

RP-HPLC 法测定黄花倒水莲中两种甙酮的含量

李 丽, 朱丹妮*, 严永清

(中国药科大学中药复方研究室, 南京 210038)

摘 要 目的: 建立反相高效液相色谱法测定黄花倒水莲中两种甙酮的含量。方法: 采用 Dikma Diamonsil C₁₈ 柱, 甲醇-水(65:35)为流动相, 流速 0.9 ml/min, 996 二极管阵列检测器(DAD), 检测波长为 245 nm, 对黄花倒水莲中两种甙酮含量进行测定。结果: 甙酮 1, 2, 3-三甲氧基甙酮和 1-甲氧基-2, 3-亚甲二氧基甙酮的重复性试验 RSD 分别为 0.96% 和 2.6%; 平均回收率分别为 99.40% 和 100.8%。结论: 该方法操作简便, 易行, 线性关系良好。

关键词 黄花倒水莲; 甙酮; 反相高效液相色谱; 二极管阵列检测器

中图分类号: TQ460.7+2 文献标识码: A 文章编号: 1000-5048(2002)01-0042-03

黄花倒水莲为远志科远志属植物黄花倒水莲(*Polygala fallax* Hemsl.) 的干燥根, 该药在民间尤其是少数民族地区应用很广, 著名老中医祝湛予称之为“补药之长”, 据古文献记载具有补益气血, 健脾利湿, 活血调经等功效^[1-3]。黄花倒水莲具有广泛的药理作用, 对乙肝病毒 E 抗原有体外抑制作用^[4], 可以提高小鼠血液红细胞 SOD 的活力, 在一定程度上有抗疲劳作用^[5], 对小鼠的免疫功能有增强作用^[6]。黄花倒水莲中含有的多种甙酮成分具有抑制醛糖还原酶活性的作用^[7]。

近年来本研究室对黄花倒水莲进行了资源调查、化学成分、药理活性、质量标准等方面的系统研究。本文报道黄花倒水莲中的两种甙酮的含量测定方法, 为黄花倒水莲的质量标准提供实验依据。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

黄花倒水莲: 产自广西的本实验室自采, 产自海南的由海南三叶公司提供, 经江苏省中国科学院植物所徐曾莱博士鉴定。对照品: 甙酮(本实验室自提, 经¹H 谱, ¹³C 谱, DEPT 谱, HMQC 谱和 HMBC 谱鉴定分别为: 1, 2, 3-三甲氧基甙酮, 代号为 F₁; 1-甲氧基-2, 3-亚甲二氧基甙酮, 代号为 F₂)。甲醇: 色谱纯, 淮阴汉邦公司; 水: 纯净水; 其它

试剂均为分析纯。

高效液相色谱仪: 美国 Waters-600E 型(Waters-600E 泵, 25 μl 微量进样器, 996 二级阵列检测器, Millennium 32 色谱管理系统); 十万分之一天平: 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司 AE240。

1.2 样品制备

1.2.1 样品提取 精称 60 下干燥恒重的黄花倒水莲(产自海南)药材粉末约 3 g, 加入 60 ml 石油醚-乙酸乙酯(5:1, v/v) 的混合溶剂, 热回流 5 h, 过滤, 将滤液用旋转蒸发仪挥干, 残留物加甲醇定容至 2 ml, 通过 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 作为供试, 按下述色谱条件进行 HPLC 测定。

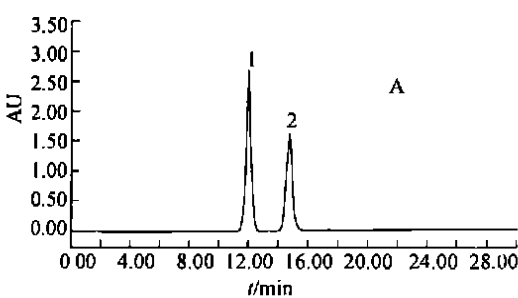
1.2.2 对照品溶液制备 精称甙酮 F₁ 和 F₂ 适量, 用甲醇溶解, 制成 6 mg/ml 的对照品溶液。

1.3 色谱条件选择和系统适应性试验

1.3.1 色谱条件 色谱柱 Dikma Diamonsil C₁₈ (150 × 4.6 mm, 5 μm) 柱, 柱温 25℃, 流动相 CH₃OH-H₂O (65:35 (v/v)), 流速: 0.9 ml/min; 进样量: 20 μl。

1.3.2 系统适用性 理论塔板数(N)按甙酮 F₁ 计算为 4000, 与相邻峰(即 F₂ 峰)分离度为 2.8, 拖尾因子为 1.11; 按甙酮 F₂ 计算 N 为 4000, 拖尾因子 1.16。

