

十三种洋地黄属强心甙成分的反相高效液相分离

朱霁虹 李维庸

(中国药品生物制品检定所, 北京)

提要 洋地黄属强心甙系由玄参科洋地黄属植物中提取出的混合物, 是重要的治疗心脏病药物。由于其成分复杂, 分离其所含的各强心甙成分十分困难。本文采用反相高效液相色谱法, 在传统用于分离洋地黄强心甙成分的乙腈—水流动相系统中加入一定量甲醇作改进剂, 并进行凹形梯度洗脱, 大大改进了结构极为近似的强心甙的分离, 13种洋地黄属强心甙化合物得到了满意的分离。

关键词 强心甙; 洋地黄毒甙; 异羟基洋地黄毒甙; 羟基洋地黄毒甙; 毛花甙 A, B, C; 去乙酰毛花甙 A, B, C

强心甙是自然界中存在的一类对心脏具有显著生理作用的甙类, 由甙体母核和多种糖结合而成。强心甙能使心肌收缩作用增强, 心率变慢, 用于治疗心肌衰竭的病人。临床上常用的几种强心甙如洋地黄毒甙、去乙酰毛花甙丙和狄戈辛等是由玄参科 (*Scrophulariaceae*) 的紫花洋地黄 (*Digitalis purpurea* L.) 和毛花洋地黄 (*D. lanata* Ehrh.) 叶中提取出的。

强心甙类化合物的分离鉴定有纸层析、薄层层析、气相色谱和高效液相色谱法^(1~6)等。本文采用反相高效液相系统, 以 (A) 乙腈—水—甲醇 (30:70:10) 和 (B) 乙腈—水—甲醇 (52.5:47.5:12) 作流动相进行凹形梯度洗脱 (紫外 220 nm 检测) 分离 13 种强心甙化合物, 可获得满意结果。

实 验 部 分

一. 试剂

强心甙对照品 洋地黄毒甙 (DIG)、异羟基洋地黄毒甙 (DG) 和去乙酰毛花甙 C (Desl C) 为中国药典对照品; 异羟基洋地黄毒甙元 (DG-G)、洋地黄毒甙元 (DIG-G) 和羟基洋地黄毒甙元 (G-G) 系由加盐酸水解相应的次级甙获得; 去乙酰毛花甙 A (Desl A) 和去乙酰毛花甙 B (Desl B) 系由加入饱和消石灰水至相应的毛花甙 A (LA) 和毛花甙 B (LB) 中脱乙酰基得到; 异羟基洋地黄单毒糖甙 (DG-I)、异羟基洋地黄双毒糖甙 (DG-II)、羟基洋地黄毒甙 (G)、毛花甙 A、毛花甙 B 和毛花甙 C (LC) 均为联邦德国 Serva 产品。

流动相溶剂 乙腈和甲醇均为高效液相色谱用溶剂, 浙江黄岩化学实验厂产品; 蒸馏水为全玻璃蒸馏器重蒸水。

二. 仪器设备和色谱条件

Waters 6000A 高压泵、U 6 K 进样器、Waters 660 梯度洗脱设备、Waters M 730 数据

处理机、Lamda-Max 481 UV-Vis 可变波长检测器和 Hamilton 25 μ l 微量注射器；色谱柱为不锈钢柱(30 cm \times 3.9 mm)、 μ -Bondapak ODS 固定相；流动相有等浓度洗脱用流动相乙腈—水系统和甲醇—水系统。梯度洗脱流动相有乙腈—水—甲醇(30:70:10)和乙腈—水—甲醇(52.5:47.5:12)。流动相流速均为 1 ml/min。数据处理机纸速为 0.3 cm/min；检测波长 220 nm；检测器衰减 AUFS 0.1。

三. 分离方法

(一) 对照品溶液配制

1. 对照品溶液配制 分别精密称取不同对照品，配成 1 mg/ml 甲醇溶液，但羟基洋地黄毒甙则为 0.2 mg/ml，羟基洋地黄毒甙元、洋地黄毒甙元、去乙酰毛花甙 A、B 则均为 0.5 mg/ml。

