

通关藤化学成分 HPLC 指纹图谱研究

乔佳¹, 沃源青², 张慧^{1*}, 冷彩云¹

(1. 辽宁中医药大学, 辽宁大连 116600; 2. 沈阳东宇生物制品有限公司, 沈阳 110015)

[摘要] 目的:研究通关藤化学成分的指纹图谱。方法:采用 HPLC 以 TC-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm), 乙腈-水为流动相进行梯度洗脱, 检测波长 210 nm, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 25 °C。结果:以 ZP-7 通关藤苷元 B([11α-O-(2-甲基丁酰基)-12β-O-乙酰基通关藤苷元 B])为参照物, 建立了通关藤的指纹图谱, 指认了 17 个共有峰, 精密度和重复性中共有峰相对保留时间 RSD < 3%, 每个产地色谱图中的共有峰的峰面积之和 > 90%, 10 批药材的相似度在 0.75 ~ 0.98, 存在一定差异。结论:该方法准确、重复性好, 为通关藤质量评价和质量控制提供依据, 也为通关藤进一步开发奠定基础。

[关键词] 通关藤; 指纹图谱; 液相色谱法

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)08-0069-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014080069

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13422/j.cnki.syfjx.000040.html>

[网络出版时间] 2014-02-07 15:25

HPLC Fingerprint of Chemical Constituents of *Marsdenia tenacissima*

QIAO Jia¹, WO Yuan-qing², ZHANG Hui^{1*}, LENG Cai-yun¹

(1. Liaoning University of Traditionail Chinese Medicine, Dalian 116600, China;

2. Shenyang Dongyu Biological Products Co. Ltd., Shenyang 110015, China)

[Abstract] **Objective:** Fingerprint analysis of chemical constituents of *Marsdenia Tenacissima*. **Method:** With the use of HPLC, TC-C₁₈ column (4.6 mm × 150 mm, 5 μm), acetonitrile-water was used as the mobile phase with gradient elution, detection wavelength at 210 nm, flow rate of 1.0 mL·min⁻¹, temperature of column at 25 °C. **Result:** The fingerprint of *M. tenacissima* was established using ZP-7tenacigenin B [11α-O-(2-methylbutyryl)-12β-O-acetyltenacigenin B] as reference substance. 17 common peaks were identified. The precision and repeatability of the relative retention time RSD were less than 3%, each producing area in the chromatogram of common peak area was more than 90%. 10 batches of similarity were between 0.75-0.98, there were some differences. **Conclusion:** The method is accurate and reproducible, which can provide the basis for quality evaluation and quality control of *M. tenacissima*, also lay the foundation for further development of *M. tenacissima*.

[Key words] *Marsdenia teneacissima*; fingerprint; HPLC

通关藤为萝藦科牛奶菜属植物通关藤

Marsdenia tenacissima (Roxb) Wight et Arn 的干燥藤茎, 始载于《滇南本草》, 性味苦, 微寒, 主产于云南、四川、贵州和广西南部地区^[1-2], 具有消炎、清热解毒、止咳平喘、散结止痛等功效^[3], 传统用于治疗气管炎、支气管哮喘^[4]等症。通关藤甙体皂苷及苷元类具有明显的调节免疫功能、抗肿瘤^[5-8]、保肝利胆等作用, 制剂主要用于治疗肺癌、食道癌、胃癌、直肠癌、肝癌等恶性肿瘤^[9]。目前通关藤的 HPLC 指纹图谱研究可见采用绿原酸等^[10-12]作对照品, 建立总

[收稿日期] 20130906(007)

[基金项目] 辽宁省教育厅基金(2009T066); 大连市科技局青年基金项目(2009J22DW040)

[第一作者] 乔佳, 硕士, 从事中药学研究, E-mail: after17qiao@yeah.net

[通讯作者] * 张慧, 教授, 硕士生导师, 从事中药质量评价与创新药物研究, Tel: 0411-87586003, E-mail: syyys@163.com

酚酸指纹图谱;采用 HPLC-ELSD,以通关藤中 10 个 C₂₁甙体皂苷^[13]对照,建立总皂苷的指纹图谱,上述研究均以甙体皂苷类成分为主。本课题组前期实验证实,皂苷元具有抗肿瘤活性,为此本实验采用活性成分 ZP-7 通关藤苷元 B([11 α -O-(2-甲基丁酰基)-12 β -O-乙酰基通关藤苷元 B])为对照,建立了通关藤皂苷元的特征指纹图谱分析方法。

1 材料

1.1 仪器 Agilent HPLC 1100 型高效液相色谱仪(真空脱气机、四元泵,美国安捷仑科技有限公司)、AT-330 型恒温柱箱(天津奥特赛恩斯仪器有限公司)、Millipore Milli-Q 型超纯水系统。

