

# 救必应酸的单体制备及RP-HPLC法测定救必应药材及精制品中3种活性成分的含量

王圆<sup>1\*</sup>,高兵<sup>1</sup>,陈华<sup>2</sup>,张雷<sup>1#</sup>(1.华南理工大学生物科学与工程学院,广州 510006;2.广东省药品检验所,广州 510180)

中图分类号 R284.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)03-0326-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.03.09

**摘要** 目的:制备高纯度的救必应酸并测定救必应药材及精制品中3种活性成分紫丁香苷、长梗冬青苷、救必应酸的含量。方法:采用醇提法制备救必应皂苷,以甲醇和氢氧化钠进一步水解,并经重结晶后得到救必应酸单体。采用反相高效液相色谱(RP-HPLC)法测定救必应药材及精制品1和精制品2中紫丁香苷、长梗冬青苷、救必应酸的含量。色谱柱为Agilent XDB C<sub>18</sub>,流动相为水-乙腈(梯度洗脱),柱温为30℃,流速为1.2 mL/min,检测波长为210 nm,进样量为10 μL。结果:所制救必应酸纯度达99%以上。紫丁香苷、长梗冬青苷、救必应酸进样量分别在0.18~3.22、0.59~10.36、0.20~3.53 μg范围内与各自峰面积积分值呈良好线性关系( $r$ 均为0.999 9),精密性、稳定性(24 h)、重复性试验的RSD均小于2.0%( $n=6\sim7$ ),平均加样回收率为96.08%~100.81%(RSD≤1.98%, $n=6$ )。紫丁香苷、长梗冬青苷、救必应酸的含量在救必应药材中分别为1.61%、7.26%、1.29%(RSD≤1.08%, $n=3$ ),在精制品1中分别为0.8259%、4.18%(RSD≤1.67%, $n=3$ );在精制品2中分别为0.7329%、7.41%(RSD≤1.15%, $n=3$ )。结论:所制救必应酸纯度高、制备方法简单且安全环保。建立的RP-HPLC法简单、可靠,可满足快速测定救必应药材及其精制品含量的要求。

**关键词** 救必应;紫丁香苷;长梗冬青苷;救必应酸;制备;反相高效液相色谱法

考察,确定了HPD100型大孔吸附树脂分离纯化TSTR的效果比较理想,通过梯度洗脱,先采用低浓度30%乙醇溶液洗去极性较大的杂质,然后再用75%乙醇溶液洗脱获得纯度为52.47%的TSTR。由于30%乙醇洗脱液中含有一定量的皂苷,故将30%乙醇洗脱液收集,浓缩,80℃烘干后得到干膏,用于进一步的分离纯化研究。从结果上分析,TSTR的含量由原来的干膏中的30.82%提高到洗脱物中的52.47%,纯化工艺稳定可行。

综上分析,HPD100型大孔吸附树脂对TSTR具有良好的纯化性能,且工艺条件稳定,可为TSTR的工业化生产提供理论参考,同时也为TSTR类物质的分离、鉴定及其应用研究提供了依据。

## 参考文献

- [1] 张玉玲,赵波,陈建双,等.赤菴根镇痛作用及有效部位研究[J].时珍国医国药,2010,21(10):2483-2484.
- [2] 刘永平,陈建双,张玉玲,等.赤菴根总皂苷镇痛作用研究[J].辽宁中医杂志,2011,38(5):993-995.
- [3] 陈建双,于海荣,张玉玲,等.赤菴根总皂苷对类风湿性关节炎大鼠血清细胞因子的影响[J].时珍国医国药,2012,23(5):1097-1098.
- [4] 刘永平,陈建双,赵波,等.赤菴根总皂苷对实验性佐剂性关节炎镇痛作用的研究[J].辽宁中医杂志,2011,38(8):1659-1661.

