

HPLC 法测定獐牙菜及其近缘植物中 4 种有效成分的含量*

林鹏程¹ 冶兆辉¹ 卢永昌¹ 赵素琴¹ 纪兰菊² 胡凤祖²

(1. 青海民族学院化学系 西宁 810007; 2. 中国科学院西北高原生物研究所 西宁 810001)

摘要 目的:建立反相高效液相色谱法同时测定獐牙菜及其近缘植物中番木鳖酸、獐牙菜苦苷、龙胆苦苷、芒果苷的含量。**方法:**采用 ZORBAX SB - C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 以流动相甲醇和水 (含 0.04% 磷酸) 的比例在 0 - 24 min 内由 22 : 78 至 38 : 62 线性梯度洗脱, 流速 1 mL · min⁻¹, 检测波长 254 nm, 柱温 30 °C。结果: 4 种成分均达到基线分离, 番木鳖酸、獐牙菜苦苷、龙胆苦苷、芒果苷的线性范围分别为 0.05 - 6.25 μg (r = 0.9999), 0.0095 - 2.9 μg (r = 0.9998), 0.0486 - 2.56 μg (r = 0.9999), 0.0056 - 2.8 μg (r = 0.9998); 回收率为 102% (RSD = 4.4%), 97.7% (RSD = 4.3%), 99.5% (RSD = 3.5%), 103% (RSD = 1.1%)。**结论:**方法测定快速, 结果准确、可靠。

关键词 反相高效液相色谱 番木鳖酸 獐牙菜苦苷 龙胆苦苷 芒果苷 獐牙菜 龙胆科

Simultaneous Determination of Four Effective Components in *Swertia* and Its Related Plants by HPLC

LIN Peng - cheng¹, YE Zhao - hui¹, LU Yong - chang¹, ZHAO Su - qin¹, JI Lan - ju² and HU Feng - zu²

(1. Chemistry Department of Qinghai Nationalities Institutes, Xining 810007;

2. Northwest Plateau Institute of Biology, The Chinese Academy of Sciences, Xining 810001)

Abstract Objective: To establish a quantitative method of simultaneously determination of loganic acid, swertiamarin, gentiopicroside and mangiferin in *Swertia* and its related plants by RP - HPLC. **Method:** The sample were separated on the column of Zorbax SB - C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) which eluted with methanol and water (0.04% phosphoric acid). The ratio of methanol and water increased from 22:78 to 38:62 in 24 min with detected wavelength at 254 nm, flow rate at 1 mL · min⁻¹, column temperature at 30 °C. **Results:** Four compounds were base - isolated. The linear ranges of loganic acid, swertiamarin, gentiopicroside and mangiferin were 0.05 - 6.25 μg (r = 0.9999), 0.0095 - 2.9 μg (r = 0.9998), 0.0486 - 2.56 μg (r = 0.9999), 0.0056 - 2.8 μg (r = 0.9998) respectively; The average recoveries were 102% (RSD = 4.4%), 97.7% (RSD = 4.3%), 99.5% (RSD = 3.5%), 103% (RSD = 1.1%) respectively. **Conclusions:** The method is rapid and precise.

Key words RP - HPLC, loganic acid, swertiamarin, gentiopicroside, mangiferin, *Swertia*, *Gentianaceae*

青藏高原龙胆科 (*Gentianaceae*) 植物是藏医广泛使用的治疗肝、胆疾病的药物^[1]。其主要化学成分有番木鳖酸 (loganic acid)、獐牙菜苦苷 (swertiamarin)、龙胆苦苷 (gentiopicroside)、芒果苷 (mangiferin)、齐墩果酸 (oleanolic acid)、当药黄素 (swertisin)、熊果酸 (ursolic acid) 等^[2,3]。现代药理学研究表明, 番木鳖酸具有一定的抗炎活性, 对角叉菜胶引起的小鼠脚肿胀和十四烷佛波醇乙脂引起的小鼠耳肿胀抑制率达 44.4%^[4]; 獐牙菜苦苷有提高皮肤机能、促进毛发生长、抑制中枢神经、镇痛和抗炎等作用^[5]; 龙胆苦苷有促进胃液分泌、抗原虫和抗炎作用^[5]; 芒果苷有抑制中枢神经、抗炎、抗结核、利胆等疗效^[5]。对龙胆科植物

