

HPLC 法同时测定 2 种獐牙菜中 4 种苷类成分

靳有才^{1,2}, 肖远灿^{1,2}, 邹小艳^{1,2}, 吕坪^{1,2}, 杜玉枝¹, 魏立新^{1*}

(1. 中国科学院西北高原生物研究所, 青海西宁 810001; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要 建立并检测印度獐牙菜和川西獐牙菜中獐牙菜苦苷、龙胆苦苷、芒果苷、异荛草苷 4 种苷类成分含量的反相高效液相色谱分析法。结果表明, 该方法简单、准确、快速, 可作为獐牙菜类药材的质量控制依据。

关键词 印度獐牙菜; 川西獐牙菜; 獐牙菜苦苷; 龙胆苦苷; 芒果苷; 异荛草苷; HPLC

中图分类号 Q946 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2007)07-01889-02

Determination of Four Glycoside Constituents in Two Kinds of Swertia by HPLC

JIN Yourcai et al (Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining, Qinghai 810001)

Abstract A method for the determination of four glycoside constituents both in Swertia chirata and wild and cultivated Swertia mussotii has been set up by HPLC. The results show that the method is simple, accurate and quick, and is available for quality control of Swertia herbs.

Key words Swertia chirata; Swertia mussotii; Swertiamarin; Gentipicroside; Mangiferin; Isorientin; HPLC

印度獐牙菜 (*Swertia chirata*) 和川西獐牙菜 (*Swertia mussotii*) 系龙胆科獐牙菜属植物, 是藏医广泛应用的两种蒂达类药材。两者皆具有清肝利胆, 清热解毒的功效。主治肝炎、胆热及血热症^[1]。蔡乐、孙洪发等分别对印度獐牙菜和川西獐牙菜进行了研究并分离鉴定了多种苷类及其他化合物^[2-5]。现代药理学试验证明, 獐牙菜中的獐牙菜苦苷具有镇痛、解挛、健胃、抗肿瘤作用, 龙胆苦苷可保肝、抗炎、抗疟原虫、促进毛发生长, 芒果苷和异荛草苷具有保肝、抗氧化、降血糖、抗炎等作用^[6-8]。这 4 种苷类物质含量高, 性质稳定, 可作为獐牙菜类药材质量控制的依据。但对獐牙菜中以上 4 种代表性苷类成分同时 HPLC 测定的文章尚未出现, 为此笔者建立了同时测定这两种獐牙菜中这 4 种苷类的梯度洗脱 HPLC 分析方法, 对辨别药材的真伪, 质量评价和新药源的开发具有重要意义。

1 仪器、试剂与材料

1.1 仪器与试剂 仪器: Agilent1100 型高效液相色谱仪 (G1379A degasser, G1312A pump, G1316A column heater, G1315B DAD); 手动进样器, Agilentchem 色谱工作站; Simplicity Millipore 超纯水器; 中兴 FW-100 高效万能粉碎机; 昆山 KQ-2500E 型数控超声波清洗器。试剂: 獐牙菜苦苷 (批号 0785-200203)、龙胆苦苷 (批号 110770-200510)、芒果苷 (批号 111607-200301) 标准品购自中国生物制品检定所; 异荛草苷标准品由中国科学院西北高原生物研究所胡凤祖提供, 纯度 98%; 甲醇为色谱纯; 其他均为分析纯; 水为 Millipore 超纯水器所制超纯水。

1.2 材料 试验用野生印度獐牙菜在尼泊尔采集; 野生川西獐牙菜采自青海省玉树州通天河两岸; 栽培川西獐牙菜采自中国科学院西北高原生物研究所试验田。所用材料由该所刘尚武研究员鉴定。试验取采集样品全株, 自然阴干。样品概况如表 1 所示。

1.3 色谱条件 Agilent Zorbax Eclipse XDB-C18(4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱, 流动相: 甲醇-水 (含 0.04% 乙酸) 体系, 在 0~30 min 内由 25:75~35:65 线性梯度洗脱, 流速 1 ml/min, 柱

温 25℃。检测波长为 240 nm。

表 1 印度獐牙菜和川西獐牙菜样品

样品名	采样时间	生长期	年	采集地	海拔 m
野生印度獐牙菜	2005-10	2		尼泊尔	1 700
野生川西獐牙菜	2006-08	2		玉树	3 765
栽培川西獐牙菜	2006-08	2		西宁	2 246

1.4 样品溶液的制备 称取经自然干燥粉碎后过 60 目筛的样品 0.500 0 g 至 50 ml 带塞三角瓶中, 加入甲醇 50 ml, 25℃ 超声提取 1 h, 过滤。滤液用甲醇定容至 50 ml 容量瓶中, 过 0.45 μm 有机滤膜, 即为样品溶液。

