

藏药提宗龙胆和线叶龙胆花中四种苦苷类成分的 HPLC 测定

许传梅^{1,2}, 董琦¹, 星玉秀^{1,2}, 胡凤祖^{1*}¹中科院西北高原生物研究所, 西宁 810001; ²中科院研究生院, 北京 100049

摘要:应用 HPLC 分析方法同时测定藏药提宗龙胆和线叶龙胆两种植物花中落干酸、獐牙菜苦苷、龙胆苦苷、獐牙菜苷 4 种苦苷类成分的含量。采用 Econosphere C₁₈ 色谱柱 (250 × 4.6 mm, 5 μm), 以甲醇-0.5% 乙酸为流动相进行梯度洗脱, 流速为 1.0 mL/min; 检测波长为 245 nm。结果表明, 除提宗龙胆中未检出獐牙菜苦苷外, 其它成分均在两种植物中存在, 但含量存在一定的差异。

关键词:藏药; 提宗龙胆; 线叶龙胆; 落干酸; 獐牙菜苦苷; 龙胆苦苷; 獐牙菜苷; HPLC

中图分类号: R284.1; Q946

文献标识码: A

Determination of Four Iridoid Glycosides in Tibetan Medicine

Gentiana tizuensis Franch. and Gentiana farreri by HPLC

XU Chuan-mei^{1,2}, DONG Qi¹, XING Yu-xiu^{1,2}, HU Feng-zu^{1*}¹Northwest Plateau Institute of Biology, the Chinese Academy of Sciences, Xining 810001, China;²Graduate University of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract: The contents of four iridoids (loganic acid, swertiamarin, gentiopicroside, sweroside) in *Gentiana tizuensis* Franch. and *Gentiana farreri* were analyzed by HPLC. The analysis was performed on Econosphere C₁₈ (250 × 4.6 mm, 5 μm) column, with the solution of 0.5% acetic acid and methanol as mobile phase, at a flow rate of 1.0 mL/min. The detection wavelength was 254 nm. The results indicated that swertiamarin was not detected in *Gentiana tizuensis* Franch., and the contents of four iridoids in these two plants were different.

Key words: Tibetan medicine; *Gentiana tizuensis* Franch.; *Gentiana farreri*; loganic acid; swertiamarin; gentiopicroside; sweroside; HPLC

提宗龙胆 (*Gentiana tizuensis* Franch.) 和线叶龙胆 (*Gentiana farreri*) 被藏医作为“邦见”使用, 《晶珠本草》记载: 邦见治毒病, 各种热症, 喉炎热闭; 按花色分为白、蓝和黑三类, 分别是“邦见嘎保”、“邦见温保”、“邦见那保”^[1]。提宗龙胆也称白花龙胆, 线叶龙胆又称蓝花龙胆, 在藏药中分别作为邦见嘎保和邦见温保使用^[2], 以花入药, 用于治疗气管炎、咳嗽、天花等。对龙胆植物中苦苷类成分的研究由来已久^[3-7], 但多集中于根、根茎的研究, 其中有效成分为环烯醚萜苷类^[3], 主要包括龙胆苦苷、獐牙菜苦苷等。目前尚未有提宗龙胆、线叶龙胆花中苦苷类成分含量测定的报道。本文应用 HPLC 法, 对上述两种植物花中 4 种苦苷类成分, 即落干酸 (loganic acid)、獐牙菜苦苷 (swertiamarin)、龙胆苦苷 (genti-

opicroside)、獐牙菜苷 (sweroside), 进行了定量分析, 以期对龙胆花的质量控制提供一定的科学依据。

1 材料与方法

1.1 仪器

Waters 515 高效液相色谱仪; Waters 2996 二极管阵列检测器; 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

落干酸、獐牙菜苦苷、龙胆苦苷、獐牙菜苷对照品 (中国药品生物制品检定所), 超纯水, 甲醇 (色谱纯), 乙酸 (分析纯)。

样品购自西藏, 经本所何廷农研究员鉴定为提宗龙胆和线叶龙胆。

1.3 色谱条件

色谱柱: Econosphere C₁₈ (250 × 4.6 mm, 5 μm)。流动相 A: 水 (含 0.5% 乙酸), 流动相 B: 甲

收稿日期: 2007-03-20 接受日期: 2007-05-25

*通讯作者 E-mail: hufz@nwipb.ac.cn

醇。梯度洗脱程序为: 0 ~ 20 min, B 为 19%; 20 ~ 35 min, B 为 19% ~ 25%; 35 ~ 40 min, B 为 25% ~ 19%。流速: 1.0 mL/min; 检测波长为 245 nm; 柱

