

藏药秦艽花的质量标准研究

张兴旺^{1,2} 文怀秀¹ 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, 青海 西宁 810008; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要:目的 对藏药秦艽花的质量标准进行研究, 着重建立秦艽花中龙胆苦苷的含量测定方法和 TLC 鉴别方法。方法 采用 TLC 法定性鉴别秦艽花; 采用 HPLC 法建立秦艽中龙胆苦苷的含量测定方法。①HPLC 色谱条件: 色谱柱: Fusion-RP 80 A C₁₈ 柱(150 mm×4.6 mm 5 μm); 流动相为甲醇-水(30:70); 流速: 1.0 ml·min⁻¹; 柱温: 30℃; 检测波长: 270 nm。②TLC 条件: 采用硅胶 GF₂₅₄ 薄层板, 以醋酸乙酯-甲醇(3:1)为展开剂, 碘蒸气显色。结果 HPLC 法龙胆苦苷在 0.4~3.6 μg 范围内线性关系良好, 藏药秦艽花中龙胆苦苷的含量不得低于 2%; TLC 鉴别结果满意。结论 该方法操作简便快速、结果可靠、重复性好, 可完善现行《中华人民共和国卫生部药品标准(藏药)(第 1 册)》, 有效控制秦艽花的质量。

关键词: 麻花秦艽花; 质量标准; 龙胆苦苷

DOI 标识: doi: 10.3969/j.issn.1008-0805.2011.07.046

中图分类号: R291.4 文献标识码: B 文章编号: 1008-0805(2011)07-1649-02

秦艽花药材为龙胆科植物麻花秦艽 *Gentiana straminea* Maxim. 的干燥花, 藏名: 结吉嘎保。青藏高原以其独特的自然地理优势, 所产藏药材秦艽花药材质量较好, 是秦艽的主要产地。本品性苦、寒, 清热解暑, 用于胃肠炎、肝炎、胆囊炎等症^[1]。本品有效成分为环烯醚萜苷类, 主要包括龙胆苦苷、獐牙菜苦苷等。龙胆苦苷有抗炎、镇痛、保肝、利胆等作用^[2]。现行《中华人民共和国卫生部药品标准(藏药)1995 年版(第 1 册)》秦艽花仅有显微鉴别和显色反应鉴别尚无 TLC 鉴别及含量测定指标, 不利于有效控制秦艽花药材的质量。为此, 我们采用反相高效液相色谱法建立了秦艽花药材中龙胆苦苷的含量测定方法, 同时规定了其含量限度, 并建立了秦艽花药材的 TLC 鉴别方法, 从而进一步完善其相关质量标准。

1 仪器与试剂

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(梅特勒公司); 硅胶 GF₂₅₄ 薄层板(青岛海洋化工厂); 龙胆苦苷(批号为: 110770-200308); 甲醇(色谱纯, 山东禹王试剂公司); 水为重蒸水; 其余试剂均为分析纯。

麻花秦艽花药材于 2009-08 采自青海省境内, 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为麻花秦艽 *Gentiana straminea* Maxim. 的花。

2 方法与结果

2.1 HPLC 含量测定

2.1.1 色谱条件及系统适应性试验 色谱柱: Fusion-RP 80 A C₁₈ 柱(150 mm×4.6 mm 5 μm); 流动相: 甲醇-水(30:70); 流速为 1.0 ml·min⁻¹; 柱温: 30℃; 检测波长: 270 nm。理论塔板数按龙胆苦苷峰计算应不低于 3 000。龙胆苦苷标准品色谱图见图 1。

2.1.2 对照品溶液的制备 精密称取龙胆苦苷对照品 4 mg 置于 10 ml 容量瓶中, 加甲醇溶解, 稀释至刻度, 摇匀, 得浓度为 0.4 mg/ml 的龙胆苦苷对照品溶液, 过 0.45 μm 的微孔滤膜过滤后作为对照品溶液。

2.1.3 供试品溶液的制备 取麻花秦艽花样品约 0.5 g, 精密称定, 置 250 ml 平底烧瓶中, 加入 20 ml 甲醇, 置微波实验仪中, 回流搅拌提取 20 min, 冷却至室温, 滤过, 滤液收集到 50 ml 容量瓶

