦丁冬青皂苷 F、苦丁冬青皂苷 E 的方法,以期为大叶冬青苦丁茶质量控制提供实验依据。

## 1 仪器与材料

BT25S 型十万分之一电子天平(德国赛多利斯科学仪器有限公司),LC-20A 型高效液相色谱仪(日本岛津公司),SPD-M20A 二极管阵列检测器,LTX XL 质谱仪(美国 Thermo 公司),AS5150A 型超声仪(奥特赛斯机器有限公司),XWK-3A 型空气发生器(天津市津分分析仪器制造有限公司),AK-400A 粉碎机(温岭市奥力中药机械有限公司)。

大叶冬青药材分别产自浙江(S1~S4)、江西(S5~S7)、安徽(S8~S10),均由吉林省中医药科学院牛志多研究员鉴定为冬青科冬青属植物大叶冬青 *Ilex latifolia* Thunb. 的干燥茎叶。

对照品大叶冬青皂苷 F、大叶冬青皂苷 H、大叶冬青皂苷 C、大叶冬青皂苷 D、苦丁冬青皂苷 F、苦丁冬青皂苷 E,均为实验室自制,经 HPLC 法检测质量分数均大于 98%;水为超纯水,乙腈、甲醇为色谱纯,其余试剂为分析纯。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

岛津 Wonda Cract ODS-2 C<sub>18</sub> 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相为乙腈(A)-水(B),二元梯度洗脱:0~15 min, 15% A; 15~65 min, 15%~42% A; 65~72 min, 42% A。体积流量 1 mL/min,柱温 35 ℃,检测波长 210 nm,进样量 20 μL。色谱图见图 1。

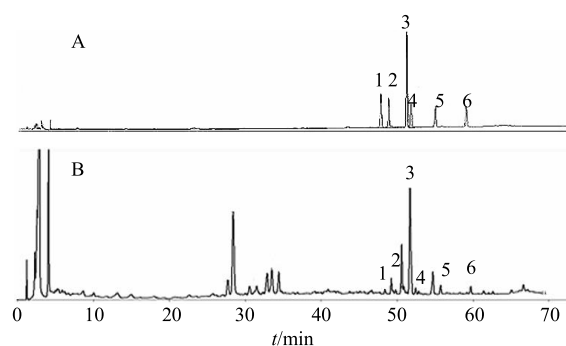
### 2.2 溶液配制

**2.2.1 对照品溶液配制** 精密称取大叶冬青皂苷 F、大叶冬青皂苷 H、大叶冬青皂苷 C、大叶冬青皂苷 D、苦丁冬青皂苷 F、苦丁冬青皂苷 E 适量,加色谱甲醇溶解并定容至量瓶,对照品溶液的质量浓度分别为大叶冬青皂苷 F 220 μg/mL、大叶冬青皂苷 H 168 μg/mL、大叶冬青皂苷 C 347 μg/mL、大叶冬青皂苷 D 170 μg/mL、苦丁冬青皂苷 F 80 μg/mL、苦丁冬青皂苷 E 190 μg/mL,避光低温保存。

**2.2.2 供试品溶液配制** 精密称取 1.0 g 大叶冬青药材粉末(过 60 目筛),定量转移至 50 mL 量瓶中,加入 70%乙醇适量,超声提取 60 min,加 70%乙醇至刻度,摇匀,0.45 μm 滤膜滤过,即得供试品溶液。

### 2.3 线性关系考察

按照“2.1”项条件,精密吸取 6 种皂苷混合对照品溶液 1、5、10、15、20、25 μL 进样,以对照品质量为横坐标(X),对应峰面积为纵坐标(Y),求得回归方程,如表 1 所示。结果表明,6 种皂苷



1-大叶冬青皂苷 F 2-大叶冬青皂苷 H 3-大叶冬青皂苷 C  
4-苦丁冬青皂苷 E 5-大叶冬青皂苷 D 6-苦丁冬青皂苷 F  
1-latifolioside F 2-latifolioside H 3-latifolioside C 4-ilekudinoside E  
5-latifolioside D 6-kudinoside F

图 1 混合对照品(A)和供试品(B)的 HPLC 谱图  
Fig. 1 HPLC of reference substances (A) and *I. latifolia* sample (B)

