

HPLC 测定四川及青海地区獐牙菜植物 中6种主要成分的含量

保怡^{1,2}, 吉文鹤¹, 马玉花¹, 纪兰菊^{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 100039)

【摘要】 目的:建立反相高效液相色谱法同时测定四川及青海地区部分獐牙菜中獐牙菜苦苷、龙胆苦苷、芒果苷、当药醇苷、异荛草苷、1,8-二羟基-3-甲氧基吡啶酮的含量。方法:采用 RP-HPLC, 使用 Kromasil C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 柱; 流动相甲醇-水(含 0.02% 磷酸); 梯度洗脱程序为 0~50 min, 甲醇的体积分数(下同)由 20% 上升至 80%; 50~55 min 由 80% 增至 100%; 55~60 min 为 100%, 流速 1 mL · min⁻¹, 检测波长 254 nm; 柱温 35 °C。结果:6 种成分均达到基线分离, 线性良好。结论:该方法快速、准确、重复性好, 为该类药材的人药提供了理论依据。

【关键词】 RP-HPLC; 獐牙菜苦苷; 龙胆苦苷; 芒果苷; 当药醇苷; 异荛草苷; 1,8-二羟基-3-甲氧基吡啶酮; 含量
【中图分类号】 R 284.1 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1001-5302(2006)24-2036-03

獐牙菜为龙胆科獐牙菜属 *Swertia* 数种植物的全草, 广泛分布于西藏、青海、四川等地区。主要用于治疗各种急慢性肝炎、肝硬化、肝腹水等各种肝胆疾病^[1]。纪兰菊等^[2] 对其化学成分做了综述性报道, 证明化学成分比较复杂, 其含量测定多为薄层扫描或高效液相色谱法^[3-5] 测定水溶性化学成分, 较少有同时测定水溶及脂溶性成分的报道, 而许多獐牙菜中含有较多的 1,8-二羟基-3-甲氧基吡啶酮, 另外, 尚未见到有关獐牙菜中的含量测定中涉及化学成分异荛草苷的报道。本试验不仅测定了常见的水溶性的獐牙菜苦苷 (swertiamarin)、龙胆苦苷 (gentiopicroside)、芒果苷 (mangiferin)、当药醇苷 (swertianolin) 的含量, 而且首次同时测定了异荛草苷 (isoorientin) 和脂溶性成分 1,8-二羟基-3-甲氧基吡啶酮 (1,8-dihydroxy-3-methoxy-xthanone) 的含量, 对评价药材质量及新药源的研究具有指导意义。

1 仪器与试剂

LC-10AT_{vp} 二元泵 (岛津公司), Rheodyne 7725 进样器 (美国), SPD-M10AVP 二极管阵列检测器 (岛津公司), Class-VP 液相色谱工作站 (岛津公

司), Milli-Q 超纯水装置。獐牙菜苦苷、龙胆苦苷购自中国药品生物制品检定所; 芒果苷、当药醇苷、异荛草苷、1,8-二羟基-3-甲氧基吡啶酮为中国科学院西北高原生物研究所孙洪发教授赠送, 纯度经归一化法测定, 均大于 98%。水为重蒸水并经 0.45 μm 滤膜过滤; 甲醇 (山东禹王试剂公司) 为色谱纯; 其他试剂均为分析纯。

样品来源: 四川产大籽獐牙菜 *S. macrosperma*、川西獐牙菜 *S. mussoitii* (花期)、毛獐牙菜 *S. pubescens*、獐牙菜 *S. bimaculate*、川西獐牙菜 (蕾前) 由中国科学院成都生物所丁立生研究员提供, 玉树产川西獐牙菜分别于 2003 年 8 月和 2004 年 9 月采于青海省玉树州, 獐牙菜植物样品经中国科学院西北高原生物研究所卢学峰研究员鉴定, 阴干后粉碎过 40 目筛。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱为 Kromasil C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相为甲醇-0.02% 磷酸水溶液, 梯度洗脱, 0~50 min, 甲醇 20%~80%; 50~60 min, 甲醇至 100%; 检测波长 254 nm; 流速 1 mL · min⁻¹; 柱温 35 °C。

2.2 对照品和供试品溶液的配制 对照品溶液的制备: 精确称取獐牙菜苦苷 1.9 mg、龙胆苦苷 2.3 mg、芒果苷 1.4 mg、当药醇苷 2.2 mg、异荛草苷 2.2 mg、1,8-二羟基-3-甲氧基吡啶酮 2.3 mg 于 10 mL 量瓶

【收稿日期】 2005-01-24

【基金项目】 青海省重点科技攻关项目 (2004-N-142); 国家中西部重点项目 (2001BA901A47)