中, 用甲醇定容至刻度, 摇匀, 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 即得供试品溶液。

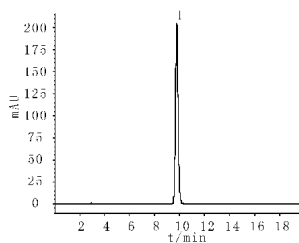


图 1 标准品色谱图 1-龙胆苦苷

2.1.4 线性关系考察 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, 得回归方程为: $Y = 1\,429.075X + 42.55$, $r = 0.999\,9$, 龙胆苦苷在 0.4~3.6 μg 范围呈良好的线性关系。

2.1.5 精密度实验 分别精密吸取上述对照品溶液 5 μl, 按上述色谱条件连续进样 5 次, 记录龙胆苦苷的峰面积。计算 RSD 为 1.24%, 表明仪器精密度良好。

2.1.6 重复性实验 按样品溶液制备方法处理同一样品 5 份, 各吸取 5 μl, 按上述色谱条件测定, 记录龙胆苦苷的峰面积。计算 RSD 为 1.68%, 表明实验方法的重复性良好。

2.1.7 稳定性实验 取同一供试品溶液分别在 0, 2, 4, 8, 16 h 按上述色谱条件测定, 记录龙胆苦苷的峰面积, 计算龙胆苦苷峰的保留时间和相对峰面积。结果表明, 龙胆苦苷峰相对保留时间和相对峰面积稳定, 计算 RSD 分别为 1.74% 和 1.02%, 表明样品溶液至少在 16 h 内稳定。

2.1.8 加样回收率实验 采用加样回收法。精密称取已知含量的药材适量, 分别精密加入一定量的龙胆苦苷对照品, 按供试品制备与测定方法, 在上述色谱条件下, 平行做 5 组, 结果测得其平均回收率为 101.02%, RSD 为 1.18%。

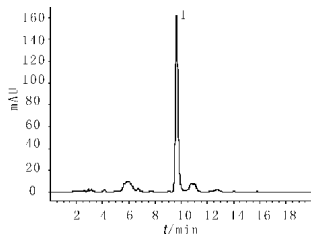
2.1.9 样品测定结果 依上述方法(样品色谱图见图 2), 测定 11 批麻花秦艽花药材中龙胆苦苷的含量。结果见表 1。

2.2 薄层鉴别 精密称取本品药材粉末 0.5 g(过 60 目筛)置 250 ml 平底烧瓶中, 加入 20 ml 甲醇, 置微波实验仪中, 回流搅拌提取 20 min, 冷却至室温, 滤过, 减压回收至干, 加入 5 ml 甲醇溶解, 作为供试品溶液。吸取 0.4 mg/ml 的龙胆苦苷对照品溶液和供试品溶液各 5 μl, 分别点于同一硅胶 GF₂₅₄ 薄层板上, 以醋酸乙酯-甲醇(3:1)为展开剂, 碘蒸气显色, 供试品色谱中, 在与对照品色谱相对应的位置上, 显相同颜色的斑点(薄层色谱图见图 3)。

收稿日期: 2010-04-28; 修订日期: 2010-11-03

基金项目: 青海省科技厅重点科技攻关(No. 2007-N-136)

作者简介: 张兴旺(1982-), 男(汉族), 山东德州人, 现为在读硕士研究生, 主要从事中藏药研究开发工作。



1 - 龙胆苦苷
图 2 样品色谱图

表 1 11 批麻花苜花药材中龙胆苦苷的含量 %

样品批次	采集地点	含量 %
1	大通	5.02
2	互助北山	5.41
3	吉尔孟乡	5.51
4	祁连路场	4.65
5	油葫芦沟	3.88
6	拉脊山	4.72
7	橡皮山	5.92
8	默勒镇	5.38
9	舟群乡	5.09
10	西海镇	6.13
11	关角山	4.52

3 讨论

3.1 药材选择 青海地处青藏高原,有其独特的地理优势,所产药材质量较好,所以我们选择了青海省境内不同地点的 11 批次药材作为样品,进行了相关质量标准研究,综合考虑,规定藏药秦艽花中龙胆苦苷的含量不得低于 2%。

