

HPLC 法测定野生与栽培藏药麻花苳中 4 种环烯醚萜苷类成分的含量*

孙菁^{1,2}, 陈桂琛^{1**}, 李玉林^{1,2}, 索有瑞¹, 马玉花^{1,2}

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

摘要 目的:对野生和栽培藏药麻花苳中龙胆苦苳、落干酸、獐牙菜苦苳和獐牙菜苳 4 种苦苳类成分进行高效液相色谱的含量测定, 并比较分析它们之间的差异。**方法:**采用 Eclipse XDB - C₈ 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm), 流动相 A 为 95% 乙腈水溶液, B 为 5% 乙腈(含 10 mmol · L⁻¹ 的甲酸)水溶液, A 在 0 ~ 20 min 内比例由 0 → 100% 进行线性洗脱, 流速 1.0 mL · min⁻¹, 检测波长 240 nm, 柱温 30 °C。**结果:**4 种成分均达到基线分离, 龙胆苦苳、落干酸、獐牙菜苦苳、獐牙菜苳的线性范围分别为 0.60 ~ 19.20 μg ($r=0.9999$), 0.24 ~ 7.68 μg ($r=0.9999$), 0.38 ~ 12.02 μg ($r=0.9999$), 0.05 ~ 1.66 μg ($r=0.9999$); 回收率分别为 99.73%, 98.13%, 98.45%, 96.22%。**结论:**栽培藏药麻花苳中苦苳类成分的含量已经接近或超过野生种的水平, 可初步代替野生药材入药。

关键词:高效液相色谱; 麻花苳; 龙胆苦苳; 落干酸; 獐牙菜苦苳; 獐牙菜苳; 野生; 栽培

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254 - 1793 (2006) 10 - 1373 - 04

HPLC simultaneous determination of four iridoid glycosides in wild and cultivated *Gentiana straminea* Maxim.*

SUN Jing^{1,2}, CHEN Gui - chen^{1**}, LI Yu - lin^{1,2}, SUO You - rui¹, MA Yu - hua^{1,2}

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

2. Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract Objective: To determinate the contents of four iridoids glycosides, gentiopicroside, loganic acid, swertiamarin and sweroside in wild and cultivated *Gentiana straminea* Maxim. by HPLC. **Method:** The samples were separated on an Eclipse XDB - C₈ column(4.6 mm × 150 mm, 5 μm) with 95% acetonitrile (A) and 5% acetonitrile (10 mmol · L⁻¹ formic acid) (B) gradient elution with flow rate at 1.0 mL · min⁻¹. Mobile phase(A) increased from 0 to 100% in 20 min with UV detection at 240 nm and column temperature at 30 °C. **Results:** Four compounds were isolated on base line. The linear ranges of iridoids, gentiopicroside, loganic acid, swertiamarin and sweroside were 0.60 - 19.20 μg ($r=0.9999$), 0.24 - 7.68 μg ($r=0.9999$), 0.38 - 12.02 μg ($r=0.9999$), 0.05 - 1.66 μg ($r=0.9999$), respectively. The average recoveries were 99.73%, 98.13%, 98.45% and 96.22%, respectively. **Conclusions:** The contents of four iridoid glycosides in cultivated *Gentiana straminea* have reached or exceeded those in the wild one. Therefore, it is preliminarily feasible for the cultivated *G. straminea* used as a herbal medicine to replace the wild one.

Key words: HPLC; *Gentiana straminea*; gentiopicroside; loganic acid; swertiamarin; sweroside; wild; cultivated

麻花苳 (*Gentiana straminea* Maxim.) 为龙胆科 (Gentianaceae) 龙胆属多年生草本植物, 其以根入药, 为常用的上品藏药, 是藏药中重要的解吉类植物药物之一^[1], 2005 年版中国药典中将其列入 4 种入药的秦艽类药物。麻花苳根中的有效成分主要为苦

苳类^[2], 对该类成分的分离鉴定、药理、分析等方面已有大量的研究工作^[2-6], 近年来的研究主要集中于其有效成分的定量分析^[7,8]。但是有关野生与栽培麻花苳中 4 种苦苳类成分, 即龙胆苦苳 (gentiopicroside)、落干酸 (loganic acid)、獐牙菜苦苳 (swer-

