

# HPLC 波長切換法測定青陽參中 7 個 $C_{21}$ 留體皂苷的含量

楊金铧<sup>1</sup>, 殷敏敏<sup>1</sup>, 張健<sup>2</sup>, 王磊<sup>3</sup>, 叶文才<sup>3</sup>, 殷志琦<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>中國藥科大學天然藥物化學教研室 & 天然藥物活性組分與藥效國家重點實驗室, 南京 210009; )

(<sup>2</sup>江蘇省中醫藥研究院轉化醫學實驗室, 南京 210028; <sup>3</sup>暨南大學中藥及天然藥物研究所 & 中藥藥效物質基礎及創新藥物研究 & 廣東省高校重點實驗室, 廣州 510632)

**摘要** 建立 HPLC 波長切換法, 同時測定青陽參中 7 個  $C_{21}$  留體皂苷的含量。採用 Alltima  $C_{18}$  (250 mm × 4.6 mm, 5  $\mu$ m) 色譜柱, 以乙腈-水為流動相, 梯度洗脫, 流速為 1.0 mL/min, 柱溫為 35 °C, 檢測波長為 259 nm (0 ~ 27 min), 223 nm (27 ~ 72 min)。結果表明, 该 7 個  $C_{21}$  留體皂苷在各自檢測範圍內線性良好, 加樣回收率範圍在 98.5% ~ 103.9% 之間。通過對不同產地的 7 個批次青陽參中 7 個成分的含量測定, 認為該方法簡便、準確、快速, 可用於青陽參藥材的質量控制。

**關鍵詞** 青陽參; 高效液相色譜;  $C_{21}$  留體皂苷; 含量測定

**中圖分類號** R917    **文獻標誌碼** A    **文章編號** 1000-5048(2014)02-0200-05

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20140212

## Simultaneous determination of seven $C_{21}$ steroidal saponins in the radix of *Cynanchum otophyllum* Schneid. by HPLC wavelength switching method

YANG Jinhua<sup>1</sup>, YIN Minmin<sup>1</sup>, ZHANG Jian<sup>2</sup>, WANG Lei<sup>3</sup>, YE Wencai<sup>3</sup>, YIN Zhiqi<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Natural Medicinal Chemistry & State Key Laboratory of Natural Medicines, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009; <sup>2</sup>Laboratory of Translational Medicine, Jiangsu Provincial Academy of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210028; <sup>3</sup>Institute of Traditional Chinese Medicine and Natural Products & Guangdong Provincial Key Laboratory of Pharmacodynamic Constituents of Traditional Chinese Medicine and New Drugs Research, College of Pharmacy, Jinan University, Guangzhou 510632, China

**Abstract** An HPLC method was established to evaluate the quality of *Cynanchum otophyllum* with a simultaneous determination of seven  $C_{21}$  steroidal saponins. The method was carried out on an Alltima  $C_{18}$  column (250 mm × 4.6 mm, 5  $\mu$ m) with a mobile phase consisting of acetonitrile-water at the flow rate of 1.0 mL/min. The detection wavelength was 259 nm (0-27 min), 223 nm (27-72 min) and column temperature was 35 °C. The seven compounds were completely separated with good linearity. The average recoveries varied from 98.5% to 103.9%. These results indicated that the method was convenient, accurate and rapid for the quality control of Radix of *Cynanchum otophyllum* in 7 commercial samples.

**Key words** *Cynanchum otophyllum*; HPLC;  $C_{21}$  steroidal saponins; content determination

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81001379); the Project Program of State Key Laboratory of Natural Medicines (China Pharmaceutical University, No. ZJ11175); the Ninth Batch of “Top Talent Project” of Jiangsu Province (No. 2012-YY-008); and the Jiangsu Province “Qing-Lan” Project

青陽參 (*Cynanchum otophyllum* Schneid.) 为蓼科鵝絨藤屬的一種常用民族藥, 多年生草質纏繞藤本, 根入藥, 广泛分布于湖南、广西、云南、四川、

