

不同采收期短葶山麦冬中短葶山麦冬皂苷C差向异构体含量测定

王宪民¹, 吴炎¹, 张闻², 李瑞明², 王玉², 戚进¹, 余伯阳^{1*}
(1. 中国药科大学江苏省中药评价与转化重点实验室, 南京 211198;
2. 天士力控股集团有限公司研究院 现代中药研究所, 天津 300410)

[摘要] 目的:建立短葶山麦冬皂苷C差向异构体含量测定方法,测定不同采收期短葶山麦冬中短葶山麦冬皂苷C差向异构体含量。方法:采用HPLC-UV法,Waters XBridge C₁₈色谱柱(4.6 mm×250 mm,3.5 μm),流动相乙腈-水(42:58),检测波长203 nm,柱温40℃,流速1.0 mL·min⁻¹。结果:25R-短葶山麦冬皂苷C和25S-短葶山麦冬皂苷C分别在20.40~408.00 mg·L⁻¹(R²=0.999 9),20.09~401.80 mg·L⁻¹(R²=0.999 9)呈良好线性关系,平均回收率分别为99.85%(RSD 2.1%),101.40%(RSD 1.8%);8批不同采收期短葶山麦冬中25R-短葶山麦冬皂苷C,25S-短葶山麦冬皂苷C分别为0.081%~0.136%,0.012%~0.150%。结论:该方法简便、快速,可准确测定短葶山麦冬皂苷C差向异构体含量;不同采收期短葶山麦冬中短葶山麦冬皂苷C差向异构体含量差异较大,25S-短葶山麦冬皂苷C含量变化尤为明显,应严格控制短葶山麦冬采收期。

[关键词] 短葶山麦冬; 短葶山麦冬皂苷C; 差向异构体; 含量测定; 采收期

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)14-0028-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.2015140028

Determination of C-25 Epimers of Liriope Muscari Baily Saponins C in Tuberos Roots of *Liriope muscari* at Different Harvest Time WANG Xian-min¹, WU Yan¹, ZHANG Wen², LI Rui-ming², WANG Yu², QI Jin¹, YU Bo-yang^{1*} (1. Jiangsu Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine (TCM) Evaluation and Translational Research, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China; 2. TCM R&D Institute of Tasly Academy, Tianjin Tasly Group Co. Ltd., Tianjin 300410, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a method for the determination of C-25 epimers of ruscogenin1-*O*-[β-D-glucopyranosyl (1 → 2)][β-D-xylopyranosyl (1 → 3)]-β-D-fucopyranoside in the tuberos roots of *Liriope muscari* at different harvest time. **Method:** A Waters XBridge C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 3.5 μm) was used for separation at 40 °C with a flow rate of 1.0 mL · min⁻¹. The wavelength of detector was set at 203 nm and the mobile phase consisted of acetonitrile-water (42:58). **Result:** The linear ranges of 25R- and 25S-epimer were 20.40-408.00 mg · L⁻¹ (R² = 0.999 9) and 20.09-401.80 mg · L⁻¹ (R² = 0.999 9). The average recoveries were 99.85% and 101.40%, and RSD were 2.1% and 1.8%, respectively. 8 batches of *L. muscari* at different harvest time were analyzed by HPLC, the contents of 25R-, 25S-epimer and were 0.081%-0.136%, 0.012%-0.150%. **Conclusion:** The method is simple, sensitive and accurate, it can be used for determination of C-25 epimers of ruscogenin1-*O*-[β-D-glucopyranosyl (1 → 2)][β-D-xylopyranosyl (1 → 3)]-β-D-fucopyranoside. The contents of 25R- and 25S-epimer in the tuberos roots of *L. muscari* at different harvest time were significantly different, especially 25S-epimer, which indicate that the harvest time of *L. muscari* should be controlled strictly.

