

doi: 10.3969/j.issn.1006-9690.2010.02.012

## HPLC 测定 7 种龙胆科植物花中龙胆苦苷与獐牙菜苦苷的含量

张兴旺<sup>1,2</sup>, 陶燕铎<sup>1\*</sup>, 梅丽娟<sup>1</sup>, 邵 赞<sup>1</sup>

(1. 中国科学院西北高原生物研究所, 青海 西宁 810008; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100049)

**摘要** 目的: 建立 7 种龙胆花中龙胆苦苷和獐牙菜苦苷含量测定的 HPLC 方法。方法: 采用微波辅助动态回流法进行提取, 色谱条件: Fusion - RP 80 A C<sub>18</sub> 柱 (150 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇 - 0.2% 磷酸溶液梯度洗脱 (0 ~ 25 min: 15% ~ 30%); 流速: 1 mL/min; 柱温: 30 °C; 检测波长 240 nm。结果: 7 种龙胆花中獐牙菜苦苷和龙胆苦苷的色谱峰与共存组分完全达到基线分离, 线性范围分别为 0.105 ~ 0.945 μg ( $r = 0.9999$ ), 0.3 ~ 0.7 μg ( $r = 0.9999$ ), 平均加样回收率分别为 97.8% ( $RSD = 1.02%$ ), 98.9% ( $RSD = 1.51%$ )。结论: 所建立的方法测定快速, 结果准确可靠。

**关键词** 高效液相色谱; 龙胆科植物花; 獐牙菜苦苷; 龙胆苦苷

中图分类号: S567 文献标识码: A 文章编号: 1006-9690(2010)02-0038-03

### Determination of Swertiamarin and Gentiopicroside in the Flowers of Seven Gentianaceae

Zhang Xingwang<sup>1,2</sup>, Tao Yanduo<sup>1</sup>, Mei Lijuan<sup>1</sup>, Shao Yun<sup>1</sup>

(1. Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810008, China;  
2. Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

**Abstract** Objective: To establish a HPLC method for the determination of swertiamarin and gentiopicroside in the flowers of seven gentianaceae. Methods: A new method—microwave - assisted reflux with magnetic stir extraction was used. Experiments were performed on Fusion - RP 80 A C<sub>18</sub> (150 mm × 4.6 mm, 5 μm) column, with the mobile phase consisting of methanol and 0.2 % phosphoric acid at a flow rate of 1 mL/min. The operation was conducted in the gradient mode in which the ratio of methanol to 0.2% phosphoric acid varied from 15:85 to 30:70 in 25 min. The column temperature was 30 °C and the determination wavelength was 240 nm. Results: Chromatographic separation of swertiamarin, gentiopicroside and the co - existed compounds achieved baseline resolution. The linear range were 0.105 ~ 0.945 μg ( $r = 0.9999$ ) and 0.3 ~ 0.7 ( $r = 0.9999$ ) separately, the average recovery were respectively 97.8% ( $RSD = 1.02%$ ) and 98.9% ( $RSD = 1.51%$ ). Conclusion: The method is rapid and precise.

**Key words** HPLC; flowers of gentianaceae; swertiamarin; gentiopicroside

龙胆花为藏医常用品种, 分为白花龙胆和杂花龙胆, 在临床上为多品种入药, 具有清湿热、泻肝胆实火、镇咳、利喉、健胃功能, 主治感冒发烧、目赤咽痛、

肺热咳嗽、胃热、脑痧、尿道热、阴痒及阴部湿疹、天花等<sup>[1]</sup>。《蓝琉璃》云:“邦见按花色不同可分为白色、蓝色和杂色三类。”龙胆花常作为藏成药的君药或臣药, 如龙胆花丸、十五味龙胆丸、三味龙胆丸等。龙胆科植物主要含有的裂环烯醚萜苷类化学成分龙胆苦苷、獐牙菜苷等, 是龙胆科的苦味成分和活性成分<sup>[2]</sup>。本实验首次建立了藏药 7 种龙胆花中龙胆苦苷

收稿日期: 2009-09-17

基金项目: 科技部国家科技支撑计划 (2007BAI45B00)

作者简介: 张兴旺 (1982 -), 男, 在读研究生, 研究方向: 天然药物化学; E-mail: zwx3244@163.com

和獐牙菜苦苷含量测定的 HPLC 方法,并对它们的含量进行了比较,为龙胆花多品种入药提供科学的依据。

## 1 仪器与材料

微波实验仪(带回流、磁力搅拌); Agilent 1200LC 高效液相色谱仪, G1379A 在线脱气机, G1311A 四元泵, G1329A 标准型自动进样器, G1316A 柱温箱, Agilent1200 色谱工作站, AG204 电子分析天平

