

文章编号: 1006-2858(2010)04-0306-05

HPLC法测定苍耳子中苍耳子噻嗪双酮苷的含量

邱玉玲, 代英辉, 王东, 崔征

(沈阳药科大学 中药学院, 辽宁 沈阳 110016)

摘要: 目的 建立苍耳子中苍耳子噻嗪双酮苷的含量测定方法。方法 采用乙醇提取、正丁醇萃取与硅胶柱色谱分离等方法制备苍耳子噻嗪双酮苷;采用 HPLC法进行含量测定,色谱条件为: DiamonsilTM ODS色谱柱 (250 mm ×4.6 mm, 5 μm),以质量分数为 0.04%的磷酸溶液-乙腈 (体积比为 90:10)为流动相,检测波长为 254 nm,流速为 1 mL·min⁻¹。结果 苍耳子噻嗪双酮苷质量浓度在 1~100 mg·L⁻¹内线性关系良好 ($r=0.9999$, $n=6$),平均回收率为 100.2%,RSD为 2.3% ($n=9$)。结论 HPLC法适合测定苍耳子中苍耳子噻嗪双酮苷的含量。

关键词: 苍耳子; 苍耳子噻嗪双酮苷; 高效液相色谱法; 含量测定

中图分类号: R 28 **文献标志码:** A

苍耳子 (Fructus Xanthii)为菊科植物苍耳 (*Xanthium sibiricum* Patr ex Widd)干燥成熟带总苞的果实,具有散风除湿、通鼻窍的功效,用于风寒头痛,鼻渊流涕,风疹瘙痒,湿痹拘挛等^[1]。现代药理研究^[2]表明苍耳子具有抑菌消炎、抗氧化、抗炎镇痛等作用,临床上多用其复方制剂治疗各种急慢性鼻炎^[3]。研究发现,苍耳子中含噻嗪酮类含硫化合物^[4-6],这些噻嗪酮类化合物为苍耳属植物的特征性成份。苍耳子所含噻嗪酮类成分中,苍耳子噻嗪双酮苷 (xanthiside,结构式见图 1)结构新颖,含量较大,可作为指标成分对苍耳子进行含量测定。此外,现行的《中华人民共和国药典》(2005年版)中苍耳子药材项下尚无含量测定方法。为此,作者从苍耳子中提取、纯化苍耳子噻嗪双酮苷,建立苍耳子的高效液相色谱含量测定方法,以供《中华人民共和国药典》(2010年版)修订苍耳子标准时参考,同时也为其临床应用、质量控制和进一步开发利用提供科学依据。

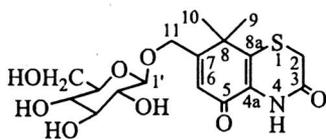


Fig 1 Structure of xanthiside

1 仪器与材料

AV-600型核磁共振光谱仪 (TMS内标,瑞士 Bruker公司), LC-2010型高效液相色谱仪 (包括四元高压梯度泵、自动进样器、柱温箱、紫外检测器,日本 Shimadzu公司), DiamonsilTM ODS色谱柱 (250 mm ×4.6 mm, 5 μm,中国迪马科技),半制备 HPLC色谱柱用 Phenomenex C₁₈ (250 mm ×10 mm, 5 μm,美国 Phenomenex公司),微量分析天平 TG332A型 (0.01 mg,上海天平仪器公司), SKf200H型超声清洗器 (上海科导超声仪器有限公司),三用紫外分析仪 (上海顾孙电光仪器厂), RE-52型旋转蒸发仪 (上海亚荣生化仪器厂)。

硅胶 GF254,柱色谱用硅胶 (青岛海洋化工厂), Sephadex LH-20 (美国 Sigma公司),所用试剂均为色谱纯 (山东禹王化学试剂厂),磷酸 (纯度质量分数为 85%,山东禹王化学试剂厂),色谱分析用水均为娃哈哈纯净水 (杭州娃哈哈集团有限公司)。

苍耳子药材的来源与产地见表 1,各批次药材均由沈阳药科大学中药学院崔征教授鉴定为苍耳子 (*X. sibiricum*)。

收稿日期: 2009-05-11

基金项目: 国家药典委员会项目 (YD011)

作者简介: 邱玉玲 (1983-),女 (汉族),陕西西安人,硕士研究生, E-mail potato252525@yahoo.com.cn; 崔征 (1942-),男 (朝鲜族),吉林扶余人,教授,博士,主要从事生药资源的研究;生药及其制剂的质量控制研究, Tel 024-23986466, E-mail cuizheng11@yahoo.com.cn.