[Key words] *Liriope muscari*; ruscogenin1-*O*-[β-D-glucopyranosyl (1 → 2)][β-D-xylopyranosyl (1 → 3)]-β-D-fucopyranoside; epimer; determination; harvest time

[收稿日期] 20150112(024)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81274004,81473317);国家“重大新药创制”科技重大专项(2012ZX09102201-015)

[第一作者] 王宪民,在读硕士,从事中药活性成分与生物技术研究,Tel:025-86185157,E-mail:piratewxm@163.com

[通讯作者] *余伯阳,教授,从事生药质量控制及药效物质基础研究,Tel:025-86185157,E-mail:boyanguy59@163.com

短葶山麦冬具有养阴生津、润肺清心的功效, 收载于《中国药典》2010 年版项下, 在福建泉州市洛江区及莆田市仙游等地广泛种植^[1]。短葶山麦冬中主要含有甾体皂苷类、糖类等成分, 其中短葶山麦冬皂苷 C 为主要活性成分, 含量较高, 具有良好的抗肿瘤转移、抗炎等作用^[2-5]。短葶山麦冬皂苷 C 的苷元为鲁斯可皂苷元, C25 位存在 *R,S* 差向异构现象, 短葶山麦冬皂苷 C 在植物中以两种差向异构体混合物同时存在^[6]。目前已有文献报道关于短葶山麦冬中短葶山麦冬皂苷 C 的含量测定方法^[7], 然而有关短葶山麦冬皂苷 C 差向异构体的含量研究却鲜有报道, 差向异构现象在天然产物中广泛存在, 由于其结构并不完全一致, 药理活性往往存在差异^[8-9], 因此分别测定短葶山麦冬中短葶山麦冬皂苷 C 的 C25 位 *R,S* 差向异构体含量对短葶山麦冬的质量控制具有重要的意义。此外, 短葶山麦冬采收期一般集中在 3—5 月, 采收时间跨度较大, 目前关于短葶山麦冬不同采收期质量控制的研究较少^[10-11]。因此, 本文建立了短葶山麦冬差向异构体质量控制方法, 分别测定了不同采收期短葶山麦冬中短葶山麦冬皂苷 C 差向异构体含量, 并对各采收期中差向异构体含量进行了比较, 为短葶山麦冬质量控制提供了实验依据。

1 材料

e2695 型高效液相色谱仪, 2489 紫外检测器, Empower2 色谱数据工作站 (美国 Waters 公司); Milli-Q AdvantageA10 型超纯水系统 (美国 Millipore 公司), XS205 型 DualRange 分析天平 (瑞士梅特勒-托利多仪器有限公司)。

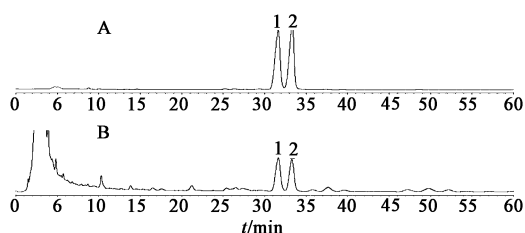
25*R*-短葶山麦冬皂苷 C 和 25*S*-短葶山麦冬皂苷 C 均自制, 经 IR, MS, ¹H-NMR, ¹³C-NMR 鉴定结构, 其纯度用 HPLC 面积归一化法计算 >98.0%。乙腈、甲醇均为色谱纯 (德国默克公司), 乙醇 (分析纯, 天津市康科德科技有限公司), 水为超纯水 (Mili-Q 制备)。

8 批不同采收期短葶山麦冬均采自福建洛江区马甲村, 经中国药科大学江苏省中药评价与转化重点实验室余伯阳教授鉴定为百合科山麦冬属植物短葶山麦冬 *Liriope muscari* 的干燥块根。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Waters XBridge C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 3.5 μm), 流动相乙腈-水 (42:58), 检测波长 203 nm, 柱温 40 °C, 流速 1 mL·min⁻¹, 此色谱条件下, 以 25*R*-短葶山麦冬皂苷 C 计算理论塔板

数不低于 4 000, 对照品及样品色谱图见图 1。



A. 对照品; B. 供试品; 1. 25*S*-短葶山麦冬皂苷 C; 2. 25*R*-短葶山麦冬皂苷 C

图 1 短葶山麦冬 HPLC

Fig. 1 HPLC chromatogram of *Liriope muscari* root

2.2 对照品溶液的制备 精密称取 25*R*-短葶山麦冬皂苷 C 和 25*S*-短葶山麦冬皂苷 C 对照品 20.40, 20.09 mg, 置 50 mL 量瓶中, 加入 70% 甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀即得。

