

## 藏药椭圆叶花锚中抗肝炎有效成分的含量测定

纪兰菊<sup>1\*</sup>, 吉文鹤<sup>1</sup>, 陈桂琛<sup>1</sup>, 代冬海<sup>2</sup>, 杨艳蓉<sup>2</sup>

(1. 中国科学院西北高原生物研究所, 西宁 810001; 2. 青海普兰特藏药研究所, 西宁 810007)

**摘要:** 运用 RP-HPLC 建立了花锚中青兰苷、去甲氧基花锚苷和花锚苷的含量分析方法, 为栽培花锚替代野生花锚入药提供一定的科学依据。花锚苷、去甲氧基花锚苷和青兰苷分别在 0.68~3.40  $\mu\text{g}$  ( $r=0.9998$ )、0.36~1.80  $\mu\text{g}$  ( $r=0.9990$ ) 和 0.80~4.00  $\mu\text{g}$  ( $r=0.9979$ ) 有良好线性关系, 平均回收率分别为 100.39% (RSD=2.60%), 99.79% (RSD=3.55%) 和 100.71% (RSD=2.19%)。栽培花锚中花锚苷和去甲氧基花锚苷的含量(抗肝炎活性成分)和在野生花锚中的含量相比无明显差别, 可以初步证明栽培花锚可以替代野生花锚入药。

**关键词:** 椭圆叶花锚; 花锚苷; 去甲氧基花锚苷; 青兰苷

中图分类号: Q946; R284.2

文献标识码: A

文章编号: 1000-470X(2004)05-0473-04

### Determination Compounds of Antihepatitis-haleniaside in Tibet Herb of *Halenia elliptica* D. Don

JILan-Ju<sup>1</sup>, JIWen-He<sup>1</sup>, CHEN Gui-Chen<sup>1</sup>, DAIDong-Hai<sup>2</sup>, YANG Yan-Rong<sup>2</sup>

(1. Northwest Plateau Institute of Biology, The Chinese Academy of Sciences, Xining 810001, China;

2. Qinghai Plateau Institute of Tibet Herbs, Xining 810007, China)

**Abstract:** The quantitative analysing method of luteoloside, demethoxyhaleniaside and haleniaside in *Halenia elliptica* D. Don was set up by RP-HPLC, and this can provide scientific basis for cultivated halenia to replace wild halenia use as medicine. The standard curves of luteoloside, demethoxyhaleniaside and haleniaside showed good linearity over the range of 0.68-3.40  $\mu\text{g}$  ( $r=0.9998$ ), 0.36-1.80  $\mu\text{g}$  ( $r=0.9990$ ) and 0.80-4.00  $\mu\text{g}$  ( $r=0.9979$ ), respectively. The average recovery was 100.39% (RSD=2.60%), 99.79% (RSD=3.55%) and 100.71% (RSD=2.19%), respectively. The content of haleniaside and demethoxyhaleniaside (compounds of anti-hepatitis) has no obvious difference between in wild and in cultivated halenia, and get the preliminary testimony that cultivated specie can replace wild specie to use as medicine.

**Key words:** *Halenia elliptica* D. Don; Haleniaside; Demethoxyhaleniaside; Luteoloside

椭圆叶花锚(*Halenia elliptica* D. Don)为龙胆科(Gentianaceae)花锚属植物,为藏医药系统中用于治疗肝胆系统疾病的常用植物药之一,泛称“藏茵陈”<sup>[1]</sup>。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种呋酮和黄酮成分<sup>[2-4]</sup>,其中抗肝炎有效成分为呋酮苷花锚苷(Haleniaside)和去甲氧基花锚苷(Demethoxyhaleniaside)<sup>[2]</sup>,对花锚有效成分含

量的研究也有较多报道<sup>[5,6]</sup>。本试验通过反相高效液相色谱法建立了测定野生和栽培椭圆叶花锚中青兰苷、去甲氧基花锚苷和花锚苷含量的方法,并且为栽培花锚替代野生花锚入药的可行性提供了初步的科学依据。

