

HPLC – DAD – MS 法同时测定藏药花锚中 6 个呋酮类成分*

王琰¹, 石建功¹, 车镇涛², 杨鹤强³, 王慕邹¹

(1. 中国医学科学院、中国协和医科大学药物所, 北京 100050; 2. 香港中文大学中医药学院, 新界沙田, 中国香港;

3. 香港中文大学医学院药理系, 新界沙田, 中国香港)

摘要 目的:建立高效液相色谱 – 二极管阵列检测 – 质谱法 (HPLC – DAD – MS) 同时测定藏药花锚中 6 个呋酮类成分, 即 5 个呋酮苷元, 1 – 羟基 – 2,3,5 – 三甲氧基 – 呋酮 (HM – 1), 1 – 羟基 – 2,3,4,7 – 四甲氧基 – 呋酮 (HM – 2), 1 – 羟基 – 2,3,4,5 – 四甲氧基 – 呋酮 (HM – 3), 1,7 – 二羟基 – 2,3,4,5 – 四甲氧基 – 呋酮 (HM – 4), 1,5 – 二羟基 – 2,3 – 二甲氧基 – 呋酮 (HM – 5) 及 1 个呋酮苷, 1 – *O* – [β – *D* – 木糖 – (1 – 6) – β – *D* – 葡萄糖] – 2,3,5 – 三甲氧基 – 呋酮 (HM – 2 – 10) 的含量。**方法:**采用 Alltima C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μ m), 以乙腈 – 0.5% 醋酸 (*v/v*) 进行梯度洗脱 (0 min, 20: 80; 20 min, 70: 30; 30 min, 80: 20; 30.1 min, 20: 80; 35 min, 20: 80), 流速 0.8 mL · min⁻¹, 检测波长 252 nm, 离子源 APCI, 扫描模式正离子。**结果:**HM – 1、HM – 2、HM – 3、HM – 4、HM – 5 和 HM – 2 – 10 分别在 0.05 ~ 5.0, 0.05 ~ 5.0, 0.05 ~ 5.0, 0.05 ~ 10.0, 3.05 ~ 5.0, 0.05 ~ 2.0, 0.05 ~ 2.0 μ g 的范围内线性关系良好 (*r* 分别为 0.9999, 0.9999, 0.9997, 0.9999, 0.9999, 0.9992); HM – 1、HM – 2 和 HM – 3 平均回收率 (*n* = 9) 分别为 95.20%, 99.80%, 97.37%。**结论:**本法简便、准确、重现性好, 可作为藏药花锚药材质量检测的方法。

关键词:藏药; 花锚; 呋酮; 高效液相色谱 – 二极管阵列检测 – 质谱法

中图分类号:R917 **文献标识码:**A **文章编号:**0254 – 1793(2008)03 – 0345 – 05

Quantitative analysis of six xanthones in *Halenia elliptica*
by high – performance liquid chromatography – diode
array detection – mass spectrometry *

WANG Yan¹, SHI Jian – gong¹, CHE Chun – tao², YEUNG H. K. John³, WANG Mu – zou¹

(1. Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing, 100050, China;

2. School of Chinese Medicine, The Chinese University of Hong Kong, Shatin, NT, Hong Kong SAR, China;

3. Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, The Chinese University of Hong Kong, Shatin, NT, Hong Kong SAR, China)

Abstract Objective: To develop a high performance liquid chromatography – diode array detection – mass spectrometry (HPLC – DAD – MS) method for simultaneous determination of six major xanthones (five xanthone aglycons and one xanthone glycoside) present in a Tibetan herb, *Halenia elliptica*. **Methods:** The analysis was achieved on an Alltima C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μ m) using a mobile phase of acetonitrile – 0.5% acetic acid gradient elution in a total run time of 35 min (0 min, 20: 80; 20 min, 70: 30; 30 min, 80: 20; 30.1 min, 20: 80; 35 min, 20: 80) and a diode array detector was set at 252 nm. The Agilent 1100 LC/MSD Trap system was equipped with an APCI source using a positive ionization mode. **Results:** HM – 1, HM – 2, HM – 3, HM – 4, HM – 5, and HM – 2 – 10 were linear over the range of 0.05 – 5.0, 0.05 – 5.0, 0.05 – 5.0, 0.05 – 10.0, 0.05 – 5.0, 0.05 – 2.0, 0.05 – 2.0 μ g (*r* was 0.9999, 0.9999, 0.9997, 0.9999, 0.9999, 0.9992, respectively). The average recoveries (*n* = 9) were 95.20%, 99.80%, 97.37% for three major xanthones, HM – 1, HM – 2, and HM – 3, respectively. **Conclusion:** This method is simple, sensitive, reliable and reproducible. It can be applied to study the quality control of *Halenia elliptica*.

