

藏药甲地然果(花锚)中 酮成分的含量测定

古锐¹, 钟国跃^{2*}, 罗维早², 张艺¹, 王昌华², 刘翔², 赵纪峰², 周华蓉²

(1. 成都中医药大学民族医药学院, 四川 成都 611131;

2. 重庆市中药研究院, 重庆 410065)

[摘要] 目的: 建立 HPLC 同时测定椭圆叶花锚中 4 种 酮成分 [1-羟基-2,3,4,7-四甲氧基 酮 (1), 1-羟基-2,3,7-三甲氧基 酮 (2), 1-羟基-2,3,4,5-四甲氧基 酮 (3), 1-羟基-2,3,5-三甲氧基 酮 (4)] 的含量的方法, 并制定其含量限量标准。方法: 采用 Welchrom C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相 乙腈-水 (43:57), 检测波长 265 nm; 流速 1.2 mL · min⁻¹, 柱温 40 °C。结果: 酮类化合物 1~4 分别在 0.414~16.580, 1.73~69.564, 5.892~117.84, 3.012~120.48 mg · L⁻¹ 线性关系良好 (r 均为 0.9999); 4 个对照品平均回收率 (n=6) 分别为 102.5%, 100.5%, 97.9%, 101.2%; 采用该方法测定了 30 份自采或制药企业使用的椭圆叶花锚样品中上述 4 种成分的含量。结论: 方法简便、准确, 重现性好, 可作为藏药椭圆叶花锚药材质量控制的方法; 综合分析确定椭圆叶花锚中 4 种成分的含量之和不得低于 1.80%。

[关键词] 椭圆叶花锚; HPLC; 酮

“蒂达”(习称“藏茵陈”)为藏医学临床治疗肝胆等疾病的要药, 据文献记载和笔者的实地调查, 其基原极为复杂, 涉及到龙胆科、虎耳草科、石竹科、唇形科、堇菜科及罂粟科等的近 10 属 60 余种^[1-2], 《中国药典》等有关标准中记载的基原及其标准检测项也不一致和不完善。为保证“蒂达”的用药准确、安全有效, 必须对其进行品种整理及质量标准的完善。龙胆科植物椭圆叶花锚 *Halenia elliptica* D. Don 系“蒂达”的主要原植物之一, 《卫生部药品标准·藏药(第 1 册)》^[3] 和《藏药标准》^[4] 中以“花锚 甲地然果”之名收载, 但均仅规定有性状和显微鉴别。本品以干燥地上部分入药, 味苦、性寒, 具清热利湿、平肝利胆之功效, 用于治疗急性黄疸性肝炎、胆囊炎、头晕头痛、牙痛等症。目前已有使用椭圆叶花锚作为“蒂达”配伍的藏成药上市。文献报道, 椭圆叶花锚含有 酮及其苷、裂环烯醚萜类、三萜类及黄酮苷等成分^[5], 其中 酮类成分具有保肝、血管舒张、抗氧化及免疫调节等广泛的生物活性^[6]。而据实地调查, 目前使用本种配伍的藏成药中多以齐墩果酸为含量控制指标成分, 显然其专属性 and 客观性不足。为建立和完善来源于椭圆叶花锚的“蒂达”药

材的质量标准, 本研究建立了采用 HPLC 法同时测定椭圆叶花锚中 4 个 酮类成分含量的方法, 并根据对 30 批样品的含量测定结果分析, 提出了椭圆叶花锚的成分含量限度建议。

1 仪器与试剂

高效液相色谱仪(戴安 P680HPLC; 检测器戴安 ASI-100ASI Chromleon 工作站; Waters 2695-2996 高效液相色谱; Empower pro 工作站); 电子天平 (Sartoris BS 224S; 岛津 AUW 220D); 纯水机 (Millipore 美国)。

椭圆叶花锚样品共 30 份, 其中 1~3 号收集自企业或市场, 其他均为自采对口药材(表 2), 经重庆市中药研究院钟国跃研究员和刘翔助理研究员鉴定, 为椭圆叶花锚 *H. elliptica* (1~29 号) 及其变种大花花锚 *H. elliptica* var. *grandiflora* (30 号)。各样品经 50 °C 烘至恒重后粉碎成均匀粉末(中粉, 过 4 号筛)。