贵州和西藏等地区<sup>[1]</sup>。其性溫、甘、苦。入肝、脾、腎三經, 有小毒, 具有祛風鎮痙、除濕解毒、活血散癧、補益肝腎的功效。常用于治疗子宫肌瘤、腰肌

\* 收稿日期 2013-11-18    \* 通信作者 Tel: 025-86185371 E-mail: chyzq2005@126.com

基金项目 国家自然科学基金资助项目(No. 81001379); 天然藥物活性組分與藥效國家重點實驗室資助項目(No. ZJ11175); 江蘇省第九批“六大人才高峰”高層次人才項目(No. 2012-YY-008); 江蘇省“青藍工程”資助項目

劳损和跌打损伤等腰痛、肺结核与子宫内膜结核以及各种癫痫<sup>[2]</sup>。已开发的制剂有青阳参片,临床常用于治疗难治性癫痫<sup>[3-4]</sup>。

青阳参的主要活性成分为 C<sub>21</sub>甾体皂苷类化合物,现代药理研究表明其具有抗癫痫、抗肿瘤、抗抑郁、免疫调节、抗肝炎和抗美尼尔综合征等作用<sup>[5-11]</sup>,其在青阳参中含量的高低,直接影响着青阳参的临床疗效,因此有必要对其进行定性和定量分析。目前采用 HPLC 法测定青阳参中 C<sub>21</sub>甾体皂

苷类化合物含量的报道较少<sup>[12-13]</sup>,而利用 HPLC 法同时测定其中多种皂苷类含量的研究未见报道。为进一步合理监控青阳参药材质量及其有效成分含量,本文首次建立了 HPLC 波长切换法同时测定青阳参中 7 个 C<sub>21</sub>甾体皂苷含量(这 7 个皂苷分别为 Otophylloloside C、Wallicoside H、Wallicoside、Caudatin 3-O- $\beta$ -cymaropyranoside、Otophylloloside M、Otophylloloside F、Otophylloloside B,图 1),以期为青阳参的质量控制提供一种新的方法。