2. 混合对照品溶液配制 用微量注射器分别抽取异羟基洋地黄毒甙元溶液 30 μ l，羟基洋地黄毒甙溶液 250 μ l，去乙酰毛花甙 A 和 B，洋地黄毒甙元和羟基洋地黄毒甙元溶液各 100 μ l，其余对照品每种各取 50 μ l，混合，使成对照品混合溶液，总体积约 1.1 ml，即稀释约 10 倍，各组分含量约 0.5 μ g/10 μ l。单一对照品溶液或混合对照品溶液每次进样量均为 10 μ l。

(二) 分离条件

1. 强心甙类化合物容量因子测定 为了解强心甙类化合物在 μ -Bondapak ODS 柱上的分离情况，采用不同流动相系统，测定多种强心甙化合物在该柱上的容量因子，以观察在确定的试验条件下，强心甙类化合物的保留特性。

实验分别测定了 DG-G, DG-I, Desl C, DG-II, LC, DG, LB, LA, DIG 九种强心甙在不同浓度甲醇—水和不同浓度乙腈—水作流动相时的容量因子，分别以容量因子的对数值为纵坐标，不同百分浓度的甲醇—水或乙腈—水为横坐标作图(图 1, 2)。

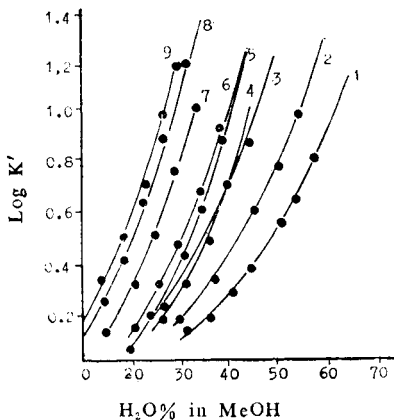


Fig 1. Log K' of 9 digitalis glycosides as a function of H_2O content in MeOH-H $_2$ O mobile phase system. 1. DG-G; 2. DG-I; 3. Desl C; 4. DG-II; 5. LC; 6. DG; 7. LB; 8. LA; 9. DIG

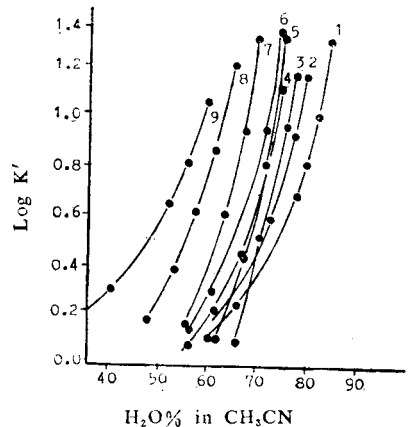


Fig 2. Log K' of 9 digitalis glycosides as a function of H_2O content in CH_3CN - H_2O mobile phase system.

图 1 说明以甲醇—水作流动相，九种强心甙中大部分成分能分开，但 Desl C 和 DG-II 以及 LC 和 DG 两对成分则在某几个甲醇—水浓度时不易分离或分离不良。

图 2 说明以乙腈—水作流动相，九种强心甙中部分成分能分开，但 DG-I 和 LC; DG-G 和

Desl C 以及 L B, DG 和 DG-II 等多组成分, 在某几个乙腈—水浓度时不能分离或分离不良。

从图 1 和图 2 以乙腈—水和甲醇—水作流动相, 强心甙成分在 ODS 反相柱上的保留特性来看, 要一次分离大部分强心甙成分是困难的。根据 Lee GJL 等⁽⁷⁾ 在用反相高效液相法分离其它化合物时, 在乙腈—水流动相系统中加入另一有机相以改善分离情况的报道, 我们将甲醇⁽⁸⁾ 加入乙腈—水流动相系统中进行试验。

(1) 在一定比例乙腈—水流动相系统中加入不同量甲醇, 考察 Desl C, L C 及 DG 三种强心甙的保留特性影响, 结果如图 3。

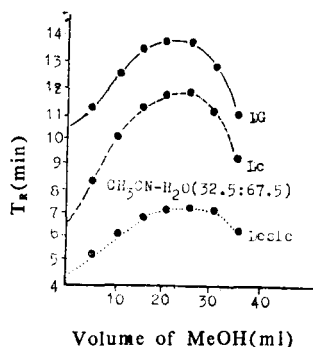


Fig 3. Effect of MeOH content on retention time of digoxin, lanatoside C and deslanoside C.

