

文章编号: 1000-4025(2005)01-0183-03

# 栽培花锚中抗肝炎活性成分的含量 在不同生长期变化的研究\*

吉文鹤, 纪兰菊\*, 马玉花, 陈桂琛, 卢学峰

(中国科学院西北高原生物研究所, 西宁 810001)

**摘要** 研究了花锚中去甲氧基花锚甙和花锚甙的含量随着不同生长期的变化趋势, 为药材的合理栽培和采收提供科学依据. RP-HPLC 法, 使用 VP-ODS C<sub>18</sub> 柱, 流动相为乙腈-磷酸水(1%), 梯度洗脱程序 0~5.00 min 乙腈的体积分数(以下同)为 15%, 5.01~14.00 min 由 15% 增至 25%, 14.01~30.00 min 由 25% 增至 40%, 流速为 1 mL/min, 柱温 25℃, 检测波长 254 nm. 花锚甙和去甲氧基花锚甙在花锚全草中的含量在不同生长期有明显变化.

**关键词** RP-HPLC 法 去甲氧基花锚甙 花锚甙

**中图分类号** Q946.83 **文献标识码** A

## Change of Anti-hepatitis Active Substance during Different Growth Period in Cultivated *Halenia elliptica*

J I Wen-he, J I Lan-ju\*, M A Yu-hua, CHEN Gui-chen, LU Xue-feng

(Northwest Plateau Institute of Biology, Academy of Chinese Science, Xining 810001, China)

**Abstract** To offer scientific base of rational cultivation and collection of *Halenia*, we study content change of Demethoxyhaleniaside and Haleniaside during different growth period. RP-HPLC use VP-ODS C<sub>18</sub> column, mobile phase: acetonitrile-phosphoric acid-water (1%), gradient elution program: 0~5.00 min acetonitrile's volume percent (as follow) is 15%, 5.01~14.00 min from 15% to 25%, 14.01~30.00 min from 25% to 40%, flow velocity: 1 mL/min, temperature: 25℃, detection wavelength: 254 nm. Content of demethoxyhaleniaside and haleniaside have distinct change during different growth period in whole plant of *Halenia elliptica*.

**Key words** RP-HPLC demethoxyhaleniaside haleniaside

花锚又称椭圆叶花锚(*Halenia elliptica* D. Don), 为龙胆科(Gentianaceae)花锚属植物, 为两年生草本植物. 花锚为藏药系统中用于治疗肝胆系统疾病的常用药物之一, 泛称“藏茵陈”. 主要分布于青藏高原, 为藏药习用药物, 全草入药. 花锚的主要化学成分为呋酮(Xanthone)、黄酮(Flavone)和三萜(Triterpene)类化合物, 已经分离鉴定了 15 种呋酮和黄酮<sup>[1-4]</sup>成分, 其中抗肝炎有效成分为呋酮甙花锚甙(Haleniaside)和去甲氧基花锚甙(Demethoxy-

haleniaside)<sup>[1]</sup>, 但关于花锚中抗肝炎活性成分在不同生长期含量变化的研究未见报道. 笔者应用反相高相色谱-二极管阵列检测法以去甲氧基花锚甙和花锚甙为指标, 检测了这两种指标性化合物在花锚全草中随不同生长期的变化趋势.

### 1 材料与方法

#### 1.1 样品采集

栽培花锚样品是从平安采集的, 采集时间分别

\* 收稿日期 2004-03-29 修改稿收到日期 2004-06-28

基金项目 国家中西部专项(2001BA901A47)

作者简介 吉文鹤(1980-), 男, 在读硕士研究生, 从事天然药物化学研究.

\* 通讯联系人. Correspondence to J I Lan-ju

为 2003 年 6 月 28 日(营养期)、2003 年 7 月 29 日(初蕾期)、2003 年 8 月 28 日(盛花期)和 2003 年 9 月 25 日(花果期)地区性变化的野生花锚采集于大黑沟和群加,栽培花锚则采集于二十里铺和群加。

## 1.2 仪器和试剂

LC-10A TVP 二元泵(岛津) Class-V P 液相色谱工作站(岛津) SPD-M 10A V P 二极管阵列检测器(岛津) Rheodyne 7725 进样器(美国) AT-130 柱温箱(天津) AB 104-N 电子天平(Mettler-toledo 公司) ZM 震动超微粉碎机 Z200B 超声波仪 Milli-Q 超纯水装置 C<sub>18</sub>硅胶小柱(1 mL Waters) 乙腈购自山东禹城禹王试剂厂,为色谱纯 磷酸和甲醇为分析纯 水为自制重蒸水 去甲氧基花锚甙和花锚甙对照品由中国科学院西北高原生物研究所孙洪发教授提供。