1.3.3 DAD 鉴定呋喃酮 F₁ 和 F₂ 色谱峰纯度 取呋喃酮 F₁ 和 F₂ 对照品溶液适量, 进样, 色谱分离图与 DAD 鉴定色谱图如图 1, 通过 Millennium 32



workstation 处理, 得到呋喃酮 F₁ 的纯度角 0.072, 纯度基线 0.706; 呋喃酮 F₂ 的纯度角 0.261, 纯度基线 0.769, 两个呋喃酮对照品均为纯净的。

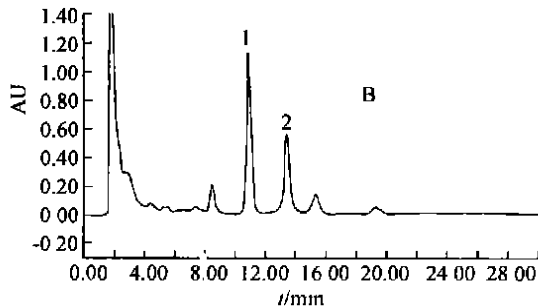


Fig 1. Chromatograms of *Polygala fallax* Hemsl.

A. standards; B. sample
peak 1: 1, 2, 3-trimethoxyxanthone; peak2: 1-methoxy-2, 3-methylenedioxyxanthone

1.4 黄花倒水莲中两种呋喃酮含量测定

1.4.1 标准曲线 取以上对照品溶液, 分别进样 4, 8, 12, 16, 20 和 24 μ L, 制作两种呋喃酮的标准曲线, 按上述色谱条件进行分析测定, 由 Millennium 32 色谱工作站数据处理系统给出峰面积, 以对照品溶液进样量(X)为横坐标, 峰面积值(Y)为纵坐标进行回归, 线性关系良好, 回归方程为 peak 1 (F_2): $Y_1 = 1.834771e^8 X_1 - 2.178922e^5$, $r = 0.9998$, 线性范围: 0.0244 ~ 0.1464 mg/ml; Peak 2 (F_2): $Y_2 = 1.635475e^8 X_2 - 1.906566e^5$, $r = 0.9998$, 线性范围: 0.0218 ~ 0.1308 mg/ml。

1.4.2 稳定性试验 将同一供试品溶液在 1 天内分别在 0, 2, 4, 6, 8 h, 进样 5 次, 测得呋喃酮 F₁ 的峰面积 RSD 为 0.90%, 呋喃酮 F₂ 的峰面积 RSD 为 1.6%, 结果表明供试品溶液在 8 h 内稳定。

1.4.3 进样精密度试验 取一定浓度的对照品溶液 20 μ L, 重复进样 5 次, 呋喃酮 F₁ 的峰面积 RSD 为 0.30%, 呋喃酮 F₂ 的峰面积 RSD 为 1.1%。

1.4.4 重复性试验 取 6 份同一批次供试品溶液, 分别测定呋喃酮 F₁ 和呋喃酮 F₂ 的含量, 结果表明重复性较好, 呋喃酮 F₁ 和呋喃酮 F₂ 的 RSD 分别为 0.96% 和 2.6%。

1.4.5 加样回收率试验 取同一批海南产样品 5 份, 每份约 1.5 g, 精密称定, 分别精密加入呋喃酮 F₁ 和 F₂ 对照品按“1.2.1”项下步骤操作, 定容 2 ml, 进样 20 μ L 测定, 计算回收率, 求得呋喃酮 F₁ 和 F₂ 的平均回收率为 99.40% 和 100.8%; RSD 值分别为

2.8% 和 1.8% ($n = 5$)。

1.4.6 样品测定结果 不同采收地及不同部位的黄花倒水莲按“1.2.1”项下步骤操作, 制备供试品, 进行 HPLC 测定, 结果见表 2, 对照品及样品色谱图见图 1。

2 讨论

2.1 样品提取方法考察

实验分别对超声提取, 索氏提取, 热回流进行考察, 实验表明, 热回流的提取效率最好, 进一步对热回流的提取时间进行考察, 发现热回流 5 h 两种呋喃酮提取效率最高。

2.2 提取溶剂考察

热回流时发现单一溶剂如石油醚其提取率较低, 且提取不完全, 乙酸乙酯及甲醇提取时提出的杂质过多, 杂质干扰样品分离, 不能达到基线分离, 而且随时间变化大。经多次实验, 同时根据两种呋喃酮的溶解性, 最后确定了石油醚和乙酸乙酯混合 5:1 为提取溶剂。

