

川西獐牙菜中不同部位 3 种药用成分的反相高效液相色谱测定*

马玉花, 陈桂琛, 吉文鹤, 卢学峰, 纪兰菊**

(中国科学院西北高原生物研究所 西宁 810001)

摘要 目的:建立野生与栽培的川西獐牙菜中不同部位 3 种有效成分,即龙胆苦苷(S_1)、芒果苷(S_2)、7- O - β - D -吡喃木糖-1,8-二羟基-3-甲氧基吡酮(S_3)的反相高效液相色谱定量分析方法。**方法:**色谱柱为 Kromasil C_{18} (250 mm \times 4.60 mm, 5 μ m), 流动相为甲醇-0.02% 磷酸水溶液, 梯度洗脱, 洗脱条件为 0 min \rightarrow 50 min \rightarrow 55 min, 甲醇: 20% \rightarrow 80% \rightarrow 100%; 流速为 1 mL \cdot min $^{-1}$, 检测波长为 260 nm。**结果:**该方法具有很好的线性关系和回收率。**结论:**本方法简单、准确、快速、实用性强。川西獐牙菜中 3 种药效成分在花的部位含量最高。

关键词:金川西獐牙菜; 不同部位; 龙胆苦苷(S_1); 芒果苷(S_2); 7- O - β - D -吡喃木糖-1,8-二羟基-3-甲氧基吡酮(S_3); 反相高效液相色谱法

RP - HPLC Determination of Three Medicinal Bioactive Components in Different Parts of *Swertia mussotii* Franch

MA Yu - hua, CHEN Gui - chen, JI Wen - he, LU Xue - feng, JI Lan - ju **

(Northwest Plateau Institute of Biology, The Chinese Academy of Sciences, Xining 810001, China)

Abstract Objective: To establish an HPLC method for determining the contents of three medicinal bioactive components: gentiopicroside (S_1), mangiferin (S_2) and 7- O - β - D -xylopyranosyl-1,8-dihydroxy-3-methoxyxanthone (S_3) in different parts of wild and cultivated *Swertia mussotii* Franch were determined by RP-HPLC. **Methods:** The analysis was performed on a Kromasil C_{18} (250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m). The mobile phase consisted of CH_3OH and 0.02% aqueous phosphoric acid. The gradient condition was 0 min \rightarrow 50 min \rightarrow 55 min, CH_3OH 20% \rightarrow 80% \rightarrow 100%. The flow rate was 1 mL \cdot min $^{-1}$. The detection wavelength was at 260 nm. **Results:** The good linear relationships and recoveries were obtained under the optimum conditions for every component. **Conclusion:** The method is simple, rapid and reliable. The flower of this herb contains more three medicinal bioactive components than its other parts do.

Key words: *Swertia mussotii* Franch; different parts; gentiopicroside (S_1); mangiferin (S_2); 7- O - β - D -xylopyranosyl-1,8-dihydroxy-3-methoxyxanthone (S_3); RP-HPLC

川西獐牙菜 (*Swertia mussotii* Franch) 属龙胆科 (Gentianaceae) 獐牙菜属植物, 是藏族民间常用单方草药, 为上品藏药, 俗名“藏茵陈”。本品具有清热解毒, 利胆退黄之功效, 传统药用部位是全草, 用于治疗肝胆系统疾病^[1]。现代医学证明, 其主要有效成分龙胆苦苷可治消化不良, 抗原虫, 抗炎; 芒果苷具有抗炎, 抗结核, 利胆之功效^[2]。川西獐牙菜为 2 年生草本植物, 主要分布于四川西北部和青海玉树

地区。由于多年的过度采挖, 野生川西獐牙菜已面临濒危。对川西獐牙菜主要有效成分的研究已有报道^[3,4], 但对其主要药效成分在不同部位的研究尚未报道, 因此, 我们以野生与栽培的川西獐牙菜中 3 种主要药用成分——龙胆苦苷 (gentiopicroside, 代号 S_1)、芒果苷 (mangiferin, 代号 S_2)、7- O - β - D -吡喃木糖-1,8-二羟基-3-甲氧基吡酮 (7- O - β - D -xylopyranosyl-1,8-dihydroxy-3-me-

* 国家中西部重点项目 (2001BA901A47)

** 通讯作者 (corresponding author)

thoxyxanthone, 代号 S_3) 为指标, 采用反相高效液相色谱法对野生与栽培的川西獐牙菜全草、根、茎、叶、花各部位进行了含量测定。

1 仪器、试剂与材料

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。

甲醇为色谱纯, 其他试剂均为分析纯。水为重蒸水并经 0.45 μm 滤膜过滤。对照品 S_1 购自中国药品生物制品检定所; 对照品 S_2 及 S_3 为中国科学院西北高原生物研究所植化室孙洪发教授所赠, 纯度均在 96% 以上。