Table 1 Medicinal products of Fructus Xanthii

No	Source	The place of origin	Remarks
Y080925	Medicinal Botanical Garden of Shenyang Pharmaceutical University	Shenyang	
Y080707	Provided by Zhejiang University of Traditional Chinese Medicine	Anhui	Designated by State Pharmacopoeia Commission
Y080708	Provided by Zhejiang University of Traditional Chinese Medicine	Hebei	Designated by State Pharmacopoeia Commission
Y070708	Purchased in Neimenggu	Neimenggu	
Y070714	Purchased in Jilin	Jilin	
Y070743	Purchased in Shandong	Shandong	
Y070746	Purchased in Jiangsu	Jiangsu	
Y070750	Purchased in Sichuan	Sichuan	
Y070751	Purchased in Shanxi	Shanxi	

2 方法与结果

2.1 苍耳子噁嗪双酮苷的分离与鉴定

苍耳子药材粗粉 10 kg,用 6 倍量体积分数为 70% 的乙醇加热回流提取 3 次(分别为 3、2、1 h),合并煎煮液,滤过,滤液减压浓缩得总浸膏(800 g)。将总浸膏混悬于水后依次用石油醚、乙酸乙酯、正丁醇萃取,取正丁醇萃取部分减压浓缩,得浸膏(120 g)。将浸膏进行硅胶柱色谱分离,用二氯甲烷-甲醇梯度洗脱(90:1~1:1),得到 17 个流份 Fr. 1~Fr. 17,收集体积比为 15:1 洗脱部分 Fr. 9,将 Fr. 9 经凝胶柱色谱纯化,得到 3 个流份 Fr. 9-1~Fr. 9-3,再将 Fr. 9-3 进行半制备高效液相色谱分离纯化,流动相为甲醇-水(体积比为 30:70),最终获得苍耳子噁嗪双酮苷。

苍耳子噁嗪双酮苷的 $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) 谱中 δ 1.35 (3H, s, H-9) 和 δ 1.36 (3H, s, H-10) 为 2 个角甲基氢信号, δ 6.57 (1H, s, H-6) 提示结构中含 1 个烯键, δ 3.46 (2H, s, H-2) 为 1 个连有强吸电基团的亚甲基信号, δ 4.46 (1H, d, $J=16.8$ Hz, H-11a) 和 δ 4.65 (1H, d, $J=16.8$ Hz, H-11b) 为受到去屏蔽效应影响的连氧亚甲基上氢信号, δ 5.27 (1H, d, $J=4.8$ Hz, H-1) 为糖端基氢信号, δ 9.33 (1H, s) 为仲氨基氢信号。 $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) 谱中,苷元部分给出 11 个碳信号, δ 175.2 为羰基碳信号 (C-5), δ 162.5 为酰胺羰基碳信号 (C-3), δ 102.3 为糖端基碳信号 (C-1), 4 个不饱和碳信号: δ 165.4 (C-7)、 δ 141.0 (C-8a)、 δ 130.0 (C-4a)、 δ 121.5 (C-6), 2 个

甲基碳信号: δ 26.9 (C-9)、 δ 26.6 (C-10), 以及 1 个连氧碳信号 δ 65.6 (C-11)。该化合物与文献 [2] 中苍耳子噁嗪双酮苷的光谱数据相比较,基本一致,故确定该化合物为苍耳子噁嗪双酮苷。