麻花秦艽(*Gentiana straminea* Maxim.)花、达乌里秦艽(*Gentiana dahurica* Fisch.)花、黄管秦艽(*Gentiana officinalis* H. Smith)花、管花秦艽(*Gentiana siphonantha* Maxim. Ex Kusnez.)花、线性龙胆(*Gentiana lawrencei* Burk.)、云雾龙胆(*Gentiana nubigena* Edgew.)花、蓝玉簪龙胆(*Gentiana veitchiorum* Hemsl.)花于2009年8月采自青海省境内,均为野生,海拔均在3500m以上,由中国科学院西北高原生物研究所梅丽娟高级工程师鉴定。

甲醇、磷酸均为分析纯,色谱用甲醇为色谱纯。龙胆苦苷(批号为:110770-200308)、购自中国药品生物制品检定所,纯度大于98%;獐牙菜苦苷由作者从麻花秦艽中分离得到,经归一化法检测,纯度大于98%。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

色谱柱: Fusion - RP 80 A C18 柱(150 mm × 4.6 mm, 5 μm); 柱温: 30 °C; 流动相: 甲醇-0.2% 磷酸溶液梯度洗脱(0~25 min: 15%~30%); 流速: 1 mL/min; 检测波长 240 nm; 进样量: 5 μL。标准品及样品色谱图见图1。

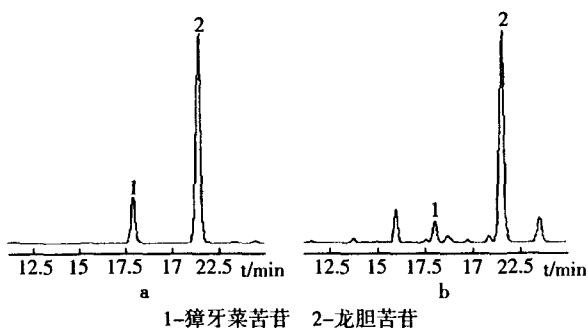


图1 对照品(a)和样品(b)HPLC图

### 2.2 对照品溶液的制备

精密称取獐牙菜苦苷,龙胆苦苷标准品适量,加甲醇制成 $0.105\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , $0.3\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的溶液,摇匀, $0.45\text{ }\mu\text{m}$ 的微孔滤膜过滤后作为对照品溶液。

### 2.3 供试品溶液的制备

取龙胆花样品约0.5g,精密称定,置250mL平底烧瓶中,加入20mL甲醇,置微波实验仪中,回流搅拌提取20min,冷却至室温,滤过,滤液收集到50mL容量瓶中,用甲醇定容至刻度,摇匀, $0.45\text{ }\mu\text{m}$ 微孔滤膜滤过,即得供试品溶液。

### 2.4 标准曲线及线性范围

分别精密吸取对照品溶液1,3,5,7,9 μL,在上述色谱条件依次进样,以进样量(X)为横坐标,峰面积(Y)为纵坐标绘制标准曲线,回归方程见表1。

表1 獐牙菜苦苷与龙胆苦苷标准曲线

化合物	线性范围/ $\mu\text{g}$	标准曲线	r
獐牙菜苦苷	0.105 - 0.945	$Y = 888.5238X + 2.145$	0.999 99
龙胆苦苷	0.3 - 2.7	$Y = 1510.7X + 36.39$	0.999 99

### 2.5 精密度试验

精确吸取对照品溶液10 μL,按2.1节色谱条件测定5次,结果獐牙菜苦苷,龙胆苦苷峰面积的RSD分别为1.21%,0.84%,表明仪器精密度良好。

### 2.6 稳定性试验

取麻花秦艽花约0.5g,精密称定,按2.3节方法制备供试品溶液,分别在0,2,4,6,8,12h后在上述色谱条件下进样5 μL,结果獐牙菜苦苷,龙胆苦苷峰面积的RSD分别为1.1%,1.54%,表明样品溶液在12h内稳定。

### 2.7 重复性试验

取麻花秦艽花约0.5g,精密称定,按上述供试品溶液的制备方法和测定条件,重复测定5份,结果獐牙菜苦苷,龙胆苦苷峰面积的RSD分别为1.3%,1.62%,表明重复性良好。

### 2.8 加样回收率试验

取已知獐牙菜苦苷,龙胆苦苷含量的麻花秦艽花样品5份,每份约0.5g,精密称定,加入对照品獐牙菜苦苷1.002mg,龙胆苦苷4.012mg,制备样品溶液。精密吸取5 μL进样分析,计算平均回收率,结果见表2。