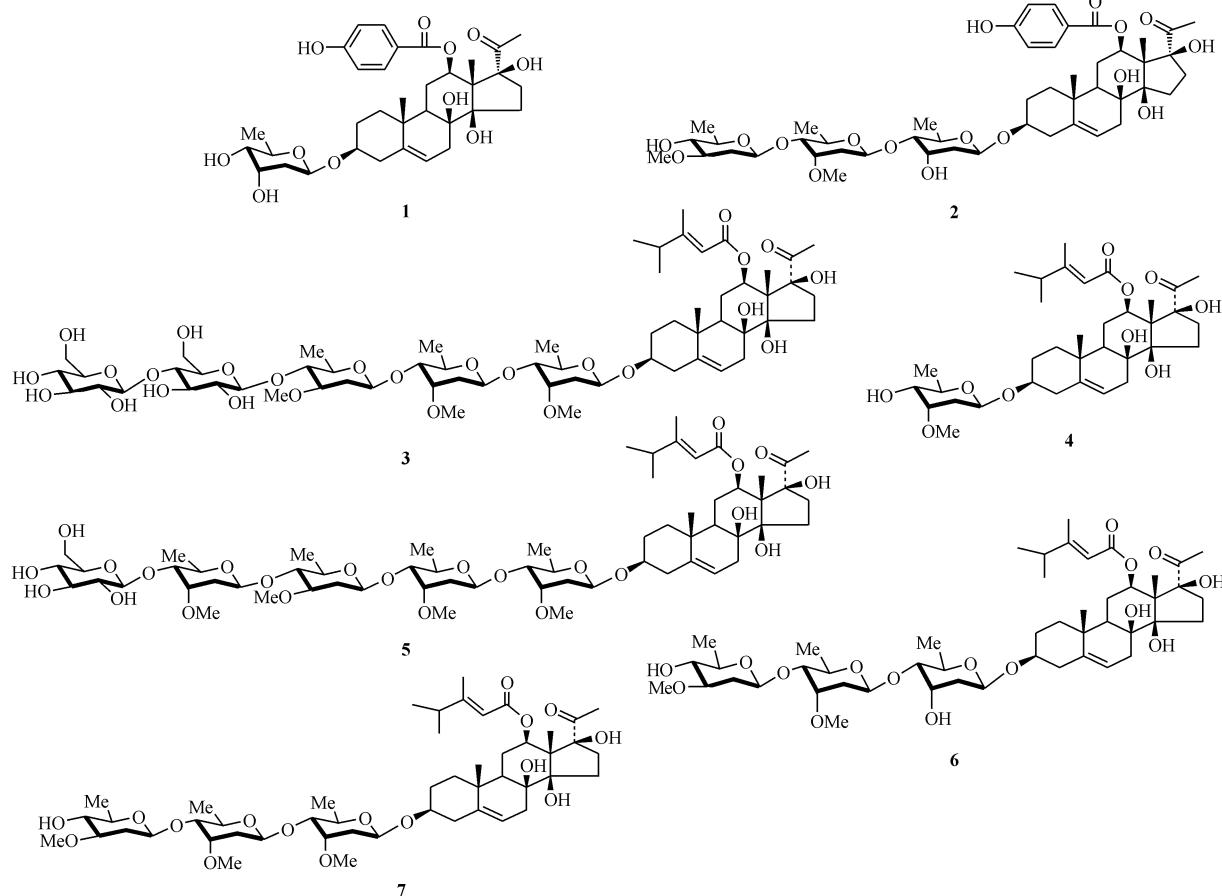


Figure 1 Structures of seven C<sub>21</sub> steroidal saponins in the radix of *Cynanchum Otophyllum* (1:Otophylloloside C;2:Wallicoside H;3:Wallicoside;4:Caudatin 3-O- $\beta$ -cymaropyranoside;5:Otophylloloside M;6:Otophylloloside F;7:Otophylloloside B)

## 1 材 料

### 1.1 样品与试剂

对照品 1~7 分别为 Otophylloloside C、Wallicoside H、Wallicoside、Caudatin 3-O- $\beta$ -cymaropyranoside、Otophylloloside M、Otophylloloside F 和 Otophylloloside B,均自制,经面积归一法测定,纯度均大于 98%。

青阳参供试药材:广西 121202,广西 130421,云南 121205,云南 130422,云南 130424,西藏

121125,西藏 130603,经中国药科大学秦民坚教授鉴定为青阳参的根。乙腈为色谱纯,水为超纯水,其余试剂均为分析纯。

### 1.2 仪 器

Agilent 1260 型高效液相色谱仪(包括 G1311C 四元泵, G1329B 自动进样器, G1316A 柱温箱, G1314VWD 检测器)(美国 Agilent 公司);UV-2100 型紫外可见分光光度计(尤尼柯仪器有限公司);AB135-S 型 1/10 万电子天平(梅特勒-托利多公

司);KH5200B型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

## 2 方法与结果

### 2.1 供试品溶液的配制

精密称定青阳参根药材粉末0.5 g,以60%乙醇水溶液40 mL回流提取90 min,冷却后用溶剂补充差重,量取上清液20 mL,挥干溶剂,用60%乙醇水溶液定容至2 mL量瓶中,摇匀,经微孔滤膜(0.45  $\mu\text{m}$ )过滤后备用。

### 2.2 对照品溶液的配制

精密称取各对照品适量,用甲醇溶解定容制成每毫升含 Otophylloloside C 0.21 mg、Wallicoside H 0.181 mg、Wallicoside 0.918 mg、Caudatin 3-O- $\beta$ -cymaropyranosi-de 0.165 mg、Otophylloloside M 0.529 mg、Otophylloloside F 0.296 mg、Otophylloloside B 0.633 mg 的混合溶液,经微孔滤膜(0.45  $\mu\text{m}$ )过滤后备用。