2.2 苍耳子噁嗪双酮苷的含量测定

2.2.1 色谱条件

色谱柱: DiamonsilTM ODS 柱 (250 mm \times 4.6 mm, 5 μm), 流动相: 质量分数为 0.04% 的磷酸水溶液-乙腈 (体积比为 90:10), 流速: 1.0 mL \cdot min⁻¹, 检测波长: 254 nm, 柱温: 40 $^{\circ}\text{C}$, 进样量: 10 μL 。

2.2.2 对照溶液的制备

精密称取苍耳子噁嗪双酮苷 10 mg, 置于 100 mL 量瓶中用甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 配制成质量浓度为 100 mg \cdot L⁻¹ 的溶液, 过 0.45 μm 微孔滤膜, 取续滤液, 作为对照溶液。

2.2.3 供试溶液的制备

取苍耳子药材细粉 (过 450 μm 筛) 约 1.0 g, 精密称定, 置 100 mL 烧瓶中, 精密加入甲醇 10 mL, 加热回流提取 3 次, 每次 1.5 h, 滤过, 合并滤液, 置 50 mL 量瓶中, 甲醇稀释至刻度, 摇匀, 过 0.45 μm 微孔滤膜, 取续滤液, 作为供试溶液。

2.2.4 系统适用性试验

在“2.2.1”条色谱条件下, 分别取对照溶液和供试溶液进样分析。供试溶液色谱图中, 在与对照溶液色谱图相应保留时间处, 有相同色谱峰 (见图 2)。苍耳子噁嗪双酮苷的峰形良好, 分离度大于 1.5, 理论塔板数不低于 4 000。

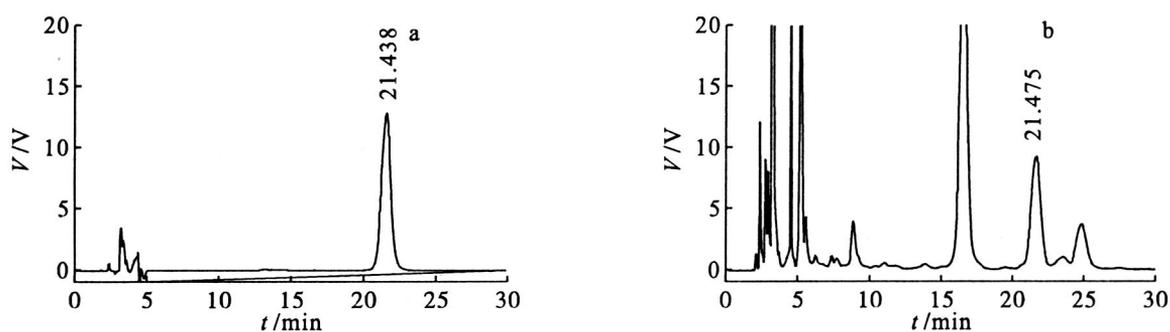


Fig 2 HPLC chromatograms of standard(a) and sample(b)

2.2.5 线性关系考察

精密吸取苍耳子噻嗪双酮苷对照溶液 0.1、0.3、1.0、3.0、5.0 和 10.0 mL, 分别置于 10 mL 量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀, 在“2.2.1”条色谱条件下依次进样 10 μ L。以苍耳子噻嗪双酮苷的质量浓度 (C) 为横坐标, 峰面积 (A) 为纵坐标, 绘制标准曲线。计算得到苍耳子噻嗪双酮苷的回归方程式为 $A = 3.000 \times 10^7 C + 4.116 \times 10^3$, ($r = 0.9999$)。结果表明, 苍耳子噻嗪双酮苷在 1 ~ 100 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 内线性关系良好。

2.2.6 精密度实验

取供试溶液, 在“2.2.1”条色谱条件下进样 10 μ L, 重复进样 6 次, 测量苍耳子噻嗪双酮苷峰面积, 计算 $\text{RSD} = 2.0\%$, 表明仪器精密度良好。