温: 30 ; 进样量: 10 μ L。该色谱条件下对照品及样品的 HPLC 色谱分离图见图 1。

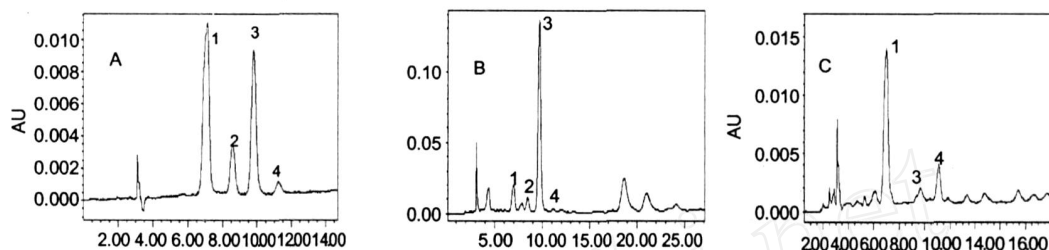


图 1 对照品 (A)、线叶龙胆 (B)、提宗龙胆 (C) 的色谱图

Fig. 1 HPLC chromatogram of standards (A), *Gentiana farreri* (B) and *Gentiana tizuensis* Franch (C)

注: 1~4 分别代表落干酸、獐牙菜苦苷、龙胆苦苷、獐牙菜苷。1-4 refers to loganic acid, swertiamarin, gentiopicroside and sweroside, respectively.

1.4 对照品溶液的制备

分别精密称取落干酸、獐牙菜苦苷、龙胆苦苷、獐牙菜苷对照品适量, 置于 10 mL 容量瓶中, 加入甲醇溶解, 并定容至刻度, 作为贮备液。分别精密量取上述贮备液各 1 mL 至 10 mL 容量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀, 作为混合对照品溶液, 其浓度为: 落干酸 1.30 mg/mL, 獐牙菜苦苷 0.44 mg/mL, 龙胆苦苷 2.12 mg/mL, 獐牙菜苷 0.023 mg/mL。

1.5 供试品溶液的制备

精密称取干燥的龙胆花粉末 (过 60 目筛, 石油醚脱脂, 干燥) 0.2 g, 置具塞锥形瓶中, 加入甲醇 20 mL, 40 超声处理 30 min, 冷却至室温, 过滤, 滤液置于 25 mL 容量瓶中, 用甲醇定容, 摇匀。

2 结果与讨论

2.1 线性关系的考察

取混合对照品溶液, 用甲醇逐级稀释一倍, 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 4 种苦苷类的回归方程 (见表 1)。

表 1 4 种苦苷类成分的回归方程及参数

Table 1 Liner equations and factors of four iridoid glycosides

对照品 Standard	线性方程 Liner equation	相关系数 r
落干酸 Loganic acid	$Y = 5033.5X - 29213$	0.9994
獐牙菜苦苷 Swertiamarin	$Y = 3675.3X - 16237$	0.9997
龙胆苦苷 Gentiopicroside	$Y = 8566.3X - 355955$	0.999
獐牙菜苷 Sweroside	$Y = 16634X - 11409$	0.9991

2.2 精密度实验

精密吸取混合对照品溶液, 进样 10 μ L, 连续进样 5 次, 进行精密度试验。测得落干酸峰面积的 RSD 为 1.14%, 獐牙菜苦苷为 1.02%, 龙胆苦苷为 1.23%, 獐牙菜苷为 1.37%。

2.3 重复性实验

平行称取线叶龙胆花粉末 5 份, 每份 0.2 g, 按“2.3 项下方法制备溶液, 按上述色谱条件测定峰面积, 测得落干酸 RSD 为 1.21%, 獐牙菜苦苷为 1.60%, 龙胆苦苷为 0.79%, 獐牙菜苷为 1.55%。

2.4 加样回收率实验

平行称取线叶龙胆花粉末 3 份, 每份 0.2 g, 分别加入混合对照品溶液 0.5、1、1.5 mL, 按“2.3 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, 得到落干酸、獐牙菜苦苷、龙胆苦苷、獐牙菜苷的回收率分别为 94.61%、98.24%、100.05%、98.64%。

2.5 样品含量测定

精密称取线叶龙胆花和提宗龙胆花各 0.2 g, 按“2.3 项下方法制备溶液, 按上述色谱条件测定, 重复进样 3 次, 得到落干酸、獐牙菜苦苷、龙胆苦苷、獐牙菜苷的峰面积积分值, 利用线性方程计算 4 种苦苷类成分的含量, 结果见表 2。

