

藏药达乌里秦艽中环烯醚萜苷的 HPLC 测定

孙 菁¹, 徐文华^{1,2}, 王延花^{1,2}, 韩友吉^{1,2}, 陈桂琛^{*1}

(1. 中国科学院西北高原生物研究所, 青海省青藏高原特色生物资源研究重点实验室, 西宁 810001;
2. 中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘 要: 采用 HPLC 法同时测定了藏药达乌里秦艽中龙胆苦苷 (gentiopicroside)、獐牙菜苦苷 (swertiamarin)、獐牙菜苷 (sweroside) 和落干酸 (loganic acid) 4 种主要环烯醚萜苷类成分, 利用在线质谱 (MS) 进行了定性分析, 并与同属藏药麻花艽进行了比较。色谱柱为 Eclipse XDB-C₈ (4.6 mm × 150 mm i. d., 5 μm), 流动相 A: 体积分数 5% 乙腈 (含 10 mmol 甲酸) 水溶液, 流动相 B: 体积分数 95% 乙腈水溶液, 以流动相 A 在 0~15 min 内由 100% 线性减至 90%, 15~20 min 内保持 90% 不变线性梯度洗脱。流速 1.0 mL/min, 检测波长 240 nm, 柱温 30℃。结果表明, 4 种成分均达到了基线分离, 具有较好的线性关系和回收率。本法可作为达乌里秦艽药材有效成分的测定方法, 为其有效成分的进一步开发利用提供依据。

关键词: 藏药; 达乌里秦艽; 环烯醚萜苷; HPLC

中图分类号: O657.7 文献标识码: A 文章编号: 1000-0720(2008)12-051-04

达乌里秦艽 (*Gentiana dahurica* Fischer) 又名小秦艽, 为龙胆科 (Gentianaceae) 龙胆属多年生草本, 生于海拔 800~4500 m 的草原阳坡、河谷阶地下^[1], 为藏族民间常用解吉那保类药物植物, 也是 2005 版“中国药典”中所记载的 4 种秦艽类药材之一。干燥根可供药用, 含有龙胆苦苷 (gentiopicroside) 等生物活性成分^[2], 用于治疗扁桃体炎、荨麻疹、风湿性关节炎等症^[2,3]。目前, 对藏药达乌里秦艽的研究仅限于其 rRNA 基因内转录间隔区测序^[4]、龙胆苦苷含量的测定^[5]、化学成分分析的研究^[6], 有关其他环烯醚萜苷类成分的测定尚未见报道。本文应用 HPLC 分析方法, 同时测定了达乌里秦艽药用部位中的龙胆苦苷、獐牙菜苦苷 (当药苦苷, swertiamarin)、獐牙菜苷 (当药苷, sweroside) 以及落干酸 (loganic acid) 的含量, 建立了其 HPLC 分析方法, 并利用在线柱后质谱进行了各组分的定性分析, 旨在对该药材的客观评价以及苦苷类

有效成分的进一步利用提供依据。

1 实验部分

1.1 仪器、试剂与材料

Agilent 1100 型高效液相色谱仪 (Agilent 公司), 配备有四元梯度泵, 在线真空脱气机, DAD 检测器, 100 位自动进样器, 大气压化学电离源 (APCI); KQ-200B 型数控超声波清洗器 (昆山市超声仪器公司), Milli-Q 超纯水系统 (美国 Millipore 公司)。

乙腈 (德国 Merck 公司) 为色谱纯, 甲醇和甲酸为分析纯。龙胆苦苷、獐牙菜苦苷对照品 (中国药品生物制品检定所, 批号分别为 110770-200308、110785-200203), 纯度大于 99%; 獐牙菜苷、落干酸对照品由中国科学院西北高原生物研究所李玉林副研究员提供, 经光谱分析鉴定, HPLC 面积归一化法表明其纯度均大于 98%。

