

用高效液相色谱法测定中草药活性组分

朱 彭 龄

(兰州大学 化学系,甘肃 兰州 730000)

中图分类号: O6-31

文献标识码: D

文章编号: 1006-3757(2011)04-0244-04

中草药是天然产物,成分复杂,以往多凭经验解释其药理作用.中草药的疗效源于所含的活性组分,虽然依据几种活性组分的含量来评价中草药的质量并非全面,但目前这还是相对比较合理和客观的办法.通过测定活性组分,可以辨别药物的真伪,考察生长地域、季节、气候变化对活性成分的影响,以及配合药理学研究.高效液相色谱法(HPLC)是在中草药分析中应用最广的手段之一.笔者从 HPLC 方法学研究和中草药样品制备两方面介绍一些自己的体会.

1 HPLC 方法

中草药成分复杂,适合采用梯度洗脱方式进行 HPLC 分析,其优点是:① 中草药活性组分的保留性质有较宽的变化范围,梯度方式能使每个组分以合适的容量因子($k=2\sim5$)被洗脱;② 中草药试样中可能含有被固定相牢固保留的组分,可以在梯度程序结束之前用高强度流动相从柱上清除这些组分,使色谱柱处于同样的状态开始下一次进样,这既有利于色谱柱的保护又提高了色谱分析的重现性,有时也省略了试样的预处理;③ 在梯度洗脱的情况下,可以借助调节陡度和梯度曲线的形状达到最佳的分离效果,减少待测组分色谱峰受相邻峰的干扰.具体地说,建立中草药活性组分梯度洗脱程序一般可按以下步骤进行:① 用含活性组分的合成试样,优化梯度洗脱条件,使各活性组分色谱峰之间有足够分辨率;② 在合成试样建立的色谱条件下,分离中草药试样溶液;③ 从实际试样给出的谱图,观察活性组分色谱峰是否和相邻峰重叠.若有干扰,可

按出峰顺序依次调整梯度局部的陡度(通过改变 t_c 或 $\Delta\%B$)或改变梯度的形状,优化梯度程序.

以建立中草药中羟基蒽醌类衍生物分析方法为例^[1].首先用合成试样优化梯度程序,图 1 是合成试样得到的色谱图(有关梯度洗脱程序的优化参阅文献[2]).用建立的程序分析大黄属药物和番泻叶得到图 2 所示的分离结果.比较图 1 和图 2 中使用的梯度程序可以看到,分析实际试样时,梯度程序作了一些调整.

2 样品制备

从复杂的固相基质中将多种活性组分提取并制成适合于 HPLC 分析的样品溶液至关重要.疏水性的差异使得待测组分在不同的溶剂中溶解度不同,活性组分和溶剂之间还可能发生一些反应,如水解、醇解等.因此,样品制备时,首先要考虑的是选择适当的溶剂,溶剂的选择主要根据被提取组分的疏水性.其次要考虑中草药中活性组分的多样性,中草药中待测组分可直接被提取,有时还需要将多种形式存在的活性组分转化为同一形式后再被提取.如对甙和甙元可以采用水解处理,使得待测分析物以甙元形式被提取出来.另一个需要考虑的因素是活性组分的热稳定性,对于热稳定性差的组分,最好采取相适宜的提取方式.目前提取中草药活性组分的手段主要是液固萃取、索氏萃取和超声波辅助萃取,后一方法更适于热不稳定组分的提取.