2.3 供试品溶液的制备 取短葶山麦冬粉末 (过 4 号筛) 约 1 g, 精密称定, 加入 70% 乙醇 50 mL, 称重, 回流提取 1 h, 放冷, 补足质量, 过滤, 滤液减压蒸干, 残渣用 70% 甲醇溶解定容至 5 mL, 摇匀, 过 0.45 μm 滤膜, 即得。

2.4 线性关系考察 分别精密吸取对照品溶液 0.25, 1, 2, 3, 4 mL 至 5 mL 量瓶中, 用 70% 甲醇稀释至刻度, 摇匀。分别以 25*R*-短葶山麦冬皂苷 C 和 25*S*-短葶山麦冬皂苷 C 对照品溶液质量浓度 (mg·L⁻¹) 为横坐标, 以各自相应色谱峰峰面积为纵坐标, 绘制标准曲线, 25*R*-短葶山麦冬皂苷 C 和 25*S*-短葶山麦冬皂苷 C 分别在 20.40 ~ 408.00, 20.09 ~ 401.80 mg·L⁻¹ 呈良好线性关系, 回归方程分别为 $Y = 9\,164.9X - 57\,380$ ($R^2 = 0.999\,9$), $Y = 9\,000.7X - 48\,706$ ($R^2 = 0.999\,9$)。

2.5 精密度试验 精密吸取 2.2 项下对照品溶液, 按 2.1 项下色谱条件连续进样 6 次, 记录峰面积值和保留时间, 结果 25*R*-短葶山麦冬皂苷 C 和 25*S*-短葶山麦冬皂苷 C 峰面积 RSD 分别为 0.08%, 0.1%, 保留时间 RSD 分别为 0.1%, 0.1%, 表明仪器精密度良好。

2.6 重复性试验 取同一批次短葶山麦冬样品约 1 g, 精密称定, 共 6 份, 按 2.3 项下方法制备供试品溶液, 进样 20 μL, 每份进样 2 次, 记录峰面积, 以外标法计算, 25*R*-短葶山麦冬皂苷 C 和 25*S*-短葶山麦冬皂苷 C 质量分数分别为 0.113%, 0.120%, RSD 分别为 2.0%, 1.8%, 表明方法重复性良好。

2.7 稳定性试验 取同一供试品溶液, 分别在 0,

4, 8, 16, 24, 48 h 进样, 结果 25R-短葶山麦冬皂苷 C 和 25S-短葶山麦冬皂苷 C 峰面积 RSD 分别为 0.4%, 0.6%, 表明供试品在 48 h 内稳定。

2.8 加样回收率试验 取已知含量短葶山麦冬块

根粉末 6 份, 每份约 0.5 g, 精密称定, 分别精密加入对照品溶液适量, 按 2.3 项下方法制备供试品溶液, 按 2.1 项下色谱条件测定, 计算加样回收率, 结果见表 1。

表 1 25R 和 25S 短葶山麦冬皂苷 C 加样回收率试验

Table 1 Recoveries of components in 25R and 25S samples

成分	称样量/g	样品中量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均值/%	RSD/%
25R-短葶山麦冬皂苷 C	0.512 5	0.577	0.563	1.146	101.06	99.85	2.1
	0.509 8	0.574	0.563	1.143	101.13		
	0.489 7	0.551	0.563	1.130	102.88		
	0.510 7	0.575	0.563	1.125	97.89		
	0.496 3	0.558	0.563	1.109	97.74		
	0.506 8	0.570	0.563	1.124	98.45		
25S-短葶山麦冬皂苷 C	0.512 5	0.613	0.595	1.225	102.68	101.40	1.8
	0.509 8	0.610	0.595	1.216	101.77		
	0.489 7	0.586	0.595	1.178	99.46		
	0.510 7	0.611	0.595	1.198	98.69		
	0.496 3	0.594	0.595	1.206	102.85		
	0.506 8	0.606	0.595	1.219	102.95		

2.9 样品含量测定 按 2.3 项下方法分别制备各样品溶液, 按 2.1 项下色谱条件测定, 分别计算不同采收期短葶山麦冬中 25R-短葶山麦冬皂苷 C 和 25S-短葶山麦冬皂苷 C 含量, 短葶山麦冬皂苷 C 总含量 (25R-短葶山麦冬皂苷 C 和 25S-短葶山麦冬皂苷 C 含量之和) 以及 R/S 值 (25R-短葶山麦冬皂苷 C 含量除以 25S-短葶山麦冬皂苷 C 含量), 结果见表 2。

