

## HPLC 法测定不同产地穿山龙中原薯蓣皂苷、原纤细薯蓣皂苷、甲基原薯蓣皂苷、伪原薯蓣皂苷、薯蓣皂苷和纤细薯蓣皂苷

尚海花<sup>1,2</sup>, 郑雅楠<sup>2</sup>, 王 淼<sup>2</sup>, 白 润<sup>3</sup>, 张保灿<sup>3</sup>, 廖茂梁<sup>1,2\*</sup>

1. 沈阳药科大学, 辽宁 沈阳 110016

2. 天津药物研究院, 天津 300193

3. 天津中医药大学, 天津 300193

**摘要:** 目的 建立 HPLC 法同时测定不同产地穿山龙药材中原薯蓣皂苷、原纤细薯蓣皂苷、甲基原薯蓣皂苷、伪原薯蓣皂苷、薯蓣皂苷和纤细薯蓣皂苷。方法 穿山龙药材粉末经 50% 甲醇超声处理。采用 Agilent SB-Aq 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-水, 梯度洗脱; 检测波长 203 nm; 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 25 °C; 进样体积 20 μL。结果 原薯蓣皂苷、原纤细薯蓣皂苷、甲基原薯蓣皂苷、伪原薯蓣皂苷、薯蓣皂苷和纤细薯蓣皂苷在 1.054 0~10.540 0、0.519 0~5.190 0、0.287 0~2.870 0、0.021 2~0.212 0、0.061 4~0.614 0、0.061 4~0.614 0 μg 线性关系良好, *r* 均大于 0.999 0。平均加样回收率分别为 100.19%、100.24%、99.87%、100.92%、99.36%、100.03%, RSD 值分别为 2.03%、2.51%、2.33%、3.07%、2.77%、3.41%。不同产地的穿山龙药材中原薯蓣皂苷、原纤细薯蓣皂苷、甲基原薯蓣皂苷、伪原薯蓣皂苷、薯蓣皂苷和纤细薯蓣皂苷的质量分数分别为 1.587~4.837%、0.260~1.950%、0.477~1.317%、0.037~0.187%、0.801~3.813%、0.088~0.524%。  
**结论** 该方法快速、简便、准确, 可用于穿山龙药材的质量控制。

**关键词:** 穿山龙; 原薯蓣皂苷; 原纤细薯蓣皂苷; 甲基原薯蓣皂苷; 伪原薯蓣皂苷; 薯蓣皂苷; 纤细薯蓣皂苷; 高效液相色谱

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2018)08-1879-05

DOI:10.7501/j.issn.1674-5515.2018.08.005

## Determination of protodioscin, protogracillin, methyl protodioscin, pseudoprotodioscin, dioscin and gracillin in *Dioscoreae Nipponicae Rhizoma* from different habitats by RP-HPLC

SHANG Hai-hua<sup>1,2</sup>, ZHENG Ya-nan<sup>2</sup>, WANG Miao<sup>2</sup>, BAI Run<sup>3</sup>, ZNANG Bao-can<sup>3</sup>, LIAO Mao-liang<sup>1,2</sup>

1. Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China

2. Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China;

3. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

**Abstract: Objective** To establish an HPLC method for simultaneous determination of protodioscin, protogracillin, methyl protodioscin, pseudoprotodioscin, dioscin, and gracillin in *Dioscoreae Nipponicae Rhizoma* from various of habitats. **Methods** The powders of *Dioscoreae Nipponicae Rhizoma* was ultrasonically extracted by 50% methanol. The separation was carried out on Agilent SB-Aq chromatography column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm). The mobile phase consisted of acetonitrile - water with gradient elution. The detection wavelengths were set at 203 nm. The flow rate was 1.0 mL/min, temperature of column was set at 25 °C, and volume of injection was 20 μL. **Results** The linear ranges of protodioscin, protogracillin, methyl protodioscin, pseudoprotodioscin, dioscin, and gracillin were 1.054 0 — 10.540 0, 0.519 0 — 5.190 0, 0.287 0 — 2.870 0, 0.021 2 — 0.212 0, 0.061 4 — 0.614 0, and 0.061 4 — 0.614 0 μg, respectively. And all *r* values were above 0.999 0. The average recoveries were 100.19%, 100.24%, 99.87%, 100.92%, 99.36%, and 100.03% with RSD 2.03%, 2.51%, 2.33%, 3.07%, 2.77%, and 3.41%, respectively. The contents of protodioscin, protogracillin, methyl protodioscin, pseudoprotodioscin, dioscin, and gracillin in *Dioscoreae Nipponicae Rhizoma* from various of