### 2.3 色谱条件

Alltima C<sub>18</sub>色谱柱(250 mm  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ),采用乙腈(A)-水(B)梯度洗脱(0~10 min, 35% A; 10~15 min, 35%~44% A; 15~25 min, 44% A; 25~28 min, 44%~50% A; 28~36 min, 50% A; 36~38 min, 50%~56% A; 38~46 min, 56% A; 46~64 min, 56%~74% A; 64~72 min, 74% A);流速1.0 mL/min;柱温35  $^{\circ}\text{C}$ ;检测波长为259 nm(0~

27 min),223 nm(27~72 min);进样量10  $\mu\text{L}$ 。在该色谱条件下,样品中7个C<sub>21</sub>甾体皂苷成分均达到基线分离,样品及混合对照品色谱图见图2。

### 2.4 方法学考察

**2.4.1 线性关系** 精密吸取对照品混合溶液适量,并依次稀释2、4、8、16倍制得系列对照品混合溶液。取上述对照品溶液各10  $\mu\text{L}$ ,按“2.3”项下色谱条件测定,以峰面积A为纵坐标,以质量浓度( $c$ , mg/mL)为横坐标,绘制标准曲线。结果表明各组分在进样量范围内线性关系良好,见表1。

**2.4.2 定量限(LOQ)和检测限(LOD)** 取对照品混合溶液1 mL,逐级稀释,每稀释一次,吸取10  $\mu\text{L}$ ,按“2.3”项下色谱条件测定对照品各物质的峰面积。以S/N=3求得各组分的检测限,以S/N=10求得各组分的定量限,结果见表1。

**2.4.3 精密度** 精密吸取混合对照品溶液10  $\mu\text{L}$ ,按“2.3”项下色谱条件连续进样5次。结果7个对照品峰面积的RSD分别为1.2%、1.1%、2.2%、1.5%、1.8%、1.8%和2.4%,表明仪器精密度良好。

**2.4.4 稳定性** 精密吸取混合对照品溶液10  $\mu\text{L}$ ,按“2.3”项下色谱条件于0,1,2,4,8,12,24 h进样,测定峰面积。结果7个对照品峰面积的RSD分别为1.4%、2.1%、2.0%、1.8%、1.7%、2.5%和1.3%,表明对照成分均在24 h内稳定。

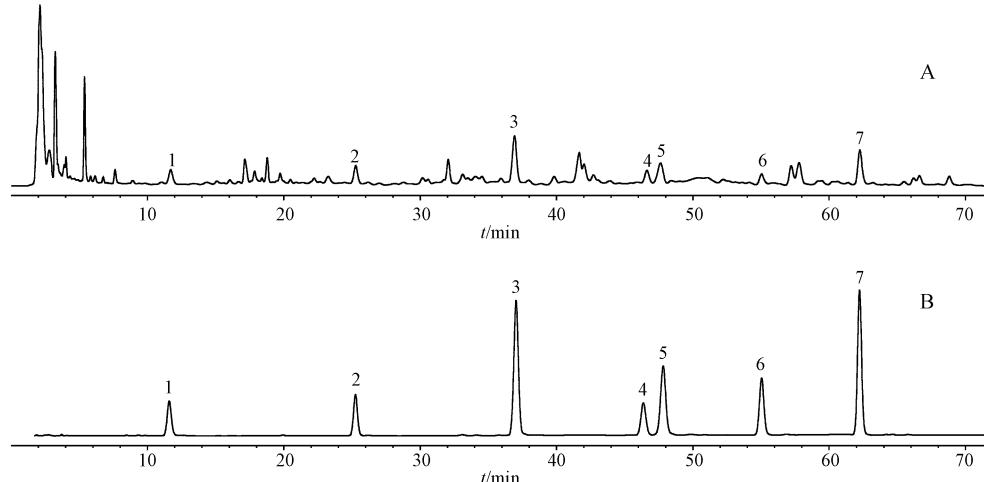


Figure 2 HPLC chromatograms of sample solution of *Cynanchum otophyllum* (A) and mixed standard substances (B)

1:Otophylloloside C;2:Wallicoside H;3:Wallicoside;4:Caudatin 3-O- $\beta$ -cymaropyranoside;5:Otophylloloside M;6:Otophylloloside F;7:Otophylloloside B