2.6 讨论

2.6.1 对传统藏药运用 HPLC 方法分析其苦苷类成分, 为对其进行质量控制以及进一步的研究开发提供一定的理论依据。本实验成功分离了藏药提宗

表 2 样品苦苣类成分含量测定结果
Table 2 Contents of iridoid glycosides samples

	提宗龙胆 <i>Gentiana tizuensis</i> Franch		线叶龙胆 <i>Gentiana farreri</i>	
	平均含量 % Average content	RSD % (n=3)	平均含量 % Average content	RSD % (n=3)
落干酸 Loganic acid	0.048	0.15	1.00	0.69
獐牙菜苦苣 Swertiamarin	未检出	-	0.595	1.56
龙胆苦苣 Gentiopicroside	0.562	0.16	4.48	0.99
獐牙菜苦苣 Sweroside	0.055	1.17	0.035	1.21

龙胆和线叶龙胆两种植物花中的 4 种苦苣类成分, 并进行了定量分析, 为进行藏药“邦见”的质量研究奠定了基础。

2.6.2 因花中脂溶性成分较多, 故先用石油醚回流提取 1 h^[8], 再进行苦苣类成分的提取。对于苦苣类成分的分离, 采用等度洗脱时, 各个组分之间未能达到基线分离。通过一系列的试验, 最终确定用甲醇-0.5%乙酸溶液的梯度洗脱程序, 可使各个组分得到良好的分离。

2.6.3 测定结果表明, 4 种苦苣类成分在线叶龙胆花中皆存在, 其中尤以龙胆苦苣含量最高, 达 4%。提宗龙胆花中未检出獐牙菜苦苣, 且其它三种苦苣类成分含量也明显低于线叶龙胆, 可能与其生态环境有关^[9], 其原因尚有待于进一步研究。

2.6.4 中国药典收载的龙胆入药为根, 具有抗炎作用, 主治肝炎, 其主要药效成分为龙胆苦苣^[10]。而“邦见”在藏医中主要用于止咳、抗气管炎, 本实验结果表明提宗龙胆和线叶龙胆花中苦苣类成分含量较低, 可能是此类成分并非其主要药效成分。因此, 要确定龙胆花中的主要药效成分, 仍需结合药理实验进行深入探讨。

参考文献

- Yang YC (杨永昌), et al Tibetan Medicines (藏药志), 1st Ed Qinghai: Qinghai People Press, 1991. 186-189.
- Liu HQ (刘海青), Liu YR (刘亚蓉), Zhu ZQ (朱志强), et al Medicinal plant resources of *Gentiana* in Qinghai Prov-ince *J Chin Med Mat* (中药材), 1995, 18: 119-125.
- Ji LJ (纪兰菊), Sun HF (孙洪发), Ding JY (丁经业), et al Study on chemical compositions of four *Gentiana* plants from Qinghai-Xizang Plateau *Acta Biologica Plateau Sinica* (高原生物学集刊), 11: 113-118.
- Luo JP (罗集鹏), Lou ZC (楼之岑). TLC-densitometry determination of bitter glycosides in the Chinese drug Longdan, *Radix gentiana*, and its quality evaluation *Acta Pharm Sinica* (药学学报), 1986, 21: 40-46.
- Rodriguez S, Marston A, Wolfender JL. "Iridoids and secoiridoids in the Gentianaceae". *Curr Org Chem*, 1987, 2: 627-648.
- Chou GX (俞桂新), Dong TX (董婷霞), Zhan HQ (詹华强), et al Comprision of different method for extraction of gentiopicroin in *Radix gentiana* *Res Practice Chin Med* (现代中药研究与实践), 2004, 18(5): 38-40.
- Cao YN (曹雅男), Sun Y (孙岳), Li L (李璐), et al HPLC determination of gentiopicroside in *Radix gentianae* *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 2005, 25: 81-83.
- Liang XY (梁向艳), Tian Q (田琼), Li CF (李超峰). Gentiopicroside content in violet *Gentiana* by LC-MS and HPLC. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 2006, 28: 548-552.
- Tao SH (陶曙红), Wu FE (吴凤镔). Effect of ecological environment on active constituents of medicinal plants *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2003, 15: 174-177.
- China Pharmacopoeia Committee. Pharmacopoeia of People's Republic of China: Part 1 (中华人民共和国药典一部), 1st Ed Beijing: Chemical Industry Press, 2005. 64-65.