2 方法与结果

2.1 检测波长的选择 獐牙菜苦苷, 龙胆苦苷为环烯醚萜苷类, 芒果苷为山酮苷类, 异荛草苷是黄酮苷类。其紫外最大吸收各不相同, 在参考相关文献^[9-12]后选择 210、240、254、270、360 nm 5 个波长, 在 1.3 节色谱条件下分析色谱图, 以 240 nm 波长峰形较好, 基线平稳, 故检测波长定为 240 nm。

2.2 标准曲线的绘制和精密度试验 依据待测样品含量范围分别配制含有不同质量浓度的 4 种苷类对照品溶液, 以相应组分的色谱峰面积 Y 对其含量 X (mg) 绘制标准曲线。将混合标准品溶液进样 10 μl, 连续进样 5 次。测定各峰面积, 计算精密度。结果如表 2 所示。

2.3 回收率试验 称取栽培川西獐牙菜样品 0.5 g 各 5 份, 分别加入 0.53 mg/ml 獐牙菜苦苷 0.8 ml, 0.216 mg/ml 龙胆苦苷 0.6 ml, 0.36 mg/ml 芒果苷 0.8 ml, 0.12 mg/ml 异荛草苷 0.4 ml。按 1.4 方法制备样品溶液, 进样 10 μl。测定后计算得各成分的平均回收率 ($n=5$) 为: 獐牙菜苦苷 98.4% ($RSD=3.62\%$), 龙胆苦苷 97.8% ($RSD=3.14\%$), 芒果苷 102.3% ($RSD=4.81\%$), 异荛草苷 98.7% ($RSD=3.18\%$)。

表 2 4 种苷类对照品标准曲线 ($n=5$)

对照品	线性范围 μg	线性	相关系数	RSD %
獐牙菜苦苷	0.009 5~2.90	$Y=12 021 X+13.383$	$R=0.999 9$	1.71
龙胆苦苷	0.004 8~2.56	$Y=12 459 X+15.351$	$R=0.999 9$	2.72
芒果苷	0.005 6~2.00	$Y=23 309 X-15.966$	$R=0.999 9$	2.00
异荛草苷	0.005 0~1.80	$Y=3 501.9 X+2.622$	$R=0.999 8$	1.85

作者简介 靳有才 (1981-), 男, 青海互助人, 硕士研究生, 研究方向: 药用植物化学。* 通讯作者。

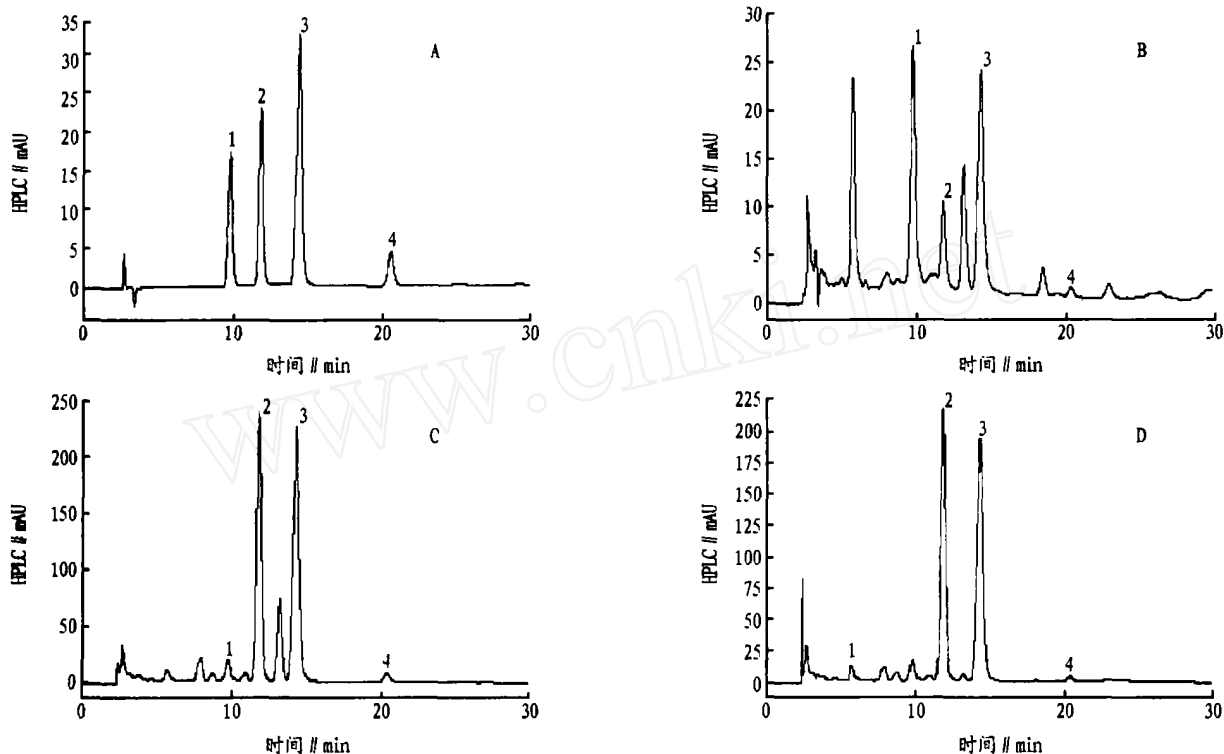
收稿日期 2006-11-30

2.4 重现性试验 在相同的色谱条件下,对野生印度獐牙菜样品按1.4方法平行制备5份,分别进样10 μ l,按外标法测定含量并计算RSD,獐牙菜苦苷0.15%($n=5$)、龙胆苦苷1.37%($n=5$)、芒果苷0.40%($n=5$)、异荭草苷0.97%($n=5$)。