2.2.7 稳定性实验

取供试溶液, 室温放置, 在“2.2.1”条色谱条

件下, 分别于 0、1、2、8、18、24 h 进样, 测量苍耳子噻嗪双酮苷峰面积, 计算 $\text{RSD} = 1.7\%$, 表明供试液在 24 h 内稳定。

2.2.8 重复性实验

精密称取同一批药材, 按“2.2.3”条供试溶液制备方法平行制备 6 份供试溶液, 在“2.2.1”条色谱条件下分别进样, 测量苍耳子噻嗪双酮苷的峰面积, 计算 $\text{RSD} = 2.1\%$ 。

2.2.9 回收率试验

精密称取同一批已知含量的药材样品 (批号: Y080925) 9 份, 各约 0.5 g, 分 3 组, 每组分别精密加入质量浓度为 30 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的对照溶液 2、4、6 mL, 按“2.2.3”条供试溶液制备方法制备, 在“2.2.1”条色谱条件下分别进样, 测定苍耳子噻嗪双酮苷的峰面积, 计算平均回收率。结果见表 2。

Table 2 Recovery test of xanthoside in Fructus Xanthii

No	$m_{\text{original}} / \mu\text{g}$	$m_{\text{added}} / \mu\text{g}$	$m_{\text{found}} / \mu\text{g}$	Recovery/%	$\bar{x}/\%$	RSD/%
1	131.0	60.0	193.0	103.3		
2	131.0	60.0	190.0	98.3		
3	131.0	60.0	192.0	101.7		
4	131.0	120.0	248.0	97.5		
5	132.0	120.0	250.0	98.3	100.2	2.3
6	132.0	120.0	251.0	99.2		
7	132.0	180.0	318.0	103.3		
8	132.0	180.0	313.0	100.6		
9	131.0	180.0	310.0	99.4		

2.3 供试品含量测定

取 9 批苍耳子药材, 每批取样 3 次, 按照“2.2.3”条供试品溶液制备方法制备, 在“2.2.1”条色谱条件下测定, 记录色谱峰面积, 按外标一点法计算样品中苍耳子噻嗪双酮苷的含量, 结果见

表 3。

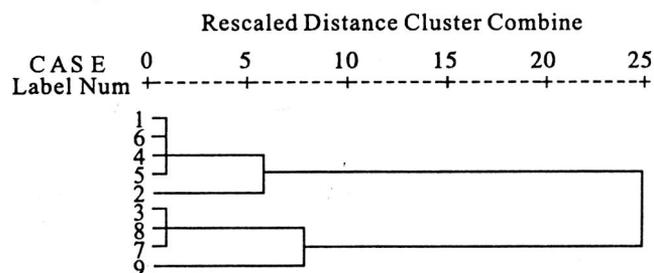
2.4 聚类分析

将上述不同产地苍耳子药材中苍耳子噻嗪双酮苷含量进行系统聚类分析, 聚类过程通过树形图表示 (见图 3)。

Table 3 Content of xanthoside in Fructus Xanthii (n = 3)

Na	w / %	\bar{x} / %	RSD / %	Na	w / %	\bar{x} / %	RSD / %
Y080925	0.031			Y070743	0.031		
	0.031	0.031	0.9		0.031	0.031	0.7
	0.031				0.031		
Y080707	0.023			Y070746	0.039		
	0.023	0.023	2.0		0.039	0.038	2.6
	0.024				0.037		
Y080708	0.040			Y070750	0.042		
	0.041	0.041	1.3		0.042	0.042	1.0
	0.041				0.043		
Y070708	0.033			Y070751	0.051		
	0.032	0.032	1.7		0.049	0.049	4.3
	0.031				0.047		
Y070714	0.029						
	0.029	0.032	3.9				
	0.043						

Dendrogram using Average Linkage(Within Group)