中獐牙菜苦苷、芒果苷、龙胆苦苷的测定方法主要有薄层扫描和高效液相色谱法^[6-8], 但对番木鳖酸及上述 3 种成分同时测定的方法都未见报道。本文利用 HPLC 同时测定了 5 种獐牙菜及其 4 种近缘植物中上述 4 种成分的含量, 对评价药材质量及新药源的研究具有重要意义。

1 仪器、试剂及样品采集

Agilent1100 高效液相色谱仪, 配置: 手动进样器、在线脱气机、高压二元梯度泵、恒温柱温箱、DAD 检测器、Agilent1100 色谱工作站、ZORBAX SB - C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱; KQ3200 超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); SZ - 97 自动三重纯水蒸馏器 (上海亚荣生化仪器厂)。

* 2003 年度青海民族学院院级重点项目

甲醇: 高效液相色谱专用试剂(山东禹王实业有限公司禹城化工厂); 水: 自制三重蒸馏水; 磷酸: AR级(北京红星化工厂)。

番木鳖酸、獐牙菜苦苷、龙胆苦苷、芒果苷对照品: 青海普兰特藏药研究所孙洪发研究员提供(经归一化法测定, 纯度大于98%)。

样品采集: 红直獐牙菜(*Swertia erythroticta* Maxim.)、抱茎獐牙菜(*S. franchetiana* H. Smith)、川西獐牙菜(*S. mussotii* Franch.)、祁连獐牙菜(*S. przewalskii* Pissjauk)、四数獐牙菜(*S. tetraptera* Maxim.)、线叶龙胆(*Gentiana farrer* Balf. f.)、辐花肋柱花[*Lomatogonium rotatum* (L.) Fries ex Nym]于1999年8, 9月采于青海玉树、果洛、祁连等地, 秦艽(*Gentiana macrophylla* Pall.)、麻花艽(*G. straminea* Maxim.) 2003年8月采于青海省互助北山林场, 所有样品均由青海普兰特藏药研究所孙洪发研究员鉴定, 阴干后粉碎过80目筛, 冷藏保存。

2 溶液配制

2.1 对照品储备液 精密称取对照品番木鳖酸 2.50 mg、獐牙菜苦苷 2.90 mg、龙胆苦苷 2.45 mg、芒果苷 2.40 mg, 分别置 1 mL 量瓶中, 以甲醇溶解并定容, 配制成相应浓度的对照品储备液, 使用时稀释成所需浓度。

2.2 样品溶液 精密称取粉碎至 80 目的样品 0.5 g, 加入甲醇 10 mL, 超声提取 0.5 h, 抽滤, 以甲醇洗涤滤渣 2 次, 每次 1 mL。滤渣重复上述操作, 所得滤液与前一次滤液合并, 浓缩后定容至 10 mL。除秦艽、麻花艽提取液外, 其余样品提取液适当稀释(红直獐牙菜 2.5 mL、祁连獐牙菜 1.25 mL、辐花肋柱花 0.5 mL、抱茎獐牙菜 2 mL、川西獐牙菜 1 mL、线叶龙胆稀释 5 mL、四数獐牙菜 3.5 mL, 均稀释至 10 mL), 过 0.45 μm 滤膜, 在选定色谱条件下测定有效成分的含量。

3 色谱条件

色谱柱: ZORBAX SB-C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 柱; 流动相: 甲醇和水(含 0.04% 磷酸)的比例在 0-24 min 内由 22:78 线性变化至 38:62; 流速 1 mL · min⁻¹; 检测波长为 254 nm; 柱温 30 °C。该色谱条件下番木鳖酸、獐牙菜苦苷、龙胆苦苷、芒果苷等 4 种成分均被洗脱且达到基线分离, 保留时间分别为 11.7, 14.0, 16.4, 19.4 min(见图 1)。

