

HPLC-DAD-ELSD 法同时测定 22 个产地通关藤中 3 种皂苷

李思雨, 张冬月, 韩丽, 张慧*
(辽宁中医药大学药学院, 辽宁大连 116600)

摘要: 目的 建立 HPLC-DAD-ELSD 法同时测定 22 个产地通关藤 *Marsdenia tenacissima* (Roxb.) Wight et Arn. 中 3 种皂苷的含有量。方法 通关藤 70% 乙醇提取物的分析采用 Agilent Zorbax SB-C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相乙腈-水 (45:55); 检测波长 235 nm; 体积流量 1.0 mL/min; 漂移管温度 80 °C; 载气压力 3.5 bar (1 bar = 100 kPa)。结果 通关藤苷 G、H、I 分别在 1.768~5.305 μg ($r=0.999\ 2$)、3.842~11.526 μg ($r=0.999\ 0$)、3.026~9.078 μg ($r=0.999\ 1$) 范围内呈良好的线性关系, 平均加样回收率分别为 99.60% (RSD=1.86%)、99.88% (RSD=2.49%)、99.08% (RSD=1.14%), 不同产地样品中三者含有量有明显差异。结论 该方法稳定可靠, 可用于通关藤的质量控制。

关键词: 通关藤; 产地; 通关藤苷 G; 通关藤苷 H; 通关藤苷 I; HPLC-DAD-ELSD

中图分类号: R284.1

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2019)05-1144-03

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2019.05.038

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, 最早记载于《滇南本草》, 主产于云南、贵州、广西等地, 其味苦, 性微寒, 具有抗肿瘤、清热解毒等作用, 由通关藤为原料制成的消癌平制剂临床应用广泛^[1-3], 用于治疗胃癌、食管癌、肝癌等消化道肿瘤^[4], 主要药效物质是 C₂₁ 甾体皂苷类化合物^[5]。目前, 有关通关藤及其制剂的含有量测定方法大多以 2015 年版《中国药典》收录的 HPLC-ELSD 法测定通关藤 H 为主, 而且也有报道采用 HPLC 法同时测定通关藤苷 G、I^[6], 或通关藤苷 A、D 含有量^[7], UPLC-MS/MS 法测定通关藤苷 A、H、I 含有量^[8], HPLC-ELSD 法测定通关藤苷 L、M、N、O、P 含有量^[9], HPLC-UV 法测定通关藤苷 A 含有量^[10], 比色法测定总皂苷含有量^[11-14]等, 但尚无 HPLC-DAD-ELSD 联用方法同时测定具有紫外吸收的通关藤苷 G、I 及无紫外吸收的通关藤 H 含有量。为了开发抗肿瘤新药原料, 并更好控制其提取物质量, 本实验建立 HPLC-DAD-ELSD 法同时测定 22 个产地通关藤中通关藤苷 G、H、I 的含有量, 为相关新药开发奠定基础, 也为临床用药提供依据。

1 材料

1.1 仪器 Agilent 1260 高效液相色谱仪 (配置真空脱气机、四元泵及 DAD、ELSD 检测器); KQ-250DE 型数控超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); JP60-4 型电子分析天平 (沈阳市龙腾电子有限公司); CP225D 型电子分析天平 (十万分之一, 德国 Sartorius 公司); RE-52A 型旋

转蒸发器 (上海亚荣生化仪器厂)。

1.2 试剂 通关藤苷 H (批号 111913-201202) 对照品购自中国食品药品检定研究院; 通关藤苷 G (批号 PM0529SA13)、通关藤苷 I (批号 PM0529SB13) 对照品均购自上海源叶生物科技有限公司。甲醇为色谱纯 (天津市科密欧化学试剂有限公司); 乙腈为色谱纯 (天津星马克科技发展有限公司); 水为纯净水 (杭州娃哈哈集团有限公司)。

1.3 药材 22 个产地通关藤均为实地采集, 经辽宁中医药大学药学院张慧教授鉴定为萝藦科牛奶菜属植物通关藤 *Marsdenia tenacissima* (Roxb.) Wight et Arn. 的干燥藤茎。药材经 70% 乙醇提取后, 浓缩干燥。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Agilent Zorbax SB-C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相乙腈-水 (45:55); 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 30 °C; 检测波长 235 nm; 进样量 20 μL。ELSD 参数为漂移管温度 80 °C; 载气压力 3.5 bar (1 bar = 100 kPa); 增益值 5。

2.2 溶液制备

2.2.1 对照品溶液制备 精密称取通关藤苷 G、H、I 对照品适量, 置于同一量瓶中, 甲醇溶解并定容至刻度, 即得 (三者质量浓度分别为 0.841、1.921、1.513 mg/mL)。

