

HPLC 测定通关藤中 ZP-7 通关藤苷元 B 的含量

张慧, 裴志东*, 王添敏, 乔佳

(辽宁中医药大学药学院, 辽宁 大连 116600)

[摘要] 目的: 建立 HPLC 测定通关藤药材中 ZP-7 通关藤苷元 B ($[11\alpha\text{-}O\text{-}(2\text{-甲基丁酰基})\text{-}12\beta\text{-}O\text{-乙酰基}]\text{通关藤苷元 B}$) 含量的方法, 并对不同产地的药材进行测定。方法: 采用 Agilent TC-C₁₈ 柱 (4.6 mm × 150 mm, 5 μm) 色谱柱, 流动相乙腈-水 (35:65), 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 210 nm, 柱温 25 °C, 进样量 10 μL。结果: ZP-7 通关藤苷元 B 的线性范围为 3.183 ~ 7.427 μg ($r=0.9994$), 平均回收率 99.95% (RSD 0.83%)。结论: 方法准确, 重复性好, 专属性强, 可控制药材的质量。

[关键词] 通关藤; ZP-7 通关藤苷元 B; 高效液相色谱; 含量; 抗肿瘤

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)13-0088-03

[doi] 10.11653/syjf2013130088

Determination of ZP-7 Tenacigenin B in Marsdeniae Tenocissimae by HPLC

ZHANG Hui, PEI Zhi-dong*, WANG Tian-min, QIAO Jia

(Liaoning University of Chinese Traditional Medicine, Dalian 116600, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a HPLC method for the content determination of ZP-7 tenacigenin B [$[11\alpha\text{-}O\text{-}(2\text{-methylbutyryl})\text{-}12\beta\text{-}O\text{-acetyl}]\text{tenacigenin B}$] in Marsdeniae Tenocissimae, and to determine the content of them in Marsdeniae Tenocissimae from different areas. **Method:** The analytical method was carried out with Agilent TC-C₁₈ (4.6 mm × 150 mm, 5 μm) column and the mobile phase consisted of acetonitrile-water (35:65) at a flow rate of 1.0 mL·min⁻¹. The detection wavelength was set at 210 nm, the column temperature was 25 °C and injection volume was 10 μL. **Result:** The calibration curves was linear within the range of 3.183-7.427 μg ($r=0.9994$) for ZP-7 tenacigenin B. The average recovery was 99.95% (RSD 0.83%). **Conclusion:** The method is accurate, reproducible and precise, and can control the content of ZP-7 tenacigenin B in Marsdeniae Tenocissimae, and can guide the clinical medication.

[Key words] Marsdeniae Tenocissimae Caulis; ZP-7 tenacigenin B; HPLC; assay; anti tumor

中药通关藤为萝藦科牛奶菜属植物通关藤 *Marsdenia tenocissima* (Roxb) Wight et Arn 的干燥藤茎, 始载于《颠南本草》, 主产于云南、四川等地区,

具有清热解毒、散结止痛等功效, 目前其单味药材制成的注射液作为治疗消化道肿瘤的一线药物广泛应用于临床^[1-2]。通关藤药材的质量标准曾收载于 1977 年版《中国药典》中, 但因标准低下, 后续历版药典均未收载, 直至 2010 年版《中国药典》经对其标准整理提高再次收载其中。新版药典采用比色测定总甾体皂苷含量^[3], 文献中可见采用 HPLC 测定绿原酸的含量^[4]。本课题组的前期药效学实验已证实 ZP-7 [$[11\alpha\text{-}O\text{-}(2\text{-甲基丁酰基})\text{-}12\beta\text{-}O\text{-乙酰基}]\text{通关藤苷元 B}$] 通关藤苷元 B 具有抗肿瘤的活性, 其为 C₂₁ 甾体皂苷元, 为了更好的控制药材质量, 本文采用 HPLC 测定通关藤中含有的具有专属性的抗肿瘤

[收稿日期] 20121204(009)

[基金项目] 辽宁省科技厅博士启动基金项目(20101069); 辽宁省教育厅基金项目(2009T006); 大连市科技局青年基金项目(2009J22DW040)

[第一作者] 张慧, 博士/博士后, 副教授, 从事中药品质鉴定研究, Tel: 0411-87586003, E-mail: syyyes@163.com

[通讯作者] *裴志东, 硕士, 副教授, 从事中药质量及管理研究, Tel: 0411-87586078, E-mail: pzd87586078@163.com