达乌里秦艽根部材料于 2004 年 9 月采集

* 收稿日期: 2007-07-22; 修订日期: 2007-10-18

基金项目: 国家中西部专项 (2001BA901A47) 项目资助

作者简介: 孙 菁 (1976-), 女, 博士; E-mail: gcchen@nwipb.ac.cn

(表 2), 每个采样点内取 20~30 个个体植株的根部, 室温自然状态下阴干, 混匀粉碎, 过孔径 180 μm 筛, 冷藏保存待用。原植物标本由中国科学院西北高原生物研究所卢学峰副研究员鉴定为达乌里秦艽 (*Gentiana dahurica* Fischer)。

1.2 实验方法

1.2.1 对照品溶液的配制 准确称取一定量的龙胆苦苷, 獐牙菜苦苷, 獐牙菜苷, 落干酸对照品分别配制成 3.63, 2.75, 2.76, 3.30 mg/mL 的对照品溶液, 备用。

1.2.2 提取方法 参照文献^[8]中提取方法的优化, 选择超声提取方法。准确称取 0.2 g 达乌里秦艽根部粉末, 置于 25 mL 三角瓶中, 分别加入 10 mL 甲醇于 60 $^{\circ}\text{C}$ 下超声振荡提取 2 次, 每次 30

min, 超声频率为 60 Hz, 冷却至室温后过滤, 滤液置于 25 mL 容量瓶中, 用甲醇定容, 摇匀, 制成供试品溶液。

2 结果与讨论

2.1 标准品的色谱分离及在线质谱鉴定

参照文献^[7]中色谱条件稍作改进, 色谱柱为 Eclipse XDB-C₈ 色谱柱 (4.6 mm \times 150 mm i. d., 5 μm)。流动相 A: 体积分数 5% 乙腈 (含 10 mmol 的甲酸) 水溶液, B: 体积分数 95% 的乙腈水溶液。流速为 1.0 mL/min, 进样量 10 μL , 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$ 。梯度洗脱程序为: 流动相 A 在 0~15 min 内由 100% 线性减至 90%, 15~20 min 内保持 90% 不变线性梯度洗脱。待测成分均被洗脱且达到基线分离 (图 1a)。

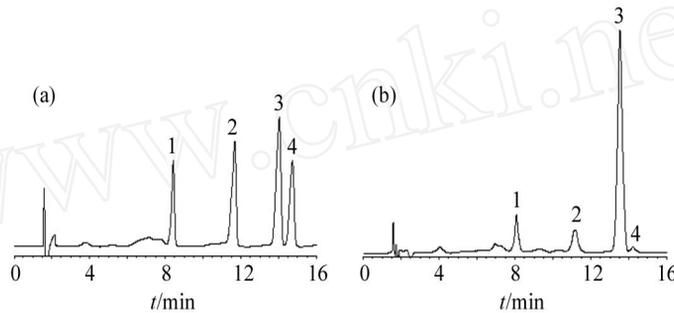


图 1 对照品 (a) 和样品 (b) 的色谱分离图

Fig. 1 HPLC chromatograms of standards (a) and samples (b)

1~4 分别为: 落干酸、獐牙菜苦苷、龙胆苦苷、獐牙菜苷

标准品溶液分别进样后, 利用 DAD 检测器在 200~400 nm 扫描其吸收光谱, 各对照品均在 240 nm 波长处有较高的吸收, 选择该波长为检测波长。在此条件下, 4 种对照品均达到了基线分离。

采用大气压化学电离源 (APCI) 进行各组分的在线柱后质谱鉴定 (负离子模式), 质谱数据见表 1。以龙胆苦苷为代表性的质谱定性见图 2 (分别为一级和二级质谱图)。