1.2 试药 ZP-7 通关藤苷元 B([11 α -O-(2-甲基丁酰基)-12 β -O-乙酰基通关藤苷元 B])对照品由本实验室自制,经¹H-和¹³C-NMR, MS 鉴定结构,纯度经 HPLC 检测含量 >98%。通关藤药材由辽宁中医药大学中药鉴定教研室翟延君教授鉴定萝藦科牛奶菜属植物通关藤 *Marsdenia tenacissima* (Roxb) Wight et Arn 的干燥藤茎,标本保存于辽宁中医药大学中药标本馆,药材编号见表 1。乙腈、甲醇为色谱纯;石油醚、三氯甲烷、盐酸均为分析纯,水为二次重蒸水。

表 1 通关藤样品来源

No.	来源	采收时间	No.	来源	采收时间
A1	云南昆明	9 月	A6	河北杏林	10 月
A2	云南思茅	9 月	A7	河北隆兴	10 月
A3	云南临沧	9 月	A8	四川绵阳	11 月
A4	云南文山	9 月	A9	四川重庆	11 月
A5	贵州贵阳	10 月	A10	四川成都	11 月

2 方法与结果

2.1 色谱条件 TC-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μ m);流动相乙腈(A)和水(B),梯度洗脱(0 ~ 4 min, 15% A; 3 ~ 20 min, 15% ~ 18% A; 20 ~ 55 min, 18% ~ 38% A; 55 ~ 80 min, 38% ~ 30% A; 80 ~ 90 min, 30% ~ 15% A),检测波长 210 nm,柱温 25 $^{\circ}$ C,流速 1.0 mL · min⁻¹,进样量 10 μ L。记录时间 80 min。理论塔板数按 ZP-7 通关藤苷元 B 峰面积计算不低于 3 000。

2.2 对照品溶液的制备 精密称取 ZP-7 通关藤苷元 B 对照品适量,加甲醇溶解配制成 1.061 g · L⁻¹ 的对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备 精密称取通关藤中粉 10 g,置 500 mL 圆底烧瓶中,加 100 mL 石油醚冷浸

脱脂 24 h,滤过,药渣加 1 mol · L⁻¹ 盐酸 100 mL,加热回流水解 4 h,放冷,加入 100 mL 三氯甲烷继续回流 1 h,冷却后在分液漏斗中分离三氯甲烷层,残液用 30 mL 三氯甲烷萃取 2 次,合并三氯甲烷层,回收三氯甲烷,水浴蒸干,残渣加甲醇溶解并定容于 25 mL 量瓶中,0.45 μ m 微孔滤膜滤过,即得。

2.4 方法学考察

2.4.1 稳定性试验 精密吸取供试品溶液 10 μ L,按 2.1 项下分别在 0, 2, 4, 6, 8, 10 h 进行测定,以上述各共有指纹峰为检测指标,计算共有峰的相对保留时间及相对峰面积,结果表明,其 RSD 分别在 0.07% ~ 1.68%, 0.27% ~ 2.89%,符合指纹图谱技术要求(RSD 均 < 3.0%),即供试品溶液在室温 10 h 内稳定性良好。

2.4.2 精密度试验 精密吸取同一供试品溶液 10 μ L,按 2.1 项下连续进样 6 次,计算共有指纹峰与参照物的相对保留时间及相对峰面积,结果 RSD 分别在 0.03% ~ 1.23%, 0.35% ~ 2.94%,表明精密度良好。

2.4.3 重复性试验 精密称取云南昆明通关藤药材 6 份,按 2.3 项下操作制备供试品溶液,按 2.1 项下分别量取 10 μ L 注入液相色谱仪,以上述各共有指纹峰为检测指标,计算共有峰的相对保留时间及相对峰面积,结果显示, RSD 分别在 0.07% ~ 2.82%, 0.42% ~ 2.71%,方法重复性良好。

2.5 指纹图谱的建立

2.5.1 参照物的确定 测定了 10 个不同产地通关藤药材样品,药材的色谱峰均在 90 min 之内出现,由于对照品 ZP-7 通关藤苷元 B 为已知成分,且其为活性成分,其色谱峰在 61 min 左右,不同产地 10 个样品均存在,因此选择此峰为参照物峰(S)。

2.5.2 共有指纹峰的标定 同时测定了未加通关藤平行制备的阴性样品溶液,对阴性液与供试品色谱图进行了比较,排除了阴性干扰峰,以 15 号峰(ZP-7 通关藤苷元 B)为参照物,选择 10 个产地保留时间与参照物相对比的相对保留时间一致的峰为共有指纹峰,最终确定共有指纹峰 17 个,经计算,10 个产地各共有峰相对保留时间 RSD < 3%,每个产地色谱图中的共有峰的峰面积之和 > 90%。典型色谱图见图 1。