* 国家中西部专项 (2001BA901A47) 与中国科学院知识创新工程领域前沿项目 (CXLY - 2002 - 08) 共同资助

** 通讯作者 Tel: (0971) 6143900; E - mail: gchchen@nwipb.ac.cn

tiamarin)、獐牙菜苷 (sweroside) 含量测定的研究尚未见报道。同时, 由于近年来用药量的需求增大, 加之多年的过度采挖, 造成野生麻花艽资源量的锐减。对麻花艽进行人工引种栽培以扩大其资源量已成为一个亟待解决的问题。因此, 本实验通过紫外检测的 HPLC 法建立了测定野生与栽培麻花艽中 4 种苦苷类成分含量的方法, 为合理开发利用麻花艽资源, 确保其品质以及栽培措施的可行性提供科学依据。

1 仪器、试剂与材料

Agilent 1100 型高效液相色谱仪: 四元梯度泵, DAD 检测器, 100 位自动进样器, Eclipse XDB - C₈ 色谱柱 (4.6 mm × 150 mm, 5 μm)。KQ - 200B 型数控超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司), Milli - Q 超纯水系统 (美国 Millipore 公司)。

色谱纯乙腈 (德国 Merck 公司); 分析纯甲醇、甲酸 (山东莱阳化工厂)。

龙胆苦苷、獐牙菜苦苷对照品购自中国药品生物制品检定所 (批号分别为 110770 - 200308, 110785 - 200203), 落干酸、獐牙菜苷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 HPLC 峰面积归一化法测定, 纯度大于 98%)。

本实验中野生麻花艽根部材料于 2004 年 9 月底分别取自四川西北部若尔盖草原、青海果洛和青海刚察, 栽培麻花艽根部材料同期分别采于青海西宁、青海湟中县和青海甘里铺地区实验栽培基地。上述样品由中国科学院西北高原生物研究所陈桂琛研究员鉴定为麻花艽 (*Gentiana straminea*), 样品经阴干、粉碎后, 过 80 目筛, 冷藏保存。

2 溶液制备

2.1 混合对照品溶液 分别精密称取对照品龙胆苦苷、落干酸、獐牙菜苦苷和獐牙菜苷, 用甲醇溶解后配成龙胆苦苷 1.9 mg · mL⁻¹、落干酸 0.8 mg · mL⁻¹、獐牙菜苦苷 1.2 mg · mL⁻¹、獐牙菜苷 0.2 mg · mL⁻¹ 的混合对照品溶液。

2.2 供试品溶液 精密称取样品粉末 0.2 g, 加甲醇 10 mL, 于 60 °C 超声 30 min; 放冷至室温后过滤, 滤液置于 25 mL 量瓶中, 用甲醇定容, 摇匀。

3 色谱条件

色谱柱: Agilent 公司 Eclipse XDB - C₈ 柱 (4.6 mm × 150 mm, 5 μm)。流动相: A 为 95% 乙腈水溶液, B 为 5% 乙腈 (含 10 mmol · L⁻¹ 的甲酸) 水溶液, A 在 0 ~ 20 min 内, 比例由 0 → 100% 进行线性洗脱。流速 1.0 mL · min⁻¹, 检测波长 240 nm, 进样量 10 μL, 柱温 30 °C。在该色谱条件下落干酸、獐牙菜苦

苷、龙胆苦苷、獐牙菜苷 4 种成分均被洗脱并达到基线分离 (图 1)。

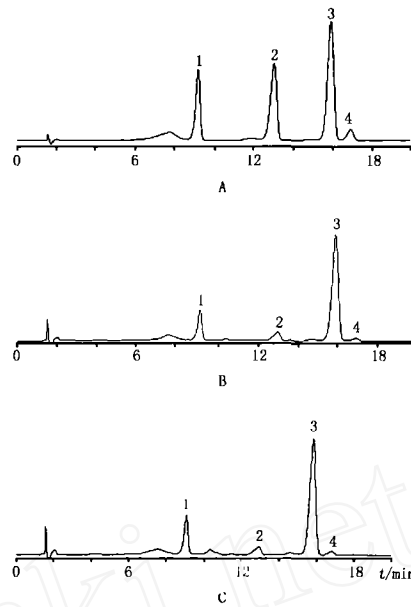


图 1 对照品 (A)、青海果洛野生样品 (B) 和青海西宁栽培样品 (C) 的色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms of reference standards (A), wild sample from Guoluo, Qinghai (B) and cultivated sample from Xining, Qinghai (C)

