

HPLC 法同时测定黄花獐牙菜根中 8 种成分

唐晓莹, 旦增绕觉, 杨晨悦, 姜 雪, 王晓玲, 陈炼红*

西南民族大学药学院, 四川 成都 610041

摘 要: 目的 建立同时测定黄花獐牙菜 *Swertia kingii* 根中獐牙菜苷、龙胆苦苷、异荛草苷、1,3,7,8-四羟基呋喃酮-1-*O*- β -D-葡萄糖、当药醇苷、1,3,7,8-四羟基呋喃酮、去甲基维菊叶龙胆酮和 1,5,8-三羟基-3-甲氧基呋喃酮 8 种成分的 HPLC 方法。方法 采用 Agilent Zorbax ODS (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m) 色谱柱, 乙腈-0.5%磷酸水梯度洗脱, 体积流量为 1.0 mL/min, 检测波长 254 nm, 柱温 30 $^{\circ}$ C。结果 獐牙菜苷、龙胆苦苷、异荛草苷、1,3,7,8-四羟基呋喃酮-1-*O*- β -D-葡萄糖、当药醇苷、1,3,7,8-四羟基呋喃酮、去甲基维菊叶龙胆酮和 1,5,8-三羟基-3-甲氧基呋喃酮分别在 3.84~96.00 μ g/mL ($r=0.999\ 6$)、3.36~84.00 μ g/mL ($r=0.999\ 2$)、5.92~148.00 μ g/mL ($r=0.999\ 8$)、4.81~118.00 μ g/mL ($r=0.999\ 2$)、4.32~108.00 μ g/mL ($r=0.999\ 3$)、4.16~104.00 μ g/mL ($r=0.999\ 2$)、5.12~128.00 μ g/mL ($r=0.999\ 4$)、4.80~120.00 μ g/mL ($r=0.999\ 6$) 与峰面积积分值呈良好的线性关系; 平均回收率分别为 99.59%、98.95%、98.61%、99.63%、99.31%、99.50%、99.80%、98.50%, RSD 分别为 0.99%、3.37%、1.87%、1.93%、1.21%、1.62%、0.54%、1.87%。结论 所建方法简便、高效、准确, 重复性好, 可用于对黄花獐牙菜的质量控制, 有利于对该植物的综合利用开发。

关键词: 黄花獐牙菜; HPLC; 獐牙菜苷; 龙胆苦苷; 异荛草苷; 1,3,7,8-四羟基呋喃酮-1-*O*- β -D-葡萄糖; 当药醇苷; 1,3,7,8-四羟基呋喃酮; 去甲基维菊叶龙胆酮; 1,5,8-三羟基-3-甲氧基呋喃酮

中图分类号: R286.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2017)14-2960-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.14.026

Simultaneous determination of eight components in root of *Swertia kingii* by HPLC

TANG Xiao-ying, DANZENG Rao-jue, YANG Chen-yue, JIANG Xue, WANG Xiao-ling, CHEN Lian-hong

