

HPLC-ELSD 同时测定链荚豆中胡萝卜苷和 β -谷甾醇含量

李慧宁, 刘洪蛟, 付小帅, 姜珍, 郭兴杰*
(沈阳药科大学 药学院, 沈阳 110016)

[摘要] 目的: 建立同时测定链荚豆中胡萝卜苷和 β -谷甾醇含量的方法。方法: 采用高效液相色谱-蒸发光散射检测法, 色谱柱为 Diamonsil C₁₈ 柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μ m), 流动相甲醇-水(95:5), 流速 1.0 mL·min⁻¹, 漂移管温度 80 $^{\circ}$ C, 载气体积流量 2.5 L·min⁻¹。结果: 胡萝卜苷和 β -谷甾醇浓度分别在 10 ~ 100 mg·L⁻¹ ($r = 0.999\ 3$) 和 25 ~ 250 mg·L⁻¹ ($r = 0.999\ 1$) 线性关系良好; 平均加样回收率分别为 99.5%, 98.9%, RSD 分别为 2.4%, 2.1%。结论: 该法专属、简便、准确, 可用于同时测定链荚豆中胡萝卜苷和 β -谷甾醇, 为链荚豆的质量控制提供依据。

[关键词] 链荚豆; 胡萝卜苷; β -谷甾醇; 高效液相色谱-蒸发光散射检测法

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)01-0119-04

Simultaneous Determination of Daucosterol and β -sitosterol in *Alysicarpus vaginalis* by HPLC-ELSD

LI Hui-ning, LIU Hong-jiao, FU Xiao-shuai, JIANG Zhen, GUO Xing-jie*
(School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

[Abstract] **Objective:** To develop a new method for simultaneous determination of daucosterol and β -sitosterol in *Alysicarpus vaginalis*. **Method:** HPLC-ELSD method was used to determine daucosterol and β -sitosterol. The separation was performed on a Diamonsil C₁₈ column (4.6 mm × 150 mm, 5 μ m) with methanol-water (95:5) as the mobile phase at the flow rate of 1.0 mL·min⁻¹. The temperature in drift tube was 80 $^{\circ}$ C and the carrier gas flow was 2.5 L·min⁻¹. **Result:** The linear ranges of daucosterol and β -sitosterol were 10-100 μ g·mL⁻¹ ($r = 0.999\ 3$) and 25-250 mg·L⁻¹ ($r = 0.999\ 1$), respectively. The average recoveries were 99.5%, 98.9%, and RSDs were 2.4% and 2.1%, respectively. **Conclusion:** This method is selective, simple, accurate, which can be applied for simultaneous determination of daucosterol and β -sitosterol in *A. vaginalis*.

[Key words] *Alysicarpus vaginalis*; daucosterol; β -sitosterol; HPLC-ELSD

链荚豆性凉, 味甘、苦, 具活血化瘀、接骨消肿、清热解毒, 利胆退黄、去腐生肌的功效, 用于治疗半身不遂、筋骨酸痛、慢性肝炎、蛇咬伤、跌打损伤、疮疡溃烂久不收口等, 为我国西南地区常用药, 疗效已得到肯定并应用于临床^[1-3]。

目前国内外未见任何有关链荚豆化学成分及质量控制方面的报道。本实验室从链荚豆中首次分离得到两种单体化合物, 经鉴定为 β -谷甾醇和胡萝卜

苷。其中 β -谷甾醇具有降胆固醇、消炎、退热、抗溃疡及抗肿瘤作用^[4-5], 可能为链荚豆的有效成分之一; 胡萝卜苷具有免疫调节活性, 对白色念珠菌引起的感染有抑制作用^[6]。本文建立了同时测定链荚豆中胡萝卜苷和 β -谷甾醇的方法, 为链荚豆的质量控制提供了可借鉴的方法。

1 仪器与试剂

高效液相色谱系统 (pump L-2130, 日本日立), 蒸发光散射检测器 (ELSD 2000ES, 美国 Alltech), As3120B 型超声波振荡器 (天津 Autoscience 公司), BS110S 型电子天平 (1/万, 德国 Sartorius 公司)。

β -谷甾醇对照品 (中国药品生物制品检定所, 110851-200403), 胡萝卜苷对照品 (实验室自制, 纯度 $\geq 99.0\%$), 甲醇 (色谱纯, 天津市康科德科技有

[收稿日期] 20120622(003)