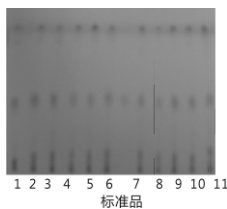


图 3 薄层色谱图

3.2 HPLC 法讨论

3.2.1 提取方法的选择 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: 11 批次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^[3-7]。实验过程中还比较了提取 10 20 30 min 对药材提取率的影响,结果表明 20 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 对样品进行提取制样。

3.2.2 色谱条件的优化 本实验通过摸索甲醇与水按一定比例混合作为流动相,考察其分离度,结果以甲醇-水(30:70)为流动相,流速 1.0 ml/min,柱温 30℃的色谱条件下样品中龙胆苦苷峰与其他共存组分峰能达到良好的分离,故本实验最终确定此色谱条件。

3.3 TLC 鉴别讨论

3.3.1 本实验首次以麻花苜花中含量较高的龙胆苦苷为对照品,对其进行薄层定性鉴定,操作简便、结果可靠,薄层色谱图清晰。

3.3.2 通过对比不同比例的醋酸乙酯-甲醇(2:1;3:1;4:1) 醋酸乙酯-甲醇-水(20:2:1)等不同展开剂,结果表明醋酸乙酯-甲醇(3:1)能展开清晰斑点且 Rf 值适中为 0.49,故采用此展开剂。

本实验首次建立了秦艽花药材中龙胆苦苷的 HPLC 含量测定方法和 TLC 定性鉴别方法,该方法操作简便、结果可靠、重现性好,可完善现行《中华人民共和国卫生部药品标准(藏药)(第 1 册)》中秦艽花药材的质量控制。

参考文献:

[1] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中华人民共和国卫生部药品标准(藏药,第 1 册). [S].
 [2] 张西玲,晋玲,刘丽莎. 濒危药用植物秦艽的资源利用与保护[J]. 中药研究与信息 2003 5(9): 27.
 [3] Garcia - ayuso L E, Velasco J, Dobarganesm C, et al. Determination of the oil content of seeds by focused microwave - assisted soxhlet extraction[J]. 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 [J]. Chromatographia 2001, 53 (7/8): 375.
 [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 Chromatography: 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[J]. 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[J]. 分析测试学报 2007 26(6): 884.

(上接第 1634 页)

[6] 邢 岩,李智慧,田庆伟,等. 番茄红素对实验性高脂血症小鼠的保护作用[J]. 中国食品添加剂实验研究 2007 4: 81.
 [7] 陈 奇. 中药药理研究方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 521.
 [8] 李来祥,陈满盛. 消痰化浊降脂汤治疗高脂血症 80 例临床研究[J]. 甘肃中医学院学报 2002 19(4): 24.
 [9] 范玉坤. 化滞灵治疗高脂血症动脉粥样硬化的实验研究[J]. 中医临床杂志 2005 17(5): 459.
 [10] 张 庆,邵华强,谷 艳,等. 芪丹合剂对高脂血症大鼠血清 ET 和 CGRP 的影响[J]. 实用医药杂志 2005 22(10): 911.
 [11] 毛孙忠,范小芳,吴小脉,等. 麦绿素对实验性高脂血症大鼠血脂及

MDA、SOD、ET-1、NO 的影响[J]. 食品科学 2007, 28(1): 306.
 [12] 马 巍,滕雅轩. 血脂康对冠心病并高脂血症患者血管内皮功能及 CRP 的影响[J]. 辽宁医药 2005 2: 22.
 [13] 廖 伟,廖永玲,施守义. 血脂康对血脂及血清内皮素、血栓烷 B2、6-酮前列腺素水平的影响[J]. 临床荟萃 2004 19(7): 384.
 [14] 张唐法,万文俊,张红星,等. 电针丰隆穴治疗高脂血症的多中心观察[J]. 中国临床康复, 2006 10(19): 18.
 [15] 陈太福. 三阴交为主针刺治疗单纯性高脂血症[J]. 黑龙江中医药, 2003 1: 44.
 [16] 吴红军,傅莉萍,王瑞华. 穴位注射治疗高脂血症疗效观察[J]. 上海针灸杂志 2005 24(8): 26.