

反相高效液相色谱法测定野生与栽培花锚药材及其制剂中的花锚甙和去甲氧基花锚甙

纪兰菊¹, 丁晨旭¹, 陈桂琛¹, 代冬海², 杨艳蓉²

(1. 中国科学院西北高原生物研究所, 青海 西宁 810001;

2. 青海普兰特藏药研究所, 青海 西宁 810007)

摘要:建立了花锚药材及其制剂中两种抗肝炎有效成分花锚甙和去甲氧基花锚甙的反相高效液相色谱测定方法。采用甲醇回流提取进行样品处理,在乙腈-磷酸水溶液为流动相作梯度洗脱、ODS柱、检测波长为254 nm条件下,花锚甙和去甲氧基花锚甙均可达到基线分离。两种成分在0.68~3.40 g/L,0.36~1.8 g/L时,其峰面积与浓度成良好的线性关系,加标回收率为95%~105%。该法适用于花锚药材及其制剂的质量分析检验。

关键词:高效液相色谱;花锚甙;去甲氧基花锚甙;花锚;乙肝健片

中图分类号:O658 文献标识码:A 文章编号:1000-8713(2004)01-0038-03

Determination of Haleniaside and Demethoxyhaleniaside in Wild and Cultivated *Halenia elliptica* D. Don. by Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography

Ji Lanju¹, Ding Chenxu¹, Chen Guichen¹, Dai Donghai², Yang Yanrong²

(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: A simple and accurate method for the determination of haleniaside and demethoxyhaleniaside in *Halenia elliptica* D. Don. materials and patent medicines with high performance liquid chromatography (HPLC) was developed. The two components were extracted from powdered samples with methanol. The resultant extract was separated within 45 min on a VP-ODS C₁₈ column (4.6 mm i. d. ×250 mm, 5 μm) under gradient elution with a mixture of acetonitrile-phosphate buffer at a flow rate of 1.0 mL/min. The detection wavelength was 254 nm and the injection volume was 20 μL. Under gradient elution program the volume fractions of acetonitrile in mobile phase were as follows: 0-5 min, 12%; 5-15 min, 12%-15%; 15-40 min, 15%-35%. Both haleniaside and demethoxyhaleniaside have good linearity in the ranges of 0.68-3.40 g/L and 0.36-1.8 g/L with correlation coefficients of 0.9998 and 0.9990 respectively. This method has been successfully applied to the analysis of *Halenia elliptica* D. Don materials and related patent medicines.

Key words: high performance liquid chromatography; haleniaside; demethoxyhaleniaside;

Halenia elliptica D. Don; Yiganjian tablet

花锚、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”。主要分布于青藏高原,为藏药习用药材,全草入药。花锚中主要化学成分为香豆酮(xanthone)、黄酮(flavone)和三萜(triterpene)类化合物,已经分离鉴定了15种香豆酮和黄酮成分^[1~3],其中主要抗肝炎有效成分为香豆酮类成分花锚甙(haleniaside)

和去甲氧基花锚甙(demethoxyhaleniaside)^[1]。由花锚为主药材研制、开发的成品药乙肝宁、急肝宁、乙肝健等,具有疗效稳定、效率高等特点,市场前景广阔。目前,生产用药材及制剂的质量标准检测方法为薄层展开和比色法,测定其总香豆酮成分的含量^[4]。本文采用高效液相色谱-二极管阵列检测方法,以花锚药材与制剂中主要抗肝炎有效成分花锚甙与去甲氧基花锚甙为指征性成分,对同一地区生

收稿日期:2003-02-11

作者简介:纪兰菊,女,副研究员,主要从事藏药药化研究工作,Tel:(0971)6143282.

基金项目:国家中西部专项基金资助(2001BA901A47).

长的野生花锚和栽培花锚及其制剂进行了含量测定。结果表明该方法简便,准确,重复性好,具有足够的灵敏度,适用于花锚药材及其制剂中花锚甙和去甲氧基花锚甙含量的同时测定。

1 实验部分

1.1 仪器、试剂、材料与标准品的配制

LC-10ATVP 二元泵、SPD-M10AVP 二极管阵列检测器、Class-VP 液相色谱工作站(日本岛津); Rheodyne 7725 进样器(美国); 2200B 超声波仪; Milli-Q 超纯水装置; C₁₈硅胶小柱(1 mL, Waters)。

花锚甙、去甲氧基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; 野生花锚药材自行采集(花后期); 栽培花锚药材采集自栽培基地——青海省湟中县群加乡; 乙肝健为市售品。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。

