

文章编号: 1000-4025(2004)07-1298-05

15 种獐牙菜属植物中主要药用成分的高效液相色谱测定^{*}

纪兰菊¹, 保 怡¹, 陈桂琛¹, 赵明存², 孙洪发²

(1 中国科学院西北高原生物研究所, 西宁 810001; 2 青海普兰特藏药研究所, 西宁 810007)

摘 要: 对青藏高原和云贵高原的 15 种獐牙菜属植物进行了 3 种苦味苷, 即獐牙菜苦苷 (swertiamarin)、龙胆苦苷 (gentiopicroside)、苦龙苷 (amarogentin)、一种黄酮苷-当药黄素 (swertisin)、及 5 种吡喃苷-芒果苷 (mangiferin)、当药醇苷 (swertianolin)、7-O-[α L-吡喃鼠李糖-(1²)- β D-吡喃木糖]-1, 8-二羟基-3-甲氧基吡喃 (7-O-[α L-rhamnopyranosyl-(1²)- β D-xylopyranosyl]-1, 8-dihydroxy-3-methoxyxanthone)、7-O- β D-吡喃木糖-1, 8-二羟基-3-甲氧基吡喃 (7-O- β D-xylopyranosyl-1, 8-dihydroxy-3-methoxyxanthone)、3-O- β D-吡喃葡萄糖-1, 8-二羟基-5-甲氧基吡喃 (3-O- β D-glucopyranosyl-1, 8-dihydroxy-5-methoxyxanthone) 等 9 种主要药效成分同时进行了高效液相色谱的含量测定 (Kromasil C₁₈柱, 甲醇-水梯度洗脱, 二级管阵列检测); 并对其主要药效成分的分布进行了比较。

关键词: 高效液相色谱法; 獐牙菜; 环烯醚萜苷; 黄酮苷; 吡喃苷

中图分类号: Q946; S567.23.9 **文献标识码:** A

Determination of active constituents in fifteen species *Swertia* of genus by high performance liquid chromatography

JILAN-ju¹, BAO Yi¹, CHEN Gui-chen¹, ZHAO Ming-chun², SUN Hong-fa²

(1 Northwest Plateau Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810001, China; 2 Qinghai Plateau Institute of Tibetan Herbs, Xining 810007, China)

Abstract: This paper deals with quantitative determination of three iridoid glycosides: swertiamarin, gentiopicroside and amarogentin, one flavonoidal glycoside: swertisin and five xanthone glycosides: mangiferin, swertianolin, 7-O-[α L-rhamnopyranosyl-(1²)- β D-xylopyranosyl]-1, 8-dihydroxy-3-methoxyxanthone, 7-O- β D-xylopyranosyl-1, 8-dihydroxy-3-methoxyxanthone, and 3-O- β D-glucopyranosyl-1, 8-dihydroxy-5-methoxyxanthone in fifteen *Swertia* species by means of HPLC. U-Bondapak C₁₈ was used as the stationary phase, and water-methanol as the gradient solvent system. Analytical results were given. The similarities and diversities of these plants were compared and discussed.

Key words: HPLC; *Swertia*; iridoid glycosides; flavonoidal glycoside; xanthone glycosides

獐牙菜属 (*Swertia*) 为龙胆科植物, 主要分布于青藏高原和云贵高原, 是用于治疗黄疸性肝胆疾病和病毒性肝炎的常用藏药, 俗称“藏因陈”。研究资料表明, 獐牙菜属植物中富含三萜类、苦味素类、黄酮

类和吡喃类^[1], 这些成分中的齐墩果酸、芒果苷、环烯醚萜苷类具有降酶、利胆、强壮、镇痛等作用。对这些成分在植物中的分布及含量也有较多研究报道^[2-4], 但缺乏较系统地多组分药用成分分布的研

* 收稿日期: 2003-7-22; 修改稿收到日期: 2004-03-17

基金项目: 国家中西部专项(2001BA901A47)