4 线性关系考察

精密量取 4 种对照品储备液, 以甲醇配制浓度分别为: 番木鳖酸 0.125, 0.050, 0.025, 0.0167,

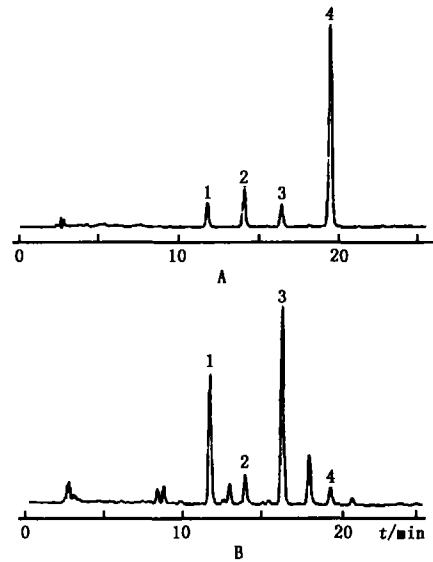


图 1 4 种对照品(A)和红直獐牙菜甲醇提取物(B)色谱图
Fig 1 HPLC chromatograms of reference substances(A) and methanol extract of *Swertia erythroticta* Maxim. (B)

- 1. 番木鳖酸(loganic acid) 2. 獐牙菜苦苷(swertiamarin)
- 3. 龙胆苦苷(gentiopicroside) 4. 芒果苷(mangiferin)

0.0125, 0.010 mg · mL⁻¹; 獐牙菜苦苷 0.580, 0.290, 0.145, 0.058, 0.029, 0.019 mg · mL⁻¹; 龙胆苦苷 0.625, 0.245, 0.122, 0.0245, 0.0122, 0.098 mg · mL⁻¹; 芒果苷 0.6, 0.24, 0.12, 0.024, 0.0048, 0.0012 mg · mL⁻¹ 的混合对照品标准液系列溶液, 每次进样 5 μL, 以峰面积的积分值定量, 测得番木鳖酸、獐牙菜苦苷、龙胆苦苷、芒果苷的回归方程分别如下:

$$A = 609.13X + 0.93 \quad r = 0.9999$$

$$A = 667.07X + 22.48 \quad r = 0.9998$$

$$A = 1007.73X + 33.40 \quad r = 0.9999$$

$$A = 3247.87X - 7.20 \quad r = 0.9998$$

线性范围分别为 0.05 - 6.25, 0.0095 - 2.9, 0.0486 - 2.56, 0.0056 - 2.8 μg。

5 检测限

在选定的色谱条件下, 当信噪比 S/N = 3 时, 对各组分最低检测限进行测定, 结果表明, 番木鳖酸、獐牙菜苦苷、龙胆苦苷、芒果苷的最低检测限分别为 1.25, 0.56, 0.50, 0.48 ng。

6 精密度试验

取浓度为 0.025 mg · mL⁻¹ 番木鳖酸、0.058 mg · mL⁻¹ 獐牙菜苦苷、0.0245 mg · mL⁻¹ 龙胆苦苷、0.024 mg · mL⁻¹ 芒果苷混合对照品溶液, 在选定的色谱条件下测定色谱峰的峰面积, 计算得 RSD 分别

为 0.72% , 0.90% , 0.69% , 0.93% ($n = 6$) , 表明仪器精密度良好。

7 重复性试验

精密称取红直獐牙菜样品 0.5 g 共 6 份, 按“2.2”项下方法操作, 在选定的色谱条件下测定番木鳖酸、獐牙菜苦苷、龙胆苦苷、芒果苷的含量, 计算得 RSD 分别为 2.4% , 1.4% , 2.0% , 2.9% ($n = 6$) , 表明方法重复性良好。

8 稳定性试验

精密称取红直獐牙菜样品 0.5 g, 按“2.2”项下方法操作, 分别在 0, 2, 4, 6, 8 h 时分别进样, 测定番木鳖酸、獐牙菜苦苷、龙胆苦苷、芒果苷的峰面积, 计算得 RSD 分别为 1.4% , 1.8% , 1.0% , 2.1% ($n = 5$)。表明样品溶液在 8 h 内稳定。

9 回收试验

精密称取 3 份已测知含量的红直獐牙菜样品

各 0.05 g, 添加各对照品溶液适量(番木鳖酸: 0.25 mg · mL⁻¹ 溶液 0.80 mL, 獐牙菜苦苷: 0.19 mg · mL⁻¹ 溶液 0.70 mL, 龙胆苦苷: 0.245 mg · mL⁻¹ 溶液 0.60 mL, 芒果苷: 0.14 mg · mL⁻¹ 溶液 0.20 mL), 按“2.2”项下方法操作, 测得番木鳖酸、獐牙菜苦苷、龙胆苦苷、芒果苷平均回收率($n = 3$) 分别为 102% , 97.7% , 99.5% , 103% ; RSD 分别为 4.4% , 4.3% , 3.5% , 1.1%。

