

不同产地白薇中 C21 甾体皂苷的含量测定

肖功胜, 王永兵*, 雷辉, 宗伟英, 沈雯, 王滔, 席晓荣(中国科学院上海生命科学研究院湖州营养与健康产业创新中心, 浙江 湖州 313000)

摘要:目的 建立白薇中蔓生白薇苷 A 及白薇 C21 甾体总皂苷的含量测定方法, 并测定其不同产地蔓生白薇中的含量。方法 以蔓生白薇苷 A 为指标, 采用高效液相色谱法和可见分光光度法分别对蔓生白薇苷 A 及白薇 C21 甾体总皂苷进行含量测定。结果 蔓生白薇苷 A 和总皂苷含量分别在 0.23~2.53 μg ($r=0.9997$) 及 11.5~115 μg ($r=0.9991$) 内线性关系良好, 平均回收率分别为 99.3% (RSD=2.68%) 和 99.7% (RSD=2.84%)。蔓生白薇苷 A 的含量以河南最高, 山东最低; 白薇 C21 甾体总皂苷则以山东最高, 辽宁最低。结论 此方法简便、稳定可靠, 便于对白薇药材进行质量评价。

关键词: 白薇; C21 甾体皂苷; 蔓生白薇皂苷 A; 含量测定

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2014)10-1228-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2014.10.016

Determination of C21-Steroidal-glycoside in Cynanchi Atrati Radix from Different Areas

XIAO Gongsheng, WANG Yongbing*, LEI Hui, ZONG Weiyang, SHEN Wen, WANG Tao, XI Xiaorong(Huzhou Research and Development Center for Nutrition and Health, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Huzhou 313000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish the method for the determination of cyanversicoside A and total C21-steroidal-glycoside in Cynanchi Atrati Radix from different areas. **METHODS** With the content and absorbance of cyanversicoside A as index, HPLC and UV were used to determine the contents of cyanversicoside A and total C21-steroidal-glycoside in all samples. **RESULTS** The linear range of cyanversicoside A and steroidal-glycoside was 0.23–2.53 μg and 11.5–115 μg , respectively, with the correlation coefficient of 0.9997 and 0.9991; the average recoveries were 99.3% and 99.7%, with RSD of 2.68% and 2.84%. There was great difference of the samples, content of cyanversicoside A of Henan was the highest, lowest in Shandong; the total C21-steroidal-glycoside in sample from Shandong was the highest, lowest in Liaoning. **CONCLUSION** The method is simple, accurate and reliable for the quality control of Cynanchi Atrati Radix.

KEY WORDS: Cynanchi Atrati Radix; C21-steroidal-glycoside; cyanversicoside A; content determination

中药白薇(Cynanchi Atrati Radix)来源于萝藦科植物白薇 *Cynanchum atratum* Bge. 或蔓生白薇 *Cynanchum versicolor* Bge. 的干燥根及根茎。白薇为临床常用中药之一, 最早见于《神农本草经》, 具有清热凉血、利尿通淋、解毒疗疮之功效, 中医临床应用于温热病发热、阴虚发热、骨蒸劳热, 产后血虚发热、热淋、血淋、痈疽肿毒等症^[1]。现代药理学研究表明, 白薇中的 C21 甾体皂苷类成分是其主要活性成分, 具有非常明确的退热、抗炎、抗肿瘤及乙酰胆碱酯酶抑制活性。然而当前白薇药材标准都仅以外观和生药性状^[2-4]及紫外光谱进行鉴别^[5]; 中国药典 2010 年版一部^[6]中仅收录外观和性状鉴别方法, 对其定性和定量质控方法无明确要求, 虽然王宏洁等^[7]报道以白薇正昔 A 为指标控制中药直立白薇的质量; 但目前尚无任

何关于蔓生白薇的质量控制方法。鉴于此, 本实验采用高效液相色谱法和可见分光光度法分别建立蔓生白薇中蔓生白薇苷 A 和白薇 C21 甾体总皂苷的含量测定方法, 并考察不同产地蔓生白薇药材中蔓生白薇苷 A 及白薇 C21 甾体总皂苷的含量差异, 从而建立简便有效、稳定可靠的蔓生白薇质量控制方法, 为其临床有效应用提供保障。