对照品 1-羟基-2,3,4,7-四甲氧基 酮 (1)、1-羟基-2,3,7-三甲氧基 酮 (2)、1-羟基-2,3,4,5-四甲氧基 酮 (3)、1-羟基-2,3,5-三甲氧基 酮 (4) 均为自制(经核磁共振波谱鉴定), 经 HPLC 面积归一化法标定各对照品纯度分别为 97.7%, 98.5%, 98.5%, 98.0%; 乙腈为色谱纯, 水为超纯水, 其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Welchrom C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相 乙腈-水 (43:57) 等度洗脱,

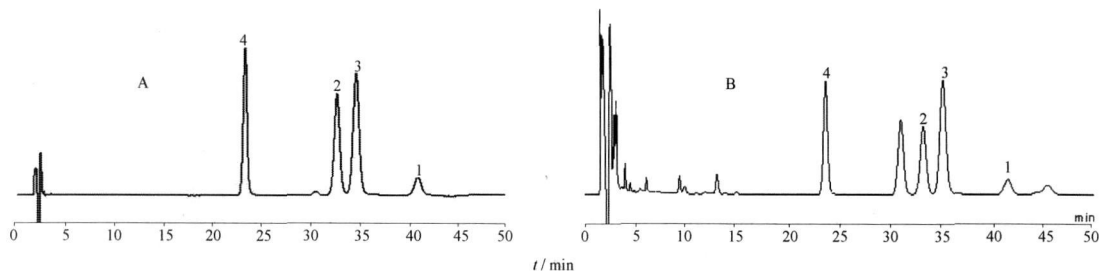
[稿件编号] 20100118012

[基金项目] 国家科技支撑计划项目子课题 (2006DA106A11-12)

[通信作者] * 钟国跃, Tel (023) 89029001; E-mail zg001@yahoocn

检测波长 265 nm, 流速 1.2 mL·min⁻¹, 柱温 40℃; 进样量 10 μL。在上述色谱条件下, 1~4 色谱峰与

相邻色谱峰分离度大于 1.5, 理论塔板数均大于 5 000, 见图 1。



1. 1-羟基-2,3,4,7-四甲氧基 酮; 2. 1-羟基-2,3,7-三甲氧基 酮; 3. 1-羟基-2,3,4,5-四甲氧基 酮; 4. 1-羟基-2,3,5-三甲氧基 酮。

图 1 对照品溶液 (A) 与供试品 (B) HPLC 图

2.2 对照品溶液的制备 精密称取 1~4 对照品适量, 加甲醇分别制成每 1 mL 含 1~4 对照品各 16.58、69.564、117.84、120.48 μg 的标准溶液。

2.3 供试品溶液的制备 取椭圆叶花锚粉末约 0.25 g 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 90% 甲醇溶液各 50 mL, 再精密加入盐酸 0.15 mL, 称重, 80℃ 水浴回流 30 min, 放冷, 再称重, 加甲醇补足失重, 摇匀, 滤过, 即得。

2.4 线性关系考察 分别精密吸取对照品母液 5.25、1.25、0.5、0.25 mL 至 10 mL 量瓶中, 甲醇定容至刻度。精密吸取上述对照品母液和上述对照品溶液 20 μL, 按上述色谱条件测定。以对照品质量浓度 X (μg) 为横坐标, 峰面积 Y 为纵坐标, 绘制标准曲线, 计算得回归方程。结果表明 1~4 分别在 0.414~16.580、1.73~69.564、5.892~117.84、3.012~120.48 mg·L⁻¹ 呈良好的线性关系。回归方程分别为 $Y = 1.1572X + 0.0012$, $r = 0.9999(1)$; $Y = 1.335X - 0.5529$, $r = 0.9999(2)$; $Y = 1.0088X - 0.27$, $r = 0.9999(3)$; $Y = 0.8107X - 0.5347$, $r = 0.9999(4)$ 。

2.5 精密度试验 精密吸取 2.2 项下混合对照品溶液, 按 2.1 项下色谱条件重复进样 6 次, 每次 5 μL, 记录 4 种对照品的峰面积, 1~4 RSD 分别为 1.4%, 1.3%, 1.2%, 1.2%, 表明精密度良好。