10 测定结果

取“2.2”项下制备的样品溶液按上述色谱条件进行分析, 经 DAD 检测器检测上述 4 种待测组分的峰纯度且其紫外光谱与对照品一致后, 按外标法以峰面积积分值计算, 得 4 种有效成分的含量(每个样品重复进样 3 次, 取平均值)。结果见表 1。

表 1 獐牙菜及其近缘植物中 4 种有效成分的含量(%, $n = 3$)
Tab 1 Contents of four effective constituents in *Swertia* and its related plants(%, $n = 3$)

| 样品 (sample) | 番木鳖酸 (loganin acid) | 獐牙菜苦苷 (swertiamarin) | 龙胆苦苷 (gentiopicroside) | 芒果苷 (mangiferin) |
|---|------------------------|-------------------------|---------------------------|---------------------|
| 红直獐牙菜(<i>Swertia erythrosticta</i> Maxim.) | 0.645 | 0.515 | 0.637 | 0.0681 |
| 祁连獐牙菜(<i>S. przewalskii</i> Pisejauk) | 1.05 | 0.288 | 3.85 | 0.836 |
| 抱茎獐牙菜(<i>S. franchetiana</i> H. Smith) | 0.750 | 1.148 | 0.441 | 0.543 |
| 川西獐牙菜(<i>S. musotii</i> Franch.) | 未检出(not detected) | 0.484 | 0.238 | 1.14 |
| 四数獐牙菜(<i>S. tetraptera</i> Maxim.) | 0.323 | 0.141 | 0.284 | 0.007 |
| 辐花肋柱花[<i>Lomatogonium rotatum</i> (L.) Fries ex Nym] | 0.458 | 3.6 | 0.105 | 0.201 |
| 线叶龙胆(<i>Gentiana farrer</i> Balf. f.) | 0.543 | 0.087 | 0.0424 | 0.197 |
| 秦艽(<i>G. macrophylla</i> Pall.) | 0.623 | 0.094 | 3.02 | 未检出(not detected) |
| 麻花艽(<i>G. straminea</i> Maxim.) | 0.383 | 0.087 | 1.90 | 未检出(not detected) |

11 讨论

11.1 检测波长的确定 上述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 254 nm 波长处有较高的吸收, 结合文献[7], 选择该波长为检测波长。

11.2 提取方法确定 参照文献[8], 比较了不同提取时间(15, 30, 45, 60 min)对提取率的影响, 结果发现, 超声提取法优于热回流法, 且超声 30 min 即可将有效成分提取完全。精密称取红直獐牙菜样品 0.5 g 共 8 份, 每 4 份为一组, 分别用甲醇超声和加热回流处理, 测定不同提取次数下上述各有效成分的含量。结果表明, 热提取 3 次以及超声提取 2 次以后, 继续增加提取次数对提取率已无明显影响, 但超声次数少, 提取率比热回流提取法略高, 故本试验

采用超声提取法。

11.3 流动相的选择 上述 4 种有效成分色谱峰易拖尾, 经试验, 当在水中加入 0.04% (v/v) 磷酸时可改善番木鳖酸、獐牙菜苦苷、龙胆苦苷、芒果苷的峰形。故选择甲醇和含 0.04% 磷酸的水做流动相。

11.4 獐牙菜及其近缘植物中的 4 种有效成分含量的比较 由表 1 结果可见, 各龙胆科植物中各有效成分含量不同, 番木鳖酸以祁连獐牙菜中含量最高, 獐牙菜苦苷以辐花肋柱花中含量最高, 龙胆苦苷以祁连獐牙菜中含量最高, 芒果苷以川西獐牙菜中含量最高。

11.5 小结 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, 对全面评价药物质量及新药缘的研究有重要的作用。