Pharmacy College, Southwest University for Nationalities, Chengdu 610041, China

Abstract: Objective To establish an HPLC method for simultaneously determining eight components, such as sweroside, gentiopicroside, isoorientin, 1,3,7,8-tetrahydroxy-xanthone-1-*O*- β -D-glucopyranosyl, swertianolin, 1,3,7,8-tetrahydroxy-xanthone, demethylbellidifolin, and 1,5,8-trihydroxy-3-methoxyxanthone in the root of *Swertia kingii*. **Methods** Chromatographic analysis was achieved on an Agilent Zorbax ODS column (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m) by gradient elution of acetonitrile-0.5% phosphoric acid in water at 30 $^{\circ}$ C. The flow rate was 1.0 mL/min and the detection wavelength was 254 nm. **Results** The calibration curves of all the eight constituents showed good linearity in a relatively wide concentration range. The linear ranges of swertiamarin, gentiopicroside, isoorientin, 1,3,7,8-tetrahydroxy-xanthone-1-*O*- β -D-glucopyranosyl, swertianolin, 1,3,7,8-tetrahydroxy-xanthone, demethylbellidifolin, and 1,5,8-trihydroxy-3-methoxyxanthone were 3.84—96.00 μ g/mL ($r=0.999\ 6$), 3.36—84.00 μ g/mL ($r=0.999\ 2$), 5.92—148.00 μ g/mL ($r=0.999\ 8$), 4.81—118.00 μ g/mL ($r=0.999\ 2$), 4.32—108.00 μ g/mL ($r=0.999\ 3$), 4.16—104.00 μ g/mL ($r=0.999\ 2$), 5.12—128.00 μ g/mL ($r=0.999\ 4$), 4.80—120.00 μ g/mL ($r=0.999\ 6$), respectively. The average recoveries were 99.59% (RSD 0.99%), 98.95% (RSD 3.37%), 98.61% (RSD 1.87%), 99.63% (RSD 1.93%), 99.31% (RSD 1.21%), 99.50% (RSD 1.62%), 99.80% (RSD 0.54%), and 98.50% (RSD 1.87%). **Conclusion** This method is simple, efficient, accurate, and reproducible, and can be used for the determination of eight constituents in root of *Swertia kingii*. This will promote the comprehensive usage of this plant.

Key words: *Swertia kingii* Hook. F; HPLC; sweroside; gentiopicroside; isoorientin; 1,3,7,8-tetrahydroxy-xanthone-1-*O*- β -D-glucopyranosyl; swertianolin; 1,3,7,8-tetrahydroxy-xanthone; demethylbellidifolin; 1,5,8-trihydroxy-3-methoxyxanthone

黄花獐牙菜 *Swertia kingii* Hook. F 系龙胆科 物多有清肝利胆、除湿清热等功效^[1]。黄花獐牙菜,
(*Gentianaceae*) 獐牙菜属 *Swertia* L. 植物, 该属植 别名赛保古折(藏名), 产于西藏南部。生于山坡上,

收稿日期: 2017-01-27

基金项目: 四川省科技支撑计划项目 (2015SZ0040)

作者简介: 唐晓莹 (1992—), 女, 重庆人, 硕士研究生, 研究方向为天然药物化学。E-mail: 474132110@qq.com

*通信作者 陈炼红 (1967—), 女, 藏族, 四川, 副教授, 研究方向为食品科学与加工。E-mail: wxl3232@sina.com

海拔 3 400~3 800 m 处。尼泊尔、印度锡金（模式标本产地）、不丹也有分布^[2]。始载于《青海高原药物图鉴》，该植物为多年生草本。是民间常用的一种治疗肝炎的草药^[3]。经文献报道^[3]和本课题组研究发现黄花獐牙菜主要含有大量呋喃及其苷类、环烯醚萜类、裂环环烯醚萜类、黄酮及其苷类、甾体类及有机酸类等^[4]，其中呋喃类成分具有抗氧化^[5]、防治心律失常^[6-7]、改善胰岛素抵抗^[8]、抑制乙酰胆碱酯酶和单胺氧化酶的活性^[9]，以及保护缺血性脑损伤的作用^[10-11]等多种活性^[12]。本实验采用 HPLC 法对黄花獐牙菜根部的主要化学成分进行测定，为全面评价和控制该药用植物质量提供参考。

1 材料

1.1 仪器

美国 Agilent 1200series 高效液相色谱仪（柱温箱，DAD 检测器，ChemStations 色谱工作站；美国安捷伦科技有限公司）；0.45 μm 微孔滤膜（上海泰坦科技公司）；AE 240 电子天平（瑞士 Metter Toledo 公司）；电子分析天平（梅特勒-托利多有限公司）；KQ-250B 超声波清洗器（昆山市超声仪器有限公司）。