表 2 各样品中短葶山麦冬皂苷 C 差向异构体含量及 R/S 值

Table 2 Contents of ruscogenin1-O- $[\beta$ -D-glucopyranosyl (1 \rightarrow 2)]- $[\beta$ -D-xylopyranosyl (1 \rightarrow 3)]- β -D-fucopyranoside and the ratio of R/S

采收日期	25R-短葶	25S-短葶	短葶山麦冬皂苷 C 总含量/%	R/S
	山麦冬皂苷 C/%	山麦冬皂苷 C/%		
2013-12-12	0.081	0.012	0.093	6.61
2014-01-12	0.097	0.046	0.143	2.11
2014-02-12	0.082	0.041	0.123	2.02
2014-03-12	0.085	0.044	0.128	1.92
2014-04-12	0.127	0.102	0.229	1.25
2014-05-12	0.108	0.096	0.204	1.13
2014-06-12	0.118	0.112	0.231	1.05
2014-07-12	0.136	0.150	0.285	0.91

3 讨论

分别考察了不同提取溶剂 (甲醇, 乙醇, 70% 甲

醇, 70% 乙醇, 95% 乙醇)、不同提取方式 (超声、回流) 和不同提取时间 (0.5, 1, 2, 3 h) 对 25R-短葶山麦冬皂苷 C 和 25S-短葶山麦冬皂苷 C 提取率影响, 结果表明, 25R-短葶山麦冬皂苷 C 和 25S-短葶山麦冬皂苷 C 溶出规律一致, 最优提取条件为 70% 乙醇热回流提取 1 h; 稳定性方面考察了 48 h 内供试品溶液的稳定性, 结果表明供试品溶液稳定性良好, 说明 25R-短葶山麦冬皂苷 C 和 25S-短葶山麦冬皂苷 C 在供试品溶液中不存在相互转化趋势。

本文所建立的方法可快速、准确测定短葶山麦冬中短葶山麦冬皂苷 C 差向异构体含量, 具有灵敏度高, 重复性好, 专属性强等特点。不同采收期短葶山麦冬中 25R-短葶山麦冬皂苷 C 和 25S-短葶山麦冬皂苷 C 含量差异明显, 随采收期变化其含量变化规律并不一致, 表现为 12 月份 25R-短葶山麦冬皂苷 C 含量远远高于 25S-短葶山麦冬皂苷 C 含量, 1 月份 25S-短葶山麦冬皂苷 C 含量急剧增加, 2, 3 月份含量趋于稳定, 而此期间, 25R-短葶山麦冬皂苷 C 含量变化不明显, 4 月份 25R-短葶山麦冬皂苷 C 含量和 25S-短葶山麦冬皂苷 C 含量明显增加, 25R-短葶山麦冬皂苷 C 含量略高于 25S-短葶山麦冬皂苷 C, 5 月份到 7 月份二者含量略有增加, 且二者含量差值不断缩小。

随采收期的延后, 25R-短葶山麦冬皂苷 C 含量

和 25S-短葶山麦冬皂苷 C 含量虽偶有降低,但整体呈增加的趋势,25S-短葶山麦冬皂苷 C 含量增加速度明显大于 25R-短葶山麦冬皂苷 C,二者含量之比随采收期的延后不断下降,由于 12 月份到 1 月份和 3 月份到 4 月份期间 25S-短葶山麦冬皂苷 C 含量增加速度明显大于 25R-短葶山麦冬皂苷 C,因此二者比值在此期间降低较快,1 月份到 3 月份和 4 月份到 7 月份期间,二者比值呈缓慢下降趋势;短葶山麦冬皂苷 C 总含量偶有降低,整体呈增加趋势明显。

本实验研究了不同采收期短葶山麦冬皂苷中短葶山麦冬皂苷 C 差向异构体含量,结果表明不同采收期短葶山麦冬皂苷 C 差向异构体含量差别较大,25S-短葶山麦冬皂苷 C 含量变化尤为明显,因此,严格控制短葶山麦冬采收期对短葶山麦冬的质量控制非常重要。考虑短葶山麦冬皂苷 C 总含量方面,短葶山麦冬采收期应从 4 月份开始,此段时期短葶山麦冬皂苷 C 含量较高,R/S 值较为稳定,方便质量控制,且文献报道此期间短葶山麦冬块根膨大加快,生物产量急剧增加^[7];考虑 R/S 值方面,采收期的确定应结合短葶山麦冬皂苷 C 差向异构体药理活性差异的进一步研究。

