

HPLC-ELSD 法测定艾可清胶囊中毛冬青皂苷甲的含量

卢元媛, 张玉虎, 黄建昌, 刘抗伦, 符林春, 胡英杰*

(广州中医药大学热带医学研究所药学研究室, 广州 510405)

[摘要] 目的: 建立艾可清胶囊中毛冬青皂苷甲的硅胶薄层色谱(TLC)鉴别方法和高效液相色谱-蒸发光散射(HPLC-ELSD)检测的含量测定方法。方法: 自药材中分离鉴定毛冬青皂苷甲; 确定 TLC 条件; 采用 ODS 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm)及保护柱, 以甲醇-0.2% 冰醋酸(67:33)为流动相, ELSD 检测器, 漂移管温度 95 °C, 载气流速 2.5 L·min⁻¹, 柱温 30 °C, 流速 1.0 mL·min⁻¹作为 HPLC 条件。结果: 设立的 TLC 条件可以从复方制剂中检出毛冬青皂苷甲; 建立的 HPLC 含量测定方法, 毛冬青皂苷甲在 1.92~9.60 μg 呈良好线性关系($r=0.9995$), 平均回收率为 99.85%, RSD 1.04%。结论: 建立的毛冬青皂苷甲的硅胶 TLC 鉴别方法和 HPLC-ELSD 含量测定方法具有操作快捷、方法准确的特点, 可作为毛冬青药材及其复方制剂的质量控制方法。

[关键词] 艾可清胶囊; 毛冬青皂苷甲; 薄层色谱; 高效液相色谱-蒸发光散射

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)17-0062-04

HPLC-ELSD Determination of Ilexsaponin A in Aikeqing Capsules

LU Yuan-yuan, ZHANG Yu-hu, HUANG Jian-chang, LIU Kang-lun, FU Lin-chun, HU Ying-jie*

(Tropical Medicine Institute, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a quality control method for identification and assay of ilexsaponin A for Aikeqing Capsules, a compound Chinese materia medica Radix Ilicis Pubescentis containing. **Method:** Ilexsaponin A was isolated and identified from the roots of *Ilex pubescens*. The Phenomenex Kromasil C₁₈(4.6 mm × 250 mm, 5 μm) column with a Phenomenex Security Guard C₁₈ guard column was used with methanol-0.2% acetic acid (67:33) as the mobile phase at a flow rate of 1.0 mL·min⁻¹. The drift tube temperature of ELSD was set at 95 °C, the gas flow was at 2.5 L·min⁻¹. **Result:** Ilexsaponin A was identified by silica gel TLC from the compound preparation of Chinese materia medica. The linear range of ilexsaponin A was 1.92-9.60 μg ($r=0.9995$), and its average recovery was 99.85% with RSD 1.04%. **Conclusion:** The methods established are rapid and accurate, and can be used for quality control on Radix Ilicis Pubescentis or its compound preparation.

[Key words] Aikeqing Capsules; ilexsaponin A; TLC; HPLC-ELSD

毛冬青 Radix Ilicis Pubescentis 为冬青科冬青属植物毛冬青 *Ilex pubescens* Hook et Am. 的干燥根, 是我国南方常用中药。具有活血通络、消肿止痛、清热解毒等功效, 主要化学成分有黄酮、三萜类^[1]。艾可清胶囊是广州中医药大学热带医学研究所研制的用于 HIV/AIDS 治疗的复方中药制剂, 由淫羊藿、虎杖、毛冬青、黄芩、甘草等 9 味药材组成, 具有补肾益气、活血解毒功效^[2-6]。本研究所曾开展毛冬青提取物实验治疗鼠逆转录病毒 (FLV) 感染小鼠的研究, 发现毛冬青提取物具有抑制 FLV 所致小鼠脾肿大

[收稿日期] 20110317(012)

[基金项目] 国家科技重大专项 (2008ZX10005-005, 2009ZX09103-414); 广东省科技计划项目 (2007A050100008); 科技部国际合作项目 (2008DFA32320)

[第一作者] 卢元媛, 研究实习员, 硕士, 研究方向: 中药新药研发, Tel: 020-36585422, E-mail: yy1980@tom.com

[通讯作者] * 胡英杰, 研究员, 博导, 研究方向: 中药新药研发, Tel: 020-36585143, Fax: 020-86373516, E-mail: yjhu01@126.com