2.5 样品含量的测定 选择野生印度獐牙菜和野生与栽培川西獐牙菜。按1.4方法制备样品溶液,进样10 μ l,进行4种苷类成分的比较研究,结果见表3。对照品和样品色谱如

图1所示。

样品名称	mg/g				总量
	獐牙菜苦苷	龙胆苦苷	芒果苷	异荭草苷	
野生印度獐牙菜	4.61	1.21	2.72	0.62	9.18
野生川西獐牙菜	3.53	40.86	26.35	7.00	77.74
栽培川西獐牙菜	3.30	38.10	23.23	3.77	68.40



注:A 标准品,B 野生印度獐牙菜,C 野生川西獐牙菜,D 栽培川西獐牙菜;1 獐牙菜苦苷,2 龙胆苦苷,3 芒果苷,4 异荭草苷。

图1 野生和栽培印度獐牙菜和川西獐牙菜中4种苷类的HPLC

3 讨论

(1) 建立用高效液相色谱法同时测定印度獐牙菜和川西獐牙菜中4种代表性苷类有效成分的分析方法。流动相:甲醇-水(含0.04%乙酸)体系,在0~30 min内由25:75~35:65线性梯度洗脱,流速1 ml/min,柱温25 $^{\circ}$ C。检测波长为240 nm。在此条件色谱条件下,分离度好,杂峰干扰少,完全出峰时间在25 min内,该方法快速、准确、可靠,具有很高的实用价值。

(2) 萃取溶剂及流动相的选择。生产中印度獐牙菜和川西獐牙菜一般采用乙醇来提取其有效成分,在制备样品时曾用95%、85%、70%、50%和蒸馏水5种不同乙醇浓度溶液索氏法提取2 h。结果在上述色谱条件下50%以上乙醇溶液无法达到基线分离,流动相改为不同比例及梯度的(乙腈-水)也无法使各物质彼此分开。50%乙醇提取液虽能够分开,但峰形不好。蒸馏水提取物虽然能够分开,但也将大量的蛋白质、多糖、淀粉提出,为进一步的纯化分离造成困难,且提取物易于霉烂。使用甲醇超声1 h就可提取完全。

(3) 样品中4种苷类的含量。从样品的测定结果来看,野生和栽培川西獐牙菜比野生印度獐牙菜4种苷类的总含量高。野生川西獐牙菜、栽培川西獐牙菜4种苷类的总含量

分别是野生印度獐牙菜的8.47、7.45倍。而野生印度獐牙菜中獐牙菜苦苷的含量要比野生和栽培川西獐牙菜高出30.6%、39.7%。

参考文献

- [1] 中华本草编委会. 中华本草[M]. 上海:上海科学技术出版社,1999:68-69,145.
- [2] 蔡乐,王曙,李涛,等. 印度獐牙菜的化学成分研究[J]. 华西药学杂志,2006,21(2):111-113.
- [3] 史高峰,鲁润华,杨云棠,等. 印度獐牙菜挥发油化学成分的研究[J]. 西北植物学报,2004,24(2):296-300.
- [4] 孙洪发,胡伯林,丁经业,等. 川西獐牙菜苷类化学成分研究[J]. 植物学报,1991,33(1):31-37.
- [5] 孙洪发. 川西獐牙菜中的山酮成分[J]. 植物学报,1981,23(6):123-126.
- [6] 陈千良. 环烯醚萜类研究进展[J]. 国外医药 植物药分册,2003,18(2):58-62.
- [7] 赵李剑. 川东獐牙菜苦苷类成分的提取及其体外抗肿瘤作用研究[J]. 中医药导报,2006,12(5):62-64.
- [8] SHI V J, BANERJ, TAPAS K S. Assessment of the anti-inflammatory effect of Swertia chirata in acute and chronic experimental models in male Albino rat [J]. India Journal of pharmacology, 2000, 32:21-24.
- [9] 孙菁,李玉林,纪兰菊,等. 不同生长季节下藏药麻花秦苁活性成分含量研究[J]. 云南植物研究,2006,28(2):219-222.
- [10] 李玉林,丁晨旭,刘健全,等. 红直獐牙菜中苷类成分[J]. 中草药,2002,33(2):104.
- [11] 林鹏程,兆兆辉,卢永昌,等. HPLC法测定獐牙菜及其近缘植物中4种有效成分的含量[J]. 药物分析杂志,2004,24(5):502-505.