

乌骨藤总苷 H 中 C₂₁ 甾体苷的测定

何依玲¹, 李晓誉², 张韩清¹

1. 金华市中心医院, 浙江 金华 321000

2. 浙江省医学科学院, 浙江 杭州 310013

摘要: 目的 建立乌骨藤总苷 H 中 C₂₁ 甾体苷的测定方法。方法 采用茴香醛硫酸显色比色法测定乌骨藤总苷 H 中 C₂₁ 甾体苷的量。结果 选定检测波长 432 nm; 通光藤苷 B 在 5.05~65.65 μg/mL 与吸光度呈良好线性关系, 回归方程 $Y=0.0129X+0.0178$, $R^2=0.9993$; 平均回收率为 99.3%, RSD 为 2.16%。结论 该方法简便、灵敏、准确、重现性好, 可用于乌骨藤总苷 H 中 C₂₁ 甾体苷的测定和质量控制。

关键词: 乌骨藤; 乌骨藤总苷 H; 茴香醛硫酸; C₂₁ 甾体苷; 通光藤苷 B

中图分类号: R286.02 文献标志码: B 文章编号: 0253-2670(2011)05-0909-02

Determination of C₂₁ steroidal glycosides in total glycosides H from *Marsdenia tenacissima*

HE Yi-ling¹, LI Xiao-yu², ZHANG Han-qing¹

1. Jinhua Central Hospital, Jinhua 321000, China

2. Zhejiang Academy of Medical Sciences, Hangzhou 310013, China

Key word: *Marsdenia tenacissima* (Roxb) Wight et Arn.; total glycosides H from *Marsdenia tenacissima*; *p*-anisaldehyde-sulfuric acid; C₂₁ steroidal glycoside; tenacissoside B

C₂₁ 甾体苷是一类广泛存在于萝藦科植物中的化合物^[1-3], 研究发现其具有明显的抗肿瘤、免疫调节、抗生育、抗癫痫等多方面的生物活性和药理作用, 因此对 C₂₁ 甾体苷的分离、结构鉴定及其药理作用的研究日益被各国学者所关注。

乌骨藤, 又名通光藤, 系萝藦科植物乌骨藤 *Marsdenia tenacissima* (Roxb) Wight et Arn. 的藤茎。具有清热解毒、化痰软坚之功效。文献报道从通光藤中分离得到几十个 C₂₁ 甾体苷——通光藤苷 A~E^[4], F~I^[5], marsdenoside I~K^[6]等。以乌骨藤单味药制成的制剂“消癌平片”和“消癌平注射液”临床用于治疗食道癌、胃癌、肺癌、肝癌, 取得较好的疗效, 但存在提取工艺有待改进, 质量控制技术落后, 有效成分有待确证等问题。因此十分有必要对乌骨藤的抗癌作用进行二次研究与开发, 阐明其中的有效成分或有效部位, 最终开发成中药一类或二类新药。

鉴于此, 本课题组进行了乌骨藤抗肿瘤药效物

质基础的研究, 结果发现其主要药效部位为乌骨藤总苷 H, 对乌骨藤总苷 H 进行 HPLC-MS/MS 分析, 共发现 18 个 C₂₁ 甾体苷类化合物^[7], 对其中含量较高的化合物进行了分离与纯化, 共得到 6 个 C₂₁ 甾体苷, 并对它们的结构进行了鉴定。为进一步控制其质量, 本实验拟建立乌骨藤总苷 H 中的主要成分 C₂₁ 甾体苷的测定方法。

1 仪器与材料

W501 恒温水浴锅 (上海申生科技有限公司), BP211D 电子天平 (德国 Sartorius), TU-1800 型紫外可见分光光度计 (北京普析通用仪器公司)。

通光藤苷 B 对照品 (自制, 质量分数 98%)。乌骨藤总苷 H (自制, 批号 20050524、20070805、20071017)。硫酸、茴香醛、乙醇、甲醇均为分析纯。

茴香醛硫酸显色剂的配制: 量取茴香醛 0.2 mL 与硫酸 2.0 mL, 加无水乙醇 37.8 mL 混匀, 即得^[8]。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的制备

收稿日期: 2010-08-23

作者简介: 何依玲 (1971—), 副主任药师, 主要从事药物制剂的研究。Tel: (0579)82100082 E-mail: heyiling_428@yahoo.com.cn

精密称取干燥至恒定的通光藤苷 B 对照品 5.05 mg, 置 10 mL 量瓶中, 加乙醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得通光藤苷 B 质量浓度为 0.505 mg/mL 的对照品溶液^[7]。

2.2 供试品溶液的制备

精密称取乌骨藤总苷 H 12 mg, 用乙醇定容至 10 mL 量瓶中, 摇匀, 即得乌骨藤总苷 H 质量浓度为 1.2 mg/mL 的供试品溶液。

2.3 检测波长的选择

精密量取 0.5 mL 对照品溶液、0.5 mL 供试品溶液分别至具塞试管中, 挥干溶剂, 各加入 0.5 mL 茴香醛硫酸显示剂于 100 °C 下反应 15 min, 冰水浴 10 min 终止反应, 精密加入 10 mL 甲醇, 分别在 400~600 nm 扫描。对照品溶液和供试品溶液均在 432 nm 处有最大吸收, 因此选择检测波长 432 nm。