\* 硕士研究生。研究方向:医药生物。电话:020-39380678。E-mail:yuanyuan03\_03@163.com

# 通信作者:教授,博士生导师。研究方向:新药创制与开发、医药生物学。电话:020-39380678。E-mail:lzhangce@scut.edu.cn

- [5] 祝晴晴,梅爱敏,刘永平,等.赤菴根总皂苷对类风湿性关节炎大鼠NF- $\kappa$ B p65和IL-6表达的影响[J].中药药理与临床,2015,31(6):62-66.
- [6] 刘春楠,洪文婷,祝晴晴,等.不同产地赤菴根中总皂苷含量的比较分析[J].承德医学院学报,2015,32(5):371-373.
- [7] 刘敏彦,王玉峰,叶晓红,等. HPD300型大孔吸附树脂纯化白芍总苷的工艺研究[J].中国医院药学杂志,2010,30(3):201-204.
- [8] 赵惠茹,龙静,杨黎彬,等. HPD-300大孔吸附树脂对山茱萸总皂苷分离工艺的优化[J].中成药,2014,36(2):416-419.
- [9] 黄怀鹏,刘彩霞,高国领,等.大孔树脂纯化积雪草总苷的工艺研究[J].中药材,2008,31(7):1072-1074.
- [10] 陈红专,张静. AB-8大孔树脂分离纯化积雪草总苷的工艺研究[J].中医药信息,2011,28(2):33-35.
- [11] 王晓林,李珍,钟方丽.大孔树脂法纯化玉竹总皂苷的工艺研究[J].食品科学,2012,33(18):83-87.
- [12] 王辉,何伟,任军.大孔吸附树脂纯化人参皂苷类成分的工艺研究[J].中国药房,2009,20(24):1865-1867.
- [13] 郭婵元,杨小明,马海乐,等.大孔树脂分离纯化宣木瓜总皂苷[J].食品工业科技,2015,36(1):140-143.
- [14] 金乾兴,李艳芳,杨洁红,等.大孔树脂吸附法优化分离纯化黄芪总皂苷的实验研究[J].中华中医药学刊,2014,32(11):2599-2601.
- [15] 彭青,李晓刚,刘亚明.大孔吸附树脂研究进展[J].实用中医药杂志,2013,29(5):409-412.

(收稿日期:2017-04-09 修回日期:2017-12-11)

(编辑:刘明伟)

# Preparation of Rotundic Acid Monomer and Content Determination of 3 Components in *Ilicis rotundae* and Its Refined Products by RP-HPLC

WANG Yuan<sup>1</sup>, GAO Bing<sup>1</sup>, CHEN Hua<sup>2</sup>, ZHANG Lei<sup>1</sup> (1.School of Bioscience and Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China; 2.Guangdong Institute for Drug Control, Guangzhou 510180, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To prepare high-purity rotundic acid, and to determine the contents of syringoside, pedunculoid and rotundic acid in *Ilicis rotundae* and its refined products. METHODS: *I. rotundae* saponins was prepared by ethanol extraction method and hydrolyzed with methanol and sodium hydroxide; rotundic acid monomer was obtained after recrystallization. The contents of syringoside, pedunculoid and rotundic acid in *I. rotundae*, its refined product 1 and its refined product 2 were determined by RP-HPLC. The determination was performed on an Agilent XDB C<sub>18</sub> column with mobile phase consisted of water-acetonitrile (gradient elution) at the flow rate of 1.2 mL/min. The column temperature was 30 °C, and the detection wavelength was set at 210 nm. The sample size was 10 μL. RESULTS: The purity of rotundic acid exceeded 99%. The linear ranges of syringing, pedunculoid and rotundic acid were 0.18-3.22, 0.59-10.36 and 0.20-3.53 μg, respectively ( $r=0.9999$ ). RSDs of precision, stability (24 h) and reproducibility tests were all lower than 2.0% ( $n=6-7$ ). The average recoveries were 96.08%-100.81% (RSD≤1.98%,  $n=6$ ). The contents of syringoside, pedunculoid and rotundic acid in *I. rotundae* were 1.61%, 7.26%, 1.29% (RSD≤1.08%,  $n=3$ ); those of refined product 1 were 0, 82.59%, 4.18% (RSD≤1.67%,  $n=3$ ); those of refined product 2 were 0, 73.29%, 7.41% (RSD≤1.15%,  $n=3$ ), respectively. CONCLUSIONS: Prepared rotundic acid has high purity and is simple in preparation, safe and environmentally-friendly. RP-HPLC method that established is simple and reliable, and can meet the requirements for rapid analysis of *I. rotundae* and its refined products.