收稿日期: 2018-04-20

基金项目: 天津市科技支撑计划项目 (15ZCZDSY00470); 天津市应用基础与前沿技术研究计划 (14JCQNJC13800; 15JCYBJC29500)

作者简介: 尚海花, 博士研究生。E-mail: shanghaihua2006@163.com

\*通信作者 廖茂梁, 副研究员。Tel: (022)23006323 E-mail: liaomaoliang@163.com

habitats were 1.587 — 4.837%, 0.260 — 1.950%, 0.477 — 1.317%, 0.037 — 0.187%, 0.801 — 3.813%, 0.088 — 0.524%, respectively.

**Conclusion** The method is rapid, simple, and accurate, and can be used for quality control of *Dioscoreae Nipponicae Rhizoma*.

**Key words:** *Dioscoreae Nipponicae Rhizoma*; protodioscin; protogracillin; methyl protodioscin; pseudoprotodioscin; dioscin; gracillin; HPLC

穿山龙为薯蓣科薯蓣属植物穿龙薯蓣 *Discorea nipponica* Makino 的根茎, 具有祛风除湿、舒筋通络、活血止痛、止咳平喘的功效<sup>[1]</sup>。甾体皂苷类成分是穿山龙中的主要活性成分<sup>[2-3]</sup>。现代药理学研究发现, 穿山龙总皂苷具有抗类风湿性关节炎、降尿酸、平喘、抗肿瘤的活性<sup>[4-8]</sup>, 临床广泛用于风湿痹病、跌扑损伤、咳嗽气喘和冠心病等<sup>[9-11]</sup>。《中国药典》2015 年版一部穿山龙项下仅对薯蓣皂苷单一成分进行质量控制。近年来, 虽然有穿山龙药材质量控制的文献报道, 但多对于穿山龙药材中薯蓣皂苷、原薯蓣皂苷、伪原薯蓣皂苷和甲基原薯蓣皂苷进行研究<sup>[12-14]</sup>。本研究拟采用 HPLC 法对穿山龙药材中原薯蓣皂苷、原纤细薯蓣皂苷、甲基原薯蓣皂苷、伪原薯蓣皂苷、薯蓣皂苷、纤细薯蓣皂苷 6 种成分进行测定, 并对不同产地的穿山龙药材进行评价, 以期通过多指标成分控制的方法全面反映穿山龙药材的内在质量, 为穿山龙药材质量控制提供依据。

## 1 仪器与试剂

### 1.1 仪器

Agilent 1260 型高效液相色谱仪(美国安捷伦公司), 带有二元高压梯度泵、自动进样器、柱温箱、DAD 全波长检测器和 Agilent 数据处理工作站; SB-3200 DTDN 超声波清洗仪(宁波新芝生物科技股份有限公司); AB204-N 电子分析天平(上海梅特勒-托利多仪器有限公司)

### 1.2 试剂

原纤细薯蓣皂苷(批号 20141001, 质量分数  $\geq 98\%$ )、甲基原薯蓣皂苷(批号 20141002, 质量分数  $\geq 98\%$ )、纤细薯蓣皂苷(批号 20141003, 质量分数  $\geq 98\%$ )均购自南京春秋生物工程有限公司; 原薯蓣皂苷(批号 111937-201201, 质量分数 96.2%)、伪原薯蓣皂苷(批号 111855-201302, 质量分数 92.0%)、薯蓣皂苷(批号 111707-200501, 质量分数 94.9%)均购自中国食品药品检定研究院。乙腈[HPLC 级, 赛默飞世尔科技(中国)有限公司]; 水(屈臣氏蒸馏水, 广州屈臣氏食品饮料有限公司); 甲醇(分析纯和色谱纯, 天津市康科德科技发展有限公司)。