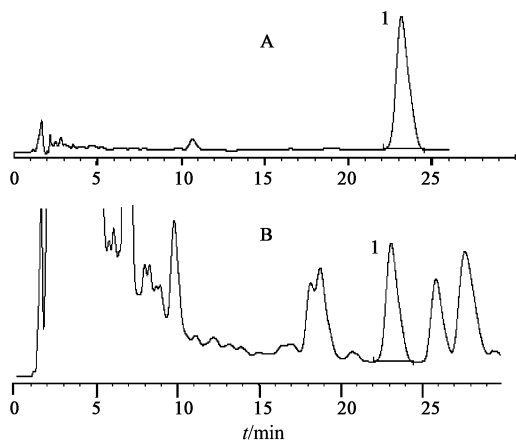
活性成分 ZP-7 通关藤苷元 B 的含量,以控制药材的质量,指导临床用药。

1 材料

Agilent 1260 型高效液相色谱仪(包括四元泵, DAD 检测器,柱温箱,自动进样器,工作站,美国安捷伦),ALC-110.4 型电子天平(德国艾科勒),KQ-500DV 型数控超声清洗机(昆山市超声仪器有限公司),Millipore Milli-Q 型超纯水系统(美国密理博),ZP-7 通关藤苷元 B 对照品自制,纯度 >98%,通关藤药材分别于 2009 年 10~12 月收集于云南临沧、怒江、大理、文山、金平,贵州盘县、四川绵阳、广西隆林、那坡、广西三江,均由辽宁中医药大学中药鉴定教研室翟延君教授鉴定为萝藦科牛奶菜属植物通关藤 *Marsdenia tenocissima* (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。甲醇、乙腈均为色谱纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Agilent TC-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm),流动相乙腈-水(35:65),检测波长 210 nm,流速 1.0 mL·min⁻¹,柱温 25 °C,进样量 10 μL,见图 1。



A. 对照品; B. 样品; 1. ZP-7 通关藤苷元 B

图 1 通关藤 HPLC

2.2 对照品溶液制备 精密称取 ZP-7 通关藤苷元 B 对照品适量,加甲醇溶解并稀释制成 0.50 g·L⁻¹ 的溶液,摇匀,即得。

2.3 供试品溶液制备 取通关藤粉末 8 g,精密称定,置 100 mL 圆底烧瓶中,加 1 mol·L⁻¹ 盐酸 25 mL,加热回流 4 h,放冷,加入 25 mL 氯仿继续回流 1 h,放冷后移置分液漏斗中,用三氯甲烷 6 mL 分 2 次洗涤烧瓶,洗涤液置上述分液漏斗中。取三氯甲烷层,残液用 5 mL 三氯甲烷萃取 2 次,合并三氯

甲烷层,水浴蒸干,残渣加甲醇溶解,并定容于 10 mL 量瓶中,0.45 μm 微孔滤膜滤过,即得。

2.4 测定法 精密量取供试品溶液和对照品溶液各 10 μL,注入高效液相色谱仪,测定色谱峰面积,按外标法计算药材含量。

2.5 方法学考察

2.5.1 线性范围考察 分别精密量取 ZP-7 通关藤苷元 B 对照品溶液(质量浓度 1.061 0 g·L⁻¹) 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5 mL 置于 5 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,精密量取 10 μL,注入高效液相色谱仪,按 2.1 项下条件测定峰面积。以对照品进样量为横坐标,峰面积为纵坐标绘制标准曲线,进行线性回归。结果 ZP-7 通关藤苷元 B 的回归方程为 $Y = 239.02X - 93$ ($r = 0.9994$),表明 ZP-7 通关藤苷元 B 的进样量在 3.183 ~ 7.427 μg 呈良好的线性关系。

2.5.2 专属性试验 除去通关藤药材,按 2.3 方法制备阴性空白溶液,精密量取 10 μL,注入高效液相色谱仪。结果显示,在阴性空白溶液的色谱图中,未见有与对照品溶液色谱图中 ZP-7 通关藤苷元 B 峰的相同位置的峰,证实阴性空白无干扰,这证实方法专属性良好。

2.5.3 稳定性试验 取同一供试品溶液 10 μL,分别在制备后 0, 2, 4, 6, 8, 10 h 内测定,记录相应色谱峰面积,经统计学处理, RSD 1.28%。结果表明,供试品溶液在室温条件下放置 10 h 基本稳定。

2.5.4 精密度试验 取通关藤药材粉末 8 g 共 6 份,分别由 3 个不同的实验人员,分别在不同的时间,按 2.3 方法制备供试品溶液,分别采用不同的仪器,按 2.1 色谱条件进样,测定各供试品溶液中的 ZP-7 通关藤苷元 B 的峰面积,计算含量。结果显示, RSD 1.43%,表明中间精密度良好。

2.5.5 重复性试验 取通关藤药材粉末 8 g 共 6 份,精密称定,按 2.3 方法制备供试品溶液。分别精密吸取 10 μL,按 2.1 色谱条件测定峰面积,计算 ZP-7 通关藤苷元 B 含量。结果方法重复性良好, RSD 1.32%。