#### 1 仪器、试剂、材料及供试品与标准品的配制

LC-10A T<sub>VP</sub> 二元泵(岛津); Rheodyne 7725 进

收稿日期: 2003-09-26, 修回日期: 2004-06-25。

基金项目: 国家中西部重点项目(2001BA901A47)资助。

\* 作者简介: 纪兰菊(1952-),女,北京人,副研究员,主要从事藏药药化研究工作。

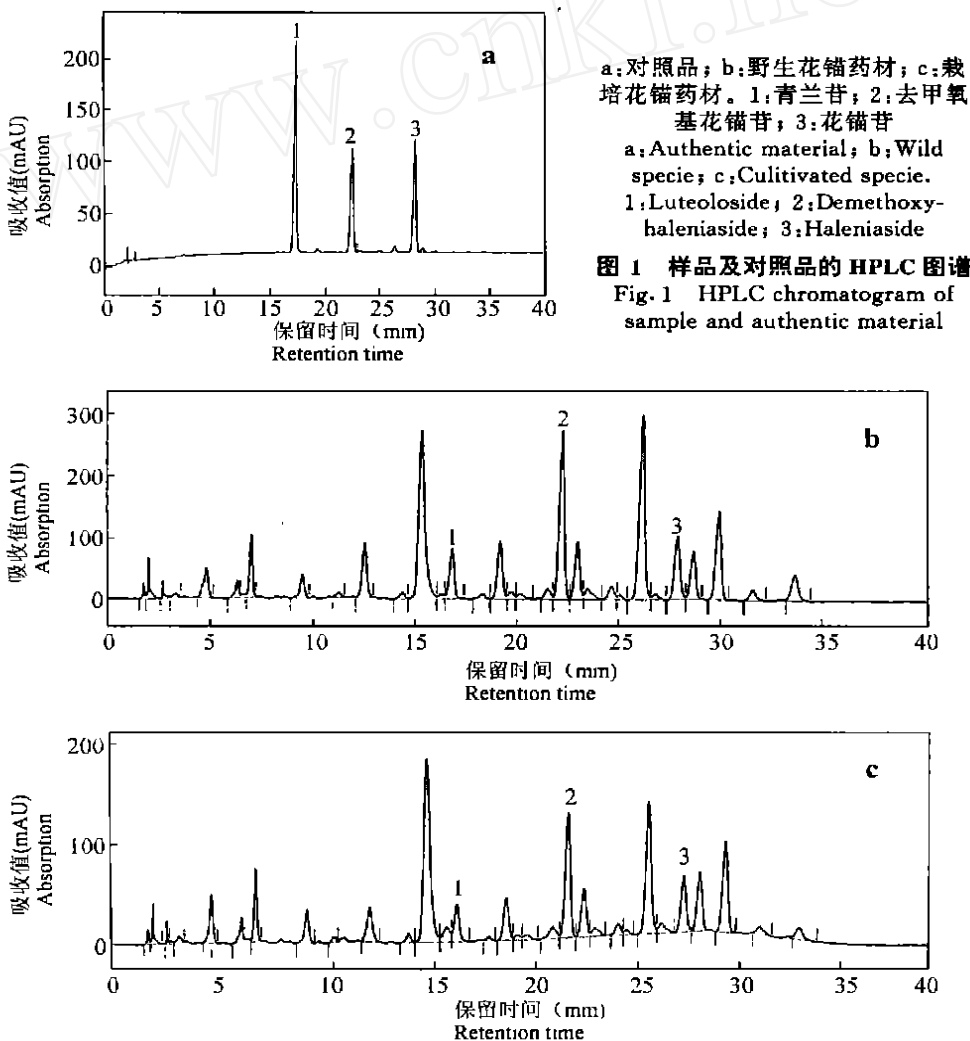
样器(美国); SPD-M 10A V P 二极管阵列检测器(岛津); Class-V P 液相色谱工作站(岛津); 2200B 超声波仪; M II Q 超纯水装置; C<sub>18</sub> 硅胶小柱(1 mL, Waters)。HPLC 级乙腈购自美国 Tedia 公司; 分析纯甲醇、磷酸购自上海化学试剂公司。花锚苷(纯度为 96%)、去甲氧基花锚苷(纯度为 98%)、青兰苷(纯度为 95%) 的对照品由中国科学院西北高原生物研究所孙洪发教授提供。