Key words: Tibetan herb; *Halenia elliptica*; xanthones; HPLC – DAD – MS

* 国家自然科学基金项目 (No. 20372084)

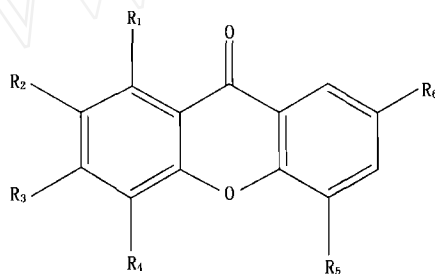
第一作者 Tel: (010) 63165238; Fax: (010) 63017757; E – mail: wangyan@imm.ac.cn

吡酮(xanthenes)是一类存在于天然产物中的多酚羟基化合物,被报道具有较广泛的生物学和药理学活性^[1,2]。龙胆科花锚属植物椭圆花锚(*Halenia elliptica* D. Don)是一常用藏药,在当地用来治疗肝炎和胆囊炎,也作为复方“乙肝健片”的君药,收载于1997年版中华人民共和国卫生部颁标准。

花锚药材中主要吡酮衍生物,包括1-羟基-2,3,5-三甲氧基-吡酮(HM-1),1-羟基-2,3,4,7-四甲氧基-吡酮(HM-2),1-羟基-2,3,4,5-四甲氧基-吡酮(HM-3),1,7-二羟基-2,3,4,5-四甲氧基-吡酮(HM-4),1,5-二羟基-2,3-二甲氧基-吡酮(HM-5)和1-O-[β -D-木糖-(1-6)- β -D-葡萄糖]-2,3,5-三甲氧基-吡酮(HM-2-10)曾被报道有一定的抗氧化活性^[3]。我们最近的研究结果首次发现5个吡酮苷元引起了大鼠冠状动脉血管的舒张,其EC₅₀值在(1.4 ± 0.1) $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (HM-1)到(5.6 ± 1.4)

$\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (HM-2)范围^[4],结果证实藏药花锚具有心血管药理活性,吡酮是其中的血管舒张活性成分,但吡酮不同衍生物结构的差异会导致其活性的强弱。

研究进一步证实了花锚中HM-1和HM-5是其中活性较强的成分,而HM-5同时也是HM-1在大鼠体外和体内主要的代谢产物^[5,6]。花锚中分布的含量较高的吡酮及其较强的血管舒张活性,提示了尽管不同的吡酮调节机理可能有差别,但是吡酮类成分是该藏药具有心血管活性的物质基础。本论文采用HPLC-DAD-MS法首次对花锚药材中6种主要吡酮的含量进行测定,结果表明方法可以使HM-1、HM-2、HM-3、HM-4、HM-5,和HM-2-10得到较好分离(结构见图1),并且简便准确、灵敏度高、重复性好,可用于藏药花锚药材的质量研究和质量控制。



No.	Name	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆
1	1-羟基-2,3,5-三甲氧基-吡酮(HM-1) [1-hydroxyl-2,3,5-trimethoxyxanthone(HM-1)]	OH	OCH ₃	OCH ₃	H	OCH ₃	H
2	1-羟基-2,3,4,7-四甲氧基-吡酮(HM-2) [1-hydroxyl-2,3,4,7-tetramethoxyxanthone(HM-2)]	OH	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	H	OCH ₃
3	1-羟基-2,3,4,5-四甲氧基-吡酮(HM-3) [1-hydroxy-2,3,4,5-tetramethoxyxanthone(HM-3)]	OH	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	H
4	1,7-二羟基-2,3,4,5-四甲氧基-吡酮(HM-4) [1,7-dihydroxy-2,3,4,5-tetramethoxyxanthone(HM-4)]	OH	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OH
5	1,5-二羟基-2,3-二甲氧基-吡酮(HM-5) [1,5-dihydroxy-2,3-dimethoxyxanthone(HM-5)]	OH	OCH ₃	OCH ₃	H	OH	H
6	1-O-[β -D-木糖-(1-6)- β -D-葡萄糖]-2,3,5-三甲氧基-吡酮(HM-2-10) [1-O-[β -D-xylopyranosyl-(1-6)- β -D-glucopyranosyl]-2,3,5-trimethoxy-xanthone(HM-2-10)]	-O-[β -D-xyl-(1-6)- β -D-gluc.]	OCH ₃	OCH ₃	H	OCH ₃	H