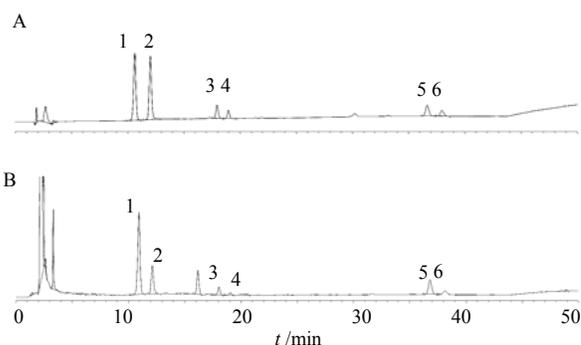
穿山龙药材经天津药物研究院中药与健康产品

研究中心张铁军研究员鉴定为穿龙薯蓣 *Discorea nipponica* Makino 的根茎。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

Agilent SB-Aq 色谱柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5  $\mu$ m); 流动相: 乙腈(A) - 水(B), 梯度洗脱(0~30 min, 25%~40% A; 30~40 min, 40% A; 40~50 min, 40%~80% A; 50~60 min, 80% A); 检测波长 203 nm; 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 25  $^{\circ}$ C; 进样体积 20  $\mu$ L。色谱图见图 1。



1-原薯蓣皂苷 2-原纤细薯蓣皂苷 3-甲基原薯蓣皂苷 4-伪原薯蓣皂苷 5-薯蓣皂苷 6-纤细薯蓣皂苷

1-protodioscin 2-protogracillin 3-methyl protodioscin 4-pseudoprotodioscin 5-dioscin 6-gracillin

图 1 混合对照品(A)和穿山龙(B)的 HPLC 图谱  
Fig. 1 HPLC chromatograms of reference substances (A) and *Dioscoreae Nipponicae Rhizoma* samples (B)

### 2.2 溶液的制备

**2.2.1 对照品溶液的制备** 精密称取薯蓣皂苷、甲基原薯蓣皂苷、纤细薯蓣皂苷对照品、伪原薯蓣皂苷对照品 20.45、14.34、4.42、4.25 mg, 分别置于 10 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 备用。精密称取原薯蓣皂苷、原纤细薯蓣皂苷对照品 10.54、5.19 mg, 并精密量取甲基原薯蓣皂苷、伪原薯蓣皂苷、薯蓣皂苷、纤细薯蓣皂苷对照品溶液 2.0、0.5、1.5、1.0 mL, 置于 10 mL 量瓶, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得含原薯蓣皂苷 1.054 mg/mL、原纤细薯蓣皂苷 0.519 mg/mL、甲基原薯蓣皂苷 0.287 mg/mL、伪原薯蓣皂苷 0.021 mg/mL、薯蓣皂苷 0.307 mg/mL、纤细薯蓣皂苷 0.044

mg/mL 的混合对照品溶液。

**2.2.2 供试品溶液的制备** 取穿山龙药材适量，粉碎，过 80 目筛，取粉末约 1.0 g，精密称定，置 100 mL 具塞三角瓶中，加 50% 甲醇 25 mL，精密称定，超声提取 20 min，放冷，加 50% 甲醇补足减失的质量，混匀，滤过，取续滤液过 0.45 μm 微孔滤膜，

