

通关藤药材 C21 甾体皂苷类成分特征图谱研究

李媛媛¹,倪艳²,李先荣²,卢方晋²,石任兵^{1*}

(1. 北京中医药大学,北京 100102; 2. 山西省中医药研究院方剂研究所,太原 030012)

[摘要] 目的:通过建立通关藤药材 C21 甾体皂苷类成分的特征图谱,为科学评价药材质量提供理论依据。方法:色谱条件: Sinochrom ODS-BP 分析柱(4.6 mm×250 mm 5 μm),柱温室温,检测波长 223 nm,流动相乙腈-0.1% 磷酸水溶液(32:68~85:15)梯度洗脱,流速 1 mL·min⁻¹。结果:通关藤药材指纹图谱选定了 17 个共有峰,其中 2 号峰为通关藤苷 A,建立了通关藤药材 HPLC 指纹图谱共有模式,得到不同产地通关藤药材的相似度数据。结论:建立的指纹图谱重复性好,具有较广泛的应用范围,可用于通关藤药材的 HPLC 指纹图谱评价其质量。

[关键词] 通关藤;通关藤苷 A;高效液相色谱法;指纹图谱

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)22-0043-04

Study on Specific Chromatogram of Tenacissoside in *Marsdenia tenacissima*

LI Yuan-yuan¹, NI Yan², LI Xian-rong², LU Fang-jin², SHI Ren-bing^{1*}

(1. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China;

2. Shanxi Province Academy of Traditional Chinese Medicine, Taiyuan 030012, China)

[Abstract] **Objective:** To develop the fingerprint of *Marsdenia tenacissima* by UV-HPLC. **Method:** The RP-HPLC was performed on a Sinochrom ODS-BP column (4.6 mm×250 mm 5 μm). The mobile phase consisted of acetonitrile-0.1% H₃PO₄ with gradient elution. The fingerprint was detected at 223 nm. **Result:** The mutual mode of HPLC-UV specific chromatogram was set up. 14 common peaks were observed on the fingerprints of *M. tenacissima*, and the second peak was tenacissoside A. **Conclusion:** This method is simple and fast, thus it may be used for the fingerprint of *M. tenacissima*. It may also qualitatively and quantitatively reflect the content variation of the main ingredients in crude drugs, which would be helpful to improve the quality control level.

[Key words] *Marsdenia tenacissima*; tenacissoside A; HPLC; fingerprints

[收稿日期] 20110614(009)

[基金项目] 山西省青年科技研究基金(2009021040-2);山西省卫生厅科技攻关计划项目(200915)

[第一作者] 李媛媛,博士研究生,从事中药化学方面的研究, E-mail: lyy8298@eyou.com

[通讯作者] * 石任兵,教授,博士生导师, E-mail: shirb@126.com

溶性灰分检查简单易行;萝卜苷含量测定能代表莱菔子的传统功效和控制其炒制程度,比芥子碱含量测定更能反映莱菔子的炮制质量。

[参考文献]

- [1] 龚千锋. 中药炮制学[M]. 北京:中国中医药出版社, 2005: 109.
- [2] 中国药典. 一部[S]. 2010: 255.
- [3] 吕文海,任涛,苏永汶,等. 炮制抑制莱菔子中萝卜苷酶解转化的初步实验研究[J]. 中国中药杂志, 2011, 36

(8): 980.

- [4] 吕文海,任涛,孟祥红,等. 莱菔子饮片中萝卜苷含量测定方法的研究[J]. 中成药, 2011, 33(9): 1563.
- [5] 谭鹏. 莱菔子炮制工艺与质量控制方法研究[D]. 济南: 山东中医药大学, 2005.
- [6] Renato I, Jessica B, Estelle G, et al. Thio-functionalised glucosinolates: unexpected transformation of desul fo glucoraphenin[J]. Tetrahedron Letters 2008, 49: 292.