表 1 6 种皂苷线性关系考察结果

Table 1 Linear relationship of six saponins

| 成分       | 线性范围/μg   | 线性方程                                    | r       |
|----------|-----------|-----------------------------------------|---------|
| 大叶冬青皂苷 F | 0.22~5.50 | $Y=1.7 \times 10^5 X-2.297 \times 10^4$ | 0.999 3 |
| 大叶冬青皂苷 H | 0.17~4.20 | $Y=1.8 \times 10^5 X+1.049 \times 10^4$ | 0.999 7 |
| 大叶冬青皂苷 C | 0.35~8.67 | $Y=2.6 \times 10^5 X-8.538 \times 10^3$ | 0.999 6 |
| 大叶冬青皂苷 D | 0.17~4.25 | $Y=2.2 \times 10^5 X-1.971 \times 10^4$ | 0.999 2 |
| 苦丁冬青皂苷 F | 0.08~2.00 | $Y=4.7 \times 10^5 X+5.384 \times 10^3$ | 0.999 8 |
| 苦丁冬青皂苷 E | 0.19~4.75 | $Y=1.9 \times 10^5 X+1.530 \times 10^4$ | 0.999 4 |

在各自质量浓度范围内具有良好的线性关系。

## 2.4 精密度试验

精密吸取大叶冬青 (S1) 供试品溶液 20  $\mu\text{L}$ , 按照“2.1”项条件连续进样 6 次, 结果显示, 大叶冬青皂苷 F、大叶冬青皂苷 H、大叶冬青皂苷 C、大叶冬青皂苷 D、苦丁冬青皂苷 F、苦丁冬青皂苷 E 峰面积积分值的 RSD 分别为 1.16%、1.41%、1.06%、1.57%、1.18%、1.03%, 表明本方法具有良好的精密度。

## 2.5 稳定性试验

精密吸取大叶冬青 (S1) 供试品溶液 20  $\mu\text{L}$ , 分别在避光条件下放置 0、2、4、6、16、24 h, 按照“2.1”项条件进样 20  $\mu\text{L}$ , 进行分析。结果显示, 大叶冬青皂苷 F、大叶冬青皂苷 H、大叶冬青皂苷 C、大叶冬青皂苷 D、苦丁冬青皂苷 F、苦丁冬青皂苷 E 的 RSD 分别为 1.61%、2.13%、1.72%、1.84%、2.04%、2.40%, 表明这 6 种皂苷在避光条件下 24 h 内稳定。

## 2.6 重复性试验

精密称取大叶冬青 (S1) 6 份, 按“2.2.2”项中制备供试液的方法平行操作, 按照“2.1”项条件进样 20  $\mu\text{L}$ , 分别测定这 6 种皂苷的量。结果显示, 大叶冬青皂苷 F、大叶冬青皂苷 H、大叶冬青皂苷

C、大叶冬青皂苷 D、苦丁冬青皂苷 F、苦丁冬青皂苷 E 量的平均质量分数分别为 0.42%、0.29%、2.39%、0.40%、0.20%、0.18%; RSD 分别为 1.22%、2.18%、1.64%、2.02%、2.62%、2.29%, 表明本方法重复性良好。

## 2.7 加样回收率试验

精密称取已测定的大叶冬青 (S1) 6 份, 精密加入大叶冬青皂苷 F、大叶冬青皂苷 H、大叶冬青皂苷 C、大叶冬青皂苷 D、苦丁冬青皂苷 F、苦丁冬青皂苷 E 对照品溶液适量, 按照“2.2.2”所述的制备方法制备供试品溶液, 按“2.1”项条件进行测定, 结果大叶冬青皂苷 F、大叶冬青皂苷 H、大叶冬青皂苷 C、大叶冬青皂苷 D、苦丁冬青皂苷 F、苦丁冬青皂苷 E 的平均回收率分别为 99.58%、99.60%、99.52%、100.42%、100.21%、100.96%, RSD 分别为 1.33%、0.92%、1.75%、1.01%、1.92%、1.11%。

## 2.8 不同产地大叶冬青中 6 种皂苷成分的测定

取 10 个不同批次的大叶冬青药材样品, 按“2.2.2”项下的方法制备供试品溶液, 精密吸取供试品溶液 20  $\mu\text{L}$ , 按“2.1”项下色谱条件进行测定, 采用外标法计算样品中 6 个皂苷的质量分数。见表 2。