图1 花锚中6个吡酮 HM-1、HM-2、HM-3、HM-4、HM-5、HM-2-10 的化学结构式

Fig 1 Chemical structures of six xanthenes in *Halenia elliptica*

1 仪器与试剂

美国 Agilent 1100 型 LC/DAD/MSD 高效液相色谱系统, Agilent 自动进样器, 大气压化学电离离子源, Agilent 色谱工作站。1-羟基-2,3,5-三甲

氧基-吡酮(HM-1), 1-羟基-2,3,4,7-四甲氧基-吡酮(HM-2), 1-羟基-2,3,4,5-四甲氧基-吡酮(HM-3), 1,7-二羟基-2,3,4,5-四甲氧基-吡酮(HM-4), 1,5-二羟基-2,3-二甲氧基

-吡酮(HM-5)和1-O-[β -D-木糖-(1-6)- β -D-葡萄糖]-2,3,5-三甲氧基-吡酮(HM-2-10)对照品(HPLC纯度均大于99%)由中国医学科学院药物所分离制备,通过波谱法确定其结构。花锚药材采自青海或购自青海,经中国医学科学院药物所宋万志研究员鉴定为龙胆科花锚属椭圆花锚。乙腈、甲醇、乙醇、乙酸乙酯、冰醋酸、三氟乙酸为色谱纯,为Sigma产品。

2 色谱条件

色谱柱:Alltima C₁₈(4.6 mm×250 mm,5 μ m);流动相:乙腈-0.5%醋酸(v/v)进行梯度洗脱(0 min,20:80;20 min,70:30;30 min,80:20;30.1 min,20:80;35 min,20:80);流速:0.8 mL·min⁻¹;检测波长:252 nm;离子源:APCI,扫描模式:正离子;柱温:室温。

3 溶液制备

3.1 对照品储备液 精密称定对照品 HM-1、HM-2、HM-3、HM-4、HM-5、HM-2-10 适量,分别置于一定容积的量瓶中,以甲醇溶解并定容,即得1 mg·mL⁻¹的储备液。

3.2 供试品溶液 取花锚药材粉末(过40目筛)0.5 g,精密称定,加甲醇25 mL超声(500 W,40 kHz),提取1 h,3800 r·min⁻¹离心10 min,倾出上清液。药渣继续用25 mL甲醇超声(500 W,40 kHz)提取2次,每次30 min,离心倾出上清液,合并上清液,于50℃减压回收溶剂至近干,以甲醇溶解转移并定容至25 mL量瓶中,以0.45 μ m微孔滤膜滤过即得。

4 方法学考察

4.1 色谱条件的优化 经过比较多种流动相系统,包括甲醇-水、乙腈-水、甲醇-0.5%醋酸、乙腈-0.5%醋酸、甲醇-0.1% TFA,其中乙腈-0.5%醋酸梯度洗脱,能将6个吡酮类成分较好分离。经过全波长扫描,6个吡酮在252 nm均有较强的吸收,故选择252 nm作为检测波长同时测定6种成分。经过大气压化学电离、正离子扫描,得到6个吡酮成分 HM-1、HM-2、HM-3、HM-4、HM-5 的[M+H]⁺峰分别为303.1,333.1,333.1,349.0,289.0,HM-2-10的[M+H-xyl-gluc]⁺为303.1。

4.2 线性关系考察 准确量取6种对照品储备液(1 mg·mL⁻¹)适量,分别置于一定容积的量瓶中配成梯度溶液,HM-1、HM-2、HM-4的溶液浓度分别为0.005,0.01,0.05,0.1,0.5 mg·mL⁻¹,HM-5和HM-2-10的溶液浓度分别为0.005,0.01,0.05,