[责任编辑 蔡仲德]

通关藤为萝藦科植物通关藤 *Marsdenia tenacissima* (Roxb.) Wight et Arn. 的干燥藤茎,味苦,微寒,入肝、肺、胃经,具有清热解毒,止咳平喘,散结止痛,抗癌之功效^[1]。通关藤来源复杂,涉及不同品种和掺伪,同名异物现象严重,其中萝藦科南山藤、苦绳、番荔枝科白叶瓜馥木等 10 余种在产地均作通关藤药用^[2]。因此需要建立通关藤药材的指纹图谱的共有模式,对通关藤的品质进行综合评价。文献报道多以绿原酸为指标评价通关藤药材,然而本课题组研究表明 C21 甾体皂苷类为通关藤中主要抗肿瘤成分,但未见以药材中 C21 甾体皂苷类成分为指标的指纹图谱研究。本文采用 HPLC,以 C21 甾体皂苷类指标性成分通关藤苷 A 为对照,研究通关藤药材的指纹图谱,为针对性评价药材的品质提供依据。

1 材料

1.1 仪器、药品 安捷伦液相色谱仪,安捷伦 N1100 化学工作站,DAD 二级阵列紫外检测器,Sinochrom ODS-BP 分析柱(4.6 mm × 250 mm,5 μm)。乙腈为色谱纯(天津四友精细化学品有限公司),水为超纯水,其他试剂均为分析纯。对照品通关藤苷 A(纯度为 98.3%),实验室自制。

1.2 药材 通关藤 *M. tenacissima*,药材经山西省中医药研究院李先荣主任药师鉴定,见表 1。

表 1 通关藤药材来源

No.	采收时间	产地
SS1	2007-10	云南丽江
SS2	2007-12	云南大理
SS3	2007-12	云南玉溪
SS4	2008-10	云南建水
SS5	2008-12	云南红河
SS6	2009-06	四川都江堰
SS7	2009-06	贵州贵阳
SS8	2009-12	贵州盘县
SS9	2009-12	云南楚雄

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 供试品溶液的制备 取通关藤药材,粉碎,过 60 目筛,取 1 g 药材粉末,精密称定,加入 40 mL 甲醇,超声提取 30 min,过滤,滤液蒸干。残渣加水 15 mL 使溶解,用水饱和的正丁醇振摇提取 3 次(30,30,20 mL),合并正丁醇液,蒸干,残渣加甲醇

溶解,置 10 mL 量瓶中,定容至刻度,摇匀,即得。临用前过 0.45 μm 滤膜,作为样品溶液。

2.1.2 对照品溶液的制备 称取通关藤苷 A 10 mg,精密称定,置于 10 mL 量瓶中,用甲醇溶解,定容,即得 0.996 g·L⁻¹ 通关藤苷 A 对照品溶液。

2.2 色谱条件 Sinochrom ODS-BP 分析柱(4.6 mm × 250 mm,5 μm),柱温室温,检测波长 223 nm,流动相乙腈-0.1% 磷酸水溶液(32:68~85:15)梯度洗脱,流速 1 mL·min⁻¹,梯度洗脱程序见表 2。

表 2 梯度洗脱程序

t/min	乙腈/%	0.1% 磷酸/%
0	32	68
10	42	58
15	46	54
28	46	54
36	48	52
60	85	15

分别取 2.1 项下供试品溶液和对照品溶液各 10 μL,注入液相色谱仪,记录色谱图,按此条件的出峰数最多,总分离度和主峰面积最大。其中,波长的选择是以参照物通关藤苷 A 最大吸收波长 223 nm 作为检测波长。

2.3 方法学考察

2.3.1 对照及空白试验 分别精密吸取空白溶剂、对照品溶液及供试品溶液各 10 μL,注入液相色谱仪,记录 70 min 内的色谱峰,结果空白为一条直线,不干扰。

2.3.2 稳定性试验 取一份通关藤药材,精密称定,按 2.1.1 项下制备供试品溶液,分别于 0,2,4,6,8,10,12 h 检测指纹图谱。结果表明,各主要色谱峰相对保留时间和峰面积占总峰面积 5% 以上峰的峰面积比值均无明显变化,其 RSD < 3% 以内,符合指纹图谱技术要求,稳定性良好。

