

HPLC法测定青海不同地区云雾龙胆花中两种活性成分的含量

张兴旺^{1,2}, 陶燕铎^{*1}, 梅丽娟¹, 邵 赟¹

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

摘 要: 建立了云雾龙胆花中龙胆苦苷和獐牙菜苦苷含量测定的 HPLC 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 C₁₈ 柱 (150 × 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 ℃; 检测波长 240 nm。云雾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 95.7% (RSD=1.1%), 98.1% (RSD=1.5%)。

关键词: 高效液相色谱; 云雾龙胆花; 獐牙菜苦苷; 龙胆苦苷

云雾龙胆 (*Gentiana nubigena* Edgew.) 为龙胆科龙胆属多年生草本, 分布于西藏, 青海, 四川, 甘肃等地。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^[1]。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。云雾龙胆花中主要含有的裂环烯醚萜苷类化学成分龙胆苦苷、獐牙菜苦苷等, 是其苦味成分和活性成分^[2]。本实验首次建立了云雾龙胆花中龙胆苦苷和獐牙菜苦苷含量测定的 HPLC 方法, 并对不同产地的含量进行了比较, 可为云雾龙胆花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, Agilent 1200 色谱工作站, AG204 电子分析天平。云雾龙胆 (*Gentiana nubigena* Edgew.) 花于 2009 年 8 月采自青海省境内, 均为野生, 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%; 獐牙菜苦苷由本人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 × 4.6 mm, 5 μm); 柱温: 30 ℃; 流动相: 甲醇-0.2% H₃PO₄ 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。

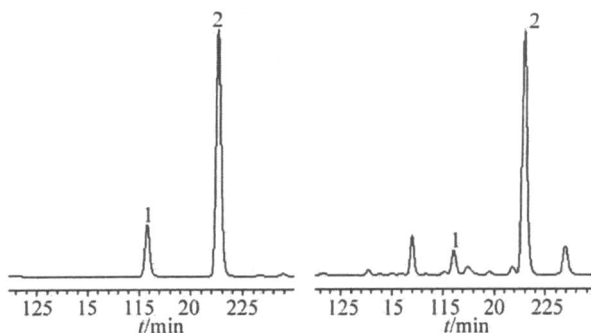


图 1 对照品 (a) 和样品 (b) HPLC 图
1 - 獐牙菜苦苷 2 - 龙胆苦苷

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, 硕士研究生; Email: zwx3244@163.com

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 mg/mL, 0.3 mg/mL 的溶液,摇匀,0.45 μm 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,0.45μm 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 $m/\mu\text{g}$	标准曲线	r
獐牙菜苦苷	0.105 - 0.945	$Y = 888.5238X + 2.145$	0.99999
龙胆苦苷	0.3 - 2.7	$Y = 1510.7X + 36.39$	0.99999

2.5 精密度试验

精确吸取对照品溶液 5 μL,按 2.1 节下色谱条件测定 5 次,结果獐牙菜苦苷,龙胆苦苷峰面积的 RSD 分别为 1.3%, 0.84%,表明仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验

取样品约 0.5g,精密称定,按 2.3 项下方法制备供试品溶液,分别在 0, 2, 4, 6, 8, 12 h 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%, 1.6%,表明样品溶液在 12 h 内稳定。

2.7 重复性试验

取样品约 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%, 1.7%,表明重复性良好。

2.8 加样回收率试验

取已知獐牙菜苦苷,龙胆苦苷含量的样品 5 份,每份约 0.5 g,精密称定,加入 0.251mg/mL 的獐牙菜苦苷对照品溶液 2mL, 2.006mg/mL 的龙胆苦苷对照品溶液 2mL,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
	m/mg	m/mg	m/mg	%	$w/\%$	%
獐牙菜苦苷	1.125	0.502	1.547	95.1	95.7	1.07
	1.118	0.502	1.563	96.5		
	1.126	0.502	1.576	96.8		
	1.121	0.502	1.53	94.3		
	1.116	0.502	1.537	95.9		
龙胆苦苷	11.252	4.012	15.295	100.2	98.1	1.50
	11.248	4.012	15.046	98.6		
	11.250	4.012	14.789	96.9		
	11.243	4.012	14.98	98.2		
	11.254	4.012	14.732	96.5		

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 5μL,测定 (n=5),取 5 次测定的平均值,结果见表 3

3 讨论

3.1 青海不同地区云雾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,祁连野牛沟云雾龙胆花中獐

牙菜苦苷的含量最高为 0.246%,舟群乡的最低为 0.222%;囊谦县云雾龙胆花中龙胆苦苷的含量最高为 2.31%,舟群乡的最低为 1.97%。本实验首次测定了青海不同地区云雾龙胆花中两种主要有效成分的含量,并进行了比较,可为云雾龙胆花入药提供科学的依据。

表 3 云雾龙胆花中獐牙菜苦苷和龙胆苦苷测定结果

样品名称	采集地点	獐牙菜苦苷	龙胆苦苷
		w/%	w/%
云雾龙胆花	青海囊谦县	0.235	2.31
云雾龙胆花	青海祁连路场	0.229	2.03
云雾龙胆花	青海祁连野牛沟	0.246	1.99
云雾龙胆花	青海天峻县	0.224	2.24
云雾龙胆花	青海玉树	0.231	2.17
云雾龙胆花	青海舟群乡	0.222	1.97

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:微波提取率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^[3-7]。实验过程中还比较了提取 10min、20min、30min 对药材提取率的影响,结果表明 20min 与 30min 提取率接近,因此,采用微波辅助动态回流提取法提取 20min 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 240nm 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% H₃PO₄ 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,云雾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. 中药草,2006,37(11):1783
- [2] 北京医学院,北京中医学院. 中草药成分化学. 北京:人民卫生出版社,1884-344
- [3] GARCIA-AYUSO L E, VELASCO J, DOBARGANESM C, et al. Determination of the oil content of seeds by focused microwave-assisted soxhlet extraction. Chromatographia, 2000, 52(1/2):103
- [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. Chromatographia, 2001, 53(7/8):375
- [5] PAN-Xuejun, N U-Guoguang, L U-Huizhou. Microwave-assisted extraction of tanshinones from salvia miltiorrhiza bunge with analysis by high performance liquid chromatography. J Chromatogr A, 2001, 922:371
- [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. 分析测试学报, 2008, 27(7):782
- [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. 分析测试学报, 2007, 26(6):884