2.5.6 加样回收率试验 分别取已知含量(0.16%)的通关藤药材粉末 4 g 共 6 份,精密称定,精密加入 ZP-7 通关藤苷元 B 对照品溶液(1.061 g·L⁻¹) 3 mL,按 2.3 方法制备供试品溶液,测定回收率。结果见表 1。

2.6 样品含量测定 取 10 个不同产地通关藤药材粉末 8 g,按 2.3 方法制备供试品溶液,按 2.1 项色

表 1 通关藤中 ZP-7 通关藤苷元 B 加样回收率

称样量 /g	样品含量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	均值 /%	RSD /%
2.098 7	3.357 9	6.573 2	101.01		
2.139 5	3.423 2	6.594 8	99.64		
2.155 3	3.448 5	6.629 6	99.94	99.95	0.83
2.210 3	3.536 5	6.674 0	98.57		
2.196 4	3.514 2	6.712 8	100.49		
2.117 6	3.388 2	6.572 8	100.05		

注:对照品加入量均为 3.183 mg。

谱条件进样 10 μ L,测定 ZP-7 通关藤苷元 B 的峰面积,按照外标法计算含量。结果见表 2。

表 2 通关藤中 ZP-7 通关藤苷元 B 含量($n=3$) %

产地	ZP-7 含量	产地	ZP-7 含量
云南金平	0.162	广西那坡	0.124
云南怒江	0.146	广西三江	0.143
云南临沧	0.113	广西隆林	0.125
云南文山	0.158	四川绵阳	0.099
云南大理	0.136	贵州盘县	0.040

3 讨论

3.1 流动相的选择 根据皂苷的结构特点,实验中曾参考文献[5-6]采用甲醇-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。结果显示,采用乙腈-水(35:65)为流动相时,ZP-7 通关藤苷元 B 与相邻色谱峰分离度良好,且阴性空白无干扰。因 ZP-7 通关藤苷元 B 在紫外最大吸收波长为 210 nm,为紫外末端吸收,基线有所波动,但在本色谱条件下,线性的相关系数已达 0.999 4,满足 HPLC 法含量测定的线性要求。

3.2 提取条件的选择 先后采用了 1 mol·L⁻¹盐酸回流后,氯仿超声提取;1 mol·L⁻¹盐酸回流后,氯仿再次回流提取等方法,结果后者方法提取的 ZP-7 通关藤苷元 B 提取完全,有效成分无损失。

3.3 检测波长的选择 取 ZP-7 通关藤苷元 B 对照品加甲醇制成每 1 mL 含 20 μ g 的溶液,在 200~400 nm 的紫外波长范围内扫描。结果显示,对照品在 210 nm 下有最大吸收,为此本品的含量测定的检测波长确定为 210 nm。

3.4 样品的含量分析 对 10 个不同产地通关藤中的 ZP-7 通关藤苷元 B 的含量测定结果显示,不同产地药材的含量有一定差异性,其中产于云南的药材含量较高,贵州较低,这与云南为通关藤的地道药材相一致。

3.5 含量测定成分的专属性 通关藤的化学成分主要为酚酸、甾体苷、多糖、生物碱、五环三萜类等,其中以 C₂₁甾体苷类化合物为主,是本品的主要活性物质和专属性成分^[7-10]。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 C₂₁甾体苷元,且前期实验证实其为抗肿瘤活性成分,为此选择了 ZP-7 通关藤苷元 B 作为含量测定的指标成分,以控制药材质量。

[参考文献]

- [1] 刑旺兴,程荣珍,陈园昕,等. 通关藤的药理作用与临床应用[J]. 中南药学,2003,1(4):229.
- [2] 陈敏,李媛媛,李先荣. 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.
- [3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:277.
- [4] 王月敏,夏素霞,于绍军,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.
- [5] 毛红梅,平欲晖,宗星星,等. HPLC 同时测定败酱草中常春藤皂苷元、齐墩果酸和熊果酸的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(15):89.
- [6] 崔春利,王敏,郭东艳,等. 不同切制法对椴木根皮中皂苷类成分的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(22):9.
- [7] 于绍帅,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.
- [8] 倪冲,裴志东,张稼小,等. 乌骨藤中白桦酯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] 方奕奇,孙雪梅. 通关藤化学成分及抗肿瘤作用的研究进展[J]. 中国生化药物杂志,2011,32(2):165.
- [10] 成冠蓝,孔令义,张仓. 通关藤化学成分和药理作用研究进展[J]. 药学与临床研究,2009,17(2):135.

[责任编辑 顾雪竹]