1 仪器与试剂

Agilent 1200-DAD 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司); UV-2000 紫外可见分光光度计[尤尼柯(上海)仪器有限公司]; AL204 型电子分析天平(瑞士梅特勒公司); 超纯水系统(美国 Millipore 公司); 乙腈(美国 TIDAE 公司); 超纯水(自制), 其他试剂均为分析纯; 蔓生白薇样品经中国科学院上海生命科学研究院湖州营养与健康产业创新中

基金项目: 湖州市自然科学基金项目(2013YZ13)

作者简介: 肖功胜, 男, 硕士, 助理研究员 Tel: (0572)2165908
研究员 Tel: (0572)2106381 E-mail: yongbingw@nhc.ac.cn

E-mail: gongshengx@nhc.ac.cn *通信作者: 王永兵, 男, 博士,

心王永兵博士鉴定为均萝藦科植物蔓生白薇 *Cynanchum versicolor* Bge. 的干燥根及根茎, 具体来源和信息见表 1; 蔓生白薇苷 A 对照品(自制, 由峰面积归一法测定其纯度>98%)。

表 1 不同产地蔓生白薇药材

Tab. 1 *Cynanchum versicolor* Bge. from different area

| 产地 | 种类 | 药材年份 | 采收季节 |
|----|----|------|------|
| 云南 | 家种 | 3 年生 | 9 月 |
| 辽宁 | 家种 | 3 年生 | 10 月 |
| 山东 | 家种 | 3 年生 | 9 月 |
| 河南 | 家种 | 3 年生 | 10 月 |

2 蔓生白薇苷 A 的含量测定

2.1 色谱条件

色谱柱: Agilent ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈, (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流速 1.0 mL·min⁻¹; 检测波长: 210 nm; 柱温: 30 °C; 进样量: 50 μL; 流动相: 乙腈-水梯度洗脱: 0~10 min, 乙腈 30% → 55%, 10~20 min, 乙腈 55% → 70%, 20~50 min, 乙腈保持 70%, 50~60 min, 乙腈 70% → 30%。

2.2 系统适应性试验

理论板数按蔓生白薇苷 A 计应 ≥ 5 000, 与相邻峰的分度度 > 1.5。

2.3 供试品溶液的制备

分别取已干燥的不同产地的蔓生白薇药材适量, 粉碎, 过二号筛。精密称取各样品药材粗粉 10 g 置于 250 mL 圆底烧瓶中, 以 10 倍量 70% 乙醇回流提取 2 次, 每次 2 h, 过滤合并滤液, 减压回收溶剂至适量, 将浓缩液冷冻真空干燥, 粉碎成细粉, 取 200 mg, 精密称定, 置于 5 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并定容至刻度, 摇匀, 临用前过 0.45 μm 的微孔滤膜, 即得。

2.4 对照品溶液的制备

精密称取蔓生白薇苷 A 对照品适量, 加甲醇制成每 1 mL 中含 0.23 mg 的溶液, 摇匀, 临用前过 0.45 μm 的微孔滤膜, 即得。

2.5 方法学考察

2.5.1 仪器精密度试验 取对照品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进行测定, 连续进样 5 次, 记录蔓生白薇苷 A 的峰面积, 计算 RSD 为 0.34%, 表明仪器精密度良好。

2.5.2 线性关系考察 分别精密吸取“2.4”项下对照品溶液 1, 3, 5, 7, 9, 11 μL, 依次按“2.1”项下色谱条件进行测定, 记录蔓生白薇苷 A 的峰

面积。以峰面积为纵坐标, 进样量(μg)为横坐标进行线性回归, 得到蔓生白薇苷 A 的回归方程为 $Y=378.37X+15.59$ ($r=0.9997$)。说明蔓生白薇苷 A 在 0.23~2.53 μg 内呈良好线性关系。

2.5.3 稳定性试验 取供试品溶液在室温下放置, 按“2.1”项下色谱条件每隔 2 h 进行测定 1 次, 8 h 内共测定 5 次, 记录蔓生白薇苷 A 的峰面积, 结果 RSD=1.32%, 表明供试品溶液在 8 h 内稳定。

2.5.4 重复性试验 取河南产蔓生白薇药材样本粗粉 5 份, 每份 10 g, 精密称定, 按“2.3”项下制备样品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进行测定, 记录蔓生白薇苷 A 的峰面积, 结果 RSD=0.95%, 表明方法的重复性较好。