[第一作者] 李慧宁, 硕士研究生, 从事药物分析研究, E-mail: lihuining_1219@163.com

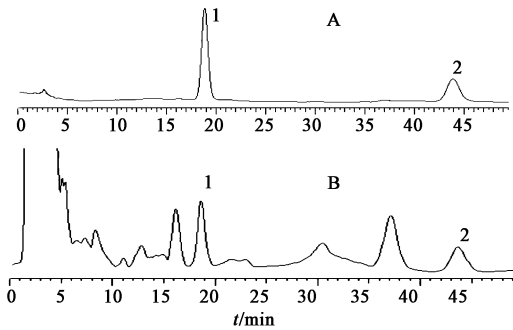
[通讯作者] * 郭兴杰, 教授, 博士生导师, 从事药物分析研究, Tel: 024-23986285, E-mail: gxjhyz@yahoo.com.cn

限公司),重蒸水(实验室自制),其他试剂均为分析纯。

3 批植物样品分别采自广西南宁、广西柳州、广西桂林,经沈阳药科大学陆金才教授鉴定为链荚豆 *Alysicarpus vaginalis*(L.) DC.。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Diamonsil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm),流动相甲醇-水(95:5),流速 1.0 mL·min⁻¹,柱温室温,漂移管温度 80 °C,载气体积流量 2.5 L·min⁻¹,进样量 20 μL。见图 1。



A. 对照品; B. 供试品; 1. 胡萝卜苷; 2. β-谷甾醇

图 1 链荚豆 HPLC

2.2 供试品溶液的制备 将链荚豆粉碎,过 40 目筛,取粗粉约 2.0 g,精密称定,加入丙酮 32 mL,水浴加热回流 5 h,趁热过滤,滤液倒入圆底烧瓶中,旋转蒸发除去溶剂,残渣用甲醇溶解并转移至 5 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,0.45 μm 微孔滤过,即得供试品溶液。

2.3 溶液的制备 对照品储备液:精密称取胡萝卜苷对照品 5 mg,置于 50 mL 量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,制成浓度 0.100 mg·kg⁻¹的对照品储备液;精密称取 β-谷甾醇对照品 2.5 mg,置于 10 mL 量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,制成浓度为 0.250 mg·kg⁻¹的对照品储备液。

混合对照品储备液的制备:精密称取胡萝卜苷和 β-谷甾醇对照品适量,置 10 mL 量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,制成 0.100, 0.250 mg·kg⁻¹的混合对照品储备液。

混合对照品溶液的制备:精密量取混合对照品储备液 4, 6 mL,分别置 10 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,得混合对照品溶液 I(胡萝卜苷和 β-谷甾醇浓度分别为 0.040, 0.100 mg·kg⁻¹)和混合对照品溶液 II(胡萝卜苷和 β-谷甾醇质量分数分别为 0.060, 0.150 mg·kg⁻¹)。

2.4 系统适用性试验 在上述色谱条件下,分别吸取对照品溶液 II 和供试品溶液注入液相色谱仪,色谱图见图 2,胡萝卜苷和 β-谷甾醇色谱峰与相邻峰的分离度均 > 1.5,理论板数按胡萝卜苷计算不低于 3 000。

2.5 线性关系考察 分别精密量取混合对照品储备液 1, 2, 4, 6, 8, 10 mL 至 10 mL 量瓶中,甲醇定容,测定。以峰面积对数(Y)为纵坐标,样品浓度对数(X)为横坐标制作工作曲线,得胡萝卜苷和 β-谷甾醇的回归方程分别为 $Y = 1.365X + 3.984$ ($r = 0.9993$); $Y = 1.280X + 3.371$ ($r = 0.9991$)。胡萝卜苷线性范围为 10 ~ 100 mg·L⁻¹, β-谷甾醇线性范围为 25 ~ 250 mg·L⁻¹。

2.6 精密度试验 精密吸取混合对照品溶液 I 20 μL,重复进样 6 次,测得胡萝卜苷和 β-谷甾醇峰面积的 RSD 分别为 3.1%, 2.1%。

2.7 稳定性试验 取供试品溶液,分别于 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 h 进样测定,记录峰面积。计算胡萝卜苷峰面积的 RSD 3.4%, β-谷甾醇峰面积的 RSD 2.5%,表明供试品溶液在 12 h 内稳定。

2.8 重复性试验 取广西南宁产链荚豆粗粉(过 40 目筛),精密称取 6 份,每份 2 g,按 2.2 项方法制备供试品溶液,在上述色谱条件进样测定,测得胡萝卜苷和 β-谷甾醇含量平均值分别为 0.110, 0.288 mg·g⁻¹, RSD 分别为 3.1%, 2.8%。

2.9 回收率试验 取广西南宁产链荚豆粗粉(过 40 目筛),精密称取 9 份,每份约 1 g,置圆底烧瓶中,分别加入适量胡萝卜苷和 β-谷甾醇对照品储备液,按 2.2 项方法制备供试品溶液,上述色谱条件进样测定,计算回收率,结果见表 1。