【通讯作者】 * 纪兰菊, Tel: (0971) 8010092, E-mail: jilanju@eyou.com

中,甲醇定容至刻度,得相应浓度的对照品溶液。

供试品溶液的制备:参考文献[5],将獐牙菜植物样品粉碎成细粉,精密称取各待测样品 1.0 g 于 100 mL 锥形瓶中,加入 20 mL 的甲醇,称重,于 80 ℃ 水浴上回流提取 2 h,冷却至室温后,重新称重,补

足散失的甲醇,然后过 0.45 μm 滤膜,备用。

2.3 线性试验 精密吸取对照品溶液 4, 8, 12, 16, 20 μL,按上述色谱条件测定。以相应组分的色谱峰面积(X)对其含量(Y)进行线性回归,得6种成分的回归方程、相关系数及线性范围,见表1。

表1 6种成分的回归方程、相关系数及线性范围

成分	线性范围/μg	回归方程	r
獐牙菜苦苷	0.19~3.80	$Y=0.751+2.28 \times 10^{-7}X$	0.999 8
龙胆苦苷	0.23~4.60	$Y=0.919+1.73 \times 10^{-6}X$	0.999 1
芒果苷	0.14~2.80	$Y=-0.544+2.61 \times 10^{-7}X$	0.999 6
当药醇苷	0.22~4.40	$Y=0.856+2.39 \times 10^{-7}X$	0.998 9
异荭草苷	0.22~4.40	$Y=0.839+4.33 \times 10^{-7}X$	0.999 5
1,8-二羟基-3-甲氧基吡啶	0.19~3.80	$Y=0.396+2.51 \times 10^{-7}X$	0.999 7

2.4 精密度试验 精确吸取上述各对照品溶液,进样 20 μL,重复5次,计算峰面积的RSD,獐牙菜苦苷 0.8%,龙胆苦苷 1.3%,芒果苷 0.9%,当药醇苷 2.4%,异荭草苷 1.0%,1,8-二羟基-3-甲氧基吡啶 0.4%。

2.5 重复性试验 精密称定同一批样品,按供试品溶液制备方法分别制备5份供试品溶液,进行重复性实验,算出6种物质的含量,计算各物质含量的RSD,獐牙菜苦苷 2.3%,龙胆苦苷 2.4%,当药醇苷 2.2%,芒果苷 2.7%,异荭草苷 2.1%,1,8-二羟基-3-甲氧基吡啶 0.5%。

2.6 稳定性试验 取上述供试品溶液,分别间隔2 h 进样,每次 20 μL,重复5次,计算峰面积的RSD,獐牙菜苦苷 1.4%,龙胆苦苷 1.3%,芒果苷 1.2%,当药醇苷 1.4%,异荭草苷 1.3%,1,8-二羟基-3-甲

氧基吡啶 1.1%,表明样品在 10 h 内稳定。

2.7 回收率试验 精确称取已知含量的川西獐牙菜样品各5份,加入一定量的对照品,按样品处理方法制备并进样 20 μL,计算各对照品的平均加样回收率。结果獐牙菜苦苷 102.1% (RSD 4.1%),龙胆苦苷 97.1% (RSD 3.2%),芒果苷 101.8% (RSD 3.0%),当药醇苷 98.4% (RSD 2.8%),异荭草苷 99.4% (RSD 2.7%),1,8-二羟基-3-甲氧基吡啶 102.9% (RSD 2.6%)。

2.8 样品测定 按供试品溶液的制备方法,对所有獐牙菜样品进行了定量提取,在限定的色谱条件下进行了6种药效成分的含量测定。取峰面积的平均值,按标准曲线计算含量,结果见表2,对照品与样品色谱图如图1所示。

表2 样品中6种成分含量(n=3)

品种	来源	1	2	3	4	5	6
大籽獐牙菜	四川	-	-	0.35	0.33	-	-
川西獐牙菜(花期)	四川	0.47	2.35	1.07	1.07	0.31	0.43
毛獐牙菜	四川	0.40	1.19	0.15	0.17	-	-
獐牙菜	四川	0.73	2.44	0.97	-	-	-
川西獐牙菜(蕾前)	四川	0.69	-	0.21	0.34	-	1.73
川西獐牙菜花(果期)	青海玉树	0.49	2.29	0.66	-	0.39	-
川西獐牙菜(花期)	青海玉树	-	6.95	1.98	-	0.74	-
大籽獐牙菜	西藏	-	-	-	0.15	-	-
毛獐牙菜	西藏	-	1.19	0.30	-	0.24	-

注:1. 獐牙菜苦苷;2. 龙胆苦苷;3. 芒果苷;4. 当药醇苷;5. 异荭草苷;6. 1,8-二羟基-3-甲氧基吡啶

3 讨论

3.1 由于獐牙菜属植物种类较多,其化学成分含量分布及差别也较大,除龙胆苦苷和獐牙菜苦苷只在大多数獐牙菜属植物中存在外^[4,5],目前还没有发现一种成分在所有獐牙菜中同时存在,说明其化学