2.5.5 加样回收率试验 取已知含量的同一批蔓生白薇样品 6 份, 各 10 g, 精密称定, 分别加入一定量对照品溶液, 按“2.3”项下制备样品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进行测定, 记录蔓生白薇苷 A 的峰面积并计算其含量, 平均加样回收率为 99.3%, RSD 为 2.68% ($n=6$)。结果见表 2。

表 2 加样回收测定结果($n=6$)

Tab. 2 Results of recovery tests($n=6$)

| 取样量/ g | 样品含量/ mg | 加入量/ mg | 测得量/ mg | 回收率/ % | 平均回 收率/% | RSD/ % |
|-----------|-------------|------------|------------|-----------|-------------|-----------|
| 10.21 | 0.6 | 0.23 | 0.82 | 95.65 | 99.3 | 2.68 |
| 10.34 | 0.6 | 0.23 | 0.81 | 100.00 | | |
| 10.42 | 0.6 | 0.34 | 0.91 | 97.06 | | |
| 10.36 | 0.6 | 0.34 | 0.95 | 102.94 | | |
| 10.27 | 0.6 | 0.46 | 1.07 | 102.17 | | |
| 10.32 | 0.6 | 0.46 | 1.04 | 97.83 | | |

2.5.6 样品测定 取不同产品蔓生白薇药材各 10 g, 精密称定, 按“2.3”项下制备样品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进行测定, 记录蔓生白薇苷 A 的峰面积并计算其含量, 结果见表 3, 色谱图见图 1。

表 3 不同产地蔓生白薇药材中蔓生白薇苷 A 的含量测定结果

Tab. 3 Results of determination of cynanversicoside A in *Cynanchi Atrati Radix* from different areas

| 编号 | 产地 | 蔓生白薇苷 A/mg·g ⁻¹ |
|----|----|----------------------------|
| 1 | 云南 | 0.060 |
| 2 | 辽宁 | 0.099 |
| 3 | 山东 | 0.041 |
| 4 | 河南 | 0.110 |

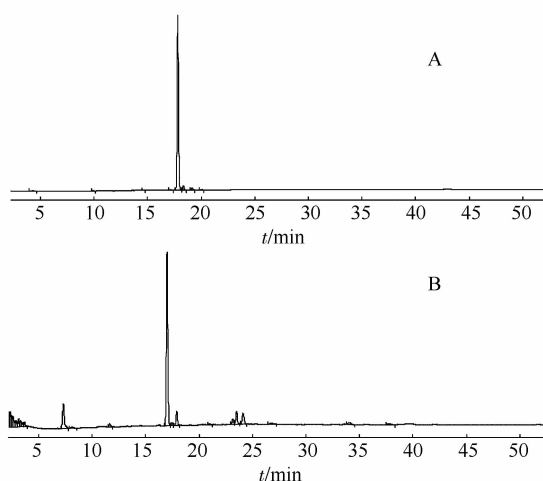


图1 蔓生白薇苷 A 对照品(A)和蔓生白薇药材供试液(B)的HPLC图谱

Fig. 1 HPLC chromatography of cyanversicoside A reference substance A (A) and sample solution of *Cynanchum versicolor* Bge.

3 白薇 C21 甙体总皂苷的含量测定

3.1 供试品溶液的制备

分别取已干燥的不同产地的蔓生白薇药材适量,粉碎,过二号筛。精密称取各样品药材粗粉 1 g 置于 100 mL 圆底烧瓶中,以 10 倍量 70%乙醇回流提取 2 次,每次 2 h,过滤,合并滤液,滤液置蒸发皿中水浴蒸干,残渣加甲醇溶解并转移至 5 mL 量瓶中,加甲醇定容至刻度,摇匀,临用前过 0.45 μm 的微孔滤膜,即得。

3.2 对照品溶液的制备

按“2.4”项下方法制备对照品溶液。

3.3 测定方法

3.3.1 测定波长的选择 精密吸取“3.2”项下对照品溶液 1 mL 置于具塞试管中,沸水浴上挥去溶剂,依次加入 0.2 mL 新配制的 5%香草醛冰醋酸溶液和 0.8 mL 高氯酸,摇匀,置于 80 °C 水浴中加热 20 min;取出,冰水浴冷却;加入 5 mL 冰醋酸,摇匀,即得测定样品溶液。于 400~800 nm 扫描,发现蔓生白薇苷 A 在 518 nm 处有最大吸收。故选择在对照品蔓生白薇苷 A 最大吸收波长 518 nm 处测定样品中总皂苷的含量。