**KEYWORDS** *Ilicis rotundae*; Syringoside; Pedunculoid; Rotundic acid; Preparation; RP-HPLC

救必应(*Ilicis rotundae* Cortex)为冬青科植物铁冬青(*Ilex rotunda* Thunb)的干燥树皮,收载于2015年版《中国药典》(一部)<sup>[1]</sup>。现代药理学研究表明,救必应药材中的活性成分分别为紫丁香苷、长梗冬青苷、救必应酸,在治疗心血管疾病<sup>[2-4]</sup>、抗肿瘤<sup>[5-7]</sup>、消肿止痛<sup>[8-10]</sup>等方面具有明显作用。在已报道的文献中,从救必应药材中采用水解和柱层析法精制得到救必应酸,总收率约为5%<sup>[6]</sup>。另在分析研究中,已报道的采用高效液相色谱(HPLC)法测定救必应药材中紫丁香苷、长梗冬青苷、救必应酸、丁香脂素4'-*O*-β-*D*-吡喃葡萄糖苷4种成分的含量的方法分析时间较长,救必应酸的出峰时间在40 min后,且流动相中的无机酸可能造成救必应苷的水解而影响含量测定准确性<sup>[11-12]</sup>。文献中纯化救必应酸过程采用硅胶分离方法,操作较为烦琐,展开剂使用量大<sup>[6]</sup>。本研究改善制备工艺以制备救必应酸单体,并进一步优化含量测定的HPLC条件,为药材及精制品中紫丁香苷、长梗冬青苷、救必应酸含量测定提供更准确、快速的评价方法。

## 1 材料

### 1.1 仪器

1200型HPLC仪(美国Agilent公司);SB-3200DT型超声波清洗仪(宁波新芝生物科技股份有限公司);TP-114型电子天平[丹佛仪器(北京)有限公司];Quattro Micro API型三重四级杆串联质谱仪(美国Waters公司);600 MHz Advance型核磁共振(NMR)波谱仪(德国Bruker公司)。

### 1.2 药材与试剂

救必应药材(广州清平药材市场,经中山大学药学院苏薇薇教授鉴定为冬青科植物铁冬青*Ilex rotunda* Thunb.的干燥树皮,密封干燥常温保存);紫丁香苷对照品(批号:111574-201504,纯度:94.9%)、长梗冬青苷对照品(批号:11868-201001,纯度:89.3%)均购自中国食品药品检定研究院;救必应酸为华南理工大学生物科学与工程学院医药生物学实验室自制(面积归一化法检测质量分数大于99%);采用甲醇溶剂降温重结晶方法代替文献[6]中的硅胶柱层析方法得到救必应精制品1;采用甲醇饱和溶液加水析晶方法代替文献[6]中的硅胶柱层析方法得到救必应精制品2(华南理工大学生物科学与工程学院医药生物学实验室自制);乙腈为色谱纯(德国Merck公司);水为超纯水;其余试剂均为化学纯。

## 2 方法与结果

### 2.1 救必应酸的制备及结构确证

按文献[6]的提取工艺得到救必应皂苷。将10.0 g救必应皂苷先后溶解于20 mL甲醇和100 mL的2 mol/L的氢氧化钠溶液中,回流反应2 h。然后用盐酸酸化反应液,静置过滤。向滤渣中加入30 mL水和10 mL乙醇,在50 °C下重结晶2次,干燥得救必应酸。采用Quattro Micro API型三重四级杆串联质谱仪和600 MHz Advance型NMR波谱仪确证救必应酸的结构,并测定其纯度。救必应酸的高分辨质谱图见图1。

电喷雾电离质谱(ESI-MS)显示准分子离子峰,其质荷比 $m/z$ 为511.3405([M+Na]<sup>+</sup>,理论值为511.3412),纯化产物核磁共振氢谱(<sup>1</sup>H-NMR)和核磁共振碳谱

