

- 研究 [J]. 中国中医药科技, 2001, 8(1): 30-33.
- [3] 张涛, 李力, 阮金兰. 马鞭草化学成分对大鼠离体子宫平滑肌条作用的研究 [J]. 中国中医药科技, 2001, 8(5): 313-315.
- [4] 卫生部药品标准中药成方制剂 [S]. 第六册, 第九册, 第十九册. 1994.

- [5] 桂承会, 唐人九. 马鞭草镇咳有效成分的研究 [J]. 中药通报, 1985, 10(10): 35.
- [6] Teborg D, Peter J. Iridoid glucosides from *Penstemon nitidus* [J]. *Planta Med*, 1991, 57: 184-187.
- [7] 张涛, 阮金兰, 吕子敏. 马鞭草环烯醚萜苷类成分的研究 [J]. 中草药, 2000, 31(10): 721-723.

HPLC-UV 法测定通光藤药材中通光藤皂苷 A

马尧, 赵陆华*, 肖望书, 李琼*

(中国药科大学 分析测试中心, 江苏 南京 210009)

通光藤又名乌骨藤、通关藤等, 系萝藦科牛奶菜属植物通光散 *Marsdenia tenacissima* (Roxb.) Wight et Arn. 的干燥藤茎, 主产于云南、贵州等地, 具有清热解毒、止咳平喘、消炎镇痛等功效。现代药理学研究表明, 通光藤独特的 C_{21} 甾体衍生物 (主要是 C_{21} 甾体皂苷) 具有显著的抗肿瘤活性; 通光藤皂苷提取物对人胃癌细胞 MKN28、人结肠腺癌细胞 Lovo 均有显著的抑制作用^[1,2]。由其研制而成的单方制剂“消癌平”, 对小鼠体内移植性实体瘤 S₁₈₀、P388 也有明显抑制作用^[3,4]。

有文献曾报道对通光藤中主要药效成分通光藤皂苷 A、G (tenacisside A、tenacisside G) 等的 HPLC-ELSD 研究^[5], 但关于通光藤皂苷 A 的 HPLC-UV 测定法目前尚未见报道。鉴于 HPLC-ELSD 法的重现性差, 以及 HPLC-UV 分析法的普及率高, 建立了通光藤皂苷 A 的 HPLC-UV 测定法, 并比较了 9 个不同产地药材以及药材不同部位中通光藤皂苷 A 的量, 为通光藤药材的质量控制提供了简单、可行的方法和依据。

1 仪器与试剂

岛津 LC-40AD VP 高效液相色谱仪, 岛津 SPD-40A VP 紫外检测器, 浙江大学 N2000 色谱工作站。

通光藤药材分别由南京圣和制药有限公司 (药材产自云南金平) 和云南医药公司提供, 共 9 个不同产地, 经中国药科大学宋学华教授鉴定为正品。通光藤皂苷 A 对照品自制 (经 MS^n 、 1H -NMR、 ^{13}C -NMR 确定其化学结构, 经 HPLC-DAD 测定, 归一化法计算质量分数 > 98%)。乙腈购自 TEDIA 公

司, 甲醇为色谱纯, 水为纯净水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件: Alltech C_{18} 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μ m); 流动相: 乙腈-水 (38:62); 检测波长: 220 nm; 体积流量: 1.0 mL/min; 柱温: 30℃; 进样量: 20 μ L; 灵敏度: 0.1 AUFS。

在上述色谱条件下, 通光藤皂苷 A 峰形良好, 与其他组分的分离度大于 1.5, 色谱图见图 1。

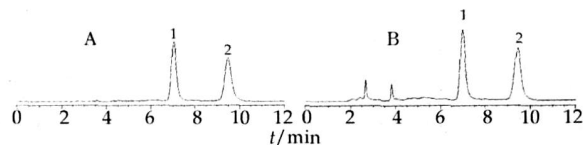


图 1 通光藤皂苷 A 对照品 (A) 和通光藤药材 (南京圣和制药) (B) 的 HPLC-UV 色谱图

Fig. 1 HPLC-UV Chromatograms of tenacisside A to reference substances (A) and sample of *M. tenacissima* (Shenghe) (B)