分别精密称取花锚甙和去甲氧基花锚甙对照品,用甲醇精确配制对照品溶液。

1.2 色谱条件

色谱柱:VP-ODS C₁₈柱(4.6 mm i. d. ×150 mm, 5 μm, 岛津)。检测波长 254 nm。进样体积 20 μL。流动相由乙腈和体积分数为 1% 的磷酸水溶液组成,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%。

1.3 花锚药材及其制剂的提取

花锚药材:取超微粉碎后的药材粉末约 1 g,精密称定,置于 100 mL 锥形瓶中,加甲醇 20 mL,水浴 80 回流 2 h; 过滤,滤液于 25 mL 容量瓶中用甲醇定容,摇匀,经 C₁₈硅胶小柱做净化处理,即先用 5 mL 甲醇预淋洗 C₁₈硅胶小柱,然后将样品提取液直接上柱,弃去初滤液后,收集续滤液上机分析。

乙肝健片:取 20 粒药片,除去糖衣,在研钵中研细,按照与药材同样的处理方法处理。

2 结果与讨论

2.1 不同提取方法的比较

由于花锚甙的甙键较弱,不宜采用酸碱和高温提取方法,因此选用甲醇作为提取溶剂,采用超声和甲醇回流两种方法提取相同的时间,进行比较试验。测定结果显示,超声提取时,药材中花锚甙和去甲氧基花锚甙的含量分别为 0.030% 和 0.042%,甲醇回流提取分别为 0.047% 和 0.087%,因此实验中选用甲醇回流提取方法。

2.2 色谱分离

分别对花锚甙和去甲氧基花锚甙的对照品进行了测定波长选择,发现在 254 nm 处,花锚甙与去甲氧基花锚甙均有较大的吸收,因此选择 254 nm 作为这两种甙的测定波长。

经反复试验,选定乙腈-磷酸水溶液系统作为流动相,随着流动相中乙腈浓度的增加,洗脱能力增强,去甲氧基花锚甙(图 1-b)及花锚甙(图 1-a)的出峰时间分别为 22 和 28 min,且峰形对称,药材与制剂色谱图(图 1-c, d)中的其他化合物基本达到基线分离。表明这两种有效成分均能得到良好的分离。

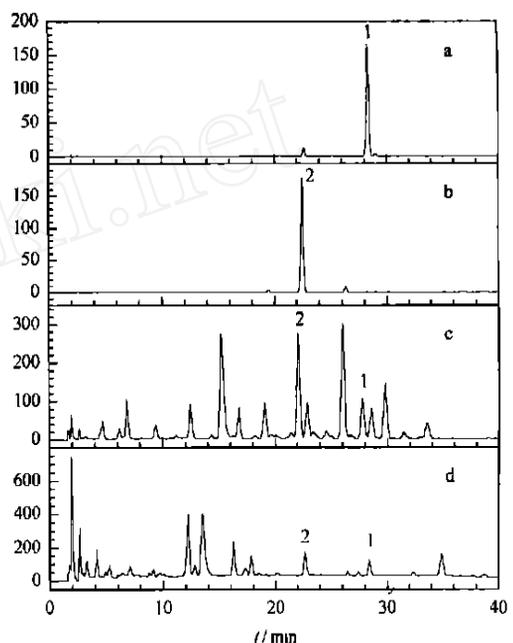


图 1 几种样品的色谱分离图

Fig. 1 Chromatograms of samples
a. haleniaside standard; b. demethoxyhaleniaside standard; c. wild *Halenia elliptica* D. Don; d. Yiganjian tablet
1. haleniaside; 2. demethoxyhaleniaside.

2.3 线性关系

分别精密吸取花锚甙(3.4 g/L)和去甲氧基花锚甙(1.8 g/L)对照品溶液各 1, 2, 3, 4 mL,用甲醇定容为 5 mL。取上述不同质量浓度的花锚甙和去甲氧基花锚甙对照品溶液各 20 μL,分别进样,测定其峰面积,以峰面积 Y(n=3)对质量浓度 X(mg/L)作图,得到线性回归方程:花锚甙为 $Y = -106848 + 2914082X$, $r = 0.9998$; 去甲氧基花锚甙为 $Y = 119868.5 + 3561361.9X$, $r = 0.9990$; 由此可见两种甙分别在 0.68~3.40 g/L 和 0.36~1.8 g/L 具有良好的线性。