## 1.3 色谱条件

色谱柱 VP-ODS C<sub>18</sub>柱(250 mm × 4.6 mm, 中国) 检测波长 254 nm 柱温 25 进样体积 20 μL; 流动相为乙腈 磷酸 水(1%) ;流速 1.00 mL/min 梯度洗脱程序:0~ 5.00 min 乙腈的体积分数为 15%, 5.01~ 14.00 min 由 15% 增至 25%, 14.01~ 30.00 min 由 25% 增至 40%。

## 1.4 对照品溶液的制备

分别精密称取适量去甲氧基花锚甙和花锚甙用甲醇定容至 10 mL, 配成浓度分别为 0.22 mg/mL 和 0.17 mg/mL 的对照品溶液。

## 1.5 供试品溶液的制备

将上述处理过的样品粉碎 精密称取 0.500 0 g, 置于 100 mL 锥形瓶中, 加入甲醇 20 mL 回流提取 2 h, 过滤 定容至 25 mL, 取少量用 C<sub>18</sub>硅胶小柱滤取色素。

## 1.6 线性关系

分别精密吸取标准品储备液 4 μL、8 μL、12 μL、16 μL、20 μL 进样作 HPLC 分析, 以峰面积对进样体积求得回归方程。去甲氧基花锚甙(0.22 mg/mL)  $Y = 428.317.2X - 328.610.4, r = 0.999.1$  线性范围为 0.88~ 4.4 μg; 花锚甙(0.17 mg/mL)  $Y = 305.289.15X - 114.858, r = 0.999.2$  线性范围为 0.68~ 3.4 μg。

## 1.7 精密度试验

取同一份对照品溶液, 按上述色谱条件连续进样 5 次, 以峰面积计算可得去甲氧基花锚甙( $n = 5$ )和花锚甙( $n = 5$ )的 RSD 分别为 1.96% 和 2.90%。

## 1.8 重复性试验

将同一份全草样品用上述供试品溶液的制备方法制备 5 份, 进行 HPLC 分析。去甲氧基花锚甙

( $n = 5$ )和花锚甙( $n = 5$ )的 RSD 分别为 3.39% 和 2.02%。

## 1.9 稳定性试验

将同一份样品按供试品溶液的制备方法制备后, 每隔 4 h 测定一次, 可知去甲氧基花锚甙( $n = 6$ )和花锚甙( $n = 6$ )峰面积的 RSD 分别为 3.00% 和 2.79%。说明去甲氧基花锚甙和花锚甙在 24 h 内稳定。

## 1.10 回收率试验

取已知含量的花锚药材适量, 加入一定量的去甲氧基花锚甙和花锚甙对照品, 按样品制备方法制备, 进行 HPLC 分析, 测得去甲氧基花锚甙( $n = 5$ )和花锚甙( $n = 5$ )的回收率分别为 99.79% ( $RSD = 3.55%$ )和 100.39% ( $RSD = 2.60%$ )。