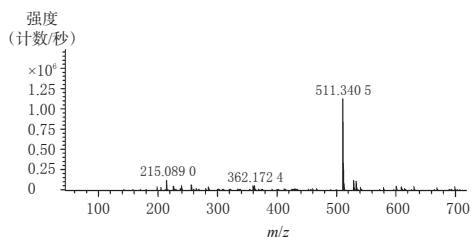


图1 救必应酸的高分辨质谱图

Fig 1 High resolution mass spectrometry of rotundic acid

$^{13}\text{C-NMR}$ 核磁数据与文献中数据对照一致<sup>[13]</sup>。经面积归一化法得出自制救必应酸纯度达99.0%。本研究采用重结晶方法代替文献[6]中硅胶分离法,操作更简单,同时还能减少展开剂使用。同时救必应酸单体在甲醇中溶解度大,向甲醇溶液中加水后会析出救必应酸,方便纯化。另外,采用17%甲醇回流,相比较文献30%乙醇,有机溶剂使用量减少,符合环保的要求。

## 2.2 反相高效液相色谱(RP-HPLC)法测定紫丁香苷、长梗冬青苷、救必应酸含量

**2.2.1 混合对照品溶液制备** 取紫丁香苷对照品、长梗冬青苷对照品、救必应酸对照品适量,精密称定,加甲醇配制含紫丁香苷0.09 mg/mL、长梗冬青苷0.30 mg/mL、救必应酸0.10 mg/mL的混合对照品溶液。

**2.2.2 供试品溶液制备<sup>[1]</sup>** 取适量干燥的救必应药材粉碎,过3号筛。精密称定0.1 g粉末,加入甲醇25 mL,超声(功率:180 W,频率:40 kHz)提取30 min,待冷却后用甲醇补充超声前后的差量,滤过,取续滤液即得。

**2.2.3 色谱条件与系统适用性考察** 色谱柱:Agilent XDB C<sub>18</sub>(250 mm×4.6 mm, 5 μm);柱温:30 ℃;流动相:水(A)-乙腈(B),梯度洗脱(0~5 min, 10%~12% B; 5~20 min, 12%~50% B; 20~30 min, 50% B);流速:1.2 mL/min;检测波长:210 nm;进样量:10 μL。取“2.2.1”“2.2.2”项下溶液进样分析,结果显示,其他成分对紫丁香苷、长梗冬青苷、救必应酸的测定无干扰。理论板数以3种待测成分计均大于3 000,且紫丁香苷、长梗冬青苷、救必应酸与相邻峰分离度均大于1.5。对照品和供试品的色谱图见图2。

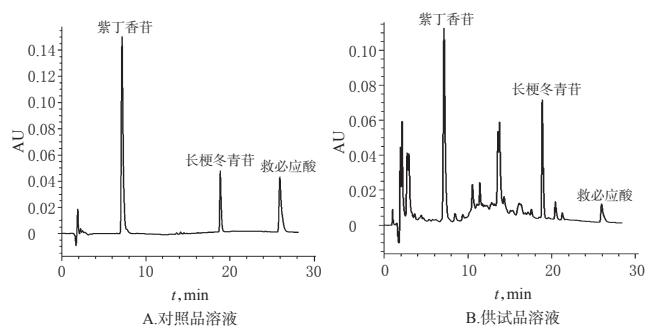


图2 高效液相色谱图

Fig 2 HPLC chromatograms

**2.2.4 线性关系考察** 分别吸取2、5、10、15、20、25、30、35 μL混合对照品溶液进样测定。以进样量(μg)为横坐标(x)、峰面积为纵坐标(y)进行线性回归,得紫丁香苷、长梗冬青苷、救必应酸的回归方程分别为 $y=1\ 606.92x+53.85$ 、 $y=172.44x+0.52$ 、 $y=248.21x-1.97$ ( $r$ 均为0.999 9)。结果表明,紫丁香苷、长梗冬青苷、救必应酸检测进样量线性范围为0.18~3.22、0.59~10.36、0.20~3.53 μg。