2.4 方法精密度与重现性

取一混合对照品溶液(含 0.85 g/L 花锚甙, 0.045 g/L 去甲氧基花锚甙)进样,每次 20 μL,重复 5 次;花锚甙峰面积的相对标准偏差(RSD)为 1.7%,

去甲氧基花锚甙峰面积的 RSD 为 2.98 %。

精密称定同一批样品,按“1.3 节方法制备 5 份供试品溶液,分别测定,结果花锚甙含量的 RSD 为 4.89 %,去甲氧基花锚甙含量的 RSD 为 4.70 %。

表 1 花锚甙和去甲氧基花锚甙回收率试验结果 (n=5)

Table 1 The recoveries of haleniaside and demethoxyhaleniaside (n=5)

Component	Background/ (mg/ g)	Added/ (mg/ g)	Found/ (mg/ g)	Average recovery/ %	RSD/ %
Haleniaside	0.88	1.0	1.89	101	2.6
Demethoxyhaleniaside	1.55	1.4	2.94	99.3	3.6

2.6 实际样品分析

用此法对青海省群加、海东地区的野生及栽培花锚甙药材和乙肝健制剂中的花锚甙及去甲氧基花锚甙进行了测定,含量分布见表 2。

表 2 实际样品中花锚甙和去甲氧基花锚甙的质量分数 (n=2)

Table 2 The mass fractions of haleniaside and demethoxyhaleniaside in real samples (n=2)

Sample	w (Component) / %	
	haleniaside	demethoxyhaleniaside
Wild (Qunjia)	0.088	0.155
Cultivated (Qunjia)	0.082	0.086
Wild (Haidong)	0.009	0.011
Cultivated (Haidong)	0.027	0.037
Yiganjian tablet	0.003	0.016

2.5 回收率试验

取已知含量的药材适量,加入一定量的花锚甙、去甲氧基花锚甙对照品,按样品制备方法制备,依法测定,测得回收率如表 1 所示。

结果表明,本实验方法不仅适用于花锚药材的分析,同样也适用于花锚制剂的分析。

参考文献:

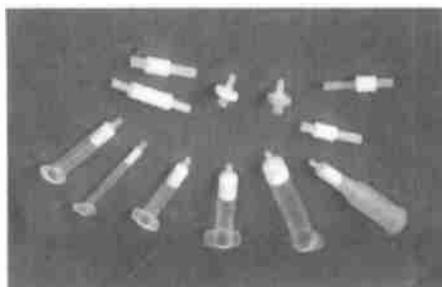
- [1] Sun Hongfa, Hu Bolin, Ding Jingye, Fan Shufen. Acta Botanica Sinica (孙洪发, 胡伯林, 丁经业, 樊淑芬. 植物学报), 1987, 29(4): 422
- [2] Hu Bolin, Sun Hongfa, Fan Shufen, Ding Jingye. Acta Biologica Plateau Sinica (胡伯林, 孙洪发, 樊淑芬, 丁经业. 高原生物学集刊), 1984, (2): 121
- [3] Sun Hongfa, Hu Bolin, Fan Shufen, Ding Jingye. Acta Botanica Sinica (孙洪发, 胡伯林, 樊淑芬, 丁经业. 植物学报), 1983, 25(5): 460
- [4] The Qinghai Ministry of Sanitation. The Standards of Medicines in Qinghai (青海省卫生厅. 青海省药品标准). 1992. 19

河北省津杨滤材厂

河北省津杨滤材厂已有二十多年的历史,是我国最早生产固相萃取柱的专业厂家,主要产品 PT-系列固相萃取柱已在多项研究工作中应用(在上千篇论文中被报道)。我厂目前可生产十多种不同规格和类型的萃取柱及微孔滤膜、固相萃取仪等产品。上述产品已广泛应用于公安、防疫、农业和科研等领域。为满足广大客户的要求,最近我厂又开发了“瘦肉精”、“毒鼠强”、“农药残留”、“磺胺类药物”等检测专用柱。

为满足广大用户的需要,我厂还开展来料加工等业务,并能应客户要求定制各种规格、类型的固相柱及滤膜、萃取仪等,同时提供各种萃取填料(键合相、高聚物、硅胶、氧化铝、树脂、活性炭等)。

我厂一贯奉行“视客户为上帝”的宗旨,坚持优质低价的经营方针,产品价格仅为进口产品的 1/3 ~ 1/5,产品具有很高的性能价格比。



欢迎来函索取有关资料

垂询电话: (0317) 7296716

手机: 13582704855

联系人: 张洪军