1—Y080925; 2—Y080707; 3—Y080708; 4—Y070708; 5—Y070714; 6—Y070743; 7—Y070746; 8—Y070750; 9—Y070751

Fig 3 Dendrogram of cases obtained with hierarchical clustering analysis

聚类分析结果显示, 9批不同产地的苍耳子药材, 根据其苍耳子噁嗪双酮苷含量不同, 共分为两类。第 1 类分别为沈阳、安徽、内蒙古、吉林、山东产苍耳子, 第 2 类分别为河北、江苏、四川、陕西产苍耳子。可见苍耳子中苍耳子噁嗪双酮苷含量存在明显的地区差异。

3 讨论

a. 提取工艺: 《中华人民共和国药典》(2005 年版一部) 苍耳子项下未提供含量测定方法。本文作者以苍耳子噁嗪双酮苷含量为考察指标, 采用超声提取法考察了水、甲醇、乙醇的提取效率,

结果表明甲醇提取效率较高; 再以甲醇为提取溶剂, 考察了超声提取与加热回流提取两种提取方法, 结果表明, 加热回流提取法提取率较高; 采用三因素三水平正交试验设计, 考察了提取时间、溶剂用量、提取次数对提取效果的影响。最终确定最佳提取工艺为: 10 倍量甲醇加热回流提取 3 次, 每次 1.5 h。

b. 色谱条件优化: 试验考察了甲醇-水、乙腈-水、甲醇-磷酸水溶液、乙腈-磷酸水溶液 4 种流动相系统。结果表明, 用乙腈-磷酸水溶液流动相系统洗脱得到的苍耳子噁嗪双酮苷峰形好, 柱效高, 可达到理想的分离度。

4 结论

本文作者首次建立了 RP-HPLC 法测定苍耳子中苍耳子噻嗪双酮苷的含量,该方法准确、可靠。9 个不同产地药材中苍耳子噻嗪双酮苷的含量稍有差异,在 0.023 ~ 0.049% 内变动。其中陕西产苍耳子药材(批号为 Y080751)中苍耳子噻嗪双酮苷含量最高。

致谢:感谢国家药典委员会对本课题的关心与大力支持。

参考文献:

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部 [M].

北京:化学工业出版社,2005:111 - 112

[2] 江苏新医学院. 中药大辞典:上册 [M]. 上海:上海科学技术出版社,1985:1071 - 1072

[3] 武汉市国营青山良种场医务室. 苍耳油治疗慢性鼻炎 [J]. 新医学,1972,(10):51.

[4] MA Ying-tsun, HUANG Mu-chi, CHANG Hsiu-fong, et al Thiiazinedione from *Xanthium strumarium* [J]. Phytochemistry, 1998, 48 (6): 1083 - 1085.

[5] AHMED A M, AHMED A A, OTMAR S, et al A new heterocyclic glucoside from the fruits of *Xanthium Pungens* [J]. Nat Prod Res, 2005, 19 (6): 585 - 589.

[6] QN Lu-ping, HAN Ting, ZHENG Han-chen, et al A new thiiazinedione from *Xanthium Strumarium* [J]. Fitoterapia, 2006, 77: 245 - 246

Determination of content of xanthoside from fruit of *Xanthium sibiricum* by HPLC

QIU Yu-ling, DAI Ying-hui, WANG Dong, CUI Zheng

(School of Traditional Chinese Materia Medica, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

Abstract: Objective To develop a method for the determination of the content of xanthoside from *Xanthium sibiricum* by HPLC. **Methods** Xanthoside was obtained by the extraction with 70% () EOH and purified by column chromatography. DiamonsilTM ODS column was used for the determination of xanthoside. The mobile phase was acetonitrile and aqua [w (H₃PO₄) = 0.04%] with the volume ratio of 10 90 and the UV detection wavelength was set at 254 nm; the flow rate was 1.0 mL · min⁻¹; the column temperature was 40 . **Results** The linear range of xanthoside was 1 - 100 mg · L⁻¹ (r = 0.999 9, n = 6). The average recovery was 100.2%, and RSD was 2.3% (n = 9). **Conclusions** The method is stable, precise and can be applied to the determination of xanthoside.

Key words: *Xanthium sibiricum*; xanthoside; HPLC; content determination