2.2 对照品溶液的制备: 取干燥至恒重的通光藤皂苷 A 对照品适量, 精密称定, 加甲醇制成质量浓度为 2.04 mg/mL 的对照品储备液; 临用前精密量取适量, 加甲醇制成 0.51 mg/mL 的对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备: 通光藤药材, 粉碎, 取 2 g, 准确称定, 置 100 mL 圆底烧瓶中, 加 70% 甲醇 50 mL 浸泡 30 min, 回流 1 h, 放冷, 滤过; 药渣加 70% 甲醇 50 mL 再回流 1 h, 放冷, 滤过, 合并 2 次滤液; 滤液水浴蒸干, 残渣加乙腈溶解并定容至 5 mL, 摇匀, 用微孔滤膜 (0.45 μ m) 滤过, 取续滤液, 即得。

2.4 线性关系考察: 精密量取通光藤皂苷 A 对照品储备液 0.05、0.1、0.2、0.5、1、1.5 mL 于 2 mL 量

* 收稿日期: 2008-08-02

基金项目: 江苏省自然科学基金资助项目 (BK2005100)

作者简介: 马尧 (1984—), 男, 江西铜鼓人, 中国药科大学药物分析专业硕士研究生, 研究方向为中药分析。

E-mail: franklinxinzhe@hotmail.com

* 通讯作者 赵陆华 Tel: (025) 83271185 E-mail: luhua Zhao@cpu@hotmail.com

瓶中,加甲醇定容至刻度,制成 0.05、0.10、0.20、0.51、1.02、1.53 mg/mL 的对照品溶液。分别吸取上述对照品溶液及对照品储备液进样测定,记录色谱峰面积。以质量浓度为横坐标,峰面积为纵坐标线性回归,得回归方程为: $Y = 2 \times 10^6 X - 2.169 \times 10^4$, $r = 0.9997$ 。结果表明通光藤皂苷 A 在 0.05 ~ 2.04 mg/mL 与峰面积线性关系良好。

2.5 最低检测限:取通光藤皂苷 A 对照品溶液,以不同比例稀释后进样测定,以信噪比 3 : 1 为最低检出,结果在本色谱条件下通光藤皂苷 A 的最低检测限为 5.1 ng。

2.6 精密度试验:取同一对照品溶液,连续进样 6 次,记录色谱峰面积,计算通光藤皂苷 A 峰面积的 RSD 为 0.71 %,表明精密度良好。

2.7 稳定性试验:取同一供试品溶液(南京圣和制药有限公司,批号 20080428),分别于制备品 0、2、4、6、8、12 h 依法测定,记录色谱峰面积,计算通光藤皂苷 A 峰面积的 RSD 为 1.24 %,表明供试品溶液在 12 h 内稳定。

2.8 重现性试验:取同一批通光藤药材(南京圣和制药有限公司,批号 20080428)6 份,制成供试品溶液,依法测定,计算通光藤皂苷 A 的质量分数,其 RSD 为 1.81 %,表明该方法重现性好。

2.9 回收率试验:准确称取已测定的通光藤药材(南京圣和制药有限公司,批号 20080428)0.5 g,6 份,分别精密加入 1.0 mL 0.51 mg/mL 的通光藤皂苷 A 对照品溶液,按 2.3 项下方法制成供试品溶液,依法测定,计算加样回收率和 RSD。结果通光藤皂苷 A 的平均回收率为 96.38 %,RSD 为 2.03 %。

2.10 样品测定

2.10.1 通光藤药材不同部位中通光藤皂苷 A 的测定:取同一产地通光藤药材(南京圣和制药有限公司,批号 20080428),分离皮部、木质部,分别按 2.3 项下方法操作,制成供试品溶液,依法测定,以外标法计算样品通光藤中皂苷 A 的量,结果见表 1。