2.6 重复性试验 取同一批号样品 6 份, 按 2.3 项下方法制备供试品溶液, 同法测定, 计算各成分含量, 结果 1~4 的 RSD 分别为 1.5%, 1.3%, 1.7%, 1.0%。

2.7 稳定性试验 取同一供试品溶液, 分别于 0、1、2、4、8 h 精密进样 10 μL, 记录峰面积, 1~4 RSD 分别为 1.7%, 1.5%, 1.4%, 0.4%。

2.8 回收率试验 取已知含量的椭圆叶花锚药材 (表 2 中序号 5) 粉末, 精密称定 0.125 g 平行 6 份, 分别精密加入混合对照品溶液适量, 按 2.3 项下方法制备供试品溶液, 同法测定, 计算各对照品的加样回收率, 见表 1。

表 1 4 种对照品的加样回收率 ($n = 6$)

测定成分	样品中量	加入量	测得量	平均值	RSD
	/mg	/mg	/mg	%	%
1	0.152	0.149	0.306	102.5	0.7
	0.152	0.149	0.305		
	0.153	0.149	0.304		
	0.153	0.149	0.305		
	0.153	0.149	0.307		
	0.153	0.149	0.305		
2	0.572	0.626	1.198	100.5	0.8
	0.572	0.626	1.198		
	0.575	0.626	1.207		
	0.574	0.626	1.199		
	0.573	0.626	1.211		
	0.573	0.626	1.202		
3	0.874	1.061	1.920	97.9	1.2
	0.874	1.061	1.902		
	0.879	1.061	1.915		
	0.878	1.061	1.903		
	0.876	1.061	1.912		
	0.876	1.061	1.936		
4	1.032	1.084	2.114	101.2	1.9
	1.031	1.084	2.118		
	1.038	1.084	2.110		
	1.036	1.084	2.144		
	1.034	1.084	2.159		
	1.034	1.084	2.145		

2.9 样品测定 取不同产地的样品及市场品, 按 2.3 项下方法制备供试品溶液, 见表 2。

表 2 不同产地椭圆叶花锚中 4 种成分质量分数

mg·g⁻¹

No. ¹⁾	产地或来源	部位	1	2	3	4	4 种成分总量 ²⁾
1	青海西宁三普药业	全草	2 853	2 130	6 782	7 445	19 21
2	甘孜州藏医院	全草	1 556	4 237	5 027	3 714	14 53
3	四川省康定(市场品)	全草	0 5050	4 444	4 033	8 856	17 84
4	青海省玉树州仲达乡	全草	2 718	1 815	4 270	4 738	13 54
5	四川省德格县江临乡	全草	1 215	4 565	6 978	8 238	21 00
6	四川省理县夹壁乡夹壁沟	全草	1 251	6 985	7 494	7 728	23 46
7	四川省龙日坝(约 18 公里)	全草	1 613	5 988	8 349	8 002	23 95
8	四川省若尔盖县瓦切	全草	1 648	5 710	9 410	8 694	25 46
9	青海省祁连县峨堡	全草	7 842	5 991	15 72	16 63	46 19
10	青海省门源东川大道	全草	2 836	6 421	11 44	11 83	32 53
11	四川省阿坝州马尔康县梦笔山	全草	1 869	6 597	9 411	7 813	25 69
12	四川省阿坝州马尔康县卓克基	全草	2 279	8 592	13 61	10 14	34 62
13	四川省道孚麻孜乡溪沟边	全草	0 6240	4 785	4 937	6 796	17 14
14	四川省九龙县城关乡桥棚子村	全草	2 697	4 262	4 518	4 570	16 05
		花, 叶	1 228	13 59	16 36	20 69	51 87
15	四川省九龙县日鲁库乡大草坪	全草	3 256	6 017	8 243	13 03	30 54
16	四川省小金县日隆乡双桥沟	全草	1 056	9 197	15 46	15 67	41 38
17	四川省小金县两河口乡小太子坡	全草	3 503	6 480	12 00	10 86	32 84
18	四川省小金县两河口乡香路堂沟	全草	1 158	8 299	9 281	10 80	29 53
19	四川省茂县三龙乡勒依村退耕地	全草	0 7930	5 039	6 496	6 830	19 16
		花, 叶	1 637	13 82	18 03	19 81	53 30
		茎, 根	0 4660	2 469	3 511	3 462	9 908
20	四川省巴塘县德达乡德达村	全草	0 9600	4 868	7 623	8 385	21 84
21	四川省理塘县曲登乡	全草	1 104	6 778	11 22	12 71	31 81
		花, 叶	1 350	10 88	20 09	23 01	55 34
		茎, 根	1 022	3 711	4 928	5 341	15 00
22	西藏自治区左贡县 9 公里处	全草	4 164	2 795	8 376	11 71	27 05
23	西藏自治区八宿县米堆冰川河滩	全草	1 612	6 753	6 541	12 63	27 54
		花, 叶	2 160	11 31	12 85	24 79	51 11
		茎, 根	1 395	3 735	2 643	4 784	12 56
24	西藏自治区八宿县然乌湖附近	全草	2 593	6 025	10 60	16 49	35 71
		花, 叶	3 176	8 928	17 02	26 67	55 79
		茎, 根	1 731	2 583	3 519	5 262	13 09
25	西藏自治区波密县古乡	全草	2 816	5 399	6 867	12 37	27 45
		花, 叶	4 104	10 49	13 25	24 08	51 92
		茎, 根	2 035	2 325	2 961	5 054	12 38
26	西藏自治区工布江达县河边	全草	1 776	6 046	10 54	13 29	31 65
27	四川省甘孜州石渠县	全草	0 8700	4 130	8 951	12 45	26 40
28	四川省甘孜州炉霍县城关	全草	1 051	5 422	8 395	9 803	24 67
29	四川省甘孜州康定县	全草	2 714	4 764	6 641	8 532	22 65
30	重庆开县满月乡(大花花锚)	全草	1 160	2 136	3 435	3 695	10 43