2.2.2 供试品溶液制备 将提取物置于量瓶中, 70% 乙醇稀释至 0.15 g/mL, 即得。

2.2.3 阴性对照溶液 取 70% 乙醇, 按“2.2.1”项下方

收稿日期: 2018-09-06

基金项目: 辽宁省高等学校优秀人才支持计划 (LR2015042); 沈阳市科技局应用基础研究专项 (17-231-1-13)

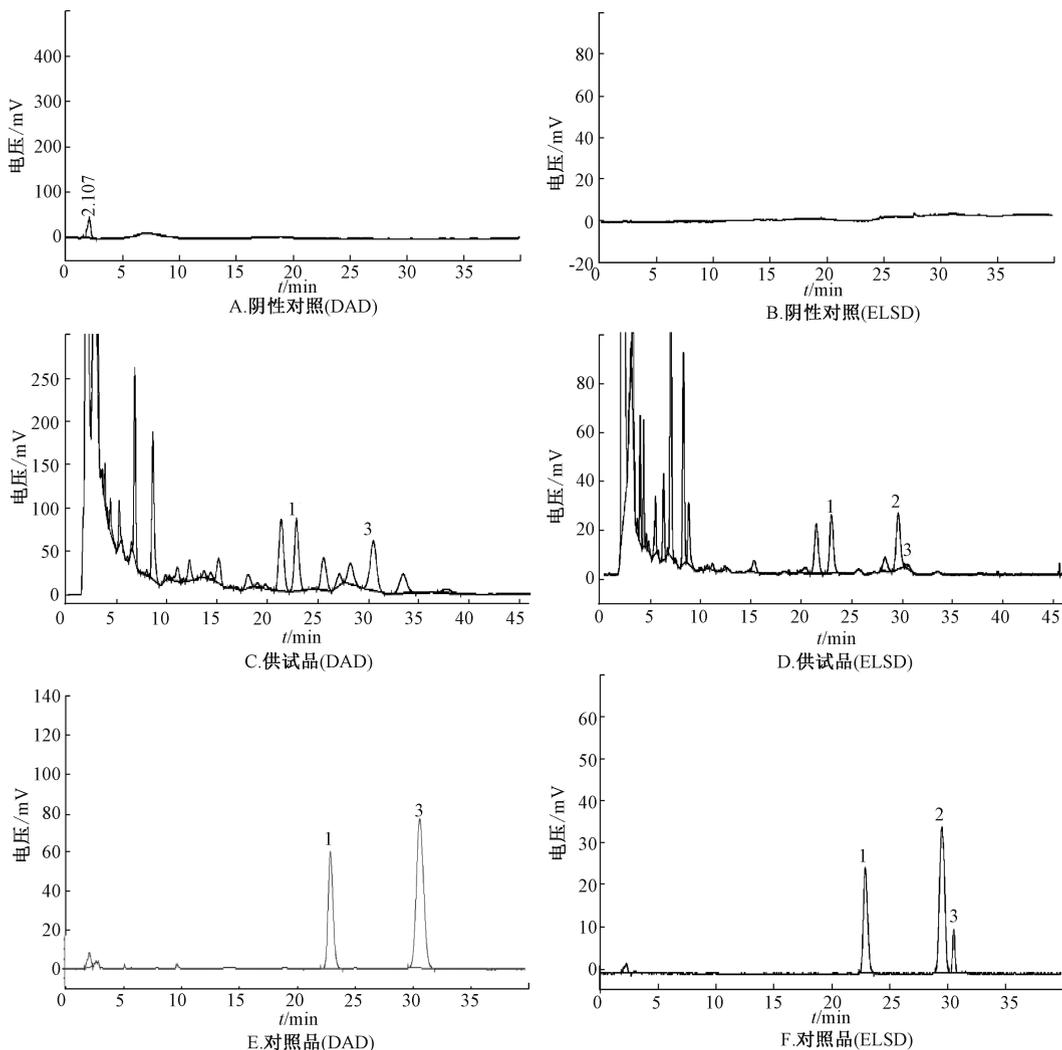
作者简介: 李思雨 (1994—), 女, 硕士生, 从事中药质量评价及创新药物研究。Tel: 18842678817, E-mail: 121035842@qq.com

* 通信作者: 张慧 (1970—), 女, 博士, 教授, 从事中药质量评价及创新药物研究。Tel: 13998541994, E-mail: syyycs@163.com