作者简介: 纪兰菊(1952-), 女(汉族), 副研究员, 主要从事藏药药化研究工作。

究。所以,系统地分析和研究獐牙菜属植物中多组分药用成分分布和含量,可以为新资源药材的发现,入药药材的质量评价提供理论依据。本研究建立了獐牙菜属植物中主要苷类成分:3种苦味苷,即獐牙菜苦苷(又称当药苦苷 swertiamarin)、龙胆苦苷(gentiopicroside)、苦龙苷(amarogentin);一种黄酮苷-当药黄素(swertisin);5种吡喃苷-芒果苷(mangiferin)、当药醇苷(swertianolin)、7-O-[α L-吡喃鼠李糖-(1 \rightarrow 2)- β D-吡喃木糖]-1,8-二羟基-3-甲氧基吡喃(7-O-[α L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β D-xylopyranosyl]-1,8-dihydroxy-3-methoxyxanthone XD-3)、7-O- β D-吡喃木糖-1,8-二羟基-3-甲氧基吡喃(7-O- β D-xylopyranosyl-1,8-dihydroxy-3-methoxyxanthone XD-4)、3-O- β D-吡喃葡萄糖-1,8-二羟基-5-甲氧基吡喃(3-O- β D-glucopyranosyl-1,8-dihydroxy-5-methoxyxanthone XD-5)等成分的高效液相色谱测定方法,并对青藏高原和云贵高原分布的15种獐牙菜属植物中的9种主要苷类药效成分含量分布进行了测定和比较。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

LC-10A T_{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;苦龙苷、当药黄素、芒果苷、当药醇苷、XD-3、XD-4、XD-5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。水为重蒸水并经0.45 μ m 滤膜过滤;甲醇(山东禹王试剂公司产品)为色谱纯;其它试剂均为分析纯。獐牙菜植物样品(表1)经中国科学院西北高原生物研究所刘尚武、何廷农教授鉴定。

1.2 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、龙胆苦苷、苦龙苷、当药黄素、芒果苷、当药醇苷、XD-3、XD-4和XD-5各对照品约2mg于10mL容量瓶中,用甲醇定容至刻度,得浓度约为0.2mg/mL的对照品溶液。供试品溶液的制备:将獐牙菜植物样品粉碎成细粉,根据测定成分的线性范围,精确称取各待测样品500~1250mg于100mL锥形瓶中,加入20mL甲醇于60 $^{\circ}$ C水浴上回流提取2h,冷却至室温后,过滤定容至25mL,待上机分析。

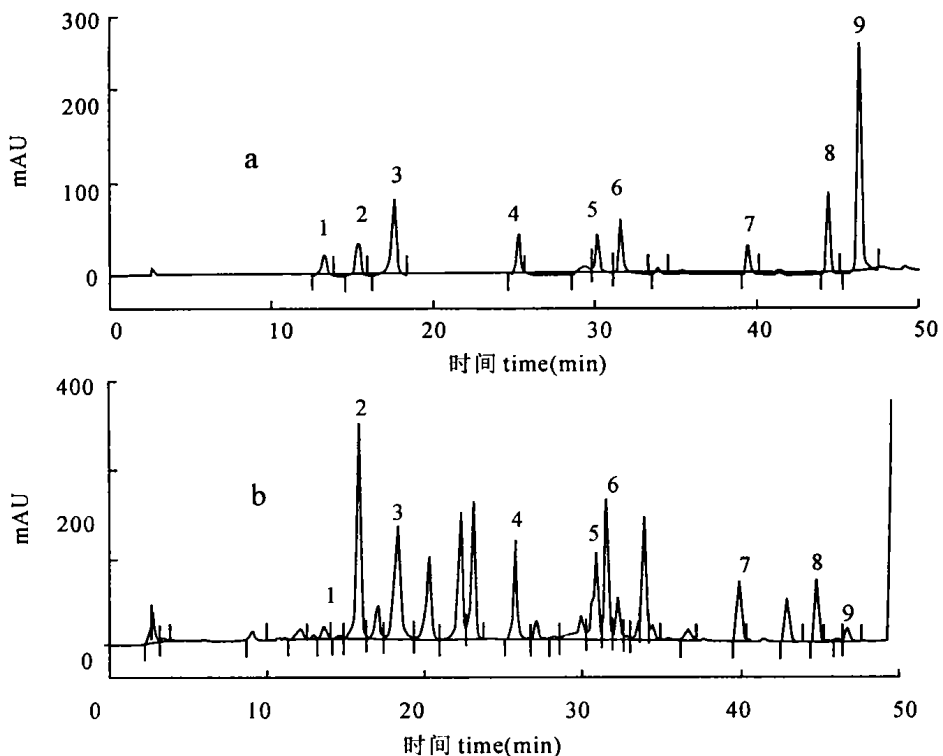


图1 对照品(a)及样品(b)色谱图

1. 獐牙菜苦苷; 2. 龙胆苦苷; 3. 苦龙苷; 4. 黄酮苷-当药黄素; 5. 吡喃苷-芒果苷; 6. 当药醇苷; 7. XD-3; 8. XD-4; 9. XD-5