表 2 不同产地的大叶冬青中 6 种皂苷测定结果

Table 2 Determination of six saponins in *I. latifolia* from different origins

| 样品  | 质量分数/%   |          |          |          |          |          |
|-----|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
|     | 大叶冬青皂苷 F | 大叶冬青皂苷 H | 大叶冬青皂苷 C | 大叶冬青皂苷 D | 苦丁冬青皂苷 F | 苦丁冬青皂苷 E |
| S1  | 0.42     | 0.29     | 2.38     | 0.41     | 0.20     | 0.17     |
| S2  | 0.43     | 0.28     | 2.43     | 0.44     | 0.19     | 0.17     |
| S3  | 0.47     | 0.28     | 2.44     | 0.42     | 0.21     | 0.19     |
| S4  | 0.44     | 0.32     | 2.39     | 0.40     | 0.22     | 0.20     |
| S5  | 0.42     | 0.26     | 2.05     | 0.35     | 0.29     | 0.21     |
| S6  | 0.45     | 0.28     | 2.00     | 0.34     | 0.27     | 0.21     |
| S7  | 0.44     | 0.27     | 2.08     | 0.32     | 0.28     | 0.20     |
| S8  | 0.40     | 0.23     | 2.11     | 0.39     | 0.18     | 0.16     |
| S9  | 0.38     | 0.27     | 2.15     | 0.38     | 0.19     | 0.17     |
| S10 | 0.33     | 0.25     | 2.17     | 0.40     | 0.18     | 0.15     |

## 3 讨论

### 3.1 供试品溶液制备方法考察

本实验比较了乙醇、70%乙醇、50%乙醇、甲醇、70%甲醇、50%甲醇为提取溶剂, 结果显示, 以 70%乙醇为提取溶剂时, 所得化合物种类最多。比较了 70%乙醇超声提取 30、60、90 min 的效果,

结果显示, 60 min 的提取率最高, 故本实验采用 70%乙醇超声提取 60 min, 作为供试品溶液制备方法。

### 3.2 检测波长及流动相的选择

本课题组已对大叶冬青正丁醇萃取部位进行系统的化学成分研究, 本实验所分析的 6 种化合物均为五环三萜皂苷, 其中大叶冬青皂苷 D 和大叶冬青

皂苷 B 具有相同的 ilexgenin B 型母核结构; 大叶冬青皂苷 H 和大叶冬青皂苷 C 具有斯阿树脂酸型母核结构; 苦丁冬青皂苷 F 和苦丁冬青皂苷 E 分别具有苦丁内酯结构和坡莫醇酸型母核结构。其母核结构相似, 仅在母核 C-19 和 C-20 位甲基构型和连接位置上有所区别, 增加了分离、检测的难度。本实验采用 DAD 二极管阵列检测器, 发现 6 种皂苷均在 210 nm 处有最大吸收, 故选取 210 nm 为检测波长, 各化合物的方法学考察均符合测定要求; 6 种皂苷的因极性相似, 在流动相的选择上采用乙腈-水为洗脱系统, 6 种皂苷分离度较好。

### 3.3 不同产地大叶冬青的测定

实验结果显示, 浙江产大叶冬青中三萜皂苷量最高, 不同批次药材间没有显著差异; 江西产大叶冬青中三萜皂苷量与浙江产相差不大, 安徽产大叶冬青中三萜皂苷量最低。大叶冬青中这 6 种成分的量较高, 本实验建立的 HPLC 法同时测定大叶冬青中 6 种皂苷成分的方法简单、准确, 可为大叶冬青苦丁茶药材质量控制提供参考。

### 参考文献

- [1] 易帆, 彭勇, 许利嘉, 等. 大叶苦丁茶的研究进展 [J]. 中国现代中药, 2013, 15(8): 710-717.
- [2] Luo X Y, Li N N, Liang Y R. Effects of *Ilex latifolia* and *Camellia sinensis* on cholesterol and circulating immune complexes in rats fed with a high-cholesterol diet [J]. *Phytother Res*, 2013, 27(1): 62-65.
- [3] 余颜, 张国明, 蔺晓源, 等. 苦丁茶对动脉粥样硬化大鼠血管内皮功能的影响 [J]. 中国中医急症, 2014, 23(2): 220-222.
- [4] 范春林. 大叶冬青的化学成分研究 [D]. 广州: 暨南大学, 2010.
- [5] 张俊清, 谭银丰, 李海龙, 等. 海南大叶冬青中 2 种活性成分的含量研究 [J]. 中国药学杂志, 2010, 45(9): 658-660.
- [6] 李宏杨, 刘飞, 张凤琴, 等. 6 种冬青科苦丁茶总三萜类物质含量的比较研究 [J]. 热带生物学报, 2010, 1(1): 17-20.
- [7] 谷婧. 苦丁茶植物资源调查整理与 DNA 分子鉴定及系统亲缘关系探讨 [D]. 北京: 北京协和医学院, 2011.