的作用^[7]。毛冬青提取物作为艾可清胶囊的臣药组分,可将其纳入该复方制剂的质量标准。

1 仪器与试药

戴安(Dionex)高效液相色谱仪(P680泵、Alltech ELSD2000检测器、Ultimate3000进样器、TCC-100柱温箱、Chromeleon工作站),色谱柱Phenomenex Luna C₁₈(4.6 mm × 250 mm, 5 μm)。Sartorius 1/万电子分析天平(BS224S)。毛冬青皂苷甲对照品(自制,纯度>98%)。硅胶G购自青岛海洋化工厂分厂,层析硅胶(200~300目,青岛海洋化工厂),乙腈及甲醇为色谱纯(DIKMA TECHNOLOGIC INC.),水为自制超纯水,其他试剂均为分析纯。艾可清胶囊(自制,批号20080606,20080712,20080722)及毛冬青阴性对照样品(按处方除去毛冬青药材后同法制剂)为自制。

2 方法与结果

2.1 毛冬青皂苷甲的提取分离鉴定 取毛冬青药材2 kg,粉碎,加10倍量80%乙醇加热回流提取两次,每次2 h,滤过,合并滤液,减压回收乙醇至浸膏。浸膏加少量甲醇-丙酮溶解,拌入100~200目硅胶粉,晾干,上硅胶柱。用氯仿-甲醇梯度洗脱,比例依次为99:1,95:5,90:10,80:20。收集洗脱液,用TLC法跟踪检测,合并相同流份,收集氯仿-甲醇95:5洗脱流份,经重复柱层析得一个单体化合物,为白色无定型粉末,mp 288 °C(分解),将其¹³C-NMR核磁共振数据与文献报道的3β,19α-二羟基-乌斯-12-烯-24,28-二羧酸甲酯(毛冬青皂苷甲昔元-24,28-二甲酯)^[8-9]相对照,确定该成分为3β,19α-二羟基-乌斯-12-烯-24,28-二羧酸-28-O-β-D-葡萄糖酯(毛冬青皂苷甲,英文名ilexsaponin A或ilexsaponin A1)^[8]。¹³C-NMR δ(100 MHz, C₅D₅N,多重度由DEPT技术确定)数据如下:38.7(C-1, CH₂), 28.1(C-2, CH₂), 76.8(C-3, CH), 48.1(C-4, C), 55.5(C-5, CH), 19.9(C-6, CH₂), 32.8(C-7, CH₂), 39.7(C-8, C), 46.1(C-9, CH), 37.0(C-10, C), 23.4(C-11, CH₂), 127.2(C-12, CH₂), 138.2(C-13, C), 40.1(C-14, C), 27.9(C-15, CH₂), 25.2(C-16, CH₂), 47.4(C-17, C), 53.3(C-18, CH), 71.7(C-19, CH), 41.3(C-20, CH), 25.8(C-21, CH₂), 36.6(C-22, CH₂), 23.7(C-23, CH₃), 177.7(C-24, COOH), 13.4(C-25, CH₃), 16.4(C-26, CH₃), 23.9(C-27, CH₃), 177.7(C-28, C), 26.4

(C-29, CH₃), 16.3(C-30, CH₃), 94.1(C-1', CH), 72.3(C-2', CH), 76.8(C-3', CH), 69.6(C-4', CH), 77.6(C-5', CH), 60.7(C-6', CH₂)。含量经HPLC(归一化法)测得为99.0%。

2.2 毛冬青皂苷甲的薄层鉴定 取艾可清胶囊内容物2 g,加水20 mL,加热使溶解,放冷,加正丁醇振荡提取3次,每次20 mL,合并正丁醇液,减压蒸干,残渣加甲醇5 mL使溶解,作为供试品溶液。取毛冬青皂苷甲对照品,加甲醇制成1 g·L⁻¹含1 mg的溶液,作对照品溶液。另取毛冬青阴性对照品同法制成阴性对照溶液。照薄层色谱法(《中国药典》一部2005年版附录VI B)试验,吸取供试品溶液及对照品溶液10 μL,对照品溶液5 μL,分别点于同一块硅胶G薄层板上,以三氯甲烷-甲醇-乙酸(9:1:0.1)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以3%香草醛-6%高氯酸溶液,在105 °C加热至斑点显色清晰。供试品色谱中,在与对照品色谱相应的位置上,显相同颜色的斑点。毛冬青阴性样品无干扰。

2.3 毛冬青皂苷甲的含量测定

2.3.1 色谱条件与系统适应性试验 Phenomenex Luna C₁₈色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),柱温30 °C,流动相甲醇-0.2%冰醋酸(65:35),流速1.0 mL·min⁻¹。检测器为蒸发光散射检测器,漂移管温度95 °C,载气流速2.5 L·min⁻¹。理论板数按毛冬青甲昔峰计算不低于1 500。