即得。

**2.3 线性范围考察**

精密吸取混合对照品溶液 1、3、5、8、10 μL，进样测定，记录色谱图。以进样质量为横坐标，响应值峰面积为纵坐标进行线性回归，计算出回归方程，见表 1。

表 1 各成分的线性关系和线性范围

Table 1 Linear relationships and ranges of major components

| 成分      | 回归方程                | r       | 线性范围/μg          |
|---------|---------------------|---------|------------------|
| 原薯蓣皂苷   | $Y=200.27 X-4.4176$ | 0.999 8 | 1.054 0~10.540 0 |
| 原纤细薯蓣皂苷 | $Y=90.423 X+16.354$ | 0.999 8 | 0.519 0~5.190 0  |
| 甲基原薯蓣皂苷 | $Y=49.958 X+9.0354$ | 0.999 8 | 0.287 0~2.870 0  |
| 伪原薯蓣皂苷  | $Y=10.077 X+0.7459$ | 0.999 8 | 0.021 2~0.212 0  |
| 薯蓣皂苷    | $Y=20.523 X-0.8218$ | 0.999 8 | 0.061 4~0.614 0  |
| 纤细薯蓣皂苷  | $Y=10.959 X+1.3233$ | 0.999 7 | 0.061 4~0.614 0  |

**2.4 精密度试验**

取穿山龙药材(批号 13091203)粉末 1.0 g，精密称定，制备供试品溶液，连续进样测定 6 次，记录色谱峰峰面积值，结果原薯蓣皂苷、原纤细薯蓣皂苷、甲基原薯蓣皂苷、伪原薯蓣皂苷、薯蓣皂苷和纤细薯蓣皂苷峰面积的 RSD 值分别为 0.58%、0.66%、0.37%、0.86%、0.47%、0.49%。

**2.5 重复性试验**

取穿山龙药材(批号 13091203)粉末 1.0 g，共 6 份，精密称定，制备供试品溶液，进样测定，记录色谱图，计算质量分数。结果原薯蓣皂苷、原纤细薯蓣皂苷、甲基原薯蓣皂苷、伪原薯蓣皂苷、薯蓣皂苷和纤细薯蓣皂苷平均质量分数分别为 3.96%、1.95%、1.08%、0.05%、1.84%、0.24%，RSD 值分别为 0.47%、0.56%、0.38%、1.34%、1.20%、1.42%。

**2.6 稳定性试验**

取穿山龙药材(批号 13091203)粉末 1.0 g，精密称定，制备供试品溶液，分别于 0、2、4、6、8、10、12、24 h 进样测定，记录色谱图和 6 种成分的色谱峰峰面积值，结果原薯蓣皂苷、原纤细薯蓣皂苷、甲基原薯蓣皂苷、伪原薯蓣皂苷、薯蓣皂苷和纤细薯蓣皂苷峰面积的 RSD 值分别为 0.87%、1.62%、0.92%、1.44%、0.53%、0.58%，结果表明公式品溶液在室温下 24 h 内稳定。

**2.7 回收率试验**

取穿山龙药材样品(批号 13091203) 6 份，每

份 0.5 g，精密称定，分别精密加入原薯蓣皂苷 19.3 mg、原纤细薯蓣皂苷 9.5 mg、甲基原薯蓣皂苷 5.3 mg、薯蓣皂苷 10.0 mg 以及 8.52 μg/mL 伪原薯蓣皂苷、49.36 μg/mL 纤细薯蓣皂苷对照品溶液各 25 mL，置于 100 mL 具塞三角瓶中，制备供试品液，进行测定，记录色谱图，计算回收率。结果原纤细薯蓣皂苷、伪原薯蓣皂苷、薯蓣皂苷和纤细薯蓣皂苷的平均加样回收率分别为 100.19%、100.24%、99.87%、100.92%、99.36%、100.03%，RSD 值分别为 2.03%、2.51%、2.33%、3.07%、2.77%、3.41%。

**2.8 样品测定**

取 10 批穿山龙药材，粉碎，过 80 目筛，取粉末各 3 份，每份 1.0 g，精密称定，制备供试品溶液。在上述色谱条件下，分别进样测定，记录色谱图，计算各目标成分的平均质量分数，结果见表 2。结果显示，不同产地、批号的穿山龙药材中均含有原薯蓣皂苷、原纤细薯蓣皂苷、甲基原薯蓣皂苷、伪原薯蓣皂苷、薯蓣皂苷、纤细薯蓣皂苷 6 种皂苷类成分，但是各皂苷成分的含量差异较大，考虑主要是由于地理环境、气候条件和采收季节之间的差异造成的。本实验共收集了穿山龙药材 10 批，其中来自吉林 3 批、黑龙江 2 批、河北 5 批。比较总皂苷含量时，当采收时间一定时，河北产地穿山龙药材 3 批总皂苷含量相对较高，黑龙江和吉林产地含量接近，而晚采收的河北产穿山龙药材总皂苷含量有一定程度的降低，与《中国药典》2015 年版一部规