Fig. 1 Chromatogram of standard (a) and samples (b)

1. Swertiamarin; 2. Gentiopicroside; 3. Amarogentin; 4. Swertisin; 5. Mangiferin; 6. Swertianolin; 7. XD-3; 8. XD-4; 9. XD-5

1.3 色谱条件

色谱柱为 Kromasil 5 μ C₁₈ 250 mm \times 4.6 mm; 流动相为 甲醇-水-0.02% 磷酸, 梯度洗脱, 0~50 min; 甲醇 20%~80%, 50~55 min, 甲醇至 100%; 检测波长: 240 nm、260 nm; 柱温为室温。

2 结果与讨论

2.1 检测波长的选择

3 种苦味苷属裂环烯醚萜苷类, 在 240 nm 波长左右均有较强吸收, 黄酮和吡啶酮属苯并色原酮, 一般在 250、260、310、380 nm 波长左右有较强吸收, 经二级管阵列检测选择, 确定 240 nm 为苦味苷检测波长, 260 nm 为黄酮苷和吡啶酮苷的检测波长。

2.2 提取溶剂及色谱条件的选择

苦味苷、黄酮苷和吡啶酮苷均具有亲脂和亲水 2 种基团, 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。在甲醇和乙醇提取实验中, 结果显示吡啶酮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。甲醇回流提取与常温下超声提取均能将 9 种成分提出, 但超声提取实验结果显示 9 种成分的转移率较回流提取的低, 为此选用回流 2 h 的提取条件, 结果苦味苷、黄酮苷和吡啶酮苷基本被提出。

研究用甲醇-水-磷酸梯度洗脱系统, 可较好地 将 3 种苦味苷和 1 种黄酮苷和 5 种吡啶酮苷基线分开, 并使全部组分在 50 min 内流出。

2.3 标准曲线及线性范围

分别精密吸取经分级稀释后的各对照品溶液, 按选定的色谱条件 20 μ L 进样, 以进样量与峰面积作标准曲线, 得 9 种成分的线性方程、相关系数及线性范围(表 1)。结果表明, 9 种化合物的线性关系良好, 符合测定要求。

表 1 9 种药用成分的线性方程($Y=A+BX$)、相关系数及线性范围

Table 1 The linear and correlation coefficient of nine compounds

化合物名称 Name	线性方程 Linear equation		相关系数(r) Correlation coefficient	线性范围 Linear range(μ g)
	A	B		
獐牙菜苦苷 Swertiamarin	1.18×10^5	1.36×10^6	0.9996	0.72~3.6
龙胆苦苷 Gentiopicroside	2.27×10^4	8.54×10^5	0.9992	0.80~4.00
苦龙苷 Amargentin	2.16×10^5	7.09×10^6	0.9982	0.408~2.040
黄酮苷-当药黄素 Swertisin	9.63×10^5	3.44×10^6	0.9993	0.92~4.60
吡啶酮苷-芒果苷 Mangiferin	1.50×10^5	3.01×10^6	0.9995	1.16~5.80
当药醇苷 Swertianolin	9.29×10^4	1.90×10^6	0.9995	0.88~4.40
XD-3	1.52×10^5	2.72×10^6	0.9993	0.88~4.40
XD-4	1.50×10^4	1.42×10^6	0.9999	0.72~3.60
XD-5	1.31×10^5	2.08×10^6	0.9986	0.68~3.40

2.4 方法精密度、重复性及回收率的测定

精确吸取上述各对照品溶液, 进样 20 μ L, 重复 5 次, 进行测定方法的精密度试验。

精确称取抱茎獐牙菜、川西獐牙菜等量样品各 5 份, 分别重复 5 次, 进行测定方法的重复性试验, 结果见表 3。

表 2 9 种化合物的精密度测定($n=5$)

Table 2 Determination of precision ($n=5$) for nine compounds

化合物 Compound	獐牙菜苦苷 Swertiamarin	龙胆苦苷 Gentiopicroside	苦龙苷 Amargentin	黄酮苷-当药黄素 Swertisin	吡啶酮苷-芒果苷 Mangiferin	当药醇苷 Swertianolin	XD-3	XD-4	XD-5
Aera(mAv)	1030495	3519414	10413407	1933588	7546777	11818856	16095036	1030967	3772254
RSD (%)	3.17	3.56	2.79	2.41	1.34	4.85	1.03	3.06	1.68

精确称取已知含量的川西獐牙菜、祁连獐牙菜等量样品各 5 份, 加入一定量的对照品, 按样品处理

方法制备并进样 20 μ L, 计算各对照品的加样回收率, 结果见表 4。

表 3 9 种化合物的重复性测定($n=5$)