0.1,0.2 mg·mL⁻¹,HM-3的溶液浓度分别为0.005,0.01,0.05,0.1,0.5,1.0 mg·mL⁻¹。分别精密吸取此溶液10 μ L注入高效液相色谱仪进行测定,以峰面积值(Y)与进样量(μ g,X)作图得标准曲线,数据经回归处理,得HM-1、HM-2、HM-3、HM-4、HM-5,和HM-2-10的回归方程分别为:

$$Y = 53.8274 + 3602.2501X \quad r = 0.9999$$

$$Y = -7.6346 + 2142.5974X \quad r = 0.9999$$

$$Y = 16.2607 + 2585.6118X \quad r = 0.9999$$

$$Y = -17.0809 + 1689.9104X \quad r = 0.9997$$

$$Y = 18.1101 + 5296.8766X \quad r = 0.9999$$

$$Y = 13.1759 + 1715.8961X \quad r = 0.9992$$

6个吡酮的线性范围分别为0.05~5.0,0.05~5.0,0.05~5.0,0.05~10.0,0.05~5.0,0.05~2.0,0.05~2.0 μ g。

4.3 稳定性考察 按“3.2”项下方法制备供试品溶液,分别在0,4,8,12,16 h测定,每次进样10 μ L。测定HM-1、HM-2、HM-3、HM-4、HM-5,和HM-2-10的峰面积,计算RSD值分别为1.1%,1.2%,1.1%,0.9%,1.3%,1.17%,表明供试品溶液中HM-1、HM-2、HM-3、HM-4、HM-5和HM-2-10在16 h内基本稳定。

4.4 精密度试验 取按“3.2”项下方法制备的供试品溶液,连续进样5次,每次10 μ L,测定HM-1、HM-2、HM-3、HM-4、HM-5和HM-2-10的峰面积,计算RSD值分别为1.1%,0.2%,0.5%,0.4%,1.7%,0.3%。同时,按“4.1”项下制备的0.01,0.05,0.1 mg·mL⁻¹对照品溶液同法测定HM-1、HM-2、HM-3、HM-4、HM-5和HM-2-10的精密度,计算RSD值分别为0.3%,3.0%,0.2%;0.3%,0.1%,0.4%;1.5%,0.1%,0.2%;0.5%,0.5%,0.8%;3.0%,3.0%,2.6%;0.3%,0.2%,0.5%。表明精密度良好,符合含量测定要求。

4.5 重复性试验 按“3.2”项方法制备5份供试品溶液,分别进样10 μ L,测定花锚吡酮 HM-1、HM-2、HM-3、HM-4、HM-5 和 HM-2-10 的峰面积,计算含量(mg·g⁻¹)和RSD值分别为6.11(1.1%),2.69(1.2%),8.11(1.1%),0.63(1.1%),0.20(2.4%),9.39(2.1%)。表明此方法测定花锚吡酮 HM-1、HM-2、HM-3、HM-4、HM-5 和 HM-2-10 的含量,重复性良好。

4.6 加样回收率 取花锚药材9份,每份0.5 g,精密称定,平均分为3组,每组分别精密加入1.0 mg·mL⁻¹ HM-1对照品溶液1.88,3.75,7.50 mL;

1.0 mg · mL⁻¹ HM-2 对照品溶液 0.75, 1.50, 3.00 mL; 1.0 mg · mL⁻¹ HM-3 对照品溶液 1.88, 3.75, 7.50 mL。按“3.2”项下的方法制备成低、中、高 3 种浓度的供试液。分别取上述溶液 10 μL 注入高效液相色谱仪, 计算回收率。

花锚主要吡酮 HM-1、HM-2、HM-3 的平均回收率($n=9$) 分别为 95.20%, 99.80%, 97.37%。低浓度时花锚吡酮 HM-1、HM-2、HM-3 回收率($n=3$) 分别为 96.0%, 94.7%, 91.7%; RSD 值分别为 1.3%, 1.6%, 2.4%。中浓度时花锚吡酮 HM-1、HM-2、HM-3 回收率($n=3$) 分别为 95.3%, 103.0%, 96.7%; RSD 值分别为 0.4%, 0.2%, 0.5%。高浓度时花锚吡酮 HM-1、HM-2、HM-3 回收率($n=3$) 分别为 94.3%, 101.7%, 103.7%; RSD 值分别为 2.6%, 0.84%, 3.0%。

表 1 花锚样品中 6 个吡酮的含量测定($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)