定的采收时间(春、秋季)一致<sup>[1]</sup>。而对于单一类成分来说,河北产穿山龙药材除原薯蓣皂苷之外,其他 5 种皂苷类成分含量比较平均,东北产穿山龙药材则以原薯蓣皂苷和薯蓣皂苷为主。值得注意的是,《中国药典》2015 年版一部穿山龙药材项下只

控制了薯蓣皂苷的量(不低于 1.3%), 按此标准判定, 10 批药材中有 3 批(1010115、13091204、13091207)不合格, 但其中原薯蓣皂苷含量较高, 因此单一控制薯蓣皂苷含量不能全面反映穿山龙药材的质量差异。

表 2 不同产地穿山龙药材中原薯蓣皂苷、原纤细薯蓣皂苷、甲基原薯蓣皂苷、伪原薯蓣皂苷、薯蓣皂苷和纤细薯蓣皂苷的测定结果 ( $n=3$ )

Table 2 Determination of protodioscin, protogracillin, methyl protodioscin, pseudoprotodioscin, dioscin, and gracillin in *Dioscoreae Nipponicae Rhizoma* from various of habitats ( $n = 3$ )

| 批号       | 产地  | 质量分数/% |         |         |        |       |        |
|----------|-----|--------|---------|---------|--------|-------|--------|
|          |     | 原薯蓣皂苷  | 原纤细薯蓣皂苷 | 甲基原薯蓣皂苷 | 伪原薯蓣皂苷 | 薯蓣皂苷  | 纤细薯蓣皂苷 |
| 1010115  | 吉林  | 1.587  | 0.678   | 0.478   | 0.187  | 1.216 | 0.257  |
| 13091201 | 吉林  | 2.472  | 0.260   | 0.809   | 0.055  | 1.658 | 0.088  |
| 13091203 | 河北  | 3.960  | 1.950   | 1.080   | 0.050  | 1.840 | 0.240  |
| 13091204 | 河北  | 4.164  | 1.436   | 1.094   | 0.051  | 0.801 | 0.228  |
| 13091205 | 黑龙江 | 2.462  | 0.347   | 0.689   | 0.056  | 2.893 | 0.178  |
| 13091206 | 吉林  | 2.414  | 0.990   | 0.778   | 0.037  | 1.847 | 0.524  |
| 13091207 | 河北  | 4.837  | 1.160   | 1.317   | 0.074  | 0.908 | 0.261  |
| 13091208 | 黑龙江 | 1.642  | 0.342   | 0.619   | 0.039  | 2.281 | 0.269  |
| 13112801 | 河北  | 1.733  | 0.858   | 0.477   | 0.077  | 3.813 | 0.187  |
| 13112803 | 河北  | 1.869  | 0.916   | 0.503   | 0.059  | 1.657 | 0.214  |

### 3 讨论

参考相关文献报道<sup>[12-15]</sup>, 本实验对色谱条件进行了优化。对检测波长进行了考察, 综合比较共有峰的响应值和基线噪音后, 结果显示, 在 203 nm 波长下原薯蓣皂苷、原纤细薯蓣皂苷、甲基原薯蓣皂苷、伪原薯蓣皂苷、薯蓣皂苷、纤细薯蓣皂苷 6 个皂苷类成分的色谱峰响应值最高, 均为末端吸收, 基线较稳, 故选择 203 nm 作为本实验的检测波长; 进一步对色谱系统进行了优化, 分别考察了甲醇-水溶液、乙腈-水溶液两个流动相系统, 结果显示乙腈-水溶液作为流动相系统, 峰型和分离度较好。因此, 最终采用乙腈-水溶液梯度洗脱作为流动相系统; 在色谱柱优选方面分别考察了 Agilent、DIKMA、Thermo C<sub>18</sub> 色谱柱, 结果显示 Agilent SB-Aq 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)分离度、对称度、拖尾因子均能达到含量测定要求, 确定选用 Agilent SB-Aq 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)。