成分的复杂性。

3.2 川西獐牙菜由于产地和采集日期不同,主要成分差异较大。值得注意的是四川西北地区与青海玉树地区虽同为青藏高原,但两地的化学成分差异较大,四川产含当药醇苷,而青海玉树产则不含当药醇

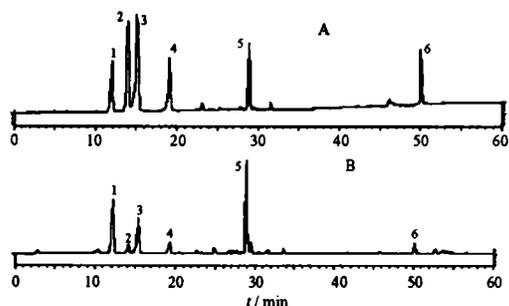


图1 对照品(A)及獐牙菜样品(B)的HPLC图

1. 獐牙菜苦苷; 2. 龙胆苦苷; 3. 芒果苷; 4. 异荛草苷;
5. 当药醇苷; 6. 1,8-二羟基-3-甲氧基吡喃

苷,造成这种差异的原因是否与生境有关有待于

进一步研究。

【参考文献】

- [1] 杨永昌,何廷农,卢生莲,等. 藏药志[M]. 西宁:青海人民出版社,1991:111.
- [2] 纪兰菊,廖志新,孙洪发. 青海龙胆科部分藏药植物化学成分研究进展[J]. 高原生物学集刊,2002,15:243.
- [3] 宋娅莉,胡凤祖,林鹏程,等. 川西獐牙菜与抱茎獐牙菜中吡喃的高效液相色谱分析[J]. 色谱,2004,22(1):51.
- [4] 高光跃,李鸣,冯毓秀. 11种獐牙菜及近缘植物中有效成分的高效液相色谱分析[J]. 药学学报,1994,29(12):910.
- [5] 纪兰菊,保怡,冯桂琛,等. 15种獐牙菜属植物中主要药用成分的高效液相色谱测定[J]. 西北植物学报,2004,24(7):1298.

Simultaneous determination of six main constituents in *Swertia* of Qinghai province and Sichuan province by HPLC

BAO Yi^{1,2}, JI Wen-he¹, MA Yu-hua¹, JI Lan-ju¹

(1. Northwest Plateau Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810001, China;

2. Graduate School, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a quantitative method of simultaneously determination of swertiamarin, gentiopicroside, mangiferin, swertianolin, isoorientin, 1,8-dihydroxy-3-methoxy-xthanone in *Swertia* from Qinghai province and Sichuan province by HPLC. **Method:** The samples were separated on the column of Kromasil C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) which eluted with methanol and water (content 0.02% phosphoric acid). The ratio of methanol increased from 20% to 80% during 20-50 min, and from 80% to 100% during 50-60 min, with detected wavelength 254 nm, flow rate at 1 mL · min⁻¹, column temperature 35 °C. **Result:** Six compounds were base-isolated, the linear ranges of swertiamarin, gentiopicroside, mangiferin, 4-swertianolin, 5-isoorientin, 1,8-dihydroxy-3-methoxy-xthanone were excellent. **Conclusion:** The method was rapid and precise, and can be use for controlling medicinal materials quality.

[Key words] RP-HPLC; swertiamarin; gentiopicroside; mangiferin; swertianolin; isoorientin; 1,8-dihydroxy-3-methoxy-xthanone; constituents

[责任编辑 张宁宁]

《中国中药杂志》征订启事

《中国中药杂志》系中国科协主管,中国药学会主办,中国中医科学院中药研究所承办的综合性中药学术期刊。

为中国创刊最早、发行量最大的中药学术刊物,全面反映我国中医药科研最高学术水平。主要报道该领域新成果、新技术、新方法与新思路,内容包括栽培、资源与鉴定、炮制、药剂、化学、药理、不良作用以及中医药理论与临床等。设有专论、综述、研究论文、研究报告、临床、学术探讨、经验交流、信息等栏目。在国际上被 MEDLINE, CA, BA, IPA, AA 等权威数据库和文摘收录;在国内被各主要有关数据库收录,为中国自然科学核心期刊、中国中文核心期刊、中国科技论文统计源核心期刊。

荣获第三届国家期刊奖百种重点期刊,第五届中国百科杰出学术期刊。

适于从事中医药科研、管理、生产、教学及医院药房、临床等专业人员订阅。本刊为半月刊,大16开,80页,每期定价12元(全年288元)。国内邮发代号2-45,国外邮发代号SM399。欢迎广大读者通过当地邮局或直接向本刊编辑部订阅。

编辑部地址:北京市东直门内南小街16号,邮编:100700。

电话:(010)64045830;传真:(010)84038684。