2.10 样品测定 取 3 批不同来源的药材,按 2.2 项方法制备供试品溶液,在上述色谱条件下测定,记录峰面积,以混合对照品溶液 I 和 II 为对照,按外标两点法计算胡萝卜苷和 β-谷甾醇含量,结果见表 2。

3 讨论

已有文献报道测定胡萝卜苷^[7]或 β-谷甾醇^[8-10]的含量,但未见文献报道同时测定二者的含量。因胡萝卜苷和 β-谷甾醇无明显的紫外吸收,需采用蒸发光散射法进行检测^[7-10]。甲醇或甲醇-水是测定胡萝卜苷和 β-谷甾醇的常用流动相^[7-10]。本文在文献报道的基础上,考察了甲醇-水的比例对分离的影响,发现当流动相甲醇-水的体积比为 95:5 时,胡萝卜苷和 β-谷甾醇能与样品中的杂质峰达到完全分离,且峰形良好,保留时间合适。

表1 胡萝卜苷和 β -谷甾醇加样回收率试验

成分	称样量/g	样品中含量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
胡萝卜苷	1.014 7	0.108 6	0.050 0	0.157 2	97.3	99.5	2.4
	1.005 0	0.107 5	0.050 0	0.156 2	97.4		
	1.021 2	0.109 3	0.050 0	0.159 6	100.7		
	1.011 7	0.108 3	0.100 0	0.210 8	102.5		
	1.002 5	0.107 3	0.100 0	0.206 5	99.2		
	1.018 9	0.109 0	0.100 0	0.206 7	97.7		
	1.035 2	0.110 8	0.150 0	0.265 6	103.2		
	1.042 0	0.111 5	0.150 0	0.256 8	96.9		
	1.032 2	0.110 4	0.150 0	0.260 7	100.2		
	β -谷甾醇	1.014 7	0.299 7	0.150 0	0.448 8		
1.005 0		0.296 6	0.150 0	0.451 0	102.9		
1.021 2		0.301 6	0.150 0	0.448 0	97.6		
1.011 7		0.298 8	0.300 0	0.590 4	97.2		
1.002 5		0.296 1	0.300 0	0.586 5	96.8		
1.018 9		0.300 8	0.300 0	0.593 0	97.4		
1.035 2		0.305 7	0.450 0	0.747 2	98.1		
1.042 0		0.307 7	0.450 0	0.760 8	100.7		
1.032 2		0.304 6	0.450 0	0.756 0	100.3		

表2 不同产地链荚豆中胡萝卜苷和 β -谷甾醇的含量(C)(n=3)

No.	胡萝卜苷		β -谷甾醇	
	C/mg·g ⁻¹	RSD/%	C/mg·g ⁻¹	RSD/%
南宁	0.108	3.8	0.298	3.5
柳州	0.247	2.9	0.621	2.7
桂林	0.195	3.0	0.495	2.6

胡萝卜苷和 β -谷甾醇均为极性小的化合物,但二者极性又有明显差别。为了选择合适的提取溶剂,采用回流提取方法,考察了石油醚、氯仿、丙酮、无水乙醇4种有机溶剂的提取效率。发现石油醚和氯仿适于 β -谷甾醇的提取,但不适于胡萝卜苷的提取;无水乙醇由于极性太大,提取的两种成分含量均低;只有丙酮提取样品中两种成分含量都较高。因此最终选择丙酮为提取溶剂。

在提取溶剂确定之后,又对提取方法,物料比,提取时间进行了单因素考察,最后确定了提取条件:取过40目筛的链荚豆粉末2g,加入16倍量的丙酮进行回流提取,提取时间为5h。

[参考文献]

- [1] 谢宗万. 全国中草药汇编. 下册[M]. 北京:人民卫生出版社, 1996: 766.
 [2] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草. 第

11卷[M]. 上海:上海科学技术出版社, 1999: 326.