**2.2.5 定量限与检测限考察** 将对照品溶液逐步稀释,进样。在信噪比为10时测定紫丁香苷、长梗冬青苷、救必应酸的定量限分别为14.2、95.0、176.9 ng,在信噪比为3时测得3种物质的检测限分别为4.1、49.4、67.3 ng。

**2.2.6 精密度的试验** 重复进样混合对照品溶液6次,记录3种成分的峰面积,并计算RSD。结果,紫丁香苷、长梗冬青苷、救必应酸峰面积RSD分别为1.22%、0.63%、0.94%( $n=6$ ),表明仪器精密度良好。

**2.2.7 重复性试验** 精密称量6份药材粉末,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,进样测定3种成分的量。结果,紫丁香苷、长梗冬青苷、救必应酸的质量分数平均值分别为1.61%、7.24%、1.30%( $n=6$ ),对应RSD分别为0.83%、1.54%、1.97%( $n=6$ ),表明方法重复性良好。

**2.2.8 稳定性试验** 取同一供试品溶液室温放置。分别于0、2、4、8、12、16、24 h进样测定。结果,紫丁香苷、长梗冬青苷、救必应酸含量的RSD分别为0.47%、0.96%、0.41%( $n=7$ ),表明供试品溶液在24 h内稳定。

**2.2.9 加样回收率试验** 平行称量6份已知含量的救必应药材0.1 g,根据救必应药材中3种成分的含量分别加入一定量的单个对照品溶液,按“2.2.2”项下制备供试品溶液。进样测定3种成分的含量,计算加样回收率。结果,紫丁香苷、长梗冬青苷、救必应酸的平均加样回收率分别为98.90%、100.81%、96.08%( $n=6$ ),RSD分别为1.72%、1.55%、1.98%( $n=6$ ),表明本法测定准确度良好,符合含量测定要求。

**2.2.10 样品测定** 取救必应药材、精制品1和精制品2制备的供试品溶液,按“2.2.3”项下色谱条件进行测定,以外标法计算各样品中紫丁香苷、长梗冬青苷、救必应酸的量,结果见表1。

由表1可见,救必应药材中紫丁香苷、长梗冬青苷、救必应酸含量分别为1.61%、7.26%、1.29%。与救必应药材比较,精制品1和精制品2中均未检测到紫丁香苷成分,长梗冬青苷、救必应酸因精制工艺不同而含量不同。

## 3 讨论

本研究优化了救必应酸提取纯化方法和3种成分含量测定的RP-HPLC方法,采用重结晶方法代替普通硅胶柱分离救必应酸成分,减少展开剂使用,工艺更简单;回流提取过程采用17%甲醇代替30%乙醇。本研究是

表1 救必应药材及其精制品中紫丁香苷、长梗冬青苷、救必应酸的含量测定结果(n=3)

Tab 1 Content determination of syringin, pedunculside and rotundic acid in *I. rotundae* and its refined products(n=3)

样品	紫丁香苷,%			长梗冬青苷,%			救必应酸,%		
	测定值	平均值	RSD	测定值	平均值	RSD	测定值	平均值	RSD
救必应	1.62	1.61	0.86	7.24	7.26	0.31	1.29	1.29	1.08
	1.61			7.29			1.29		
	1.59			7.27			1.31		
精制品1	0	0	0	82.22	82.59	0.79	4.15	4.18	1.67
	0			83.34			4.26		
	0			82.21			4.13		
精制品2	0	0	0	73.12	73.29	0.23	7.44	7.41	1.15
	0			73.29			7.47		
	0			73.46			7.31		

通过救必应提取纯化制备救必应酸单体作为研究对象,意在开发救必应酸这一单体药物(化学1.1类新药),提取工艺研究中使用的甲醇。将在后续制备产品过程中检查甲醇残留量,使之符合国家规范。救必应酸制备过程中筛选了不同的提取溶液。救必应酸在甲醇中溶解度大,且在后续处理过程中在加入水后会析出救必应酸,方便纯化救必应酸单体。另甲醇基本可以100%回收利用,符合环保的要求,故在制备中选用甲醇为提取液。