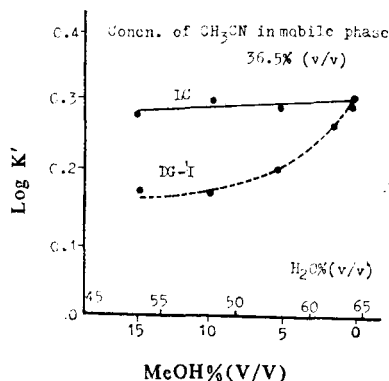


Fig 4. Effect of MeOH on separating digoxigenin, monodigitoxoside and lanatoside C.

从图 3 看出当乙腈浓度不变时, 若逐渐增加甲醇量, 则强心甙的保留时间有先增加而后下降的趋势。

(2) 在固定乙腈浓度的乙腈—水流动相系统中, 甲醇的加入量对强心甙成分分离效果的影响。结果见图 4 和图 5。

图 4 和图 5 说明, 在乙腈—水流动相系统中乙腈浓度分别为 36.5%(V/V) 和 32%(V/V) 时, 原来几乎完全不能分离的两对强心甙化合物, 加入甲醇后可完全分离。因此考虑采用乙腈—水—甲醇系统作流动相进行梯度洗脱, 效果可能更好。

2. 乙腈—水—甲醇系统作流动相的梯度洗脱试验 以 (A) 乙腈—水—甲醇(30:70:10) 和 (B) 乙腈—水—甲醇(52.5:47.5:12) 作流动相进行凹形梯度洗脱。梯度: 0~100% B; 时间: 30 min; 梯度曲线 8。混合样进样量: 10 μ l, 结果如图 6。

从图 6 看出 13 种已知强心甙混合物分离良好, 得到全部基本达基线的分离峰, 多次重复结果一致。保留时间均经与各自的对照品并同时用对照品加入法确证。

讨 论

一. 在乙腈—水系统中加入不同量甲醇, 能显著改善洋地黄强心甙的分离效果, 其作用一方面由于甲醇的极性与乙腈和水不同, 因而可起调节作用, 另一方面不同甙在甲醇和乙腈中的溶解性能不同。开始增加甲醇时, 整个系统乙腈比例相对减少, 但系统原来含水比例较大, 加入少量甲醇对含水比例改变不大, 因而有极性增大的趋势, 于是使部分疏水性强, 在极性的流动相中不易溶解而在键合相柱上有相当亲和力的强心甙的保留时间延长。相反, 当甲

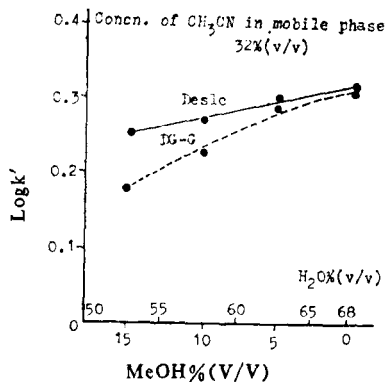


Fig 5. Effect of MeOH on separating deslanoside C and digoxigenin.

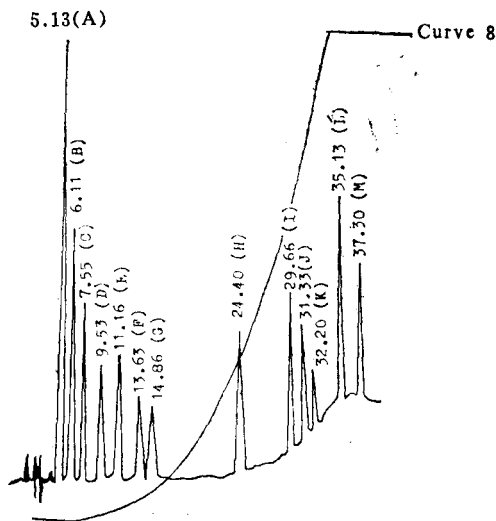


Fig 6. Gradient elution of 13 digitalis glycosides on μ -Bondapak ODS. (A) DG-G; (B) DG-I; (C) Desl C; (D) DG-II; (E) G-G; (F) LC; (G) DG; (H) DIG-G; (I) LB; (J) G; (K) Desl A; (L) LA; (M) DIG