Tab 1 The contents of six xanthones of *Halenia elliptica*

样品号(sample No.)	产地或购买地点(Source)	HM-1	HM-2	HM-3	HM-4	HM-5	HM-2-10
1	青海大坂山(Da'an Mountain, Qinghai)	6.13	2.67	8.09	0.64	0.21	9.37
2	青海西宁(Xining, Qinghai)	3.16	1.25	3.34	0.20	0.19	1.14
3	青海西宁(Xining, Qinghai)	2.08	1.43	2.81	0.23	0.15	1.39
4	青海西宁(Xining, Qinghai)	1.50	1.03	2.05	0.17	0.11	0.87
5	青海西宁(Xining, Qinghai)	3.82	1.85	5.07	0.41	0.16	5.12

注(note): 1: 采集花锚药材(samples collected); 2-5: 购买花锚药材(samples purchased from market)。

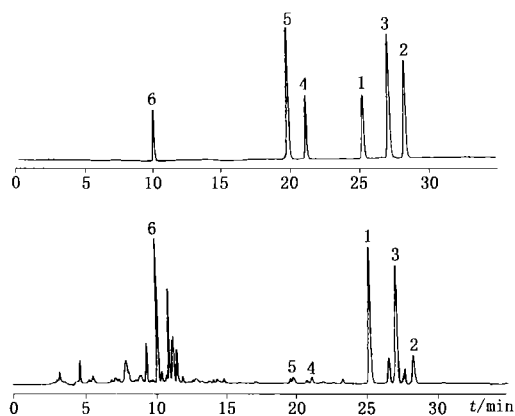


图 2 对照品(A)和 1 号样品(B)HPLC-DAD 色谱图

Fig 2 HPLC-DAD chromatograms of reference substances (A) and sample 1 (B)

1. HM-1 2. HM-2 3. HM-3 4. HM-4 5. HM-5 6. HM-2

5 讨论

5.1 作为藏药花锚提取分离得到的系列衍生物, HM-1、HM-2、HM-3、HM-4、HM-5、HM-2-10 均具有相同的吡酮骨架, 所以在紫外区有较强的吸收, 故选择二极管阵列检测器同时检测 6 种成分, APCI/MS 用以鉴定每个色谱峰的相对分子质量信

4.7 最低检测限和定量限 定义信噪比(S/N) 为 3:1 时的浓度为最低检测限, S/N 为 10:1 时的浓度为定量限。花锚吡酮 HM-1、HM-2、HM-3、HM-4、HM-5 和 HM-2-10 的最低检测限分别为 0.5, 0.5, 0.5, 2.0, 0.5, 2.0 ng; 定量限分别为 1.7, 1.7, 1.7, 6.7, 1.7, 6.7 ng。

4.8 样品测定 按“3.2”项下方法制备供试品溶液, 每一溶液进样 10 μL ($n=3$), 测得样品中花锚吡酮 HM-1、HM-2、HM-3、HM-4、HM-5 和 HM-2-10 的峰面积, 依据回归方程, 计算得到各样品所含 HM-1、HM-2、HM-3、HM-4、HM-5 和 HM-2-10 的含量。6 种成分色谱峰经 APCI/MS 鉴定其准分子离子峰, 与对照品完全一致。结果见表 1, 色谱图见图 2。

息。这些吡酮只有母核上的取代基发生改变, 极性差别较小, 特别是 HM-2 和 HM-3 互为同分异构体, 所以采用恒定比例流动相洗脱不能使 6 个组分得到分离, 因此采用梯度洗脱, 并对流动相进行优化, 从而得到良好分离。

5.2 曾比较了不同的提取方法, 包括冷浸提取、超声提取和加热回流提取, 以及不同的提取时间, 结果表明冷浸的提取效果最差, 加热回流提取使得 HM-2-10 峰面积明显小于超声提取, 提示吡酮苷可能对热不稳定, 所以提取方法选择超声提取。同时, 也考察了不同的提取时间和提取次数, 结果表明, 超声提取 1 h 后, 残渣再用甲醇分别提取 2 次, 每次 30 min, 可将吡酮提取完全。提取溶剂比较了 50% 甲醇、甲醇和乙醇, 由于吡酮苷元为脂溶性成分, 50% 甲醇作为溶剂溶解度较差, 甲醇比乙醇溶解度稍好, 鉴于甲醇作为定容溶剂并经微孔滤膜滤过时操作方便, 故选择了甲醇作为提取溶剂。