2.5.3 样品指纹图谱测定 取 10 个不同产地通关藤药材粉末,按 2.3 项下供试品溶液制备方法制备样品,分别量取 10 μ L 注入色谱仪,进行测定,计算相对保留时间和相对峰面积,结果显示 10 个产地的

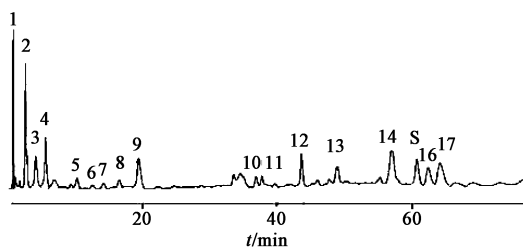


图1 通关藤 HPLC 指纹图谱(S 为 ZP-7 通关藤苷元 B)

17 个共有峰的相对保留时间 RSD < 3%, 10 个产地的共有峰的相对峰面积相差较大,证明不同产地通关藤药材质量有一定差异。色谱图见图 2。

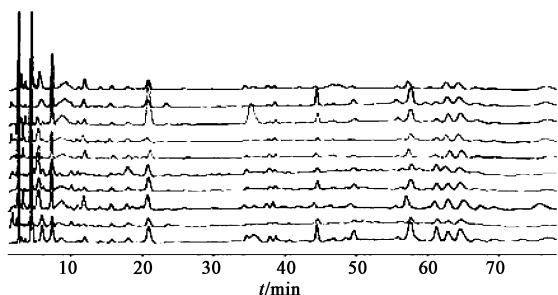


图2 10 个不同产地通关藤指纹图谱

2.5.4 相似度评价 对 10 批样品中 17 个共有色谱峰峰面积的平均值作为共有模式,选用夹角余弦的测度方法,计算样品与共有模式之间的相似度,结果显示,10 批药材的相似度在 0.75 ~ 0.98,其中 A9, A5 的相似度 < 0.90,为此二者药材质量不佳,结果见表 2。

表 2 相似度评价

No.	相似度	No.	相似度
A1	0.900 1	A6	0.987 0
A2	0.900 8	A7	0.960 4
A3	0.984 9	A8	0.960 2
A4	0.957 3	A9	0.826 4
A5	0.752 3	A10	0.985 2

2.5.5 聚类分析 对 10 批通关藤进行系统聚类分析,应用 SPSS 软件 16.0,选用夹角余弦作为样品间的相似性测度,采用组内连接方法,得到聚类树图 3。聚类树图显示,产地 A1, A2, A3, A4, A6, A7, A8, A10 聚为 1 类,产地 A5, A9 与其他产地距离较远,分别各聚为 1 类。

3 讨论

3.1 提取溶剂和方法考察 对超声和回流提取 2 种方法,后者提取效率高,最后确定选择用回流提取法。在此基础上,考察了 1 mol·L⁻¹ 盐酸三氯甲烷等作为提取溶剂,比较发现三氯甲烷作为提取溶剂的

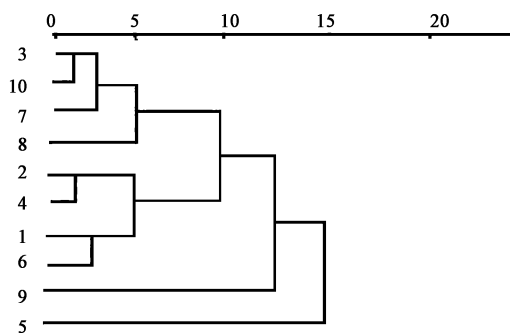


图3 通关藤样品聚类分析谱

ZP-7 通关藤苷元 B 提取完全,且提取效率最高,无损失。

3.2 色谱条件考察 分别考察了甲醇-水、乙腈-水、甲醇-0.6% 醋酸溶液、乙腈-磷酸盐溶液的不同比例为流动相。结果表明,采用乙腈-水流动相系统,ZP-7 通关藤苷元 B 与相邻色谱峰分离度良好,且基线平稳,有利于指纹图谱分析,因此确定乙腈-水系统作为流动相系统。

3.3 检测波长选择 对通关藤提取物供试品溶液在 200 ~ 400 nm 扫描,在 210 nm 左右均有最大吸收,兼顾基线噪声,分离度,色谱峰信息等,综合比较选择 210 nm 作为检测波长。

3.4 共有峰化学成分 本品采用盐酸水解总皂苷,再以三氯甲烷提取制备供试品溶液,提取物中主要成分为皂苷元,经比色法测定,证实提取物中皂苷元含量达 85% 以上,为此指纹图谱共有峰中的化学成分主为皂苷元。

3.5 相似度评价 评价结果显示,样品贵州贵阳(A5)、四川重庆(A9)与相似度与其他样品差异较大,推测原因主要为药材产地不同所致,可见产地是影响药材质量的一个主要因素。

3.6 药材混淆品 市场上常见通关藤混淆品 6 种,分别为白叶瓜馥木、黑龙骨、夜来香、黑风藤、南山藤、独山瓜馥木等^[14],通关藤与 6 种混淆品分别来源于不同科/属的植物,正品与混淆品的化学成分区别较大,采用文中建立指纹图谱可鉴别药材真伪。

[参考文献]

[1] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:化学工业出版社,1977:507.
 [2] Qiu S X, Luo S Q, Lin L Z, et al. Further polyoxypregnanes from tenacissima [J]. Marsdenia Phytochemistry, 1996, 41(5): 1385.