2.3.3 精密度试验 取同一供试品溶液,重复进样 6 次,记录指纹图谱。结果表明,各主要色谱峰相对保留时间和峰面积占总峰面积 5% 以上峰的峰面积比值均无明显变化,其 RSD 为 1.6% ~ 3.0%,符合指纹图谱技术要求,精密度良好。

2.3.4 重复性试验 取一份通关藤药材样品粉末 6 份,精密称定,按 2.1.1 项下制备供试品溶液,分别进样,记录指纹图谱。结果表明,各主要色谱峰相对保留时间和峰面积占总峰面积 5% 以上峰的峰面积比值均无明显变化,其 RSD 分别为 0.6% ~

2.0% ,符合指纹图谱技术要求 ,重复性良好。

2.4 对照图谱的建立 取 9 批通关藤样品 ,按 2.1.1 项下配制样品溶液 ,取上述样品溶液各 10 μ L 按照 2.2 项下色谱条件分别进样 ,得到 9 批通关藤 HPLC 指纹图谱。将试验数据导入中药指纹图谱相似度评价软件 ,设定参照图谱 ,将谱峰自动匹配 ,然后生成对照图谱 ,进行相似度评价(图 1)。通过中药指纹图谱相似度计算软件得出通关藤药材指纹图谱的共有模式(即对照图谱 R) ,见图 1 ,然后将 9 批通关藤样品的指纹图谱与该共有模式比较 ,采用相关系数和夹角余弦作为测度 ,以其中位数矢量作为

共有模式 ,计算各样品的相似度。17 个匹配峰的相对保留时间其结果见表 3 4。

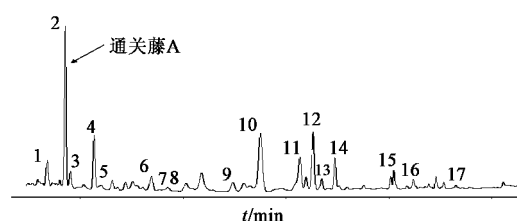


图 1 通关藤指纹图谱特征峰谱

表 3 共有峰相对保留时间

No.	SS1	SS2	SS3	SS4	SS5	SS6	SS7	SS8	SS9	RSD
1	0.907 0	0.906 7	0.905 0	0.904 6	0.906 3	0.906 7	0.905 7	0.9073	0.907 4	0.11%
2	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	0.00%
3	1.026 3	1.027 6	1.027 3	1.027 9	1.027 0	1.027 6	1.028 3	1.026 4	1.026 4	0.07%
4	1.149 2	1.149 4	1.150 7	1.150 0	1.151 0	1.150 3	1.150 5	1.148 9	1.149 2	0.07%
5	1.185 7	1.185 9	1.187 2	1.194 4	1.187 2	1.187 4	1.186 9	1.185 1	1.185 4	0.25%
6	1.448 2	1.447 1	1.451 9	1.446 9	1.451 2	1.448 5	1.442 4	1.449 8	1.450 4	0.21%
7	1.530 2	1.532 2	1.541 1	1.530 5	1.537 0	1.533 6	1.528 5	1.530 9	1.531 4	0.27%
8	1.623 2	1.625 9	1.580 2	1.622 0	1.632 4	1.577 1	1.620 0	1.624 0	1.624 1	1.34%
9	1.871 8	1.870 6	1.878 9	1.868 8	1.877 9	1.872 3	1.867 2	1.871 2	1.870 9	0.22%
10	2.017 2	2.015 2	2.029 8	2.008 2	2.022 2	2.018 7	2.010 1	2.018 2	2.018 1	0.34%
11	2.216 0	2.219 0	2.215 0	2.214 1	2.228 9	2.216 9	2.230 3	2.212 7	2.210 7	0.33%
12	2.286 9	2.289 0	2.287 1	2.258 0	2.244 2	2.287 5	2.300 3	2.285 3	2.283 3	0.81%
13	2.327 9	2.334 4	2.328 0	2.310 3	2.343 3	2.331 5	2.351 8	2.325 2	2.322 9	0.55%
14	2.398 1	2.403 0	2.395 6	2.413 5	2.412 3	2.399 0	2.420 9	2.394 7	2.391 8	0.44%
15	2.686 7	2.709 8	2.684 0	2.704 5	2.720 7	2.699 9	2.744 5	2.678 4	2.675 2	0.87%
16	2.799 3	2.808 6	2.790 1	2.815 2	2.822 8	2.802 3	2.838 5	2.792 2	2.788 9	0.63%
17	3.016 1	3.029 4	3.005 3	3.024 1	3.044 6	3.020 9	3.065 4	3.007 4	3.004 0	0.71%