在供试品液的制备方法方面, 对超声处理和加热回流处理两种提取方法进行了优化比较, 结果表明两种提取方式对 6 种成分的含量测定无明显差

异, 因此采用简便、快捷的超声提取方法。在提取溶剂考察中, 分别考察了 50% 甲醇、甲醇、无水乙醇等提取溶剂, 结果显示, 50% 甲醇作为溶剂时, 提取效果最佳; 对提取溶剂用量和提取时间进行了优化试验, 25 mL 溶剂用量提取 20 min 能够提取完全; 最终确定了 50% 甲醇 25 mL 超声提取 20 min 的供试品液制备方法。

综上所述, 本实验所建立的多成分的测定方法经过方法学验证, 可以同时测定穿山龙药材中原薯蓣皂苷、原纤细薯蓣皂苷、甲基原薯蓣皂苷、伪原薯蓣皂苷、薯蓣皂苷、纤细薯蓣皂苷 6 个活性成分, 可为穿山龙药材质量标准制定和深入研究提供有效的方法和试验依据。

### 参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015: 267.
- [2] 李德成, 刘庆燕, 刘春燕. 穿山龙的化学成分和药理作用研究进展 [J]. 山西中医学院学报, 2016, 17(2): 69-70.
- [3] 刘克建, 张天, 邓冬莉. 穿山龙化学成分与分离纯化技术研究进展 [J]. 广州化工, 2013, 41(10): 21-22.

- [4] 张 宁, 于栋华, 周 琦, 等. 穿山龙药理作用的研究进展 [J]. 中国药房, 2015(4): 547-550.
- [5] 王 焯, 裴银辉, 宋鸿儒. 穿龙薯蓣皂苷药理作用研究进展 [J]. 医学美学美容旬刊, 2014(2): 491-492.
- [6] 林芳芳, 刘树民, 周 琦, 等. 穿山龙总皂苷对痛风性关节炎大鼠血清生物标志物的影响 [J]. 中国新药杂志, 2017, 26(23): 2840-2845.
- [7] 段一娜, 杨佳琪, 王 晶, 等. 穿山龙水溶性总皂苷对RSC-364细胞分泌MMP-2和MMP-9的影响 [J]. 承德医学院学报, 2014, 31(3): 189-191.
- [8] 胡晶晶, 杨珺超, 汪 瀚, 等. 穿山龙总皂苷对哮喘小鼠气道重塑及MMP-9、TIMP-1表达的影响 [J]. 云南中医学院学报, 2014, 37(6): 1-4.
- [9] 韩佳颖, 王 真. 穿山龙治疗支气管哮喘研究进展 [J]. 山东中医药大学学报, 2016, 40(4): 388-390.
- [10] 姜 丹, 吴 坚. 吴坚教授应用穿山龙治疗风湿病临证经验和临床举隅 [J]. 亚太传统医药, 2016, 12(6): 98-99.
- [11] 方 芳, 顾媛媛, 郭玉岩, 等. 穿山龙药理及临床研究 [J]. 长春中医药大学学报, 2018, 34(3): 450-452.
- [12] 秦兰艳, 贾凌云, 孙启时, 等. RP-HPLC法同时测定穿山龙中薯蓣皂苷和纤细皂苷的含量 [J]. 沈阳药科大学学报, 2007, 24(10): 627-630.
- [13] 李东翔, 李 清, 关潇滢, 等. HPLC法测定穿山龙中伪原薯蓣皂苷、薯蓣皂苷和延龄草苷的含量 [J]. 药物分析杂志, 2012, 32(4): 596-598.
- [14] 郑雅楠, 廖茂梁, 孙 卫, 等. 穿山龙超高效液相色谱特征指纹图谱的研究 [J]. 现代药物与临床, 2015, 30(1): 28-32.
- [15] 郭红霞, 李 娟, 宋 飞, 等. HPLC法测定不同产地穿山龙中薯蓣皂苷的含量 [J]. 西北药学杂志, 2015, 30(2): 126-128.