

HPLC 法同时测定藏药岷县龙胆中 4 种有效成分的含量

董琦, 吉文鹤, 肖远灿, 谭亮, 胡风祖*

中国科学院西北高原生物研究所, 西宁 810008

摘要: 采用高效液相色谱法同时测定藏药岷县龙胆中獐牙菜苦苷、龙胆苦苷、獐牙菜苷和异苈草苷含量。结果测定岷县龙胆中獐牙菜苦苷、龙胆苦苷、獐牙菜苷和异苈草苷的含量分别为 0.108%、1.46%、2.21%、1.61%。色谱条件为: 色谱柱: XDB-C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 柱温: 25 °C; 流速: 1.0 mL/min; 流动相: 甲醇/0.01% 乙酸水溶液梯度洗脱; 检测波长 260 nm。本方法快速、准确、重复性好, 适用于岷县龙胆中 4 种有效成分的含量测定, 可为藏药岷县龙胆药材的质量控制提供依据。

关键词: 岷县龙胆; 苦苷类成分; 异苈草苷; HPLC

中图分类号: R29

文献标识码: A

Simultaneous Determination of Four Active Components in Tibetan Herb *Gentiana purdomii* Marq. by HPLC

DONG Qi, JI Wen-he, XIAO Yuan-can, TAN Liang, HU Feng-zu*

Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Qinghai Xining 810008, China

Abstract: A quantitative method of the simultaneous determination of swertiamain, gentiopicroside, sweroside and Isoorientin in *Gentiana purdomii* Marq. was established using RP-HPLC. The results showed that the contents of swertiamain, gentiopicroside, sweroside and Isoorientin were 0.108%, 1.46%, 2.21% and 1.61%, respectively. The HPLC analysis conditions were as follows: XDB-C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) was used for chromatographic separation and methanol-0.01% acetic acid were used as the mobile phases with gradient elution; The flow rate was 1.0 mL/min with a column temperature at 25 °C, and the UV detection wavelength was set at 260 nm. The assay demonstrated that the developed method had adequate accuracy and selectivity. It was suitable for the determination of four active components in *G. purdomii*. Hence, it can provide additional evidence for the quality evaluation of *G. purdomii*.

Key words: *Gentiana purdomii* Marq.; iridoid glycosides; isoorientin; HPLC

岷县龙胆 (*Gentiana purdomii* Marq.) 为龙胆科龙胆属植物, 是中国的特有植物, 分布在中国大陆的青海、甘肃、四川等地。岷县龙胆也称白花龙胆, 在藏药中作为邦见嘎保使用^[1], 以花入药, 用于脑膜炎、肝炎、胃炎、喉部疾病、尿痛、阴痒、阴囊湿疹^[2]。现代药理学研究表明, 獐牙菜苦苷具有抑制中枢神经、镇痛抗炎等作用^[3]; 龙胆苦苷具有促进胃液分泌、抗原虫和抗炎、保肝、健胃等作用^[4-6], 獐牙菜苷具有退热、抗惊厥^[7]、保肝^[8]的作用, 异苈草苷具有明显的保肝活性^[9]。上述物质与藏医所用功能相符, 是岷县龙胆中的主要有效成分。本文建立了 HPLC 法同时测定岷县龙胆花中上述 4 种有效成分

含量的分析方法, 为白花龙胆质量标准的制定及其开发利用提供了科学依据。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Agilent 1260 高效液相色谱仪 (美国 Agilent 公司); KQ-100E 型超声波清洗器 (昆山超声仪器科技有限公司); MOLELEMENT 元素型超纯水机 (上海摩勒生物科技有限公司)。

1.2 试剂与材料

獐牙菜苦苷 (批号: 110785-200203)、龙胆苦苷 (批号: 110770-200611)、獐牙菜苷 (111742-200501)、异苈草苷 (批号: 10080621) 对照品均购自中国药品生物制品检定所; 甲醇 (色谱纯, 山东禹王); 乙酸、提取用甲醇均为分析纯; 检测用水为一级超纯水。

收稿日期: 2012-11-21 接收日期: 2013-05-08

基金项目: 青海省自然科学基金项目 (2011-Z-922Q)

* 通讯作者 Tel: 86-971-6132750; E-mail: hufz@nwipb.cas.cn

岷县龙胆干燥样品经中国科学院西北高原生物研究所卢学峰副研究员鉴定为岷县龙胆(*Gentiana purdomii* Marq.)的花。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: XDB-C₁₈ (4.6 mm × 250 mm 5 μm); 柱温: 25 °C; 流速: 1.0 mL/min; 流动相: A 相为甲醇, B 相为 0.01% 乙酸水溶液; 梯度洗脱程序: 0 ~ 30 min, 15% ~ 30% (A); 30 ~ 40 min, 30% ~ 35% (A); 40 ~ 55 min, 35% (A); 55 ~ 60 min, 35% ~ 85% (A); 60 ~ 65 min, 85% ~ 15% (A); 检测波长: 260 nm; 进样量: 10 μL。