5.3 对采集和市售 2 种类型的花锚药材进行了含量测定, 结果表明, 采集样品中的吡酮苷(HM-2-10) 明显高于市售样品, 虽然不同样品中花锚吡酮的含量差别较大, 但是所有药材中均以 HM-1

和 HM-3 含量最高,而 HM-4 和 HM-5 含量最低。

5.4 由于 HM-1、HM-2、HM-3、HM-4、HM-5、HM-2-10 基本骨架相同,结构类似,所以在加样回收率试验中选择了 6 个吡酮中含量较高的 HM-1、HM-2、HM-3,实验结果证实了加样回收率符合要求。

5.5 虽然 HM-5 在花锚药材中的含量不高,但我们最近的研究证明 HM-5 是 HM-1 在大鼠体外和体内的主要代谢产物,而 HM-1 和其代谢产物 HM-5 都具有舒张大鼠心脏冠状动脉血管的活性^[5,6],提示了在花锚植物体内存在的 HM-5 可能是植物自身的代谢产物或降解产物。

参考文献

1 Jiang DJ, Dai Z, Li YJ. Pharmacological effects of xanthones as cardiovascular protective agents. *Cardiovasc Drug Rev*, 2004, 22(2): 91

- 2 Pinto MMM, Sousa ME, Nascimento MSJ. Xanthone derivatives: New insights in biological activities. *Curr Med Chem*, 2005, 12: 2517
- 3 GAO Jie(高洁), WANG Su-juan(王素娟), FANG Fang(方芳), et al. Xanthones from Tibetan medicine *Halenia elliptica* and their antioxidant activity(藏药花锚中吡酮和抗氧化活性). *Acta Acad Med Sin*(中国医学科学院院报), 2004, 26: 364
- 4 Wang Yan, Shi Jian-gong, Wang Mu-zou, et al. Isolation, structure evaluation and biological activities of xanthones from a Tibetan herb, *Halenia elliptica* *J Ethnopharmacol*, submitted for publication
- 5 Wang Yan, Shi Jian-gong, Wang Mu-zou, et al. Mechanisms of the vasorelaxant effect of 1-hydroxy-2,3,5-trimethoxyxanthone(HM-1) isolated from a Tibetan herb, *Halenia elliptica* on rat coronary artery. *Life Sci*, 2007, 81(12): 1016
- 6 Wang Yan, Shi Jian-gong, Wang Mu-zou, et al. Mechanisms of the vasorelaxant effects of 1,5-dihydroxy-2,3-dimethoxy-xanthone, an active metabolite of 1-hydroxy-2,3,5-trimethoxy-xanthone isolated from a Tibetan herb, *Halenia elliptica*, on rat coronary artery. *Life Sci*, 2008, 82(1-2): 91

(本文于 2008 年 1 月 25 日修改回)

欢迎订阅 2008 年《药物分析杂志》

《药物分析杂志》是由中国科学技术协会主管,中国药学会主办,中国药品生物制品检定所药物分析杂志编辑部编辑出版的学术性期刊。主要栏目有研究论文、交流、综述等。报道化学药物、中药与天然药物、抗生素、蛋白质、多肽类药物、生物技术药物等的分析、质量标准研究、临床药物分析、药物分析基础理论与实践以及新方法、新技术的应用,并及时报道国家重大研究课题的最新成果。

本刊获 2006 年、2007 年中国科协精品科技期刊工程项目 C 类资助。

本刊为我国自然科学核心期刊,被国内外主要检索系统收录。

本刊坚持质量第一、面向广大读者,以其独具的深度与广度展示我国药物分析的现状与发展。

本刊 2005 年开始由双月刊改为月刊,大 16 开本,每期 126 页,国内外公开发行。每期定价 20 元,全年定价 240 元,国内邮发代号:2-237,国外读者请同中国国际图书贸易总公司(中国国际书店,北京 399 信箱)联系。欢迎广大读者到当地邮局订阅,并欢迎有关专业人员集体订购,价格从优。

希望为本刊推广发行者,价格另议。

地址:北京市天坛西里 2 号(100050) 联系人:刘小帅

电话:(010)67058427 传真:(010)67012819

网址:www.nicbbp.org.cn E-mail: ywfx@nicbbp.org.cn