### 2.4.5 重复性

取同批次青阳参粉末,平行取样5份,按“2.1”项下方法配制供试品溶液,按“2.3”

项下色谱条件测定峰面积。结果7个对照成分含量的RSD分别为2.1%、2.9%、1.3%、1.9%、

2.5%、1.8% 和 2.4%，表明方法重复性较好。

**2.4.6 加样回收率** 精密称取同批次已知含量的青阳参粉末 0.5 g，平行称定 6 份，分别精密加入适量的 7 个对照品，按“2.1”项下方法配制供试品溶液，按照“2.3”项下色谱条件测定峰面积，计算平

均回收率和 RSD，结果见表 2。

## 2.5 样品含量测定

按拟定的含量测定方法，对不同产地和批次的青阳参药材的 7 个 C<sub>21</sub>甾体皂苷进行含量测定，结果见表 3。

**Table 1** Calibration curves of seven C<sub>21</sub> steroidal saponins from *Cynanchum otophyllum*

Compd.	Linear range/( mg/mL)	Regression equation	r	LOD/( mg/mL)	LOQ/( mg/mL)
1	0.013 13-0.210	$A = 7.607 \times 10^3 c - 2.504$	0.999 9	$1.26 \times 10^{-3}$	$6.27 \times 10^{-3}$
2	0.011 31-0.181	$A = 9.949 \times 10^3 c - 4.554$	0.999 9	$1.07 \times 10^{-3}$	$3.51 \times 10^{-3}$
3	0.057 38-0.918	$A = 7.469 \times 10^3 c - 1.654$	0.999 9	$2.33 \times 10^{-3}$	$7.80 \times 10^{-3}$
4	0.010 31-0.165	$A = 10.835 \times 10^3 c - 8.646$	0.999 9	$1.35 \times 10^{-3}$	$4.27 \times 10^{-3}$
5	0.033 06-0.529	$A = 7.652 \times 10^3 c - 13.267$	0.999 9	$1.17 \times 10^{-3}$	$5.59 \times 10^{-3}$
6	0.018 50-0.296	$A = 9.621 \times 10^3 c - 4.188$	0.999 9	$2.02 \times 10^{-3}$	$8.72 \times 10^{-3}$
7	0.039 56-0.633	$A = 9.987 \times 10^3 c + 36.455$	0.999 8	$2.09 \times 10^{-3}$	$8.56 \times 10^{-3}$

**Table 2** Recovery of seven C<sub>21</sub> steroidal saponins (n=6)

Compd.	Original/mg	Spiked/mg	Found/mg	Average recovery /%	RSD/%
1	0.356 9	0.332 2	0.684 8	98.7	2.3
2	0.313 3	0.301 9	0.627 0	103.9	2.7
3	1.269 5	1.156 3	2.421 2	99.6	1.8
4	0.235 7	0.242 4	0.476 4	99.3	1.2
5	0.722 8	0.691 5	1.431 6	102.5	2.7
6	0.206 2	0.184 7	0.396 6	103.1	2.9
7	0.590 9	0.630 7	1.212 1	98.5	1.4

**Table 3** Contents of seven C<sub>21</sub> steroidal saponins from *Cynanchum otophyllum* (mg/g)

Sample source	1	2	3	4	5	6	7	Total
<i>Guangxi</i> (121202)	0.473 2	0.607 9	1.740 9	0.674 3	1.590 0	0.237 8	0.936 2	6.260 3
<i>Yunnan</i> (121205)	0.537 7	0.630 7	2.458 5	0.169 6	0.813 1	0.500 9	1.567 5	6.678 0
<i>Xizang</i> (121125)	0.339 1	0.503 6	1.385 4	0.307 3	0.700 7	0.493 4	1.347 9	5.077 4
<i>Yunnan</i> (130424)	0.710 7	0.623 9	2.527 9	0.469 3	1.439 3	0.410 6	1.176 6	7.358 2
<i>Yunnan</i> (130422)	1.002 4	0.649 9	2.130 0	0.315 0	1.302 4	0.271 7	0.779 2	6.450 6
<i>Guangxi</i> (130421)	0.826 4	0.595 4	1.239 1	0.221 3	1.003 2	0.297 5	1.404 7	5.587 6
<i>Xizang</i> (130603)	0.536 6	0.577 7	1.418 4	0.172 1	0.739 5	0.367 2	0.878 3	4.689 7