2.4 线性关系考察

精密吸取对照品溶液 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.1、1.3 mL 置具塞试管中, 按“2.3”项下操作并测定 432 nm 处吸光度值。以吸光度值为纵坐标, 通光藤苷 B 质量浓度为横坐标进行线性回归, 得回归方程 $Y=0.0129X+0.0178$, $R^2=0.9993$, 表明通光藤苷 B 在 5.05~65.65 µg/mL 与吸光度值线性关系良好。

2.5 精密度试验

精密吸取供试品溶液 0.5 mL 至具塞试管中, 按“2.3”项下操作并测定 432 nm 处吸光度值。连续测定 6 次, 计算得吸光度值的 RSD 为 0.05%。

2.6 稳定性试验

精密量取 0.5 mL 供试品溶液置具塞试管中, 按“2.3”项下操作, 分别于 0、5、10、15、20、30 min 测定 432 nm 处吸光度值。计算得吸光度值的 RSD 为 1.16%, 表明供试品溶液在 30 min 内稳定。

2.7 重现性试验

按“2.2”项方法制备 6 份供试品溶液, 分别精密吸取样品液 0.5 mL 置具塞试管中, 按“2.3”项下操作并测定 432 nm 处吸光度值, 外标法计算得 C₂₁ 甾体苷质量分数的 RSD 为 1.63%。

2.8 加样回收率试验

精密称取乌骨藤总苷 H 约 6 mg, 6 份, 置 10 mL 量瓶中, 各精密加入 5.1 mg 通光藤苷 B 对照品, 甲醇定容, 混匀。分别精密吸取 0.5 mL 置具塞试管中, 按“2.3”项下操作并测定 432 nm 处吸光度值,

计算回收率, 结果平均回收率为 99.3%, RSD 为 2.16%。

2.9 样品测定

取 3 批次(批号 20050524、20070805、20071017) 乌骨藤总苷 H, 各样品测定 3 次, 得 C₂₁ 甾体苷的质量分数分别为 83.47%、85.03%、81.95%。

3 讨论

C₂₁ 甾体苷类化合物除了萝藦科黑鳗藤属的少数化合物因为含有 N-甲基邻氨基苯甲酰基而在 360 nm 左右有强烈荧光外^[9-10], 基本上都没有紫外吸收。从乌骨藤总苷 H 中分离到的 C₂₁ 甾体苷就属于没有紫外吸收的。本实验选用茴香醛硫酸法对乌骨藤总苷 H 中的 C₂₁ 甾体苷进行测定, 方法简单, 有一定的专一性, 可用于控制乌骨藤总苷 H 的质量。

参考文献

- [1] 娄红祥, 李 锐. C₂₁ 甾体甙的化学研究进展 [J]. 国外医药: 植物药分册, 1990, 15(2):51-56.
- [2] 张援虎, 杨亚婷, 陈东林, 等. 黑龙骨化学成分的研究 [J]. 中草药, 2006, 37(3): 345-347.
- [3] 边宝林, 王宏洁, 司 南, 等. 白薇化学成分的研究 [J]. 中草药, 2005, 36(7): 990-991.
- [4] Miyakawa S, Yamaura K, Hayashi K, et al. Five glycosides from the Chinese drug ‘tong-guan-san’: The stems of *Marsdenia tenacissima* [J]. *Phytochemistry*, 1986, 25(12): 2861-2865.
- [5] Chen J J, Zhang Z X, Zhou J. New C₂₁ steroidal glycosides from *Marsdenia tenacissima* [J]. 云南植物研究, 1999, 21(3): 369-377.
- [6] Deng J, Liao Z X, Chen D F. Three new polyoxypregnane glycosides from *Marsdenia tenacissima* [J]. *Helv Chim Acta*, 2005, 88(10): 2675-2682.
- [7] 叶益萍. 黑鳗藤中 C₂₁ 甾体苷类成分及其免疫活性研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2006.
- [8] 李林洲, 余伯阳. 比色法测定短葶山麦冬药材中总皂苷含量 [J]. 海峡药学, 2005, 17(3): 44-47.
- [9] Chen J J, Li X Y, Sun C R, et al. Identification of polyoxypregnane glycosides from the stems of *Marsdenia tenacissima* by high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry [J]. *Talanta*, 2008, 77(1): 152-159.
- [10] Yoshikawa K, Okada N, Kann Y, et al. Steroidal glycosides from the fresh stem of *Stephanotis lutchuensis* var. *japonica* (Asclepiadaceae). Chemical structures of Stephanosides A-J [J]. *Chem Pharm Bull*, 1996, 44(10): 1790-1796.