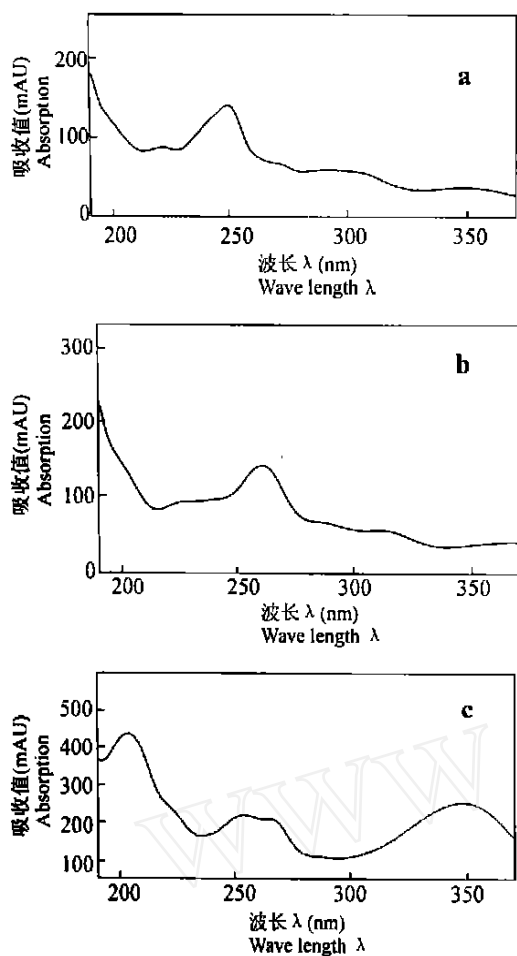
野生椭圆叶花锚药材(花后期)自行采集(2002-09); 栽培花锚药材采自栽培基地——青海省湟中县群加乡。花锚药材全株剪碎, 置超微粉碎机中粉碎 10 min, 精密称取 0.5 g, 置 100 mL 锥形瓶中, 加甲醇 20 mL, 置 80 °C 水浴锅上回流 2 h, 放冷至室温, 过滤, 滤液于 25 mL 容量瓶中, 用甲醇定容; 摇匀后经 C<sub>18</sub> 硅胶小柱做脱脂处理, 先用 5 mL 蒸馏水活化小柱, 即用 5 mL 甲醇淋洗, 再用 10 mL 蒸馏水洗脱后,

将样品提取液直接上柱, 弃取初滤液, 收集续滤液上机分析。分别精密称取花锚苷、去甲氧基花锚苷和青兰苷 1.70 mg、0.90 mg 和 2.00 mg 用甲醇定容至 10 mL 容量瓶中, 配制成浓度为 0.17、0.09 mg/mL 和 0.20 mg/mL 的对照品溶液。

## 2 色谱条件

色谱柱: VP-ODS C<sub>18</sub> 柱(5 μm, 150 mm × 4.6 mm); 流动相: 由乙腈-水-磷酸(1%) 组成。流速 1.0 mL/min; 梯度洗脱程序为 0~5 min, 乙腈的体积分数(下同)为 12%; 5~15 min, 乙腈由 12% 线性增加至 15%; 15~40 min, 乙腈由 15% 线性增加至 35%; 检测波长 254 nm; 柱温: 室温。色谱分离图及花锚苷、去甲氧基花锚苷和青兰苷的紫外光谱图分别见图 1 和图 2。





a 花锚苷; b 去甲氧基花锚苷; c 青兰苷  
a Haleniaside; b Demethoxyhaleniaside;  
c Luteoloside

图 2 紫外光谱图

Fig. 2 Figure of UV spectrum

### 3 方法与结果

**线性关系考察** 分别精密吸取花锚苷、去甲氧基花锚苷、青兰苷对照品 1、2、3、4 mL 置 5 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 吸取上述溶液, 分别进样 20  $\mu$ L, 以进样量为横坐标, 各自的峰面积积分为纵坐标, 进行线性回归, 回归方程分别为花锚苷:  $y = -106848 + 2914082x$ ,  $r = 0.9998$ ; 线性范围: 0.68 ~ 3.40  $\mu$ g; 去甲氧基花锚苷:  $y = 9868.5 + 3561361.9x$ ,  $r = 0.9990$ ; 线性范围: 0.36 ~ 1.80  $\mu$ g; 青兰苷  $y = 481391 + 4930041.5x$ ,  $r = 0.9979$ ; 线性范围: 0.80 ~ 4.00  $\mu$ g。

**精密度试验** 以同一混合对照品溶液进样, 每次 20  $\mu$ L, 重复 5 次; 花锚苷峰面积的 RSD 为 1.7%, 去甲氧基花锚苷峰面积的 RSD 为 4.0%, 青兰苷峰面积的 RSD 为 5.1%。

**重现性试验** 精密称定同一批样品, 按供试品溶液制备方法分别制备 5 份供试品溶液, 分别测定, 结果花锚苷含量的 RSD 为 4.89%, 去甲氧基花锚苷含量的 RSD 为 4.70%, 青兰苷含量的 RSD 为 2.62%。

**回收率试验** 取已知含量的药材适量, 加入一定量的花锚苷、去甲氧基花锚苷、青兰苷对照品溶液, 按样品制备方法制备, 上机分析, 测得回收率见表 1。

表 1 回收率试验  
Table 1 Test of recovery rate

样品 Sample	回收率 Recoveries (%)		
	花锚苷 Haleniaside	去甲氧基花锚苷 Demethoxyhaleniaside	青兰苷 Luteoloside
1	102.54	95.21	98.79
2	100.03	97.28	102.50
3	99.19	98.44	103.40
4	96.82	104.30	97.54
5	103.36	103.70	101.30
RSD (%)	2.60	3.55	2.19