法制备供试品溶液，即得。

2.3 专属性试验 精密吸取供试品、对照品、阴性对照溶液各 20 μL ，在“2.1”项色谱条件下进样测定，见图 1。

可知，阴性对照溶液色谱图中未见与对照品溶液中 3 种成分保留时间相同的色谱峰，表明阴性无干扰，方法专属性良好。



1. 通关藤苷 I 2. 通关藤苷 H 3. 通关藤苷 G

图 1 各成分 HPLC-DAD-ELSD 色谱图

2.4 线性关系考察 精密吸取对照品溶液 0.5、0.75、1.0、1.25、1.5 mL，置于 5 mL 量瓶中，加甲醇稀释至刻度，在“2.1”项色谱条件下进样测定。其中，通关藤苷 G、I (DAD) 以进样量为横坐标 (X)，峰面积为纵坐标 (Y) 进行回归；通关藤苷 H (ELSD) 以进样量的自然对数为横坐标 (X)，峰面积的自然对数为纵坐标 (Y) 进行回归。结果，通关藤苷 G、H、I 方程分别为 $Y = 1.092X - 317.76$ ($r = 0.9992$)、 $Y = 1.1395X + 4.471$ ($r = 0.9990$)、 $Y = 472.89X - 651.48$ ($r = 0.9991$)，分别在 1.768~5.305、3.842~11.526、3.026~9.078 μg 范围内呈良好的线性关系。

2.5 精密度试验 精密量取对照品溶液 20 μL ，在“2.1”项色谱条件下进样测定 6 次，测得通关藤苷 G、H、I 峰面积 RSD 分别为 0.94%、1.96%、1.01%，表明仪器精密度良好。

2.6 重复性试验 精密称取云南产药材粉末 6 份，按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液，在“2.1”项色谱条件下进样测定，测得通关藤苷 G、H、I 含有量 RSD 分别为 1.54%、1.90%、1.03%，表明该方法重复性良好。

2.7 稳定性试验 精密量取供试品溶液 20 μL ，于 0、2、4、6、8 h 在“2.1”项色谱条件下进样测定，测得通关藤苷 G、H、I 峰面积 RSD 分别为 0.94%、1.91%、1.80%，表明供试品溶液在 8 h 内稳定性良好。

2.8 加样回收率试验 精密加入通关藤苷 G 对照品溶液 (0.841 mg/mL) 2.0 mL、通关藤苷 H 对照品溶液 (0.1024 mg/mL) 3.0 mL、通关藤苷 I 对照品溶液 (1.513 mg/mL) 2.5 mL，置于同一量瓶中，平行 6 批，挥干溶剂，加入各成分含有量已知的提取物，按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液，在“2.1”项色谱条件下进样测定，计算回收率，结果见表 1。

表 1 各成分加样回收率试验结果 (n=6)

成分	称样量/	原有量/	加入量/	测得量/	回收率/	平均回收 率/% (RSD/%)
	g	mg	mg	mg	%	
通关藤苷 G	0.160 1	1.524 2	1.682 0	3.179 0	98.39	99.60 (1.86)
	0.160 4	1.527 0	1.682 0	3.224 1	100.90	
	0.159 5	1.518 4	1.682 0	3.156 5	97.39	
	0.161 1	1.533 7	1.682 0	3.197 8	98.94	
	0.160 9	1.531 8	1.682 0	3.204 3	99.44	
	0.165 8	1.578 4	1.682 0	3.303 1	102.54	
通关藤苷 H	0.160 1	0.286 6	0.307 2	0.604 4	103.46	99.88 (2.49)
	0.160 4	0.287 1	0.307 2	0.588 6	98.14	
	0.159 5	0.285 5	0.307 2	0.584 1	97.20	
	0.161 1	0.288 4	0.307 2	0.602 9	102.39	
	0.160 9	0.288 0	0.307 2	0.591 1	98.66	
	0.165 8	0.296 8	0.307 2	0.602 3	99.45	
通关藤苷 I	0.160 1	3.595 8	3.782 5	7.312 5	98.26	99.08 (1.14)
	0.160 4	3.602 6	3.782 5	7.422 9	101.00	
	0.159 5	3.582 4	3.782 5	7.352 9	99.68	
	0.161 1	3.618 3	3.782 5	7.349 7	98.65	
	0.160 9	3.613 8	3.782 5	7.357 9	98.98	
	0.165 8	3.723 9	3.782 5	7.426 6	97.89	

2.9 样品含有量测定 分别取 22 个产地提取物,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,在“2.1”项色谱条件下进样测定,计算含有量,结果见表 2。