1. 落干酸 (loganic acid) 2. 獐牙菜苦苷 (swertiamarin) 3. 龙胆苦苷 (gentiopicroside) 4. 獐牙菜苷 (sweroside)

4 线性关系考察

取“2.1”项下的混合对照品溶液, 逐级稀释 1 倍, 每次进样 10 μL, 以峰面积定量, 分别得到 4 种苦苷类成分的回归方程及线性范围, 见表 1。

表 1 4 种苦苷类成分的回归方程及线性范围

Tab 1 Linear equation and linear rang of four iridoid glycosides

成分 (constituents)	线性范围 (linear rang) / μg	线性方程 (linear equation)	r
龙胆苦苷 (gentiopicroside)	0.60 ~ 19.20	Y = 6.016 × 10 ³ X + 106.47	0.9999
落干酸 (loganic acid)	0.24 ~ 7.68	Y = 6.384 × 10 ³ X + 40.12	0.9999
獐牙菜苦苷 (swertiamarin)	0.38 ~ 12.02	Y = 6.058 × 10 ³ X + 55.73	0.9999
獐牙菜苷 (sweroside)	0.05 ~ 1.66	Y = 6.536 × 10 ³ X + 10.82	0.9999

5 精密度实验

取“2.1”项下的混合对照品溶液, 在选定的色谱条件下进样, 重复 5 次, 测得龙胆苦苷、落干酸、獐牙菜苦苷和獐牙菜苷峰面积的 RSD 分别为 1.0%,

1.6% ,1.9% ,2.2% 。

6 重复性实验

精密称取青海果洛产野生麻花艸样品粉末 5 份,每份 0.22 g,按“2.2”项下平行制备供试品溶液,再按“3”项下色谱条件进样测定,得龙胆苦苷、落干酸、獐牙菜苦苷、獐牙菜苷的平均含量分别为 11.65%、1.48%、0.64%、0.22%; RSD 分别为 1.9%、2.3%、2.1%、2.9%。

7 稳定性实验

取“2.2”项下青海西宁栽培供试品溶液 1 份,分别于 0,4,8,12,16,24 h 依次测定,得龙胆苦苷、落干酸、獐牙菜苦苷和獐牙菜苷峰面积 RSD 分别为 1.1%、1.2%、1.6%、1.9%。结果表明供试品溶液

在 24 h 内比较稳定。

8 加样回收率实验

取已知含量的青海西宁栽培药材适量(0.2 g),加入一定量的对照品混合溶液,按照样品处理方法操作并进样 10 μL。重复上述操作 5 次,计算各成分的加样回收率,得到龙胆苦苷、落干酸、獐牙菜苦苷和獐牙菜苷的平均回收率分别为 99.73%、98.13%、98.45%、96.22%; RSD 分别为 1.3%、1.8%、2.1%、2.3%。

9 样品测定

精密吸取供试品溶液 10 μL,分别进样 5 次,用外标法计算 4 种苦苷类成分的含量,结果见表 2。

表 2 野生与栽培麻花艸中苦苷类成分的含量(%,n=5)

Tab 2 Contents of four iridoid glycosides in wild and cultivated *Gentiana straminea*

样品类型 (sample types)	采集地 (collecting location)	苦苷类成分(iridoid glycosides)				总和 (total)
		龙胆苦苷 (gentiopicroside)	落干酸 (loganic acid)	獐牙菜苦苷 (swertiamarin)	獐牙菜苷 (sweroside)	
野生(wild)	四川若而盖(Ruo'ergai, Sichuan)	10.305 ± 0.004	1.826 ± 0.004	0.782 ± 0.004	0.221 ± 0.007	13.134
	青海果洛(Guoluo, Qinghai)	11.727 ± 0.012	1.543 ± 0.010	0.663 ± 0.005	0.238 ± 0.011	14.171
	青海刚察(Gangcha, Qinghai)	6.590 ± 0.006	1.023 ± 0.003	0.482 ± 0.007	0.301 ± 0.004	8.396
	平均值(mean)	9.541 ± 1.531	1.464 ± 0.235	0.642 ± 0.087	0.253 ± 0.024	-
栽培(cultivated)	青海西宁(Xining, Qinghai)	6.456 ± 0.017	1.351 ± 0.009	0.456 ± 0.010	0.204 ± 0.006	8.467
	青海湟中(Huangzhong, Qinghai)	7.109 ± 0.010	0.714 ± 0.010	0.595 ± 0.008	0.199 ± 0.007	8.617
	青海甘里铺(Nianlipu, Qinghai)	8.153 ± 0.010	1.392 ± 0.011	0.733 ± 0.006	0.234 ± 0.008	10.512
	平均值(mean)	7.239 ± 0.494	1.152 ± 0.219	0.595 ± 0.080	0.212 ± 0.011	-