本实验以青海玉树及四川地区野生的川西獐牙菜和青海平安地区栽培的川西獐牙菜为样品, 分全草、根、茎、叶、花 5 个部位。样品采收期均为 2003 年 9 月中旬。实验用川西獐牙菜样品由中国科学院西北高原生物研究所卢学峰研究员鉴定。

2 色谱条件

色谱柱为 Kromasil C_{18} (250 mm \times 4.60 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-0.02% 磷酸水溶液, 梯度洗脱, 洗脱条件为 0 min \rightarrow 50 min \rightarrow 55 min, 甲醇: 20% \rightarrow 80% \rightarrow 100%; 流速为 1 mL \cdot min⁻¹, 检测波长为 260 nm, 柱温为室温。

3 溶液的制备

3.1 供试品溶液 分别将样品置超微粉碎机中粉碎 20 min, 精密称取 0.5 g, 置 100 mL 锥形瓶中, 加甲醇 20 mL, 置 80 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅上回流 2 h, 放冷至室温, 过滤, 滤液置于 25 mL 量瓶中, 用甲醇淋洗药渣及滤器并定容至刻度, 摇匀, 转入 C_{18} 预处理小柱(预先用甲醇 5 mL 洗脱), 弃去初滤液, 收集续滤液为供试品溶液。

3.2 对照品溶液 精密称取对照品 S_1 及 S_3 各约 2 mg, 对照品 S_2 约 1 mg 分别置于 10 mL 量瓶中, 用适量甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 作为单一对照品溶液于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱避光保存。分别吸取单一对照品溶液各 1 mL 置于同一 5 mL 量瓶中, 用甲醇稀释至所需浓度, 即得 S_1 、 S_2 及 S_3 的混合对照品溶液。

4 线性实验

分别精密吸取单一对照品溶液 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 (Y) 对其进样量 (X , μg) 进行线性回归, S_1 、 S_2 及 S_3 的回归方程依次为:

$$Y = 4.231 + 167556.5X \quad r = 0.9991$$

$$Y = -17395.6 + 740478.7X \quad r = 0.9986$$

$$Y = 149830.9 + 872433.4X \quad r = 0.9995$$

线性范围依次为: 0.80 ~ 4.00, 0.41 ~ 2.04, 0.72 ~ 3.60 μg 。

5 精密度实验

精确吸取上述各单一对照品溶液, 进样 20 μL , 重复 5 次, 根据所得峰面积值计算, 测得 3 种药效成分 S_1 、 S_2 、 S_3 峰面积的 RSD 分别为 3.5%, 1.3%, 1.0%。

6 重复性实验

精密称定四川野生的川西獐牙菜全草样品, 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, 求得 S_1 、 S_2 、 S_3 的 RSD 值分别为: 3.0%, 2.8%, 3.3%。

7 稳定性实验

取上述供试品溶液, 分别间隔 2 h 进样, 每次 20 μL , 重复 5 次, 进行测定方法的稳定性实验, 求得 S_1 、 S_2 、 S_3 的 RSD 值分别为 4.7%, 3.3%, 2.5%。

8 回收率实验

精密称取已测知含量的青海玉树野生的川西獐牙菜全草样品 0.25 g, 5 份, 分别加入对照品 S_1 储备液 0.3 mL, 对照品 S_2 储备液 0.7 mL, 对照品 S_3 储备液 0.4 mL, 按“3.1”项下方法处理, 在上述色谱条件下测定, 计算各成分的平均加样回收率。结果 S_1 为 102.2% (RSD = 2.2%), S_2 为 99.6% (RSD = 3.4%), S_3 为 99.3% (RSD = 3.2%)。

9 样品测定

按“3.1”项下方法制备各样品的供试品溶液, 在选定的色谱条件下测定, 根据峰面积计算不同地区野生与栽培的川西獐牙菜全草、根、茎、叶、花各部位 3 种主要药效成分的含量。结果见表 1。混合对照品溶液(用于确定各成分峰位)与样品色谱图见图 1。

10 讨论

10.1 由于 S_1 属于苦味苷, S_2 及 S_3 属于吡啶苷, 所以这 3 种药效成分在脂溶性溶剂中难溶, 在水中有一定溶解性。在醇中溶解性较大, 在甲醇和乙醇中提取的实验结果显示吡啶苷在甲醇中的转移率较乙醇中高且杂质含量低, 所以, 实验中选择甲醇为提取溶剂。选用回流 2 h 的提取条件, 3 种药效成分基本被提出。