参考文献

- 1 YANG Yong - chang (杨永昌), HE Ting - nong (何廷农), LU Sheng - lian (卢生莲), *et al.* Tibetan Medicines (藏药志). Xining (西宁): Qinghai People's Publishing House (青海人民出版社), 1991. 111
- 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 gentiana plants from Qinghai - Xizang Plateau (青藏高原四种龙胆植物化学成分初步研究). *Acta Biologica Plateau Sinica* (高原生物学集刊), 1992, 11: 113
- 3 LI Yu - lin (李玉林), DING Chen - xu (丁晨旭), LIU Jian - quan (刘健全), *et al.* Glycosides from *Swertia erythrosticka* (红直獐牙菜的苷类成分). *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2002, 33(2): 104
- 4 Recio MC, Giner RM, Manes S, *et al.* Structural considerations on the iridoids as anti - inflammatory agents. *Planta Med*, 1994, 60(3): 232
- 5 SUN Wen - ji (孙文基), SHENG Jin - fang (绳金房). A Handbook of Bioactive Natural Products (天然活性成分简明手册). Beijing (北京): China Medico - Pharmaceutical Science and Technology Publishing House (中国医药科技出版社), 1998. 539, 256, 367
- 6 Miyakawa Tatsuharu (宫川辰治), Osnima Toshiyuki (大岛俊幸), Hirayama Husayoshi (平山健良), *et al.* Determination of two main bitter secoiridoid glycosides in Gentianaceae (龙胆科 2 种苦苷的含量测定). *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 1997, 17(4): 241
- 7 HU Feng - zu (胡凤祖), SONG Ya - li (宋娅莉), LIU Mei (刘梅), *et al.* Analysis of medicinal bioactive composition of *Gentianaceae* in Qinghai - Tibet by high performance liquid chromatography (青藏高原龙胆科植物药用有效成分的高效液相色谱分析). *Chin J Chromatogr* (色谱), 2003, 23(1): 63
- 8 GAO Guang - yue (高光跃), LI Ming (李鸣), FENG Yu - xiu (冯毓秀), *et al.* Determination of effective constituents in 11 *Swertia* and related plants by HPLC (11 种獐牙菜及近缘植物中有效成分的高效液相色谱测定). *Acta Pharm Sin* (药学报), 1994, 29(12): 910

(本文于 2004 年 7 月 2 日修改回)

高效液相色谱 - 荧光检测法测定大鼠生物样品中阿德福韦

徐智儒 蒋晔* 张晓青

(河北医科大学药学院 石家庄 050017)

摘要 目的: 建立生物样品中阿德福韦的反相高效液相色谱分析方法。方法: 生物样品经沉淀蛋白处理后进行衍生化反应, 用 Intersil C₈ 反相柱 (150 mm × 4.6 mm, 5 μm), 乙腈 - 10 mmol · L⁻¹ 磷酸盐缓冲液 (2 mmol · L⁻¹ 氢氧化四丁基铵, 氢氧化钠溶液调节 pH 为 7.0) (10:90) 为流动相, 流速 1.5 mL · min⁻¹, 荧光检测波长为 λ_{ex} 309 nm 和 λ_{em} 425 nm。结果: 测定血药浓度的线性范围为 0.020 - 7.9 μg · mL⁻¹ (r = 0.9993), 最低检测限为 5 μg · L⁻¹。方法回收率为 95.1% - 99.0%。结论: 本法准确, 灵敏度高, 重复性好, 为阿德福韦酯的临床前及临床药代动力学研究提供了方法学基础。

关键词 高效液相色谱 药代动力学 阿德福韦酯

Determination of adefovir in Biological Samples of Rats by HPLC with Fluorescence Detection

XU Zhi - ru, JIANG Ye * and ZHANG Xiao - qing

(School of Pharmacy, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017)

Abstract Objective: To establish a HPLC method for the determination of adefovir in rats biological samples. **Method:** The biological samples were derivatized after precipitating protein. The Intersil C₈ column (150 mm × 4.6 mm, 5 μm) was used as analytical column with a mobile phase consisted of acetonitrile - 10 mmol · L⁻¹ phosphate buffer solution containing 2 mmol · L⁻¹ tetrabutylammonium hydroxide, adjusted to pH 7.0 with sodium hydroxide (10:90). The flow rate was of 1.5 mL · min⁻¹ with fluorescence detection set at λ_{ex} 309 nm and λ_{em} 425 nm. **Results:** The linear range was 0.020 - 7.9 μg · mL⁻¹ (r = 0.9993) in rat plasma with a minimum detectable limit of 5 μg · L⁻¹ (S/N > 3). The recovery of the method was 95.1% - 99.0%. **Conclusions:** The developed analytical method has a good selectivity and reproducibility and is suitable for application in preclinical and clinical pharmaco-

* 联系人 (corresponding author)