## 3 讨 论

### 3.1 指标成分的选择

C<sub>21</sub>甾体皂苷类是青阳参的主要药理活性成分，其在青阳参中是以苷的形式存在，而不是游离的皂苷元，因此本文选择皂苷而非皂苷元为指标成分控制药材的内在质量。目前已有明确文献报道 Otophylloloside B、Otophylloloside C、Otophylloloside F 和 Caudatin 3-O-β-cymaropyranoside 的药理作用，研究发现 Otophylloloside B 对大鼠慢性癫痫模型-听源性发作有较强的抑制作用<sup>[6]</sup>，且可有效治疗肝炎尤其是迁延性肝炎和慢性肝炎<sup>[14]</sup>；而 Otophylloloside C 和 Otophylloloside F 抗美尼尔综合征作用显著，它们

不同于一般免疫药物的单一免疫活性，而是对免疫-中枢神经-内分泌系统同时起作用<sup>[5]</sup>；Caudatin 3-O-β-cymaropyranoside 可以有效抑制大鼠体内 H22 肿瘤细胞的生长，并且有效抑制 SMMC-7721 肿瘤细胞株的生长<sup>[7]</sup>；目前虽无有关 Wallicoside H、Wallicoside 和 Otophylloloside M 的药理活性研究报道，但它们在青阳参中含量较高有利于含量测定。此外，经文献检索和化学成分研究发现，青阳参中所含 C<sub>21</sub>甾体皂苷的苷元以两种苷元为主，分别是青阳参苷元和告达亭，本文所选的 7 个 C<sub>21</sub>甾体皂苷中，化合物 Otophylloloside C 和 Wallicoside H 的苷元为青阳参苷元，其余 5 个成分苷元均为告达亭。因此，选取的青阳参中 7 个 C<sub>21</sub>甾体皂苷不仅

代表药材中主要两类苷元的甾体皂苷成分,且以苷为指标成分而非苷元进行含量测定,更能真实反映药材中有效成分的含量。

### 3.2 检测波长的选择

选择的7个指标成分为两类苷元的C<sub>21</sub>甾体皂苷,单波长测定时,仅能准确检测其中一类苷元的C<sub>21</sub>甾体皂苷含量。本研究利用紫外分光光度计分别对7个指标成分进行全波长扫描,结果发现青阳参苷元的C<sub>21</sub>甾体皂苷的最适波长为259 nm,告达亭的C<sub>21</sub>甾体皂苷的最适波长为223 nm。因此选定这两个检测波长,依据7个化合物不同洗脱时间,采用不同检测时间变换波长的方法<sup>[15-16]</sup>,以保证7种指标成分均在其最大紫外吸收处检测,从而保证含量测定的准确性。

### 3.3 流动相的选择

实验过程中比较了甲醇-水、乙腈-水、甲醇-磷酸水和乙腈-磷酸水的洗脱效果,结果表明乙腈-水的洗脱效果好,因此优选乙腈-水作为流动相系统。由于青阳参中的化学成分复杂,且所含C<sub>21</sub>甾体皂苷种类多、化学结构相近,等度洗脱的方法达不到定性定量的要求,因此本实验选择乙腈-水梯度洗脱。

### 3.4 供试品制备方法的考察

本实验比较了不同提取方法(回流、超声),不同提取溶质(70%、85%、100%甲醇;60%、75%、90%乙醇),溶质用量(30、50、80、100倍)和提取时间(30、60、90、120 min),结果发现采用80倍量的60%乙醇溶液加热回流提取90 min时,青阳参的7个C<sub>21</sub>甾体皂苷类成分提取率较高。