**样品测定** 吸取各供试品溶液 20  $\mu$ L, 分别平行进样 4 次, 测定花锚苷、去甲氧基花锚苷、青兰苷的峰面积积分值, 用外标法计算含量, 结果见表 2。

表 2 花锚(野生与栽培)药材中花锚苷、去甲氧基花锚苷、青兰苷的含量

Table 2 The content of haleniaside, demethoxyhaleniaside and luteoloside in wild and cultivated of *Halenia elliptica* D. Don

采集地点 Collection place	类型 Type	花锚苷 (%) haleniaside	去甲氧基花锚苷 (%) demethoxyhaleniaside	青兰苷 (%) luteoloside
群加乡 Qunjia	野生 Wild	0.090	0.160	0.025
清沙山 Qingsha Hill	野生 Wild	0.080	0.165	0.030
察汗河 Chahan River	野生 Wild	0.120	0.229	0.017
大通 Datong	野生 Wild	0.060	0.128	0.010
果洛 Guo Luo	野生 Wild	0.042	0.095	0.024
鲁郎 Lulang	野生 Wild	0.141	0.274	0.060
天祝 Tianzhu	野生 Wild	0.158	0.242	0.025
群加乡 Qunjia	栽培 Cultivated	0.079	0.095	0.033
西宁 Xining	栽培 Cultivated	0.044	0.054	0.020
北山 Beishan	栽培 Cultivated	0.092	0.045	0.039

## 4 讨论

在紫外图谱中,花锚苷甲醇溶液  $\lambda_{\max}$  为 260 nm, 去甲氧花锚苷甲醇溶液  $\lambda_{\max}$  为 250 nm, 青兰苷甲醇溶液  $\lambda_{\max}$  为 255 nm、340 nm。选择  $\lambda$  254 nm 检测, 可同时兼顾 3 种被测物质的最大吸收度, 且其它物质峰形对称, 基本达到基线分离, 故选择 254 nm 为检测波长。用乙腈-磷酸-水系统为流动相, 因乙腈为无末端吸收, 梯度洗脱时与单纯使用甲醇-水系统比较, 基线较平稳, 加入磷酸改善了峰形的拖尾, 保证 95% 以上的峰达到基线分离, 3 种含量测定的峰, 分离度均大于 1.0。采用 HPLC 法测定花锚药材中主要水溶性成分中抗肝炎有效成分吡酮苷类的花锚苷与去甲氧花锚苷及黄酮类成分青兰苷, 同时进行紫外光谱的鉴定(见图 2)。笔者对色谱分离条件和测定方法进行了考察, 证明该方法简便、准确、稳定, 可以作为藏药花锚品质评价的方法之一。

表 2 所示结果表明, 在野生花锚中去甲氧基花锚苷的含量高于花锚苷的含量, 并且青兰苷的含量在野生和栽培花锚中的含量总比花锚苷和去甲氧基花锚苷低, 栽培花锚中花锚苷和去甲氧基花锚苷(抗

肝炎活性成分)的含量与在野生花锚中的含量相比无明显差别。色谱分离图表明除花锚苷、去甲氧花锚苷、青兰苷以外的其它水溶性成分的保留时间、峰形也基本一致。我们的结果可以初步证明栽培植物藏药花锚可代替野生花锚入药。

## 参考文献

- [1] 江苏新医学院编 中药大辞典(上册) [M]. 上海: 上海人民出版社, 1975. 1 060
- [2] 孙洪发, 胡伯林, 丁经业, 樊淑芬. 花锚的三种新吡酮苷[J]. 植物学报, 1987, 29(4): 422-428
- [3] 孙洪发, 胡伯林, 樊淑芬, 丁经业. 花锚的三个新吡酮苷[J]. 植物学报, 1983, 25(5): 460-467.
- [4] Dhasmana H, Grag H S. Two xanthone glucosides from *Halenia elliptica* D. Don [J]. *Photochemistry*, 1989, 28(10): 2 819-2 821.
- [5] 高光跃, 李鸣, 冯毓秀, 谭沛. 11 种獐牙菜及近缘植物中有效成分的高效液相色谱测[J]. 药学学报, 1994, 29(12): 910-914
- [6] 胡凤祖, 宋娅莉, 刘梅, 师治贤. 青藏高原龙胆科植物药用有效成分的高效液相色谱分析[J]. 色谱, 2003, 21(1): 63-65