2.1 样品制备

在不同条件(如提取方式、溶剂、酸度等)制备试样溶液,用建立的 HPLC 方法进行分析.比较各活

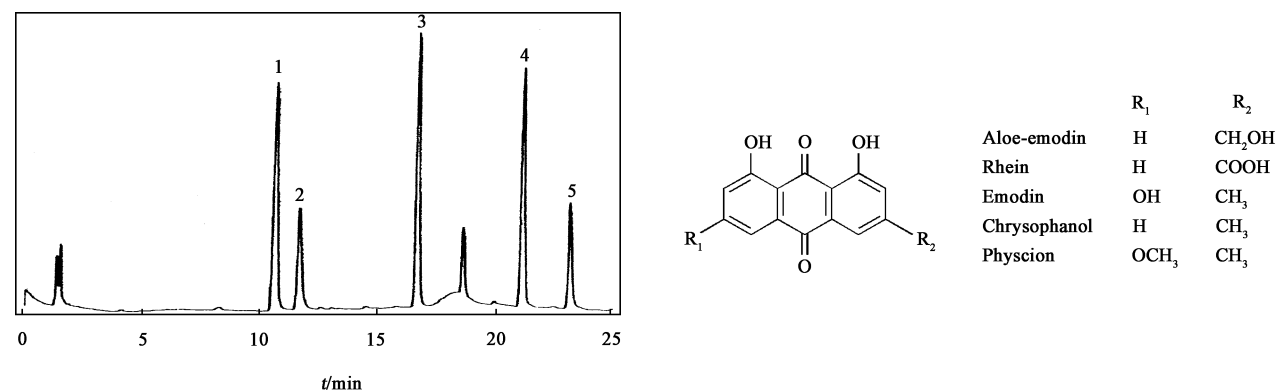


图 1 合成试样色谱图

Fig. 1 Chromatogram of synthetic sample

化合物:(1)芦荟大黄素;(2)大黄酸;(3)大黄素;(4)大黄酚;(5)大黄素甲醚。
色谱条件:分析柱, 15 × 0.46 – cm Zorbax RX – C18, 5 μm; 流动相, A, 36 mmol/L TEAP (pH 2.5)/B, 乙腈; 流速, 1 mL/min; 梯度, 36/36/80/80% B at 0/ 10/ 25/ 30 min;
检测器, UV, 254 nm; 温度, 室温; 进样体积, 6 μL.