### 3.5 样品测定结果

采用本文建立的HPLC波长切换法对7批次青阳参根中的7个C<sub>21</sub>甾体皂苷类成分的含量进行测定,结果表明不同产地及同产地不同批次的样品中7个C<sub>21</sub>甾体皂苷的总含量有差别,且单个皂苷含量的差别较大,可能与青阳参产地、采收时间和加工炮制有关。

## 参考文献

- [1] Jiang Y, Li BT. *Flora of China* (中国植物志) [M]. Beijing: Science Press, 1977:377.
- [2] Sun YN, Yan JL. Clinical application of *Cynanchum otophyllum* Schneid. as a national medicine [J]. *Chin J Ethnomed Ethno-pharm* (中国民族民间医药杂志), 1999, (5):309.
- [3] Zhao XG, Tang LJ. Observation on the treatment of 20 cases of intractable epilepsy by *Cynanchum otophyllum* Schneid. [J]. *Shaanxi Med J* (陕西新医药), 1985, 14(8):22-23.
- [4] Xue SX, Yuan WC, Yang CM. Clinical analysis on the treatment of 20 cases of intractable epilepsy of children by *Cynanchum otophyllum* Schneid. [J]. *J Applied Clin Pediat* (实用儿科临床杂志), 1991, 6(4):1931.
- [5] Mu QZ, Shen YM, Zhou XL, et al. Extraction of novel otophyllolides C-G from *Cynanchum otophyllum* Schneid. for treatment of hepatitis and Meniere's syndrome: CN, 1150951 [P]. 1997-07-04 [2013-10-20].
- [6] Mu QZ, Shen YM, Zhou XL, et al. Two new antiepilepsy compounds otophilloside A and B: CN, 1148958 [P]. 1997-05-07 [2013-10-20].
- [7] Peng YR, Ding YF, Wei YJ, et al. Caudatin-2,6-dideoxy-3-O-methyl- $\beta$ -D-cymaropyranoside induced apoptosis through caspase 3-dependent pathway in human hepatoma cell line SMMC-7721 [J]. *Phytoth Res*, 2011, 25(5):631-637.
- [8] Li YB. Application of caudatin-3-O- $\beta$ -D-cymarin in preparation of medicine for treating liver cancer: CN, 101011404 [P]. 2007-08-08 [2013-10-20].
- [9] Peng YR, Li YB, Liu XD, et al. Antitumor activity of C<sub>21</sub> steroid glycosides from *Cynanchum auriculatum* Royle ex Wright [J]. *Phytomedicine*, 2008, 15:1 016-1 020.
- [10] Chen SY, Li LY, Chen Y, et al. Effect on lymphocyte in immunosuppressant mice of C<sub>21</sub> steroid saponins in *Cynanchum otophyllum* Schneid. [J]. *Pharmacol Clin Chin Mater Med* (中医药理与临床), 1988, 4(4):51-52.
- [11] Sun SK, Tian SH, Li XP. Mechanism of *Qingyangshen* glycosides (QYS) treating on liver injury in mice [J]. *Ningxia Med J* (宁夏医学杂志), 2010, 32(2):120-122.
- [12] Ming QZ, Dong Y, Zhou XY. RP-HPLC assay for cynanchogenin in qingyangshen tablets [J]. *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 2006, 26(8):1 156-1 157.
- [13] Li WL, He WJ, Li HQ, et al. Determination of cynanchogenin in *Cynanchum otophyllum* Schneid. by HPLC [J]. *West China J Pharm Sci* (华西药学杂志), 2009, 24(6):663-664.
- [14] Mu QZ, Shen YM, Zhou XL, et al. Application of otophilloside A and otophilloside B in pharmaceutical industry: CN, 1148958 [P]. 1997-05-07 [2013-10-25].
- [15] Wu J, Ji L, Wang LF, et al. RP-HPLC with UV Switch determination of paeoniflorin and pepper alkali in *Zhitong* tablets [J]. *Chin J Exp Tradit Med Formulae* (中国实验方剂学杂志), 2011, 19(15):140-142.
- [16] Li WM, Zhao YR, Yang YY, et al. RP-HPLC with UV switch determination of 9 components in white peony root pieces [J]. *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 2011, 31(12):2 208-2 012.