Table 3 Determination of repeat ($n=5$) for nine compounds

化合物 Compound	獐牙菜苦苷 Swertiamarin	龙胆苦苷 Gentiopicroside	苦龙苷 Amargentin	黄酮苷-当药黄素 Swertisin	吡啶酮苷-芒果苷 Mangiferin	当药醇苷 Swertianolin	XD-3	XD-4	XD-5
Contents (%)	3.495	0.9368	0.0385	0.1398	0.0902	1.1651	0.1266	0.1332	0.1245
RSD (%)	2.73	4.11	1.45	3.51	1.85	2.61	2.68	4.52	1.88

表 4 9 种化合物的回收率测定 ($n=5$)Table 4 Results of recoveries ($n=5$) for nine compounds

化合物 Compound	本底量 Background (mg/L)	加样量 Added (mg/L)	基本量 Found (mg/L)	回收率 Recovery (%)	RSD (%)
swertiamarin	102.7	38	140.93	100.22	3.85
gentiopicroside	8.56	10	18.56	102.20	2.22
amargentin	113.33	44	157.60	100.24	3.20
swertisin	49.37	21	69.44	101.81	2.92
mangiferin	23.05	34	56.96	99.61	3.41
swertianolin	112.2	22	135.32	101.00	2.65
XD-3	133.40	211.6	345.72	100.53	3.63
XD-4	25.16	24	48.99	99.31	3.24
XD-5	81.98	36	116.99	98.79	2.33

表 5 15 种獐牙菜中 9 种药用成分的测定 ($n=2$)Table 5 Contents of active constituents in *Swertia* ($n=2$)

种名 Species	采集地点 Place of collection	活性成分 Active constituents* (%)								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
1 叶萼獐牙菜 <i>S. calycina</i>	云南玉龙雪山 Yunnan Yulong Xueshan		0.1484	0.2417	0.0152	0.4645	0.1795			
2 金沙獐牙菜 <i>S. patens</i>	云南善州花甸 Yunnan Shanzhou	+	3.5311	+		0.3090	0.3109	0.0144	0.0162	
3 西南獐牙菜 <i>S. cincta</i>	云南善州花甸 Yunnan Shanzhou	0.0805	1.4133	+	0.0085	0.0075	0.0162		0.0078	0.0109
4 显脉獐牙菜 <i>S. nervosa</i>	云南昆明市郊 Yunnan Kunming	+	0.0609	+	0.0110	+	0.0289		0.0074	+
5 毛獐牙菜 <i>S. pubescens</i>	云南善州花甸 Yunnan Shanzhou			0.0247	+	0.2542	0.2294		+	0.1407
6 印度獐牙菜 <i>S. clivayita</i>	西藏 Xizang	0.4205	0.0668	0.1078		0.1144	0.0083		0.0503	+
7 普兰獐牙菜 <i>S. purpurascens</i>	西藏 Xizang	0.1577	0.0389	0.1980		2.8603		0.0286	+	
8 祁连獐牙菜 <i>S. przewalskii</i>	青海海北州 Qinghai Haibei		3.6333	0.0513	0.0977	0.0461	0.2596			0.1640
9 红直獐牙菜 <i>S. erythrosticta</i>	青海海北州 Qinghai Haibei		0.3205	0.1749	0.0196	0.1308	0.5487		1.0041	+
10 四数獐牙菜 <i>S. tetraptera</i>	青海海东地区 Qinghai Haidong	0.1474	3.8177	+	0.2379	+	0.0272			
11 大籽獐牙菜 <i>S. macrospema</i>	西藏 Xizang				0.0354	+	0.0329		0.0132	0.0300
12 狭叶獐牙菜 <i>S. angustifolia</i>	西藏 Xizang	0.6248	0.0253		0.0246	+				
13 藏獐牙菜 <i>S. racemosa</i>	西藏 Xizang		0.0750			0.0179		0.0119	0.0214	
14 川西獐牙菜 <i>S. mussotii</i>	青海玉树州 Qinghai Yushu	0.2535	4.8751	0.0824	0.0701	0.9462		0.4835	0.0224	0.1334
15 川西獐牙菜 <i>S. mussotii</i>	青海玉树州 Qinghai Yushu	+	9.8833	0.1509	+	0.7497		0.1261	+	0.1464
16 抱茎獐牙菜 <i>S. franchetiana</i>	青海互助县 Qinghai Huzhuxian	0.1347	0.0543	+	0.0234	0.0059	0.0376			
17 抱茎獐牙菜 <i>S. franchetiana</i>	青海西宁市 Qinghai Xining	4.8193	1.0799	+	0.1127	0.1087	0.8969			
18 抱茎獐牙菜 <i>S. franchetiana</i> cv	青海西宁市(栽培) Qinghai Xining (cv)	0.6675	0.2675		0.0359	0.0357	0.3382			