2.2 对照品溶液的制备

分别精密称定獐牙菜苦苷、龙胆苦苷、獐牙菜苷和异荭草苷对照品 4.05、5.63、3.35、3.43 mg, 置于 10 mL 量瓶中, 加入甲醇使溶解, 并稀释至刻度, 摇匀, 作为标准贮备液。分别精密移取上述贮备液各 1.0 mL 至同一 10 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 作为混合对照品溶液, 其浓度分别为: 獐牙菜苦苷 40.5 μg/mL, 龙胆苦苷 56.3 μg/mL, 獐牙菜苷 33.5 μg/mL, 异荭草苷 34.3 μg/mL。

2.3 供试品溶液的制备

称取 0.25 g 干燥的龙胆花粉末, 精密称定(精确至 0.0001 g), 置具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 25 mL, 称重, 40 °C 超声处理 30 min, 冷却至室温, 补足失重, 过滤待测。

2.4 线性关系的考察

取混合对照品溶液, 用甲醇逐级稀释, 按上述色谱条件测定 4 种成分各自的峰面积。以对照品浓度

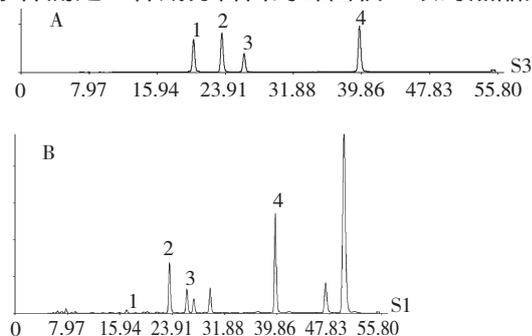


图1 对照品(A)和样品(B)的HPLC色谱图

Fig. 1 HPLC chromatogram of reference substances (A) and sample (B)

1. 獐牙菜苦苷 2. 龙胆苦苷 3. 獐牙菜苷 4. 异荭草苷
1. swertiamain 2. gentiopicroside 3. sweroside 4. isoorientin

为横坐标(x) 相对应的峰面积为纵坐标(y) 绘制标准曲线, 得到回归方程及相关系数分别为獐牙菜苦苷 $y = 333.22x - 0.146$ ($r = 0.9992$)、龙胆苦苷 $y = 1111.2x + 1.907$ ($r = 0.9997$)、獐牙菜苷 $y = 368.36x - 2.005$ ($r = 0.9990$)、异荭草苷 $y = 2203.4x - 7.589$ ($r = 0.9993$)。獐牙菜苦苷、龙胆苦苷、獐牙菜苷和异荭草苷的浓度分别在 40.5 ~ 8.1、56.3 ~ 11.3、33.5 ~ 6.7、34.3 ~ 6.9 μg/mL 范围内呈良好的线性关系。混合对照品色谱图见图 1。

2.5 精密度试验

精密吸取混合对照品溶液, 按“2.1”项下色谱条件连续进样 5 次, 记录各色谱峰面积值。结果测得獐牙菜苦苷、龙胆苦苷、獐牙菜苷和异荭草苷峰面积的 RSD 分别为 1.02%、1.23%、1.37%、1.14%。精密吸取混合对照品溶液, 按“2.1”项下色谱条件, 每天进样一次, 连续三天, 计算三天各标准品色谱峰面积值, 结果测得獐牙菜苦苷、龙胆苦苷、獐牙菜苷和异荭草苷峰面积的 RSD 分别为 2.03%、1.78%、2.56%、1.61%。精密吸取同一样品溶液, 按“2.1”项下色谱条件, 每天进样 3 次, 连续三天, 结果测得獐牙菜苦苷、龙胆苦苷、獐牙菜苷和异荭草苷峰面积的 RSD 分别为 2.31%、1.95%、2.44%、1.73%。

2.6 重复性试验

平行精密称取岷县龙胆花粉末 5 份, 每份 0.25 g, 按“2.3”项下方法制备溶液, 并按上述色谱条件测定峰面积, 结果测得獐牙菜苦苷、龙胆苦苷、獐牙菜苷和异荭草苷峰面积的 RSD 分别为 1.11%、0.87%、0.55%、1.21%。

2.7 稳定性试验

取供试液, 室温放置, 分别于 0、2、4、6、8、12 和 24 h 进样 10 μL, 按上述色谱条件测定峰面积, 结果测得獐牙菜苦苷、龙胆苦苷、獐牙菜苷和异荭草苷峰面积的 RSD 分别为 1.00%、1.27%、1.19%、1.33%。结果表明供试溶液中各成分在 24 h 内稳定。

2.8 加样回收率试验

采用加样回收法, 平行称取已知各成分含量的岷县龙胆花粉末 3 组, 每组 3 份, 每份 0.25 g, 分别加入混合对照品溶液 0.5、1.0、1.5 mL, 按“2.4”项下方法制备溶液, 按上述色谱条件测定峰面积, 计算回收率, 得到獐牙菜苦苷、龙胆苦苷、獐牙菜苷和异荭草苷的平均回收率分别为 94.61%、98.24%、100.05%、98.64%, RSD 分别为 2.11%、1.45%、