3.3.2 样品测定 以甲醇作为空白溶液,分别精密吸取各供试品溶液 1 mL 置于具塞试管中,沸水浴上挥去溶剂,依次加入 0.2 mL 新配制的 5%香草醛冰醋酸溶液和 0.8 mL 高氯酸,摇匀,置于 80 °C 水浴中加热 20 min;取出,冰水浴冷却;加入 5 mL 冰醋酸,摇匀,即得测定用样品溶液。在

518 nm 处分别测定各供试品溶液与对照品溶液的吸光度,计算,即得。

3.4 方法学考察

3.4.1 仪器精密度的试验 分别精密吸取“3.2”项下对照品溶液 6 份,每份 1 mL,按照“3.3.2”项下方法测定其吸光度,计算 RSD 值,结果 RSD=1.03%,表明该方法仪器精密性较好。

3.4.2 线性关系考察 分别精密吸取“3.2”项下对照品溶液(0.23 mg·mL⁻¹)0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 mL 于具塞试管中,按“3.3.2”项下方法显色,在 30 min 内测定吸光度 A,以吸光度 A 对应的取样量(mg)做标准曲线,得到回归方程: $Y=5.8X+0.0562$, $r=0.9991$,结果表明,蔓生白薇苷 A 样品显色后的吸光度值与样品取样量在 11.5~115 μg 内呈良好的线性关系。

3.4.3 稳定性试验 精密吸取“3.1”项下河南产地药材供试品溶液 1 mL 于具塞试管中,按“3.3.2”项下进行显色,冷却至室温,分别于显色后 10, 20, 30, 40, 50, 60 min,在 518 nm 下测定吸光度。计算 RSD 值,结果 RSD=1.71%,表明样品在 1 h 内稳定,故选择显色后在 1 h 内测定其吸光度。

3.4.4 重复性试验 取河南产蔓生白薇药材样本粗粉 5 份,每份 1 g,精密称定,按“3.1”项下制备样品溶液,按“3.3.2”项下进行显色,并测定其吸光度,计算相对标准偏差,结果 RSD=1.95%,表明方法的重复性较好。

3.4.5 回收率试验 取已知含量的同一批蔓生白薇样品 6 份,各 1 g,精密称定,分别加入一定量对照品溶液,按“3.1”项下制备样品溶液,并按“3.3.2”项下测定方法测定其白薇 C21 甙体总皂苷的含量,计算平均加样回收率为 99.7%,RSD 为 2.84%(n=6)。结果见表 4。

表 4 加样回收测定结果(n=6)

Tab. 4 Results of recovery tests(n=6)

| 取样量/ g | 样品中含量/ mg | 加入量/ mg | 测得量/ mg | 回收率/ % | 平均回 收率/% | RSD/ % |
|-----------|--------------|------------|------------|-----------|-------------|-----------|
| 1.03 | 0.12 | 0.069 | 0.187 | 97.10 | 99.7 | 2.84 |
| 1.06 | 0.12 | 0.069 | 0.190 | 101.45 | | |
| 1.07 | 0.12 | 0.12 | 0.23 | 97.50 | | |
| 1.09 | 0.12 | 0.12 | 0.23 | 96.67 | | |
| 1.05 | 0.12 | 0.23 | 0.35 | 101.30 | | |
| 1.04 | 0.12 | 0.23 | 0.36 | 104.35 | | |

3.4.6 样品的测定 分别取不同产地蔓生白薇各 1 g,精密称定,按“3.1”项下方法制备样品溶液,并按“3.3.2”项下测定方法进行测定,记录吸光

度, 计算含量, 结果见表 5。

表 5 不同产地蔓生白薇药材中 C21 甙体总皂苷的含量测定结果

Tab. 5 Results of determination of total C21-steroidal-glycoside in *Cynanchum versicolor* Bge. from different areas

| 编号 | 产地 | C21 甙体总皂苷/mg·g ⁻¹ |
|----|----|------------------------------|
| 1 | 云南 | 0.120 |
| 2 | 辽宁 | 0.116 |
| 3 | 山东 | 0.133 |
| 4 | 河南 | 0.117 |