Notes: 1. Swertiamarin; 2. Gentiopicroside; 3. Amargentin; 4. Swertisin; 5. Swertisin; 6. Swertisin; 7. XD-3; 8. XD-4; 9. XD-5

2.5 样品的测定

根据上述样品处理方法, 对 15 种獐牙菜属植物进行了定量提取, 在限定的色谱条件下, 对 15 种獐牙菜进行了 9 种药效成分的含量测定(表 5)。结果显示, 青藏高原的 10 种獐牙菜中, 3 种苦味苷分布以龙胆苦苷最多, 獐牙菜苦苷次之, 苦龙苷最少; 吡

酮苷类成分分布以芒果苷居首, 当药醇苷次之; 非药典收载植物中, 红直獐牙菜(*S. erythrosticta*)及祁连獐牙菜(*S. purpurea*)药用成分的分布与药典收载植物成分分布、含量相近, 值得进一步开发利用。

川西獐牙菜与抱茎獐牙菜的植物形态与味觉十分接近, 但其药理研究显示抗肝炎作用有一定差异,

这和药效成分^[5,6]分布中,抱茎獐牙菜基本不含有川 一步研究。
西獐牙菜中苷 3、苷 4、苷 5 的成分是否有关,值得进

参考文献:

- [1] SONG W ZH (宋万志). General of medicinal plants of Gentianaceae in China[J]. *Chinese Medicine Communication* (中药通报), 1986, **11** (11): 643- 647 (in Chinese).
- [2] GAO G Y (高光跃), LI M (李 鸣), FENG Y X (冯毓秀), TAN P (谭 沛). Determination of effective constituents in 11 *Swertia* and related plants by HPLC[J]. *Acta Pharmaceutica Sinica* (药学报), 1994, **29**(12): 910- 914 (in Chinese).
- [3] SAH D D, YUKIO O, YUKIO H, KUN D T. High-performance liquid chromatographic analysis of *Swertia* herb[J]. *Journal of Chromatography*, 1986, **360**: 307- 311.
- [4] HU F Z (胡凤祖), SONG Y L (宋娅莉), LIU M (刘 梅), SHI ZH X (师治贤). Analysis of medicinal bioactive composition of Gentianaceae in Qinghai Tibet plateau by high performance liquid chromatography[J]. *Chinese Journal of Chromatography* (色谱), 2003, **21** (1): 63- 65 (in Chinese).
- [5] JIL J (纪兰菊), LIAO ZH X (廖志新), SUN H F (孙洪发). A survey of *Gentian* plants of Tibetan traditional herb medicines[J]. *Acta Biologica Plateau Sinica* (高原生物学集刊), 2002, **15**: 243- 250.
- [6] SUN H F (孙洪发), HUB L (胡柏林), DING J Y (丁经业), FAN SH F (樊淑芬). The glucosides from *Swertia mussotii* Franch[J]. *Acta Botanica Sinica* (植物学报), 1991, **33** (1): 31- 37 (in Chinese).

《高等真菌代谢产物》一书出版

《高等真菌代谢产物》一书由高锦明教授主编,西北农林科技大学出版社出版。

本书是国家自然科学基金(No. 30370019)、教育部优秀青年教师资助计划、云南省自然科学基金(No. 2000B0066M)、中科院昆明植物研究所植物化学开放研究重点实验室基金及西北农林科技大学重点资助项目研究的主要成果之一,是高锦明教授近5年来对10种高等真菌代谢产物研究成果的总结。

全书共11章,介绍了印度块菌、蓝黄红菇、耳状网褶菌、黄鳞多孔菌、蜜环菌、远东疣柄牛肝菌等10种高等真菌代谢产物的提取分离纯化方法,阐明了近百个化合物的化学结构,初步评价了鞘脂和甾醇抑制磷脂酶A2活性及抗HIV-1活性,介绍了从糖醇手性原料合成糖苷酶抑制剂——多羟基氮杂糖的通用方法,测定了60种高等真菌的杀虫抑菌活性。

本书可供从事天然产物化学、微生物学、生物技术、生物工程、中药学、食品科学与工程、植物保护等高等院校专业师生及相关领域的科技人员参考。