注: ¹⁾ 样品序号按收集时间顺序排列; ²⁾ 粗体数据表示低于本研究确定的成分含量限量。

3 讨论

3.1 测定方法的选择 据文献[5]报道和笔者对各样品的成分分析结果, 椭圆叶花锚中除苷元外, 同时还含有大量的对应 酮苷。由于苷和苷元之间存

在转化关系, 受产地生态环境、药材采收季节及其储存条件等多方面因素的影响, 药材中的苷和苷元的存在状况往往是多变的, 而苷元的存在状况相对于苷来说更为稳定。本研究中对自采的 26 批椭圆叶



花锚对口药材中水解前后 4 种 酮苷元成分含量测定结果表明, 水解前 4 种成分总质量分数在 $5.209 \sim 35.98 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 平均值为 $16.67 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 置信区间为 $16.67 \pm 7.069 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$; 水解后 4 种成分总质量分数在 $13.54 \sim 46.19 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 平均为 $27.30 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 置信区间为 $27.30 \pm 7.380 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。4 种成分总质量分数提高约 10% ~ 259%, 平均提高 76%, 水解后 4 种成分总含量变化幅度明显减小。另一方面, 文献报道花锚中的 酮苷在消化、吸收和代谢过程中很快被转化为 酮苷元, 花锚中 酮苷类成分的活性也主要是通过转化为 酮苷元来实现的^[6]。综上分析, 在测定方法上以水解后测定 酮苷元的含量较未水解直接测定更为客观合理。

在供试品溶液制备的溶剂选择中, 分别比较了甲醇 (100%, 90%, 80%, 70%)、酸 (盐酸、冰醋酸、甲酸)、盐酸用量 (0.05, 0.1, 0.15, 0.2 mL)、提取溶媒用量 (90% 甲醇各 25, 50, 75 mL)、水解温度、水解时间, 结果表明以 50 mL 90% 甲醇溶液, 精密加入盐酸 0.15 mL, 80 °C 水浴回流 30 min, 提取及水解最完全和彻底。分别比较了 Kromasil Hypersil Diamonsil (迪马) 和 Welchm-C₁₈ 色谱柱的分离效果, 比较了以甲醇-水、乙腈-水、乙腈-磷酸缓冲盐溶液等流动相的分离效果, 结果表明仅在使用 Welchm-C₁₈ 色谱柱, 以乙腈-水 (43: 57) 为流动相分离效果最好, 在该色谱条件下极性相近的 II, III 能达到完全分离。实验结果表明, 该方法用于测定椭圆叶花锚中 4 种 酮类成分含量, 简便、分离度和重复性好。