为改善色谱峰形状,文献[12]中采用了加入无机酸的方法。本文建立的RP-HPLC方法则将文献中流速1.0 mL/min 提高为1.2 mL/min,既能起到改善峰形作用,又能缩短分析时间,所有成分可在30 min内完成含量测定。

采用精制工艺获得的救必应精制品作为纯化救必应酸的原料,在精制过程中通过碱水解、抗溶剂化结晶方法去除紫丁香苷成分,所以精制品中紫丁香苷成分含量为0。虽然长梗冬青苷和救必应酸的含量因精制工艺而明显不同,但是工艺稳定性很好。大多数研究多以紫丁香苷、长梗冬青苷两种成分的含量评价救必应药材及其制剂的质量<sup>[1,14-15]</sup>。救必应酸作为药材中治疗心血管疾病的活性成分,且为长梗冬青苷在体内的水解产物,因此也应控制其在救必应药材及其制剂中的含量。2015年版《中国药典》(一部)规定救必应药材中紫丁香苷、长梗冬青苷含量不得少于1.0%、4.5%,并未规定救必应酸的含量。不同产地救必应药材中救必应酸的含量差别大,所以设定药材和制剂中救必应酸含量的最低限度还需大量测定不同产地救必应药材,并依据药材或制剂的药效确定。本研究建立的RP-HPLC法满足同时测定紫丁香苷、长梗冬青苷、救必应酸含量的需要,方法快速准确、重复性好,为救必应药材和制剂的质量控制

提供了科学的依据。

本试验尚未比较经不同的提取精制工艺后长梗冬青苷、救必应酸的含量变化,下一步计划设计多种工艺比较二者的含量差异;另外,计划通过体内外试验探讨救必应酸单体在治疗心血管疾病方面的活性,为开发救必应酸单体药物奠定试验基础。

### 参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:312-313.
- [2] 董艳芬,梁燕玲,罗集鹏.救必应不同提取物对血压影响的实验研究[J].中药材,2006,29(2):172-174.
- [3] 谭晓斌,贾晓斌,沈明勤,等.结合药效的刺五加纯化工艺优选[J].中国药房,2007,18(12):902-904.
- [4] 赵全成.救必应药物组合物及其用途:中国,201010607-550.1[P]. 2011-06-01.
- [5] LEE TH, JUANG SH, HSU FL, et al. Triterpene acids from the leaves of planchonella duclitan (Blanco) Bakhui-zan [J]. *J Chin Chem Soc*, 2005, 52(6):1275-1280.
- [6] 赫玉芳.救必应酸的制备及其衍生物的设计、合成和抗肿瘤活性研究[D].长春:吉林大学,2013.
- [7] 许睿.救必应化学成分研究及抗肿瘤活性成分初步筛选[D].广州:广州中医药大学,2009.
- [8] 张丽芬,刘志承,索娟,等.活血舒筋贴膏剂的质量标准研究[J].中国药房,2011,22(11):1012-1014.
- [9] 常艳茹,南敏伦,赵昱玮,等.救必应化学成分及药理活性研究进展[J].黑龙江医药,2015,28(1):11-14.
- [10] 黄闻健.救必应的民间应用[J].江西中医药,1996(2):147.
- [11] 顾利红,毕福钧,陈嵩.不同来源救必应药材的质量评价[J].中草药,2013,44(5):622-625.
- [12] 朱锦萍,杨宝,杨滔,等. HPLC法同时测定救必应药材中4种成分的含量[J].中药新药与临床药理,2015,26(4):558-560.
- [13] NAKATANI M, HATANAKA S, KOMURA H, et al. The structure of rotungenoside, a new bitter triterpene gluco-side from *Ilex rotunda*[J]. *Bull Chem Soc Jpn*, 1989, 62(2):469-473.
- [14] 王军宪,张元媛,贾晓妮,等. HPLC法测定救必应药材中紫丁香苷的含量[J].药物分析杂志,2008,28(5):788-789.
- [15] 王晓博,张俏,曹爱兰,等.铁冬青不同产地不同部位质量分析[J].中南药学,2016,14(7):728-730.

(收稿日期:2017-04-05 修回日期:2017-11-30)

(编辑:余庆华)