表 1 通光藤药材不同部位中通光藤皂苷 A 的测定结果 (n = 3)

Table 1 Determination of tenacisside A in different parts of <i>M. tenacissima</i> (n = 3)	
部 位	通光藤皂苷 A/(mg · g ⁻¹)
皮部	1.584 8
木质部	0.303 2

2.10.2 不同产地通光藤药材中皂苷通光藤皂苷 A 的测定:取不同产地的通光藤药材各 3 份,制成供试品溶液,依法测定,以外标法计算药材中通光藤皂苷

A 的量,结果见表 2。

表 2 不同产地通光藤药材中通光藤皂苷 A 的测定 (n = 3)

Table 2 Determination of tenacisside A in *M. tenacissima* from different habitats (n = 3)

产地	通光藤皂苷 A/(mg · g ⁻¹)	产地	通光藤皂苷 A/(mg · g ⁻¹)
圣和	0.975 7	玉溪	1.344 9
曲靖	3.588 0	楚雄	—
贵州	0.153 6	禄劝	0.406 7
文山	1.727 4	山西	—
红河	2.444 1		

3 讨论

3.1 提取方法的选择:对药材的提取方法,曾试用乙醇、甲醇、70 %甲醇、50 %甲醇、醋酸乙酯为提取溶剂,分别采取超声提取和回流提取的方法,以及水煎煮后醋酸乙酯萃取等方法。结果表明采用 70 %甲醇回流提取效果最好,虽杂质也较多,但分离度良好,不影响测定,且经方法学验证,重现性和回收率均符合要求,因此采用 70 %甲醇进行回流提取。

3.2 色谱条件的选择:考虑到 C₂₁甾体皂苷的紫外末端吸收,故本实验选用 220 nm 作为检测波长。试验中曾对甲醇-水、甲醇-0.1 %冰醋酸和乙腈-水 3 种洗脱系统以及梯度洗脱和等度洗脱两种洗脱方式分别进行考察,结果表明在乙腈-水(38 : 62)等度洗脱条件下,通光藤皂苷 A 与其他组分分离度最好,峰形较理想,且能在 30 min 内完成样品测定,故确定为本实验的流动相系统。

3.3 质量差异:由表 1 结果可以看出,通光藤药材不同部位中通光藤皂苷 A 的量存在很大差异,皮部中的量为木质部中量的 5 倍多,因此在药材的质量评价时,应注意取样的影响;另外在研发新药时,建立重点对皮部进行提取。由表 2 结果可以看出,受气候、土壤、生态环境等因素的影响,不同产地通光藤药材中通光藤皂苷 A 的量也存在着明显差异;9 个产地药材中,通光藤皂苷 A 的量在 0.153 6 ~ 3.588 0 mg/g,且有 2 个产地的药材中未检出通光藤皂苷 A,因此在新药研发时,应尽量选用量高的药材。

参考文献:

[1] 朱萱萱,赵陆华,严士海,等. 乌骨藤提取物对人胃癌细胞(MKN28)细胞增殖的研究[J]. 实用中医内科杂志, 2007, 21(6): 36-38.
[2] 朱萱萱,赵陆华,严士海,等. 乌骨藤提取物对人结肠腺癌细胞增殖的实验研究[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2007, 12(12): 1372-1375.
[3] 周 丹,韩大庆,王凤梅,等. 消癌平片抗肿瘤作用研究[J]. 吉林中医药, 2002, 22(1): 57-58.
[4] 韩大庆,刘 伟,王力平,等. 消癌平口服液抗肿瘤作用研究[J]. 中华综合临床医学杂志, 2004, 6(1): 20-21.
[5] Deng J, Shen F, Chen D F. Quantitation of seven polyoxy-pregnane glycosides in *Marsdenia tenacissima* using reversed-phase high-performance liquid chromatography-evaporative light-scattering detection[J]. *J Chromatogr B*, 2006, 1116(1-2): 83.