2.3.2 对照品溶液的制备 取毛冬青甲昔对照品适量,精密称定,加甲醇制成每1 mL含0.5 mg的溶液,即得。

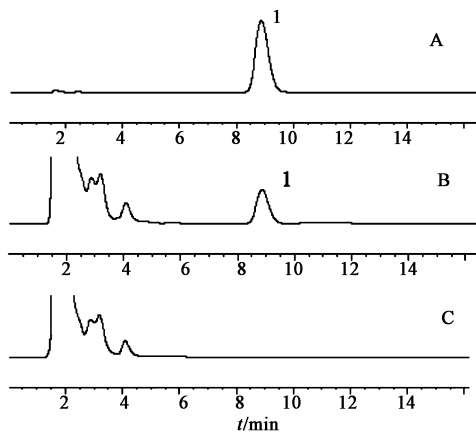
2.3.3 供试品溶液的制备 取本品内容物0.5 g,精密称定,置50 mL量瓶中,加甲醇45 mL超声30 min,冷却至室温,加甲醇定容至刻度,摇匀,滤过,即得。

2.3.4 阴性对照样品溶液 依据处方制备缺毛冬青的复方制剂,再按供试品溶液的制备方法制备毛冬青阴性对照样品溶液。

2.3.5 测定法 分别精密吸取对照品溶液10,20 μL及供试品溶液20 μL,注入液相色谱仪,测定。即得。

2.3.6 专属性验证 取供试品溶液、对照品溶液及毛冬青阴性对照样品溶液各10 μL,按上述色谱条件测定。比较色谱图,可见阴性对照无干扰;供试品色谱中,在与对照品色谱相应的保留时间位置上有

相应的色谱峰,并且与其他峰有明显的分离(图 1)。



1. 毛冬青皂苷甲; A. 毛冬青皂苷甲对照品;
B. 艾可清供试品; C. 毛冬青阴性对照样品

图 1 艾可清色谱

2.3.7 线性关系 吸取对照品溶液 4, 6, 8, 12, 16, 20 μL , 注入色谱仪并记录色谱图, 以进样量 (μg) 的自然对数值为横坐标, 峰面积值的自然对数值为纵坐标, 进行线性回归, 回归方程 $Y = 1.6992X - 0.9171$ ($r = 0.9995$)。结果表明毛冬青皂苷甲在 1.92 ~ 9.60 μg 呈良好线性关系。

2.3.8 精密度试验 取对照品溶液, 连续进样 6 次, 记录峰面积, RSD 0.51%, 说明进样精密度良好。

2.3.9 稳定性试验 分别于 0, 2, 4, 6, 8, 12 h 精密吸取供试品(批号 20080606) 溶液 10 μL , 进样, 测定毛冬青皂苷甲的峰面积, 结果峰面积 RSD 0.80%。表明供试品溶液在 12 h 内稳定。

2.3.10 重复性试验 精密称取同批供试品 6 份(批号 20080606), 测定。结果平均含量为 10.9 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, RSD 1.90%, 表明方法重复性良好。

2.3.11 加样回收率试验 取已知含量(毛冬青皂苷甲 10.9 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$) 的艾可清胶囊内容物(批号 20080606) 约 0.2 g, 精密称定, 按低、中、高质量浓度分别精密加入毛冬青皂苷甲, 依法制备供试液, 测定, 毛冬青皂苷甲的回收率为 99.85%, RSD 1.04%。表明方法回收率良好(表 1)。

2.4.12 样品测定 取供试品 3 批制成供试品溶液, 取供试品溶液 20 μL , 依法测定, 3 批(批号 20080606, 20080712, 20080722) 样品中毛冬青皂苷甲质量分数分别为 (10.89 \pm 0.04), (11.23 \pm 0.03), (10.46 \pm 0.06) $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

3 讨论

1977 年版《中国药典》收录的毛冬青药材、卫生

表 1 毛冬青皂苷甲加样回收率试验

称样量 /g	样品中含 量/mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
0.2011	2.19	1.8	4.02	101.56		
0.2006	2.19	1.8	3.98	99.64		
0.2022	2.20	1.8	3.97	98.11		
0.2008	2.19	2.2	4.38	99.60		
0.2025	2.21	2.2	4.42	100.58	99.85	1.04
0.2001	2.18	2.2	4.39	100.41		
0.2016	2.20	2.6	4.78	99.33		
0.2014	2.20	2.6	4.81	100.57		
0.2009	2.19	2.6	4.76	98.85		

部部颁标准收载的毛冬青胶囊 (WS. B-1290-93) 都是采用显色反应作为鉴别依据, 制剂含量测定是以芦丁为对照的总黄酮比色法, 在质量控制方面缺乏专属性。本实验分离鉴定毛冬青药材的专属性指标成分毛冬青皂苷甲作为对照品, 进行含毛冬青复方制剂的薄层鉴别和 HPLC 含量测定, 针对性较强。由于毛冬青皂苷甲紫外吸收非常弱, 宜采用蒸发光散射检测器进行检测。在样品的预处理时, 先后采用了超声提取、回流提取等方法制备供试品, 通过比较提取液含量, 结果表明提取效果无明显差异, 故采用较简便的超声提取; 再比较了制备供试液的溶媒稀乙醇、无水乙醇和甲醇, 结果显示以甲醇为溶剂提取毛冬青皂苷甲含量最高。通过本实验建立的质控方法具有专属性高、准确性与重复性好、操作便捷的特点, 适用于毛冬青药材及其复方中药制剂的质量控制。