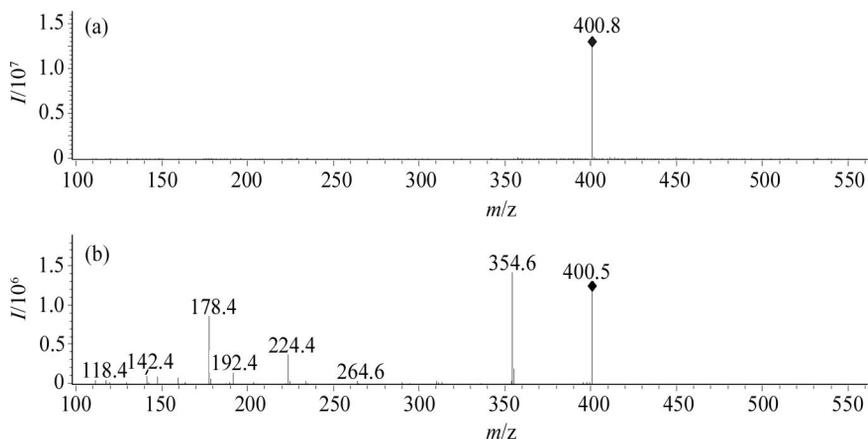


图 2 代表性龙胆苦苷的一级 (a) 和二级 (b) 质谱图

Fig. 2 First and second order mass spectra of representative gentiopicoside

2.2 线性关系

取上述 4 种对照品溶液, 逐级稀释, 进样量为

10 μL , 以峰面积来定量, 测得各组分的回归方程、线性范围以及检出限如表 1。

表 1 达乌里秦艽根中 4 种环烯醚萜苷的线性回归方程、相关系数、线性范围、检出限、一级质谱数据

Tab. 1 Linear regression equations, correlation coefficients, linear range, detection limits and mass spectral data of four iridoid glycosides constituents in *G. dahurica* roots

成分	回归方程 $Y = A + B$	线性相关系数 r	线性范围 $m/\mu\text{g}$	检出限 $/(\mu\text{g}/\mu\text{L})$	质核比 m/z
落干酸	$Y = 517.3 + 9.75$	0.9997	0.25 ~ 7.92	2.85E-06	375
獐牙菜苦苷	$Y = 700.7 + 15.95$	0.9990	0.33 ~ 10.54	3.09E-06	449
龙胆苦苷	$Y = 601.4 + 25.45$	0.9991	0.54 ~ 17.40	3.73E-06	401
獐牙菜苷	$Y = 808.1 + 13.54$	0.9992	0.23 ~ 7.28	2.55E-06	403

2.3 稳定性实验

取上述 4 种对照品溶液, 分别间隔 0、2、8、12、16、24 h 进样, 进样量 10 μL , 测得龙胆苦苷, 獐牙菜苦苷, 獐牙菜苷, 落干酸的 RSD 分别为 1.3%, 1.2%, 2.8%, 1.6%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.4 精密度实验

取上述 4 种对照品溶液, 分别连续进样, 每次为 10 μL , 重复 5 次, 测得龙胆苦苷, 獐牙菜苦苷, 獐牙菜苷, 落干酸的 RSD 分别为 1.0%, 2.4%, 2.5%, 2.7%。

2.5 重复性试验

准确称定同一批样品, 按照供试品溶液制备方法, 得到 5 份供试品溶液, 每次进样 10 μL , 重复 5 次, 测得龙胆苦苷, 獐牙菜苦苷, 獐牙菜苷,

落干酸的 RSD 分别为 0.4%, 2.3%, 1.6%, 0.8%。

2.6 加样回收率实验

取已知量的药材适量, 加入一定量的对照品混合溶液, 按照样品处理方法制备并进样 10 μL , 计算对照品的加样回收率, 龙胆苦苷, 獐牙菜苦苷, 獐牙菜苷, 落干酸的平均回收率分别为 99.3%, 98.1%, 97.4% 和 97.5%。

2.7 样品测定

按照 1.2 项下提取方法, 制得供试品溶液。吸取上述供试品溶液 10 μL 进样, 重复 3 次, 得到 HPLC 色谱分离图见图 1b。根据对照品的保留时间, 参照文献^[7]中紫外吸收光谱图确定各峰的位置, 利用线性方程和各峰的峰面积积分值计算 4 种成分的质量分数(表 2)。

表 2 达乌里秦艽根部四种环烯醚萜苷类成分测定 ($n = 3$)