3.2 测定指标成分的选择 酮类为椭圆叶花锚保肝药效的活性部位^[7-8], 已报道的有 17 种苷元和 6 种苷^[5], 其中 1-羟基-2, 3, 4, 7-四甲氧基 酮 (1) 具有促进胆固醇排泄和利胆作用^[9], 1-羟基-2, 3, 4, 5-四甲氧基 酮 (3) 具有利胆和溶血作用^[9]、1-羟基-2, 3, 5-三甲氧基 酮 (4) 具有血管舒张作用^[10]。由图 1-B 可知, 化合物 2, 3 前还有 1 个 酮成分, 通过对 1-O-[β-D-木糖-(1-6)-β-D-葡萄糖]-2, 3, 5, 7-四甲氧基 酮 (花锚苷) 进行水解对比, 表明该成分可能为 1-羟基-2, 3, 5, 7-四甲氧基 酮。经水解前后的指纹图谱对比分析表明, 图 1-B 中 5 个成分为椭圆叶花锚中主要的 酮苷元, 它们在不同样品中的峰面积占全谱总峰面积的 16% ~ 66%, 选择上述 1~4 酮苷元成分作为质量评价的含量测定指标成分具有较好的客观性 (因 1-羟基-2, 3, 5, 7-四甲氧基

基 酮未获得对照品, 故未测定)。

3.3 成分含量限量的确定 从表 2 可知, 不同产地样品间, 所测的 4 种成分的各自含量变化幅度较大, 故成分含量限度以规定 4 种成分总含量为宜。结合置信区间综合分析, 确定椭圆叶花锚成分含量限度为: 按干燥品计算, 以 1-羟基-2, 3, 4, 7-四甲氧基 酮 (C₁₇H₁₇O₇), 1-羟基-2, 3, 7-三甲氧基 酮 (C₁₆H₁₅O₆); 1-羟基-2, 3, 4, 5-四甲氧基 酮 (C₁₇H₁₇O₇); 1-羟基-2, 3, 5-三甲氧基 酮 (C₁₆H₁₅O₆) 的总量计, 不少于 1.80%。30 号样品中 2, 3 (企业样品), 4, 13 和 14 号椭圆叶花锚样品不符合限量规定, 占 17.2%, 表明该限量规定较为合理 (企业样品质量较差的原因分析见后)。

3.4 成分含量与地域及种类的关系 椭圆叶花锚广泛分布于内蒙西部至西藏东南部, 从海拔 700 ~ 4 000 m 以上地带均有生长^[11], 本研究中自采的 26 批样品采自于海拔较高的祁连山至西藏东南部, 相对于其广阔的分布区域, 样品中 4 种 酮成分的总含量虽然有一定差异, 但多数在 $20 \sim 30 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 并未显示出明显的随分布区域的经纬度变化的趋势。对于海拔较低和偏北的华中和内蒙省区分布的椭圆叶花锚的成分含量状况还有待进一步研究。椭圆叶花锚的变种大花锚分布于云南、贵州、重庆、青海、陕西^[12], 所测成分含量明显低于其原变种 (30 号样品), 可能与其种类和分布海拔有关, 该变种也未见有药用记载, 不宜药用。文献记载花锚属植物我国仅分布有椭圆叶花锚和花锚 *H. comiculata* (Linn.) Comaz (分布于东北、华北及河南) 2 种 1 变种^[12], 前种花冠蓝色或紫色, 后者花冠黄色是主要区别特征^[12], 但笔者在资源调查中发现, 在青海南部和四川西部地带, 即使在同一群落中, 也存在着蓝、紫色花冠和白色花冠的椭圆叶花锚混生的情况, 但两者的成分种类并无差异 (11 和 17 号样品为白花样品); 在九龙采集的 14 号样品花较大, 黄色, 酮成分组成相同但含量较低。上述品种在分类上的地位还有待探讨。

3.5 不同部位成分积累情况 据表 2 分析可知, 4 种 酮成分在植株的花和叶中积累多, 在茎和根中分布较少, 水解后花和叶中的含量约为茎和根的 4 倍, 提示在椭圆叶花锚药材采集后的干燥中应注意避免花、叶脱落而导致药材质量下降; 从制药企业收集的 1~3 号样品以茎干为主, 其 4 种成分的总含量