2.55%、1.12%。

2.9 样品含量测定

按“2.3”项下操作制备供试液,并适当稀释,使各成分峰面积在标准曲线范围内,准确吸取供试液 10 μ L 进样,在上述色谱条件下测定,用回归方程计算,结果见表 1。样品色谱图见图 1。

表 1 岷县龙胆 4 种有效成分含量测定结果($n = 3$)

Table 1 Determination results of four active components in *G. purdomii* ($n = 3$)

有效成分 Components	平均含量 Average content (%)	RSD (%)
獐牙菜苦苷 Swertiamain	0.107	0.15
龙胆苦苷 Gentiopicroside	1.467	0.16
獐牙菜苷 Sweroside	2.213	1.17
异荭草苷 Isoorientin	1.602	0.15

3 讨论

提取方法的确定:对 70% 乙醇超声提取、甲醇超声提取、石油醚除去脂溶性物质和叶绿素后再用甲醇提取总黄酮 3 种提取方法进行比较,发现甲醇超声提取较其他方法效果好,所以采用甲醇超声提取方法。检测波长的确定:对照品溶液分别进样后,利用 DAD 检测器在 200~400 nm 扫描其吸收光谱,各对照品均在 260 nm 波长处有较高的吸收,因此选择该波长为检测波长。所建方法具有提取、分析方法简便、快速、结果准确可靠等特点,可同时测定苦苷类成分及异荭草素含量,对全面评价藏药岷县龙胆及其藏成药质量有重要的作用。

参考文献

- 1 Yang YC (杨永昌). Tibetan Annals (藏药志). Qinghai: people's Publishing House, 1991. 186-189.
- 2 Jia MR (贾敏如), Li XW (李星炜). China National Medicine Records (中国民族药志要). Beijing: Chinese Medicine Science and Technology Press, 2005. 292.
- 3 Ji YS (季宇彬). Pharmacology and Application of Effective Components in Traditional Chinese Medicine (中药有效成分药理与应用). Harbin: Heilongjiang Science and Technology Press, 1995. 453-454.
- 4 Ma YH (马玉花), Sun F (孙峰), Sun J (孙菁), et al. Research advances in a Tibetan medicine-Gentiana straminea. *J Anhui Agric Sci* (安徽农业科学) 2005, 33: 1698-1699.
- 5 Zhang Y (张勇), Jiang JX (蒋家雄), Li WM (李文明). Advances in pharmacological research of gentiopicroside. *Med Pharm Yunnan* (云南医药), 1991, 12: 304-306.
- 6 Liu T (刘涛), Cai Q (才谦), Fu YQ (付玉芹), et al. Research progress of Chinese gentian. *Liaoning J Tradit Chin Med* (辽宁中医杂志) 2004, 31: 85-86.
- 7 Song WZ (宋万志). Chinese Gentianaceae medicinal plant profiles. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 1986, 11: 643-647.
- 8 Ji YB (季宇彬). Pharmacology and Application of Effective Components in Traditional Chinese Medicine (中药有效成分药理与应用). Harbin: Heilongjiang Science and Technology Press, 1995. 452-453.
- 9 Wu XA (吴新安), Zhao YM (赵毅民). Research progress of Natural flavonoid glycoside and its active carbon. *Pharm J Chin People's Liber Army* (解放军药学学报), 2005, 21: 153-158.
- 10 Zheng XL, Sun HX, Liu XL, et al. Astilbic acid induced CO-LO 205 cell apoptosis by regulating Bcl-2 and Bax expression and activating caspase-3. *Acta Pharma Sin*, 2004, 25: 1090-1095.
- 11 Zheng XL (郑晓亮), Cheng LY (程丽艳), Tu LL (屠凌岚), et al. Neuroprotective effect of 2-phenoxy-indan-1-one derivatives YKY-7, a novel acetylcholinesterase inhibitor, on β -amyloid peptide induced damage *in vitro*. *Chin Pharm Bull* (中国药理学通报) 2010, 26: 1344-1349.
- 12 Zheng XL (郑晓亮), Li Q (李钦), Zhao Y (赵吟), et al. Anaphylactoid reaction induced by Qingkailing injection via basophils cells degranulation. *Chin J Chin Mater Med* (中国中药杂志) 2010, 21: 2904-2907.
- 13 Qiu XY (邱晓燕), Liu Y (刘艳), Chen XL (陈小麟), et al. Anticancer activity of antimicrobial peptides isolated from *Musca Domestica* Vicina. *Chin J Hygienic Insecticides Equipm* (中华卫生杀虫药械) 2003, 9: 13-16.
- 14 Xu SX (徐水祥), Li YZ (李跃中), Tang L (唐靓), et al. Research on Inhibition Effect of *Chrysomya Megacephala* Fab Larva Extracts on Leukemia Cell and Lung Cancer Cell. *Pharm Biotech* (药物生物技术) 2008, 15: 286-288.

(上接第 498 页)