注:表中数值取自平均值与标准误差(n=5)

Note: Values are means ± S. E. M. (n=5)

10 结果与分析

对采自野生与栽培麻花艸种群中龙胆苦苷、落干酸、獐牙菜苦苷与獐牙菜苷 4 种苦苷类成分的含量进行了分析。2005 年版中国药典中规定,麻花艸药材中龙胆苦苷的含量应该 ≥2%。实验结果显示,不论是野生种还是栽培品种,其龙胆苦苷的含量已经达到并超过药典中规定,均可以入药。4 种苦苷类成分中,龙胆苦苷的含量远远高于其他 3 种成分。这说明,麻花艸苦苷类成分中龙胆苦苷的高含量对开发利用以龙胆苦苷为主的新药源有一定的启示意义。药典中将其作为秦艸类植物入药的关键指标也是具有一定科学依据的。本实验中,野生种群中 4 种苦苷类成分的平均含量基本上都大于栽培种群,其总和野生种群的含量也高于栽培的。虽然栽培品种从龙胆苦苷含量方面而言已经可以入药,但是如何保持栽培品种与野生品种在品质方面的稳定性、

延续性、一致性以及有效控制药用植物资源中有效活性成分的含量是人工引种栽培实验成功与否的关键因素之一^[9]。药用植物有效成分的含量不仅与植物的基因型有关,与生态环境也有着密不可分的联系^[10]。因此,对于药用植物(不论野生品种还是栽培品种)而言,有效活性成分与生态环境以及其周围生物因子之间的内在关联值得进一步的探讨。

本实验采用 HPLC 法首次同时测定了野生与栽培麻花艸根中 4 种苦苷类有效成分,精密度高,重复性好。并采用和对照品中各组分的相对保留时间(RT)及紫外光谱(UV)相结合的比较方法确定了样品色谱图中各组分的位置(见图 2),结果准确、可靠。实验结果表明,栽培与野生麻花艸中 4 种苦苷类成分分布基本一致。因此,采用人工引种栽培麻花艸的方法,不仅可以解决野生麻花艸资源量的供给问题,也可为栽培品的广泛应用提供可靠的科学依据。