2.5 指纹图谱相似度计算 采用中药色谱指纹图谱相似度软件 2004 年 A 版(国家药典委员会开发)确定共有指纹峰 17 个 ,其中包括作为参照物的通关

藤苷 A ,以 17 个共有峰的峰面积的均值作为模板 ,利用“相关系数”法计算指纹图谱的相似度结果见表 5。

表 4 共有峰相对峰面积

No.	SS1	SS2	SS3	SS4	SS5	SS6	SS7	SS8	SS9
1	0.335 1	0.273 2	0.462 9	0.293 8	0.319 3	0.474 0	0.326 4	0.247 2	0.297 6
2	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0
3	0.101 1	0.088 7	0.240 2	0.018 7	0.204 4	0.170 5	0.156 1	0.078 5	0.066 3
4	0.454 6	0.675 1	0.919 2	0.440 8	0.436 7	0.664 6	0.734 6	0.518 7	0.555 0
5	0.099 6	0.086 8	0.166 1	0.027 9	0.146 4	0.135 7	0.077 1	0.083 9	0.040 9
6	0.182 9	0.237 7	0.256 3	0.227 6	0.198 5	0.191 1	0.190 3	0.213 5	0.178 9
7	0.099 9	0.071 0	0.204 5	0.186 6	0.123 1	0.112 7	0.092 6	0.120 4	0.026 5
8	0.109 5	0.190 2	0.073 7	0.313 5	0.161 5	0.077 7	0.150 5	0.202 4	0.067 5
9	0.223 1	0.410 5	0.609 6	0.233 2	0.123 8	0.507 2	0.207 7	0.220 3	0.197 8
10	0.739 3	0.803 4	0.726 6	0.259 4	0.811 8	0.565 7	0.715 7	0.529 5	0.440 0
11	0.371 8	0.602 1	0.993 7	0.030 4	0.447 9	0.702 6	0.593 7	0.366 5	0.277 8
12	0.214 1	0.284 7	0.415 3	0.405 1	0.505 3	0.202 5	0.332 0	0.367 5	0.124 5
13	0.051 9	0.059 6	0.162 1	0.053 2	0.114 4	0.084 3	0.108 8	0.037 8	0.030 1
14	0.158 1	0.058 7	0.429 9	0.276 3	0.238 0	0.169 1	0.271 5	0.2081	0.112 0
15	0.178 9	0.219 9	0.186 1	0.341 4	0.144 4	0.270 6	0.287 4	0.147 6	0.085 1
16	0.091 2	0.273 2	0.415 1	0.427 9	0.094 4	0.254 1	0.094 1	0.089 6	0.057 5
17	0.021 4	0.080 6	0.244 1	0.049 2	0.031 7	0.069 2	0.024 5	0.027 8	0.011 3

表 5 不同批次药材相似度

样品	相似度	样品	相似度
SS1	0.937	SS6	0.934
SS2	0.914	SS7	0.775
SS3	0.832	SS8	0.941
SS4	0.751	SS9	0.924
SS5	0.886		

3 结果与讨论

本试验建立的通关藤 HPLC-UV 指纹图谱中各个样品谱峰分离效果较好,17 个共有峰在上述图谱中基本上也可以出现,从样品测定的相似度发现,不

同产地的药材存在一定的差异,主要表现在特征峰的峰面积高低的差异。所以,本指纹图谱的提取、测试、分析方法具有较好的分离效果和较广泛的应用范围,为研究通关藤药材的指纹图谱分析鉴定提供了科学的方法借鉴。

[参考文献]

[1] 中国药典.一部[S].2010:277.
[2] 邢旺兴,程荣珍,陈斌,等.乌骨藤常见混用品种辨析[J].现代中药研究与实践,2004,18(1):33.

[责任编辑 蔡仲德]