甾体皂苷 C25 位 R,S 差向异构体由于其结构、理化性质较为相似,色谱拆分较为困难,已严重制约其药理学研究及药材质量控制,文献[12-13]报道采用超临界色谱法、高效毛细管电泳法拆分甾体皂苷及甾体皂苷元 C25 位 R,S 差向异构体,但所建立的超临界色谱法并未对 C25 位 R,S 差向异构体进行定量研究,高效毛细管电泳法无法大量获得光学纯的 C25 位 R,S 差向异构体;本研究所建立的方法简便、快速,可尝试用于其他甾体皂苷的色谱分离工作。差向异构现象在甾体皂苷中广泛存在,由于其结构并不完全一致,药理活性往往存在差异;甾体皂苷作为一种天然产物,其在植物体内的含量随产地、采收期的不同有较大区别,因此,最佳产地、最佳采收期的确定应结合甾体皂苷差向异构体的含量及药理活性差异做进一步研究。

[参考文献]

[1] 余伯阳,徐国钧. 中药麦冬资源的利用研究[J]. 中草药, 1995, 26(4):205-210.
[2] 余伯阳,殷霞,荣祖元,等. 短葶山麦冬皂甙 C 的

理活性研究[J]. 中国药科大学学报, 1994, 25(5): 286-288.

[3] 徐强,王蓉,余伯阳. 短葶山麦冬皂甙 C 对迟发型变态反应及炎症反应的影响[J]. 中国药科大学学报, 1993, 24(2):98-101.
[4] Zhang Y Y, Liu J H, Kou J P, et al. DT-13, a steroidal saponin from *Liriope muscari* L. H. Bailey, suppresses A549 cells adhesion and invasion by inhibiting MMP-2/9 [J]. Chin J Nat Med, 2012, 10(6):436-440.
[5] Zhang Y Y, Liu J H, Kou J P, et al. DT-13 suppresses MDA-MB-435 cell adhesion and invasion by inhibiting MMP-2/9 via the p38 MAPK pathway [J]. Mol Med Rep, 2012, 6(5):1121-1125.
[6] Ma S T, Kou J P, Yu B Y. Safety evaluation of steroidal saponin DT-13 isolated from the tuber of *Liriope muscari* (Decne.) Baily [J]. Food Chem Toxic, 2011, 49(9), 2243-2251.
[7] 胡正芳,蒋畅,秦民坚,等. HPLC-ELSD 测定不同产地与采收期短葶山麦冬中短葶山麦冬皂苷 C 的含量[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(19):2508-2510.
[8] Zhang J W, Zhou F, Niu F, et al. Stereoselective regulations of P-glycoprotein by ginsenoside Rh₂ epimers and the potential mechanisms from the view of pharmacokinetics[J]. PloS One, 2012, 7(4):e35768.
[9] Dirk Classen-Houben, Daniela Schuster, Thierry Da Cunha, et al. Selective inhibition of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase 1 by 18 α -glycyrrhetic acid but not 18 β -glycyrrhetic acid [J]. J Steroid Biochem Mol Biol, 2009, 113(3/5):248-252.
[10] 苏海兰,唐建阳,陈菁瑛,等. 短葶山麦冬吸肥规律初步研究[J]. 福建农业学报, 2009, 24(2): 149-152.
[11] 黄颖桢,陈菁瑛,苏海兰,等. 短葶山麦冬最佳采收期研究[J]. 福建农业学报, 2010, 25(5):572-575.
[12] Zhao Y, Mc Cauley J, Pang X, et al. Analytical and semipreparative separation of 25 (R/S)-spirostanol saponin diastereomers using supercritical fluid chromatography [J]. J Separ Sci, 2013, 36: 3270-3276.
[13] 陈乃东,陈琼,何健. 高效毛细管电泳法拆分 25R、25S 鲁斯可皂苷元初步研究[J]. 药物分析杂志, 2014, 34(5):805-812.

[责任编辑 顾雪竹]