4 讨论

本实验针对流动相的选择, 分别考察了甲醇-水、乙腈-水、甲醇-磷酸及其缓冲液和乙腈-磷酸及其缓冲液系统对蔓生白薇提取物的分离效果, 最终选择乙腈-水为流动相, 并采用梯度洗脱的方法分离分析蔓生白薇中的甙体皂苷类化合物, 使得蔓生白薇苷 A 与其他色谱峰分离效果最好。

采用高效液相色谱法和分光光度法对不同产地蔓生白薇中蔓生白薇苷 A 和白薇 C21 甙体总皂苷的含量进行了测定。结果表明, 不同产地的蔓生白薇中蔓生白薇苷 A 及白薇 C21 甙体总皂苷的含量相差较大, 蔓生白薇苷 A 高者, 总皂苷不一定高, 反之亦然。因此, 不能单用蔓生白薇苷 A

或白薇 C21 甙体总皂苷来评价蔓生白薇的质量, 而只有两者均高者才是质量最佳。

该方法简便灵敏、准确可靠, 可作为蔓生白薇中蔓生白薇苷 A 和白薇 C21 甙体总皂苷的含量测定方法。

REFERENCES

- [1] State Administration of Traditional Chinese Medicine of the People's Republic of China. Chinese Materia Medica(中华本草) [M]. Shanghai: Shanghai Science Press, 1999: 330-333.
- [2] QI X P, NIE J, HOU C. The simple identification of several easy-mislead Chinese herbal medicine [J]. Lishizhen Med Mater Med Res(时珍国医国药), 2005, 16(5): 399-400.
- [3] REN J M. Identification of Radix Gentianae and Radix Cynanchi Atrati [J]. Henan J Tradit Chin Med(河南中医药), 2002, 17(6): 27.
- [4] WANG X X. Identification of 5 groups easy-mislead Chinese herbal medicine [J]. Lishizhen Med Mater Med Res(时珍国医国药), 2002, 13(2): 107.
- [5] XUE F R, CHEN Y L. Ultraviolet spectrum identification of Cynanchii Shauntunii Rhizoma et Radix, Radix Cynanchi Atrati, Radix Cynanchi Paniculati and easy-mislead Chinese herbal medicine [J]. Shandong J Tradit Chin Med(山东中医药), 1994, 13(8): 362.
- [6] Ch.P(2010)Vol I (中国药典 2010 年版. 一部)[S]. 2010: 103.
- [7] WANG H J, SI N, BIAN B L. Content determination of cynanchumside A in *Cynanchum versicolor* Bge. [J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学), 2005, 11(10): 5-6.

收稿日期: 2013-11-18

HPLC 测定参茸珍宝片中特女贞苷的含量

郭培果(贵阳济仁堂药业有限公司, 贵阳 550005)

摘要: 目的 建立测定参茸珍宝片中特女贞苷含量的方法。方法 采用反相高效液相色谱法, 色谱柱为 Ultimate XB-C₁₈-H (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-水(38 : 62), 流速为 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长为 224 nm, 进样量为 10 μL。结果 特女贞苷进样量在 0.053 44~1.603 3 μg 内与峰面积积分值线性关系良好($r=0.999 9$); 平均加样回收率为 96.90%, RSD 为 0.93%。结论 该方法快速简便、准确可靠、重复性好, 可用于参茸珍宝片中特女贞苷的含量测定。

关键词: 参茸珍宝片; 特女贞苷; 高效液相色谱法; 含量测定

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2014)10-1231-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2014.10.017

Determination of Specnuezhenide in Shenrongzhenbao Tablets by HPLC

GUO Peiguo(Guiyang Jirentang Pharmaceutical Manufacture Co., Ltd., Guiyang 550005, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish an HPLC method of specnuezhenide content in Shenrongzhenbao tablets. METHODS Separation was performed on a Ultimate XB-C₁₈-H column with methanol-water(38 : 62) as the mobile phase. The detection wavelength was 224 nm, the flow rate was 1.0 mL·min⁻¹, and the injection volume was 10 μL. RESULTS In the

作者简介: 郭培果, 男, 高级工程师 Tel: (0851)5400121-8804

E-mail: guozdq_888@163.com