表 2 各成分含有量测定结果

编号	产地	含有量/%		
		通关藤苷 I	通关藤苷 G	通关藤苷 H
1	云南大理	2.839	0.751	0.913
2	云南西双版纳	0.598	0.326	0.143
3	云南临沧市	0.917	0.406	0.167
4	云南普洱市	1.350	0.801	1.028
5	云南	1.592	0.624	0.931
6	云南文山	1.670	0.739	0.713
7	云南保山	1.375	0.617	0.416
8	云南西双版纳	2.128	0.784	0.868
9	云南昆明	1.976	0.695	0.507
10	云南	2.400	0.936	0.173
11	云南昆明	2.804	1.017	0.158
12	广西	2.111	0.735	0.380
13	广西钦州	1.729	0.740	1.039
14	广西	0.582	0.301	0.040
15	广西玉林	0.562	0.346	0.130
16	贵州 1	1.229	0.733	0.944
17	贵州 2	2.245	0.678	1.337
18	贵州 3	1.630	0.715	0.564
19	贵州 4	2.960	0.838	0.181
20	贵州 5	1.393	0.860	0.502
21	四川 1	1.426	0.645	0.098
22	四川 2	1.815	0.617	0.194

3 讨论

3.1 指标成分选择 2015 年版《中国药典》一部中,通关藤含有量测定成分仅选择通关藤苷 H,难以准确反映其药效。课题组前期药效学实验发现,通关藤苷 G、H、I 具有明显抗肿瘤作用,故本实验选择三者作为指标成分。

3.2 色谱条件选择 本实验曾采用 40:60、47:53、50:50 等比例的乙腈-水流动相,发现在 45:55 时通关藤苷 G、H、I 分离效果最好,峰形最佳。由于通关藤苷 G、I 有

紫外吸收,而通关藤苷 H 无紫外吸收,故本实验采用 HPLC-DAD-ELSD 法,并且发现该方法灵敏度高,重复性好。

3.3 含有量分析 除广西、四川 2 个批次外,其他 20 个产地通关藤 70% 乙醇提取物中通关藤苷 H 含有量均符合 2015 年版《中国药典》不得低于 0.12% 的规定;不同产地提取物中通关藤苷 G、H、I 含有量差异明显,其中通关藤苷 H 可达 33 倍,并且通关藤苷 I 普遍高于其他 2 种成分,表明多成分同时测定可更全面科学地评价该药材质量。

参考文献:

[1] Aenkata R E, Nageswara R E, Santharam S S. Studies on *Marsdenia tenacissima* (White Nisoth) [J]. *Indian J Pharm*, 1976, 38: 54-56.

[2] Singhal S, Mittal M, Khare A. Cissogenin, a pregnane genin from *Marsdenia tenacissima*: structure of a new genin drevogenin-Q[J]. *Indian J Chem*, 1980, 19B: 178-182.

[3] Singhal S, Khare M P, Khare A. Cissogenin, a pregnane genin from *Marsdenia tenacissima* [J]. *Phytochemistry*, 1980, 19 (11): 2427-2430.

[4] 王祁民, 马银铃, 董占军. HPLC 法测定通关藤药材中 2 种皂苷含量[J]. *中国临床药理学杂志*, 2018, 34(2): 158-160, 164.

[5] 白爽, 李奕诺, 徐鑫, 等. 通关藤化学成分及药理活性研究进展[J]. *解放军药学学报*, 2015, 31(3): 260-264.

[6] 徐凯, 乔佳, 韩丽, 等. HPLC 法测定不同产地通关藤中通关藤苷 G 和 I 的含量[J]. *药物分析杂志*, 2016, 36(4): 607-610.

[7] 张慧, 裴志东, 姜欢, 等. HPLC 法同时测定乌骨藤中通关藤苷 A 和 D 的含量[J]. *药物分析杂志*, 2013, 33 (6): 1037-1040.

[8] 王祁民, 安静, 李颖, 等. UPLC-MS/MS 法同时测定通关藤药材中 3 种皂苷的含量[J]. *中国药房*, 2018, 29 (8): 1048-1051.

[9] 刘傲镭, 王曙, 何俊, 等. HPLC-ELSD 鉴别不同产地通关藤的皂苷类成分[J]. *华西药学杂志*, 2007, 22(3): 328-329.

[10] 马尧, 赵陆华, 肖望书, 等. HPLC-UV 法测定通关藤药材中通关藤苷 A[J]. *中草药*, 2009, 40(5): 820-821.

[11] 陈强, 毛春芹, 陆兔林, 等. 不同产地通关藤药材中总皂苷与通关藤苷 B 的含量比较[J]. *医药导报*, 2009, 28 (12): 1615-1617.

[12] 张稼小, 张慧, 倪冲, 等. 不同产地通关藤中总皂苷的含量测定[J]. *中国民族民间医药*, 2011, 20(23): 86-87.

[13] 姚庆, 陆兔林, 毛春芹, 等. 通关藤药材藤茎皮部和木部中总皂苷及苷 B 的含量测定[J]. *安徽医药*, 2010, 14 (1): 36-38.

[14] 何俊, 王曙, 严晓梁. 不同产地的通关藤中总皂苷含量的比较[J]. *华西药学杂志*, 2008, 23(2): 201-202.