也低于平均水平,可能即是由于茎和花部位在干燥、运输等过程中损失较多的主要原因所致。另一方面,目前花锚药材全部来自于野生采集,在今后进行椭圆叶花锚人工栽培中,应培育多叶的品种。

[参考文献]

[1] 钟国跃,古锐,王昌华,等.藏药“蒂达”(藏茵陈)的名称与品种考证[J].中国中药杂志,2009,34(23):3139.
[2] 钟国跃,王昌华,刘翔,等.常用藏药“蒂达(藏茵陈)”的资源与使用现状调查[J].世界科学技术——中医药现代化,2010,12(1):112
[3] 中国卫生部药典委员会.药品标准·藏药.第1册[M].广州:广东科技出版社,1995:45.
[4] 西藏、青海、四川、甘肃、云南、新疆卫生局.藏药标准,第1,2分册合编本[M].西宁:青海人民出版社,1978:53.
[5] 古锐,钟国跃,张艺,等.藏药椭圆叶花锚研究进展[J].中药新药与临床药理,2009,20(4):398.
[6] 高洁,王素娟,徐瑞明,等.以体内吸收分布特点指导花锚成

分的研究[J].药学报,2004,39(3):198.
[7] 刘海兰,梁鸢,张惠鸣.花锚对小鼠肝糖原含量的影响[J].青海医学院学报,2007,28(4):271.
[8] 金兰,葛月宾,罗桂花,等.椭圆叶花锚醇提物对化学性肝损伤小鼠的保护作用[J].中药新药与临床药理,2007,18(5):345.
[9] 王良信.花锚煎剂及其咕吨酮化合物的利胆和保肝作用[J].国外医药·植物药分册,2001,16(4):66-67.
[10] Yan Wang, Jiangong Shi, Muzou Wang et al. Mechanisms of the vasorelaxant effect of 1, 5-dihydroxy-2, 3, 4-trimethoxy-xanthone, an active metabolite of 1-hydroxy-2, 3, 5-trimethoxy-xanthone isolated from a Tibetan herb, *Halenia elliptica*, on rat coronary artery [J]. Life Sci 2008, 82(1/2): 91.
[11] 傅立国.中国高等植物.第9卷[M].青岛:青岛出版社,1999:59.
[12] 中国科学院植物研究所.中国植物志.第62卷[M].北京:科学出版社,1988:293.

Determination of xanthenes in Tibetan herb *Jiadiranguo* (*Herba Haleniae*)

GU Rui¹, ZHONG Guoyue^{2*}, LUO Weizao², ZHANG Yi¹, WANG Changhua²,
LIU Xiang², ZHAO Jifeng², ZHOU Huacong²

(1. Ethnomedicine School of Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611131, China;
2. Chongqing Academy of Chinese Materia Medica, Chongqing 400065, China)

[Abstract] A HPLC method was developed for simultaneous determination of 1-hydroxy-2, 3, 4, 7-trimethoxyxanthone (1), 1-hydroxy-2, 3, 7-trimethoxyxanthone (2), 1-hydroxy-2, 3, 4, 5-trimethoxyxanthone (3), and 1-hydroxy-2, 3, 5-trimethoxyxanthone (4) in *Halenia elliptica*. The analytical column was Welchrom C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm). The mobile phase was acetonitrile-water (43:57). The detection wavelength was 265 nm. The flow rate was 1 mL·min⁻¹ and the column temperature was set at 40 °C. There was good linearity between the peak areas and concentration at the ranges of 0.414-16.6, 1.73-69.6, 5.89-117, 3.01-120.5 mg·L⁻¹ for 1, 2, 3 and 4 respectively. The average recoveries (n = 6) of 1, 2, 3 and 4 were 102.5%, 100.5%, 97.9% and 101.2%. Those four xanthenes in thirty samples of *H. elliptica* were determined by this method. The method is simple, accurate, repeatable, which could be used for the quality evaluation of *H. elliptica*. The total content of those four xanthenes in *H. elliptica* should not less than 1.80% by comprehensive analysis.

[Keywords] *Halenia elliptica*, HPLC, xanthone

doi 10.4268/cjmm20102116

[责任编辑 王亚君]