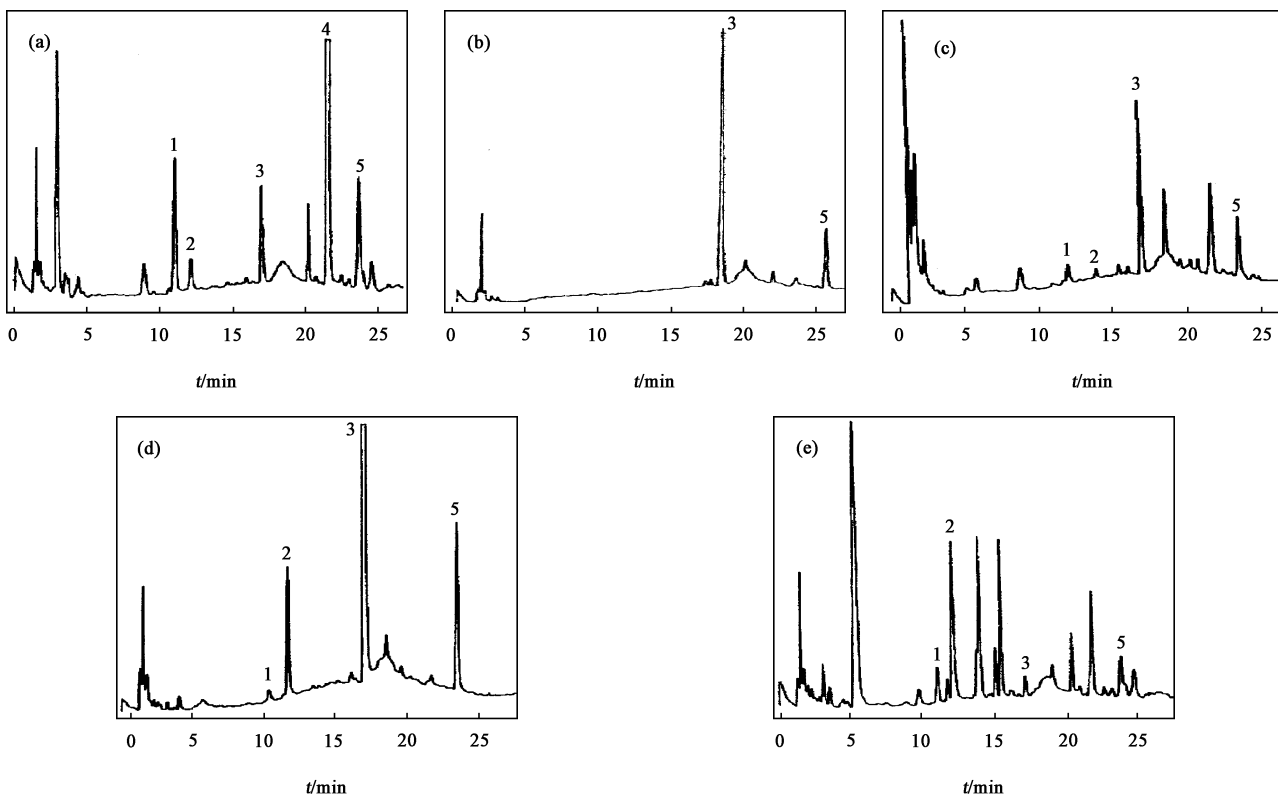


图 2 一些含羟基蒽醌衍生物中草药的色谱图

Fig. 2 Chromatograms of some Chinese herb medicines containing hydroxyanthraquinone derivatives

(a) 大黄; (b) 何首乌块根; (c) 何首乌茎; (d) 虎杖; (e) 番泻叶。
化合物:(1)芦荟大黄素;(2)大黄酸;(3)大黄素;(4)大黄酚;(5)大黄素甲醚。
色谱条件:梯度: 36/ 36/ 80/ 80% B at 0/ 5.5/ 20.5/ 25.5 min; 其他条件同图 1.

性组分的分析结果,选择最佳提取条件,探讨制备过程中可能发生的反应,为制定合理的样品制备操作
规程提供依据。
为证实提取的效率,用同一制备步骤处理试样

残留物,若提取液中活性组分含量很低(如小于提取总量的 2%),说明活性组分能被提取完全。

当对某一个活性组分的稳定性有疑问时,在试样制备的条件下,处理单一活性组分溶液,从活性组分的变化对其稳定性予以解释。

2.2 实例

2.2.1 实例 1

从大黄属药物和番泻叶中提取羟基蒽醌类衍生物活性组分. 该类化合物在中草药中以蒽醌甙及其甙元 2 种形式存在. 羟基蒽醌类衍生物具有较强的疏水性,于是选用氯仿作为萃取剂,在酸性条件下水解,使蒽醌甙转化为相应的甙元后,与原存的甙元一并被氯仿萃取,依据甙元的分析结果评价药物. 色谱分离结果见图 1。

具体操作如下所述. 取 0.05 g 药物粉末,在通风橱内,与 15 mL 1 mol/L 硫酸和 20 mL 氯仿回流 30 min,取出氯仿层. 再加入氯仿,重复上述操作,共 3 次. 将氯仿萃取液合并,在水浴上蒸发至干. 用 36 mmol/L TEAP(pH 2.5)/乙腈(V/V,65/35)溶解残渣,并转移至 25 mL 容量瓶中定容. 溶液经 0.45 μm 聚四氟乙烯膜过滤后进样. 若继续加 20 mL 氯仿萃取回流后的药渣,萃取液中活性组分的含量低于总量的 2%,表明上述操作规程能够将羟基蒽醌类衍生物萃取完全。

2.2.2 实例 2

天麻甙(gastrodin, GA)和对羟基苯甲醇(p-

hydroxybenzyl alcohol, HA)是天麻的主要活性组分(图 3). 作为糖甙,天麻甙在常规反相柱上的保留很弱,与相邻峰也不能基线分离. 本实验室利用聚乙