不同生长年限山豆根中苦参碱和氧化苦参碱的含量比较

彭红华¹, 蒋嫦月¹, 林吴¹, 田辉¹, 杨东爱², 张晶晶¹, 员晓云¹, 梁国隆¹, 梁臣艳^{1*}

(1. 广西中医药大学, 南宁 530001; 2. 广西民族医药研究所, 南宁 530001)

[摘要] 目的: 探讨不同生长年限山豆根中苦参碱和氧化苦参碱的含量, 为建立和完善中药材山豆根的质量控制体系和适宜采收时间提供实验依据。方法: 采用 HPLC 测定, 色谱柱 welch materials XB-C₁₈, 流动相乙腈-0.08% 三乙胺水溶液 (12:88), 流速 0.8 mL·min⁻¹, 检测波长 220 nm, 检测温度 25 ℃。结果: 不同生长年限的山豆根中生物碱的含量差异明显。1、2 年生山豆根中生物碱的含量较低, 3 年生的药材含量明显升高, 3~6 年的药材含量变化不大。结论: 苦参碱和氧化苦参碱的含量变化规律可为确定山豆根的采收年限提供参考依据。

[关键词] 山豆根; 苦参碱; 氧化苦参碱; 高效液相色谱法

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)08-0072-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfix.2014080072

Comparison of Matrine and Oxymatrine in Radix Sophorae Subprostrata of Different Growing Years

PENG Hong-hua¹, JIANG Chang-yue¹, LIN Wu¹, TIAN Hui¹, YANG Dong-ai², ZHANG Jing-jing¹,
YUAN Xiao-yun¹, LIANG Guo-long¹, LIANG Chen-yan^{1*}

(1. Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530001, China;

2. Guangxi National Medical Research Institute, Nanning 530001, China)

[收稿日期] 20130306(027)

[基金项目] 广西教育厅科研立项课题(200810LX101); 广西自然科学基金创新团队研究项目(2011GXNSFF018006)

[第一作者] 彭红华, 研究生, 副教授, 从事中医药学研究, Tel: 0771-3936092, E-mail: zydphh@163.com

[通讯作者] * 梁臣艳, 硕士, 副教授, 从事中药、药学的有效成分和质量控制方法研究, Tel: 0771-3137585, E-mail: liang_chen_yan@126.com

- [3] 刑旺兴, 陈斌, 苾鹤鸣, 等. 通光藤的化学成分的研究[J]. 中国中药杂志, 2004, 29(12): 1148.
- [4] 江苏新医学院. 中药大辞典. 下册[M]. 上海: 上海人民出版社, 1975: 470.
- [5] 张文平, 王昌利, 仲英子, 等. 乌骨藤及其制剂的研究进展[J]. 齐鲁药事, 2006, 25(5): 293.
- [6] 于邵帅, 陈明苍, 李志雄, 等. 通关藤的化学成分与药理活性研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(21): 279.
- [7] 陈敏, 李媛媛, 李先荣, 等. 通关藤抗肿瘤作用机制研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(16): 334.
- [8] 倪冲, 裴志东, 张婧小, 等. 乌骨藤中白桦脂酸的提取分离及抗肿瘤活性[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(9): 172.
- [9] 钱军, 华海清, 秦叔逵. 通关藤制剂抗肿瘤作用研究进展[J]. 中国中药杂志, 2009, 34(1): 11.
- [10] 赵陆华, 相秉仁, 陆红柳. 乌骨藤药材 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中成药, 2008, 30(8): 1093.
- [11] 李媛媛, 倪艳, 李先荣, 等. 通关藤药材 C21 甾体皂苷类成分特征图谱研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(16): 43.
- [12] 王月敏, 夏素霞, 于邵军, 等. 乌骨藤药材中绿原酸的含量测定方法研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2007, 13(7): 12.
- [13] 李迩娜, 腾再进, 刘世平, 等. 不同产地通关藤药材 HPLC-ELSD 指纹图谱[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(11): 1610.
- [14] 张慧, 裴志东, 倪冲, 等. 通关藤及其混淆品的 RAPD 鉴别研究[J]. 中药材, 2011, 34(9): 13550.

[责任编辑 顾雪竹]