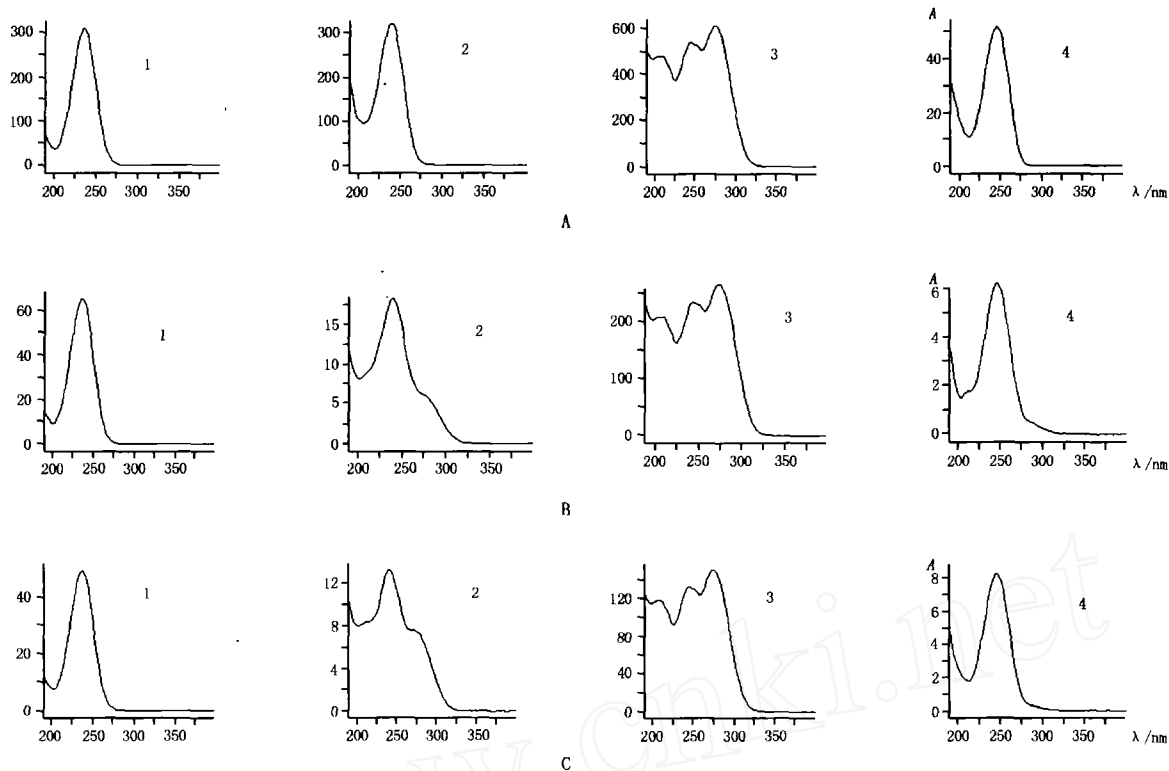


图2 对照品(A)、野生样品(B)、栽培样品(C)紫外光谱图

Fig 2 UV spectra of reference substances(A), wild sample(B) and cultivated sample(C)

1. 落干酸(loganic acid) 2. 獐牙菜苦苷(swertiamarin) 3. 龙胆苦苷(gentiopicroside) 4. 獐牙菜苷(swerside)

参考文献

- 1 YANG Yong - chang (杨永昌). Tibetan Medicines (藏药志). Qinghai (青海): Qinghai People's Publishing House (青海人民出版社), 1991. 9
- 2 JI Lan - ju (纪兰菊), SUN Hong - fa (孙洪发), DING Jing - ye (丁经业), et al. Study on chemical compositions of four Gentiana plants from Qinghai - Xizang Plateau (青海高原四种龙胆植物化学成分初步研究). *Acta Biolog Plateau Sin* (高原生物学集刊), 1992, 11: 113
- 3 LUO Ji - peng (罗集鹏), LOU Zhi - cen (楼之岑). The thinlayer chromatographic identification of the secoiridoid glucosides in certain Gentiana species used as the Chinese drug Longdan (中药龙胆中裂环烯醚萜甙类的硅胶薄层与聚酰胺薄膜色谱鉴定). *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 1985, 5(1): 7
- 4 LUO Ji - peng (罗集鹏), LOU Zhi - cen (楼之岑). Separation and identification of gentiopicroside, swertiamarin and sweroside in the traditional drugs Longdan, Radix Gentianae (中药龙胆中龙胆苦甙、当药苦甙和当药甙的分离与鉴定). *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1986, 17(4): 1
- 5 SONG Wan - zhi (宋万志). General survey on medicinal plants of Gentianaceae in China (中国龙胆科药用植物概况). *Bull Chin Mater Med* (中药通报), 1986, 11(1): 3
- 6 JI Lan - ju (纪兰菊), LIAO Zhi - xin (廖志新), SUN Hong - fa (孙洪发). A survey of Gentiana plants of the Tibetan traditional herb medicines (青海龙胆部分藏药植物化学成分研究进展). *Acta Biolog Plateau Sin* (高原生物学集刊), 2002, 15: 243
- 7 JI Lan - ju (纪兰菊), MA Yu - hua (马玉花), CHEN Gui - chen (陈桂琛), et al. Determination and evaluation of two iridoids in *Gentiana straminea* herbs by HPLC (藏药麻花苳中苦苷类成分的含量测定及品质评价). *Acta Bot Boreal - Occident Sin* (西北植物学报), 2004, 24(2): 292
- 8 LIU Li - sha (刘丽莎), ZHANG Xi - ling (张西玲), HUANG Xiao - ping (黄晓萍). HPLC determination of gentiopicroside in wild and cultivated *Gentiana macrophyllia* Pall. and *Gentiana straminea* Maxim. (栽培和野生秦艽及麻花苳中龙胆苦苷的含量测定). *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2002, 27(2): 152
- 9 Canter Peter H, Thomas Howard, Ernst Edzard. Bringing medicinal plants into cultivation: opportunities and challenges for biotechnology. *Trends Biotechnol*, 2005, 23(4): 180
- 10 TAO Shu - hong (陶曙红), WU Feng - e (吴凤镔). Effect of ecological environment on active constituents of medicinal plants (生态环境对药用植物有效成分的影响). *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2003, 15(2): 174

(本文于2005年6月27日收到)