醇增加至一定量后，系统中水的比例相对降低了，系统的极性便有减小的趋势，同时疏水性强的强心甙在低极性流动相中的溶解度有所增大，保留时间逐渐变短。因而图 3 是抛物线型曲线。

实验同时作了加入不同量乙醇和异丙醇对固定浓度的乙腈—水流动相系统的影响，结果也有与甲醇相似的作用，但随碳链的增加作用逐渐减弱。

二. 根据洋地黄强心甙成分疏水性强弱和极性大小与其在反相 HPLC 上的分离特点⁽⁹⁾，归纳为以下几个方面：

(一) 洋地黄属强心甙在反相柱上用含水流动相洗脱时洗脱次序与洋地黄毒糖的存在和数目有关，强心甙中洋地黄毒糖的疏水性强，所以其保留性能也强，在此情况下，极性小的甙元成分首先被洗脱，而含单毒糖、双毒糖及三毒糖的各级甙成分的保留性能则依次递增，但含葡萄糖的强心甙，由于所含葡萄糖的强亲水性，其在反相柱上的保留性能比相应的不含葡萄糖的弱，因此去乙酰毛花甙和毛花甙的保留时间比相应的紫花甙短。

(二) 强心甙成分母核中含羟基愈多极性愈大，因此，含羟基洋地黄毒甙的保留时间比洋地黄毒甙短。另外也与羟基位置有关，母核上异位羟基极性大于正位羟基，因此，异羟基毒甙的保留时间较羟基毒甙短。

(三) 去乙酰基毒糖甙的极性大于含乙酰基毒糖甙，因此去乙酰毛花甙的保留时间较相应毛花甙短。

三. 梯度洗脱最初用上述(A)，(B) 流动相进行线性梯度洗脱，结果毛花甙 C 和异羟基洋地黄毒甙两峰重叠，分离不良，后改用凹形梯度洗脱，分离良好，获得满意结果。

参 考 文 献

1. Evans FJ. High-pressure liquid chromatography of digitoxigenin and its glycosides. *J Chromatogr* 1974; **88**:411.
2. Castle MC. Isolation and quantification of picomole quantities of digoxin, digitoxin and their metabolites by high-pressure liquid chromatography. *Ibid* 1975; **115**:437.
3. Linder W, et al. Partition high-performance liquid chromatography system for the separation of digitalis glycosides of the cardenolide group. *Ibid* 1976; **117**:81.
4. Erni F, et al. A comparison of reversed-phase and partition high-performance liquid chromatography of some digitalis glycosides. *Ibid* 1977; **130**:169.
5. Wichtl M, et al. Analysis of *Digitalis* leaf extracts. *Ibid* 1982; **247**:359.
6. 朱霁虹. 反相高效液相色谱法检测狄戈辛纯度. 药物分析杂志 1986; **6**:93.
7. Lee GJL, et al. Use of organic modifiers in the mobile phase for the reversed-phase high-performance liquid chromatographic separation of steroidal hormones. *J Chromatogr* 1981; **212**:108.
8. Fujii Y. Separation of digitalis glycosides by micro high performance liquid chromatography. *Ibid* 1980; **202**:139.
9. Pekic B, et al. High-performance liquid chromatography of some digitalis glycosides and their aglycones on chemically bonded phases. *Ibid* 1983; **268**:237.

SEPARATION OF 13 DIGITALIS GLYCOSIDES OF CARDE- NOLIDE GROUP BY REVERSED-PHASE HPLC

ZHU Ji-Hong and LI Wei-Yong

(National Institute for the Control of Pharmaceutical and Biological Products, Beijing)

ABSTRACT Digitalis glycosides of cardenolide group are important constituents with closely similar structures isolated from *Digitalis* plants of Sreophulariaceae for the treatment of heart diseases. A reversed-phase HPLC has been developed to separate 13 digitalis glycosides successfully by using methanol as a modifier to acetonitrile-water in concave gradient elution from (A) CH₃CN-H₂O-MeOH (30:70:10) to (B) CH₃CN-H₂O-MeOH (52.5: 47.5: 12). The effects of methanol on the separation of the digitalis glycosides and the characteristics between retention time and structures are also hereby discussed.

Key words Cardiac glycoside; Digitoxin; Digoxin; Gitoxin; Lanatoside A, B, C; Deslanoside A, B, C