表 1 样品含量测定结果(%)

Tab 1 Determination results of samples contents(%)

样品 (sample)	成分 (component)	全草 (whole grass)	根 (root)	茎 (stem)	叶 (leaf)	花 (flower)
四川(Sichuan)						
野生(wildness)	S ₁	4.10	0.72	1.81	2.99	5.60
	S ₂	0.31	0.02	0.10	0.36	0.60
	S ₃	0.41	0.06	0.05	0.15	1.57
青海(Qinghai)						
野生(wildness)	S ₁	2.96	1.80	3.22	6.46	10.04
	S ₂	0.89	0.10	0.32	2.17	2.54
	S ₃	0.12	0.01	0.08	0.14	0.34
栽培(planting)	S ₁	3.44	1.73	2.49	9.06	12.50
	S ₂	0.47	0.05	0.20	1.79	1.88
	S ₃	0.02	0.04	0.01	0.02	0.12

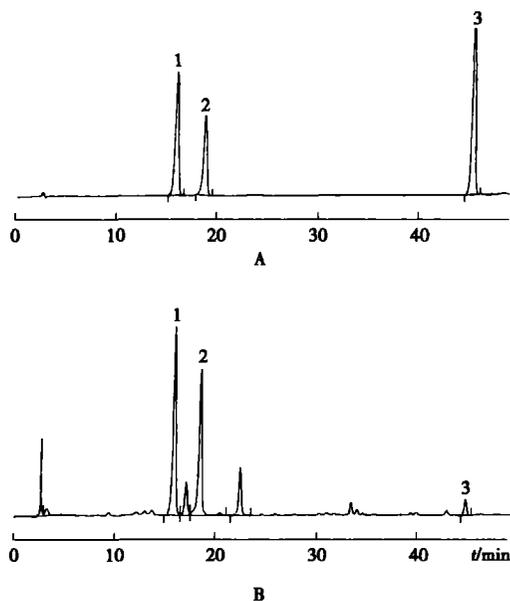


图 1 对照品(A)及样品(B)色谱图

Fig 1 Chromatograms of reference substances(A) and samples(B)

1. S₁ 2. S₂ 3. S₃

10.2 在流动相选择中,比较了甲醇-水、甲醇-醋酸水溶液(0.02%~0.1%)及甲醇-磷酸水溶液

(0.02%~0.1%)系统,发现后者梯度洗脱系统具有较好的分离效果,因此甲醇-磷酸水溶液(0.02%)梯度洗脱系统为本实验的流动相。10.3

实验结果显示,野生与栽培的川西獐牙菜中不同部位3种药效成分的含量分布趋势基本一致。野生样品中3种药效成分均在花的部位含量最高,并且随根、茎、叶、花各部位其含量依次升高。栽培样品中S₂的含量在茎、叶、花中均较高,其余2种成分的含量分布与野生样品一致,各部位S₁的含量明显高于野生样品,S₃的含量低于野生样品。

10.4 川西獐牙菜样品分别采集于海拔不同的3个地区,不同生境的川西獐牙菜中不同部位的3种药效成分的含量也各不相同,其原因是否与生境有关,尚待进一步研究。

10.5 本实验对色谱分离条件和测定方法进行了考察,证明该方法简便、准确、稳定,为野生与栽培川西獐牙菜植物的定性、定量分析和品质评价及含量分布提供了快速、准确、有效的分析方法。

参考文献

- 1 Northwest Plateau Institute of Biology, The Chinese Academy of Sciences(中国科学院西北高原生物研究所编著). Tibetan Medicines(藏药志). Xining(西宁): Qinghai People's Publishing House(青海人民出版社),1991. 110
- 2 JI Yu-bin(季宇彬). Pharmacological Action and Application of Available Composition of Traditional Chinese Medicine(中药有效成分药理与应用). Ha'erbin(哈尔滨): Heilongjiang Science and Technology Press(黑龙江科学技术出版社),1994. 211,293
- 3 SUN Hong-fa(孙洪发), HU Bai-lin(胡柏林), DING Jing-ye(丁经业), et al. The glucosides from *Swertia mussotii* Franch(川西獐牙菜甙类成分). *Acta Bot Sin*(植物学报),1991,33(1):31
- 4 SONG Ya-li(宋娅莉), HU Feng-zu(胡凤祖), LIN Peng-cheng(林鹏程), et al. Determination of xanthones in *Swertia mussotii* and *Swertia franchetiana* by high performance liquid chromatography(川西獐牙菜与抱茎獐牙菜中呋喃的高效液相色谱分析). *Chin Chromatogr*(色谱),2004,22(1):51

(本文于2004年6月9日收到)