2.3 两种呋喃酮的含量测定结果

不同采收地及不同部位黄花倒水莲中两种呋喃酮的含量测定结果表明, 主要是根中含有此两种呋喃酮, 茎中不含有, 这与黄花倒水莲药用部位为其根是吻合的, 同时发现采收地不同, 该植物中两种呋喃酮的含量不同, 这说明不同来源的药材有地区性差异, 也表明中药的复杂性, 这在研究中应引起

Tab 1. Recovery of Xanthone F₁ and Xanthone F₂

No.	Xanthone F ₁					Xanthone F ₂				
	Added	Found	Recovery	Average	RSD	Added	Found	Recovery	Average	RSD
	μg	μg	(%)	(%)	(%)	μg	μg	(%)	(%)	(%)
1	112.9	226.5	100.4			75.3	152.3	102.5		
2	115.4	231.7	101.8			76.1	152.4	100.8		
3	112.1	220.6	96.6	99.40	2.8	75.2	151.2	101.9	100.8	1.8
4	112.3	220.7	96.3			75.1	150.7	101.2		
5	113.6	228.5	101.9			76.9	150.0	97.8		

Tab 2. Result of sample test

Collected area	Xanthone F ₁	Xanthone F ₂
	(μg/g)	(μg/g)
Nanning, Guangxi (root)	—	5.33
(stem)	—	—
Nalin, Guangxi (root)	2.74	—
(stem)	—	—
Wantian, Guangxi (root)	—	2.22
(stem)	—	—
Bobai, Guangxi (root)	8.86	6.75
(stem)	—	—
Pubei, Guangxi (root)	—	29.4
(stem)	—	—
Longsheng, Guangxi (root)	28.6	12.0
(stem)	—	—
Jingxi, Guangxi (root)	2.32	3.36
(stem)	—	—
Hainan provided by Sanye Co. (root)	72.7	50.1
(stem)	—	—

重视。实验同时对同属药材远志进行两种黄酮的测定,远志中不含有这两种黄酮,说明草本远志和木本远志的化学成分各有特点,远志属药用植物草本植物和木本植物化学成分、药理活性和植物亲缘

RP-HPLC Determination of Two Different Xanthone in Polygala Fallax Hemsl.

LI Li, ZHU Dan-Ni*, YAN Yong-Qin

Department of Chinese Prescription, China Pharmaceutical University, Nanjing 210038

ABSTRACT **AIM** The purpose is to develop a method for determining the contents of two different xanthone in *Polygala fallax* Hemsl. **METHOD** The method used Dikma Diamonsil C₁₈ column with MeOH-H₂O(65 35) as mobile phase, 0.9ml/min as flow-rate and 996-photodiode array detector at 245 nm. **RESULTS** The relative standard deviation of the repeatability were 0.96% and 2.6% respectively and the average recovery were 99.40% and 100.8% respectively. **CONCLUSION** The method was simple and had good liner relationship.

KEY WORDS *Polygala fallax* Hemsl.; Xanthone; RP-HPLC; DAD

学相关性有待进一步研究。

参 考 文 献

[1] 全国中草药汇编编写组编. 全国中草药汇编,上册,北京:人民卫生出版社,1975. 765.

[2] 江苏新医学院编. 中药大词典,下册,上海:上海科学技术出版社,1986. 2079.

[3] 秦华珍(Qin HZ),夏新华(Xia XH),李钟文(Li ZW). 黄花倒水莲多糖的抗应激作用[J]. 广西中医药(*Guangxi J of TCM*), 1996, **19**(3): 52-54.

[4] 李梨平(Li LP),王伟华(Wang WH). 黄花倒水莲对乙肝病毒E 抗原体外抑制作用的初步观察[J]. 湖南中医药导报(*Hunan Guiging Journal of TCM*), 1998, **4**(10): 32-33 .

[5] 李 萍(Li P),钟 鸣(Zhong M),邱翠娥(Qiu CE). 黄花参抗衰老作用的初步探讨[J]. 云南中医中药杂志(*Yunnan J Trad Chin Med and Mat*), 1995, **16**(4): 13-15.

[6] 秦华珍(Qin HZ),夏新华(Xia XH),李钟文(Li ZW). 黄花倒水莲对正常小鼠免疫功能的影响[J]. 中药材(*J Chin Med Mat*), 1998, **21**(9): 467-468.

[7] 毛士龙(Mao SL),廖时萱(Liao SX),吴久鸿(Wu JH)等. 黄花远志根化学成分的分离和结构鉴定[J]. 药学报(*Acta Pharm Sin*), 1996, **31**(2): 118-121.