[参考文献]

- [1] 江苏新医学院. 中医药大辞典. 上册. [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1977: 441.
- [2] 张奉学, 邓文娣, 胡英杰, 等. 中药艾可清体外抑制猴免疫缺陷病毒活性的观察[J]. 广州中医药大学学报, 1999, 16(2): 127.
- [3] 马伯艳, 符林春, 蔡卫平, 等. 艾可清胶囊治疗 HIV 感染者的临床疗效分析[J]. 中医杂志, 2007, 48(12): 1092.
- [4] 马伯艳, 符林春, 蔡卫平, 等. 艾可清胶囊对高效抗病毒逆转录疗法的增效减毒作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2007, 13(8): 60.
- [5] 马伯艳, 符林春, 蔡卫平, 等. 艾可清胶囊联合高效抗病毒逆转录疗法治疗艾滋病临床观察[J]. 广州中医药大学学报, 2007, 24(6): 466.

RP-HPLC 测定栀子金花丸中芒果苷的含量

温金莲,周清,宋粉云*
(广东药学院药,广州 510006)

[摘要] 目的:建立栀子金花丸中芒果苷的含量测定方法。方法:采用反相高效液相色谱法,Diamonsil-C₁₈柱,乙腈-0.2%磷酸水溶液(13:87)为流动相,流速 1.0 mL·min⁻¹,检测波长 258 nm,柱温 35 °C。结果:芒果苷质量浓度在 5.1~30.6 mg·L⁻¹具有良好的线性关系($r=0.9996$),芒果苷平均回收率为 99.0%,方法精密度 RSD 1.7% ($n=6$)。结论:该法可用于栀子金花丸中芒果苷的含量测定。

[关键词] 栀子金花丸;芒果苷;反相高效液相色谱法;含量测定

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2011)17-0065-03

Determination of Mangiferin in Zhizi Jinhua Wan by RP-HPLC

WEN Jin-lian, ZHOU Qing, SONG Fen-yun*
(Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)

[Abstract] **Objective:** To establish the method for determination of mangiferin in Zhizi Jinhua Wan. **Method:** An RP-HPLC method was established. The chromatographic column was Diamonsil-C₁₈. The mobile phase was a mixture of acetonitrile -0.2% phosphoric acid (13:87). The flow rate was 1.0 mL·min⁻¹ and the detection wavelength was 258 nm. **Result:** The linear range of mangiferin was 5.1-30.6 mg·L⁻¹ ($r=0.9996$). The average recovery for mangiferin was 99.0%, precision of the method was 1.7% (RSD, $n=6$). **Conclusion:** The method can be used for quantitative determination of the preparation.

[Key words] Zhizi Jinhua Wan; mangiferin; RP-HPLC; assay

栀子金花丸是由栀子、知母、黄芩、黄连、黄柏等 8 味药材制成的中药成方制剂,具有清热泻火、凉血解毒之功效。临床用于肺胃热盛,口舌生疮,牙龈肿痛,目赤眩晕,咽喉肿痛,吐血衄血,大便秘结等的治

疗。其现行标准采用 HPLC 测定栀子苷的含量^[1]。HPLC 测定黄芩苷、栀子苷、绿原酸等含量的报道^[2-6],但芒果苷的含量测定未见报道。知母为方中主药,其化学成分主要有甾体皂苷、双苯吡酮类、木

[收稿日期] 20110312(005)

[基金项目] 广东省自然科学基金项目(5002841)

[第一作者] 温金莲,副教授,本科,研究方向:药物分析,Tel:18928842938,E-mail:jinlianwen@126.com

[通讯作者] *宋粉云,教授,研究生,研究方向:药物分析,Tel:13660528126,E-mail:fuhaiwu@163.com

[6] 符林春,胡英杰. 预防和治疗艾滋病的药物组合物、制备方法和用途. 中国[P];ZL 200610123956.6.

[7] 冯鹰,符林春,肖凤仪. 毛冬青对小鼠逆转录病毒感染模型脾大症治疗机制的研究[J]. 江苏中医药,2007,39(11):85.

[8] 秦国伟,陈政雄,徐任生,等. 毛冬青化学成分的研究

II. 毛冬青皂苷甲的化学结构[J]. 化学学报,1987,45(3):249.

[9] Ngounou F N, Lontsi D, Sondengam B L. A pentacyclic triterpene diacid from *Myrianthus arboreus* [J]. Phytochem, 1988, 27(7):2287.

[责任编辑] 蔡仲德