表2 獐牙菜苦苷,龙胆苦苷加样回收率

化合物	样品中量	加入量	测得量	回收率	平均值	RSD
	/mg	/mg	/mg	/%	/%	/%
獐牙菜苦苷	2.015	1.002	2.996	99.3	97.8	1.02
	2.004	1.002	2.931	97.5		
	2.020	1.002	2.971	98.3		
	2.013	1.002	2.937	97.4		
	2.009	1.002	2.912	96.7		
龙胆苦苷	12.850	4.012	16.946	100.5	98.9	1.51
	12.843	4.012	16.636	98.7		
	12.856	4.012	16.278	96.5		
	12.860	4.012	16.805	99.6		
	12.845	4.012	16.722	99.2		

### 2.9 样品含量测定

取供试品溶液,过0.45 μm的微孔滤膜,分别进样5 μL,测定(n=5),取5次测定的平均值,结果见表3。

表3 7种龙胆花中獐牙菜苦苷和龙胆苦苷测定结果

样品名称	獐牙菜苦苷/%	龙胆苦苷/%	合计/%
麻花秦艽花	0.402	2.57	2.972
达乌里秦艽	0.387	2.49	2.877
管花秦艽花	0.440	3.21	3.650
黄管秦艽花	0.712	1.60	2.312
线性龙胆花	0.276	2.51	2.786
云雾龙胆花	0.222	1.97	2.192
蓝玉簪龙胆花	0.228	2.45	2.678

## 3 讨论

### 3.1 7种龙胆花中獐牙菜苦苷与龙胆苦苷含量的比较

由表3可以看出,黄管秦艽花中獐牙菜苦苷的含量最高为0.712%,云雾龙胆花含量最低为0.222%,其他龙胆花介于二者之间。管花秦艽中龙胆苦苷的含量最高为3.21%,黄管秦艽中的含量最低为1.60%,本实验对这7种龙胆花中2种主要有效成分的含量进行了比较,可为龙胆花多品种入药提供科学的依据。

### 3.2 不同提取方法的比较

比较了3种提取法:甲醇加热回流30 min;甲醇微波回流(带磁力搅拌)20 min和甲醇超声30 min。

结果表明:7种药材微波提取率均大于加热回流法和超声法,而且与其他提取方法相比,微波辅助提取法具有提取时间短、溶剂消耗及废物产生量低、提取选择性和提取物的纯度高等特点而被广泛用于天然植物的提取中<sup>[3-7]</sup>。实验过程中还比较了提取10 min、20 min、30 min对药材提取率的影响,结果表明20 min与30 min提取率接近,因此,采用微波动态回流提取法提取20 min对7种龙胆花进行提取制样。

### 3.3 检测波长的确定

将獐牙菜苦苷、龙胆苦苷对照品溶液在200~400 nm范围内进行扫描,结果在240 nm处有较好吸收,故选择240 nm为检测波长。

### 3.4 流动相的选择

在筛选獐牙菜苦苷与龙胆苦苷两种活性成分测定的色谱条件过程中,曾尝试过用不同比例的甲醇-0.2%的磷酸作为流动相进行梯度洗脱,发现甲醇-0.2%磷酸溶液梯度洗脱(0~25 min:15%~30%),流速:1 mL/min,7种龙胆花中獐牙菜苦苷和龙胆苦苷的色谱峰与共存组分完全达到基线分离。

### 参考文献:

- [1] 刘圆,孟庆艳,彭镰心,等. RP-HPLC法测定藏药龙胆花的两种原植物白花龙胆和蓝玉簪龙胆中龙胆苦苷[J]. 中草药,2006,37(11):1783.
- [2] 北京医学院,北京中医学院. 中草药成分化学[M]. 北京:人民卫生出版社,1984:344.
- [3] GARCIA-AYUSO L E, VELASCO J, DOBARGANES M C, et al. Determination of the oil content of seeds by focused microwave-assisted soxhlet extraction[J]. Chromatographia, 2000, 52(1/2):103-108.
- [4] EIGUREN FERN AND EZA, SOSA FERRERA Z, SANTANA RODRIGUEZ J J. Microwave-assisted extraction of organochlorine compounds in marine sediments with organized molecular systems[J]. Chromatographia, 2001, 53(7/8):375-379.
- [5] PAN Xuejun, NIU Guoguang, LIU Huizhou. Microwave-assisted extraction of tanshinones from salvia miltiorrhiza bunge with analysis by high performance liquid chromatography[J]. J Chromatogr: A, 2001, 922: 371-375.
- [6] 万益群,吴世芳. 何首乌中磷脂类化合物的微波辅助萃取/高效液相色谱法测定[J]. 分析测试学报, 2008, 27(7): 782-784.
- [7] 周围,李雪梅. 中药材中拟除虫菊酯类农药残留的微波萃取/气相色谱检测[J]. 分析测试学报, 2007, 26(6):884-887.