Tab. 2 Contents of four active constituents in *G. dahurica* roots

采样点(海拔/m)	w/ %				
	落干酸	獐牙菜苦苷	龙胆苦苷	獐牙菜苷	总量
青海省同仁县 (2630 m)	2.271 \pm 0.033	0.724 \pm 0.021	6.409 \pm 0.303	0.278 \pm 0.011	9.682
青海省贵德县 (3580 m)	3.089 \pm 0.030	1.144 \pm 0.015	9.297 \pm 0.269	0.536 \pm 0.012	14.066
青海省海晏县 (3140 m)	1.212 \pm 0.023	0.944 \pm 0.037	7.731 \pm 0.248	0.784 \pm 0.015	10.671
青海省平安县 (2610 m)	2.255 \pm 0.025	0.970 \pm 0.017	8.840 \pm 0.273	0.962 \pm 0.012	13.027
青海省结古镇 (4410 m)	1.895 \pm 0.025	0.695 \pm 0.011	6.415 \pm 0.191	0.329 \pm 0.009	9.334

表中 w/ % = 平均值 \pm SD

测定结果中, 4 种成分中以龙胆苦苷量为最高, 平均值为 7.738%, 超过 2005 版药典中规定的

2% 含量标准。此方法可用来评价达乌里秦艽药材质量, 可以更准确更有效地控制该药材的质量。

与同时期同属另一藏药麻花苳中相同 4 种成分的含量^[7]进行比较,二者均以龙胆苦苷的含量为最高,其余 3 种成分含量略有差异,但四者之和未显示出较大的差别。这表明二者在环烯醚萜苷的次生代谢方面具相似性,将其同时列入 2005 版药典中秦艽类药材,且都以龙胆苦苷的含量作为入药指标也是有科学依据的。

参考文献

[1] Ho Ting-nong & Liu Shang-wu. A worldwide monograph of *Gentiana*. Beijing: Science Press. 2001. 174

- [2] 中华人民共和国药典, 2005 版(一部), 210
- [3] 杨永昌, 藏药志. 西宁: 青海人民出版社. 1991. 11
- [4] 姬可平, 张西玲, 刘丽莎等. 中国中药杂志, 2003, 28(4): 313
- [5] 倪慧, 波拉提·马卡比力, 卿德刚等. 中药材, 2004, 27(4): 500
- [6] 杨婕, 马骥, 周东星等. 中草药, 2006, 37(2): 187
- [7] 孙菁, 陈桂琛, 李玉林等. 分析试验室, 2005, 25(5): 28
- [8] 林鹏程, 冶兆辉, 卢永昌等. 中药材, 2004, 27(11): 819

Determination of four iridoid glycosides in a famous Tibetan medicine *Gentiana dahurica* Fischer by HPLC
SUN Jing¹, XU Wen-hua^{1,2}, WANG Yan-hua^{1,2}, HAN You-ji^{1,2} and CHEN Gui-chen^{*1} (1. Qinghai Key Laboratory of Qinghai-Tibet Plateau Biological Resources, Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810001; 2. Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049), Fenxi Shiyanshi, 2008, 27(12): 51~54

Abstract: A simple and reliable method for the simultaneous quantitative determination of four iridoid glycosids gentiopicroside, swertiamarin, sweroside and loganic acid in a famous Tibetan medicine *Gentiana dahurica* Fischer by HPLC was developed. Identification of four analytes was performed by on line post-column mass spectrum (APCI). Comparison with another Tibetan medicine *G. straminea* in the same sampling time was also discussed. All the analysis were performed on Eclipse XDB-C₈ (4.6 mm ×150mm i. d., 5 μm) at column temperature of 30 with a good baseline resolution and eluted with the solution of mobile phase A: 5% acetonitrile (including 0.01 mol methanoic acid) and mobile phase B: 95% acetonitrile. The proportion of A and B changed from 100:0 to 90:10 in 0~15 min and 90:10 in 15~20 min. The flow rate was 1.0 mL/min. Good linear regression equations ($r = 0.9990$) within test ranges and recoveries were obtained. The analytical method was simple, accurate, and could be used for the quantitative determination and quality control of this plant medicine *G. dahurica*.

Key words: Tibetan medicine; *Gentiana dahurica* Fischer; Iridoid glycosides; HPLC