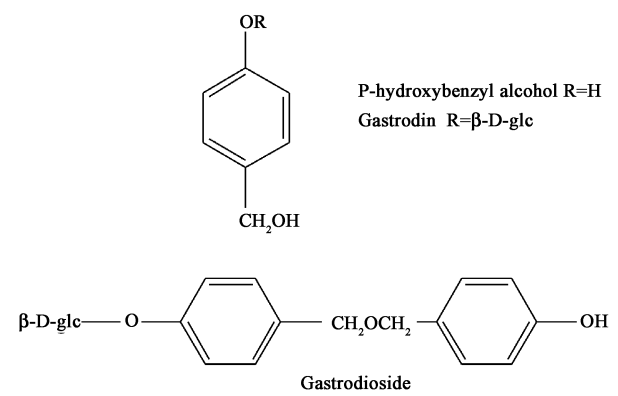


图 3 天麻甙、对羟基苯甲醇和天麻醚甙的结构式
Fig. 3 Structures of gastrodin, p - hydroxybenzyl alcohol and gastrodioside

二醇 - C8 柱^[3]建立了天麻活性组分的分析方法^[4],在这里将对天麻试样制备作一介绍。

在 3 个不同的条件下制备试样溶液. 方法 1:取 0.1 g 天麻粉末(~100 μm)样品,加水 20 mL,回流 1 h. 冷却后定容至 25 mL,以 3 500 r/min 离心 10 min,吸出上清液分析. 残渣用水洗涤后,再加水进行第 2 次萃取. 方法 2:以甲醇代替水作溶剂,过程同方法 1. 方法 3:在 40 ℃以超声波代替回流提取,过程同方法 1. 实验结果列于表 1。

表 1 不同试样制备方法得到的分析结果
Table 1 Analytical results by different sample preparation methods %

试样制备	方法 1(n=3)				方法 2(n=4)				方法 3(n=3)			
	GA		HA		GA		HA		GA		HA	
	Content	RSD	Content	RSD	Content	RSD	Content	RSD	Content	RSD	Content	RSD
1st Extraction	0.504	0.3	0.128	5.1	0.404	1.5	0.058	1.2	0.301	3.4	0.078	2.6
2nd Extraction	0.037	0.6	0.007	17.3	0.018	3.7	—	—	0.013	4.2	0.004	6.1
Total	0.541	0.6	0.135	4.3	0.423	1.3	0.058	1.2	0.314	3.4	0.083	2.5

方法 1 测得的天麻甙和对羟基苯甲醇含量最高,原因可能是天麻醚甙水解也产生这 2 种成分,高温加速了水解过程. 这样处理样品和中草药的煎煮过程较为相似. 天麻醚甙能醇解产生天麻甙,因此用方法 2 测得的天麻甙含量较高. 方法 3 受天麻醚甙水解的影响较小,测得结果反映天麻中实际存在的天麻甙和对羟基苯甲醇含量. 无论哪个方法,第 1 次提取均占 2 次提取量的 95% 以上,1 次提取制备样

品溶液即可。

3 小结

本文讨论了建立中草药 HPLC 分析方法的基本过程. 鉴于中草药成分的复杂性,在建立相应的 HPLC 分析方法时,应更多关注样品制备. 为促进中草药活性组分分析方法的规范化,有待对中草药样品制备进行大量细致的工作。

参考文献:

[1]

Liu C L, Zhu P L, Liu M C. Computer – aided development of high performance liquid chromatographic method for the determination of hydroxyanthraquinone derivatives in chinese herb medicine rhubarb [J]. J Chromatogr A, 1999, 857: 167 – 174.

[2]

朱彭龄. 梯度洗脱 [J]. 分析测试技术与仪器, 2010, 16(1):56 – 59.

[3]

Zhang H X, Liu M C, Zhu P L. Preparation of a polyglycol – C8 bonded phase and its characteristics [J]. Chromatographia, 2000 (51): 437 – 442.

[4]

Hua D, Liu C L, Zhang H X, et al. Development of HPLC method for the determination of gastrodin and para – hydroxybenzyl alcohol in tall gastrodia tuber on the polyglycol – C8 column [J]. Anal Lett, 2001: 34.

Development of HPLC Methods for Determination of Effective Components in Chinese Herbal Medicines

Zhu Peng – Ling

(Department of Chemistry, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China)