- [3] 江苏省植物研究所,中国医学科学院药物研究所. 新华本草纲要[M]. 上海:上海科学技术出版社, 1988-1991:423
 [4] 彭莺,刘福祯,高欣. 天然植物甾醇的应用与提取工艺[J]. 化工进展, 2002, 21(1):49.
 [5] 钟建华,徐方正. 植物甾醇的特性、生理功能及应用[J]. 食品与药品, 2005, 7(2A):20.
 [6] LEE J H, LEE J Y, PARK J H, et al. Immunoregulatory activity by daucosterol, a β -sitosterol glycoside, induces protective Th1 immune response against disseminated Candidiasis in mice[J]. Vaccine, 2007, 25(19): 3834.
 [7] 闫雪生,徐新刚,李霞,等. HPLC-ELSD法测定柏子仁霜中胡萝卜苷的含量[J]. 中国药房, 2011, 22(15):1383.
 [8] 吴春蕾,焦涛,刘圆. HPLC-ELSD测定白花丹药材中的 β -谷甾醇[J]. 华西药学杂志, 2009, 24(6):661.
 [9] 刘圆,任朝琴. HPLC-ELSD法测定千斤拔的不同种和不同药用部位中 β -谷甾醇[J]. 中草药, 2008, 39(12):1891.
 [10] 许文林,沙鸥,钱俊红,等. 混合植物甾醇中豆甾醇和 β -谷甾醇的高效液相色谱分析[J]. 分析测试学报, 2003, 22(6):98.

[责任编辑 顾雪竹]

HPLC 测定复方西洋参泡腾片中人参皂苷 及维生素 C 的含量

王婴*, 王岩, 郭子扬, 钟志良, 叶国强
(广东药学院, 广州 510006)

[摘要] 目的:建立复方西洋参泡腾片中人参皂苷 Rg₁、Re、Rb₁ 及维生素 C 的含量测定方法。方法:采用高效液相色谱法,色谱柱为 Diamonsil C₁₈ 柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),人参皂苷及维生素 C 的流动相分别为乙腈-0.1% 磷酸溶液(梯度洗脱)和甲醇-0.1% 磷酸溶液(3:97),检测波长 203 nm 和 254 nm。结果:人参皂苷 Rg₁ 线性范围 0.050 4 ~ 1.26 μg,平均加样回收率 98.59%;人参皂苷 Re 线性范围 0.336 ~ 8.4 μg,平均加样回收率 99.11%;人参皂苷 Rb₁ 线性范围 1.052 ~ 26.3 μg,平均加样回收率 98.12%;维生素 C 线性范围 0.806 4 ~ 20.16 μg,平均加样回收率 97.50%。结论:建立的方法简便、重复性好、准确度高,可用于该产品的质量控制。

[关键词] 复方西洋参泡腾片; 高效液相色谱; 人参皂苷; 维生素 C

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2013)01-0122-04

Content Determination of Ginsenosides and Vitamin C in Compound Effervescent Tablets of Radix Panacis Quinquefolii by HPLC

WANG Ying*, WANG Yan, GUO Zi-yang, ZHONG Zhi-liang, YE Guo-qiang
(Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)

[Abstract] **Objective:** To establish the content determination method for ginsenoside Rg₁, ginsenoside Re, ginsenoside Rb₁ and vitamin C in Compound Effervescent Tablets of Radix Panacis Quinquefolii. **Method:** HPLC method was adopted. The chromatographic column was Diamonsil C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) column. The mobile phases were acetonitrile-0.1% phosphate solution (gradient elution) and methanol-0.1% phosphate solution (3:97) respectively. The detection wavelengths were set at 203 nm and 254 nm. **Result:** The concentration have good linear correlations within the range of 0.050 4-1.26 μg for notoginsenoside Rg₁, 0.336-8.4 μg for ginsenoside Re, 1.052-26.3 μg for notoginsenoside Rb₁ and 0.806 4-20.16 μg for vitamin C. The average recovery rates were 98.59%, 99.11%, 98.12% and 97.50% respectively. **Conclusion:** The method is simple, reproducible and accurate, and applicable for the quality control of the product.

[Key words] compound effervescent tablets of Radix Panacis Quinquefolii; HPLC; ginsenoside; vitamin C

复方西洋参泡腾片由西洋参、维生素 C、牛磺酸组方而成。西洋参中含有多种人参皂苷,具有滋阴降火、养胃生津、滋补提神等功效^[1]。西洋参提取物与维生素 C、牛磺酸合用,既能增强免疫力、缓解

体力疲劳,同时又能补充身体必须营养素。本研究采用高效液相色谱法测定复方西洋参泡腾片中人参皂苷 Rg₁、人参皂苷 Re、人参皂苷 Rb₁ 及维生素 C 的含量,为该制剂的质量控制提供依据。

1 仪器与试剂

LC-20AT 型高效液相色谱仪、SPD-20A 紫外检测器(日本岛津),Diamonsil C-18(2) 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm, 迪马科技),BP-211D 型电子分析天平(1/10 万,北京赛多利斯科学仪器有限公司)。人参皂苷对照品 Rg₁、人参皂苷对照品

[收稿日期] 20120727(017)

[基金项目] 广东省科技计划项目(粤科规划字[2012]145 号)

[通讯作者] * 王婴,硕士,实验师,从事药物新剂型与质量控制研究,Tel: 0760-88207937, E-mail: 1248322680@qq.com