## 1.11 样品的测定

将上述处理好的样品分别进样 20 μL, 进行 HPLC 分析, 其结果见图 1、2 和表 1。

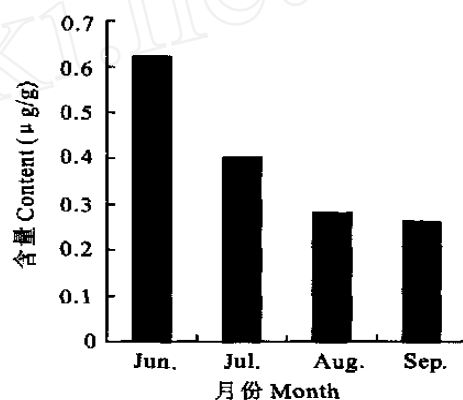


图 1 抗肝炎成分含量的季节性变化

Fig. 1 The content change of anti-hepatitis with season

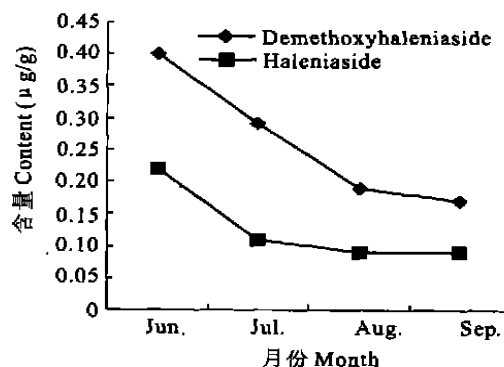


图 2 去甲氧基花锚甙和花锚甙含量的季节性变化

Fig. 2 The change of demethoxyhaleniaside and haleniaside with season

表 1 不同地区花锚中去甲氧基花锚甙和花锚甙的含量

Table 1 The content of demethoxyhaleniaside and haleniaside in different area

采集地 Collection place	类型 Type	去甲氧基花锚甙 Demethoxyhaleniaside( $\mu\text{g/g}$ )	花锚甙 Haleniaside( $\mu\text{g/g}$ )
二十里铺 Ershilipu	栽培 Cultivated	0.09	0.05
大黑沟 Daheigou	野生 Wild	0.17	0.09
群加 Qunjia	栽培 Cultivated	0.09	0.08
群加 Qunjia	野生 Wild	0.16	0.09

## 2 结果和讨论

### 2.1 提取方法的选择

影响被提取物质转移率的主要因素有粒度、提取方法和溶剂的选择。去甲氧基花锚甙和花锚甙为极性比较大的物质,选甲醇为提取溶剂,本试验考察了一般粉碎、超微粉碎和回流提取、超声提取,结果显示一般粉碎、回流提取去甲氧基花锚甙和花锚甙的转移率比较高。

### 2.2 色谱条件的选择

用二极管阵列检测器分析比较了去甲氧基花锚甙和花锚甙对照品色谱峰及样品所测成分相应色谱峰的紫外吸收图,试验证明二者的紫外光谱基本一致,均在 254 nm 处有最大吸收,故检测波长为 254 nm。流动相选择经反复试验,选定乙腈-磷酸-水系统,去甲氧基花锚甙和花锚甙的出峰时间依次为 19 和 21 min,且峰形对称,野生与栽培药材中其它化合物基本达到基线分离,表明这两种指标成分均能

得到良好分离。

### 2.3 花锚中抗肝炎活性成分

活性成分主要为去甲氧基花锚甙和花锚甙,图 1 为这两种活性成分含量加和值的季节性变化趋势,从图中可以得知抗肝炎活性成分在营养期含量最高,并且依次降低,但在盛花期和花果期其含量无明显区别。图 2 为去甲氧基花锚甙和花锚甙含量的季节性变化趋势,图 2 显示去甲氧基花锚甙的含量高于花锚甙的含量,并且两种甙的含量从 6~9 月逐渐降低。从抗肝炎活性成分的含量角度考虑,6 月份(营养期)为花锚的最佳采收期。

表 1 结果显示,群加和大黑沟的野生花锚中抗肝炎活性成分无明显区别。在栽培花锚中,去甲氧基花锚甙的含量明显比野生花锚中的含量低,而花锚甙的含量无明显区别。不同的栽培条件对抗肝炎成分的含量也有影响,二十里铺温室培养的花锚中抗肝炎成分的含量低于群加的栽培花锚中的含量,可能是由于温室培养连续生长的原因所致。

## 参考文献:

- [1] SUN H F(孙洪发),HU B L(胡柏林),D N G J Y(丁经业),FAN SH F(樊淑芬). Three new xanthoneside in *Halenia elliptica* D. Don[J]. *Acta Botanica Sinica*(植物学报),1987,29(4) 422- 428(in Chinese).
- [2] HU B L(胡柏林),SUN H F(孙洪发),D N G J Y(丁经业),FAN SH F(樊淑芬). Xanthone compounds in *Halenia elliptica* D. Don[J]. *Acta Biologica Plateau Sinica*(高原生物学集刊),1984(in Chinese).
- [3] SUN H F(孙洪发),HU B L(胡柏林),FAN SH F(樊淑芬),D N G J Y(丁经业). Three new xanthone in *Halenia elliptica* D. Don[J]. *Acta Botanica Sinica*(植物学报),1983,25 460- 467(in Chinese).
- [4] DHASMANA H,GRAGH S. Two xanthone glucosides from *Halenia elliptica*[J]. *Phytochemistry*(植物化学),1989,28(10) 2819- 2821(in Chinese).