1.2 试药

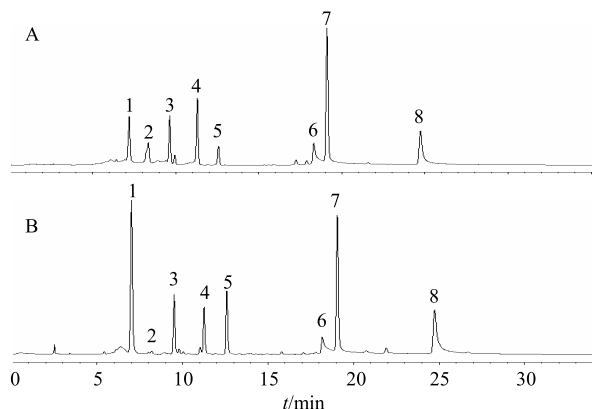
对照品獐牙菜苷（PS13060801）购于成都普思生物科技有限公司，经面积归一化法测定，质量分数大于 99.0%，对照品龙胆苦苷、异荛草苷、1,3,7,8-四羟基呋喃-1-*O*-β-*D*-葡萄糖、当药醇苷、1,3,7,8-四羟基呋喃、去甲基维菊叶龙胆酮和 1,5,8-三羟基-3-甲氧基呋喃均为本课题组自行分离精制，并经 MS、UV、¹H-NMR、¹³C-NMR 鉴定结构，HPLC 检测，质量分数均大于 97.0%。乙腈、磷酸均为色谱纯，水为屈臣氏蒸馏水并经 0.45 μm 微孔滤膜滤过，黄花獐牙菜采自西藏拉萨，共 3 批。经西藏自治区食品药品检验所达瓦卓玛副主任药师鉴定均为龙胆科植物黄花獐牙菜 *Swertia kingii* Hook. f. 的根。甲醇、乙腈（色谱纯，美国 Sigma 试剂公司）；无水乙醇、磷酸均为国产分析级；水（屈臣氏蒸馏水）。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

采用 Agilent Zorbax ODS (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱，流动相为乙腈（A）-0.5%磷酸水溶液（B），梯度洗脱 0~5 min, 10~20% A；5~15 min, 20%~45% A；15~30 min, 45%~65% A；30~35 min, 65%~75% A。体积流量为 1.0

mL/min；柱温 30 °C；检测波长 254 nm；进样量 20 μL。在此条件下，混合对照品及黄花獐牙菜提取物样品的色谱图见图 1。理论塔板数按龙胆苦苷峰计算不低于 3 000。



1-獐牙菜苷 2-龙胆苦苷 3-异荛草苷 4-1,3,7,8-四羟基呋喃-1-*O*-β-*D*-葡萄糖 5-当药醇苷 6-1,3,7,8-四羟基呋喃 7-去甲基维菊叶龙胆酮 8-1,5,8-三羟基-3-甲氧基呋喃
1-swertiamarin 2-gentiopicroside 3-isoorientin 4-1,3,7,8-tetrahydroxy-xanthone-1-*O*-β-*D*-glucopyranosyl 5-swertianolin 6-1,3,7,8-tetrahydroxy-xanthone 7-demethylbellidifolin 8-1,5,8-trihydroxy-3-methoxyxanthone

图 1 混合对照品溶液 (A) 和供试品溶液 (B) 的 HPLC 图谱
Fig. 1 HPLC of mixed reference substances solution (A) and sample solution (B)

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 称取獐牙菜苷 2.4 mg、龙胆苦苷 2.1 mg、异荛草苷 3.7 mg、1,3,7,8-四羟基呋喃-1-*O*-β-*D*-葡萄糖 3.0 mg、当药醇苷 2.7 mg、1,3,7,8-四羟基呋喃 2.6 mg、去甲基维菊叶龙胆酮 3.2 mg 及 1,5,8-三羟基-3-甲氧基呋喃 3.0 mg，置于 25 mL 量瓶中，用甲醇溶解并定容至刻度，摇匀，制成混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备 取黄花獐牙菜根粉末（50 目）0.5 g，精密称定，置具塞三角瓶中，精密加入甲醇 25 mL，超声处理（500 W，40 kHz）0.5 h，用甲醇补足减失质量，放置至室温，滤过，吸取 2 mL 溶液，置于 10 mL 量瓶中，用甲醇定容至刻度，摇匀，用 0.45 μm 滤膜滤过，即得。

2.3 线性关系考察

精密吸取“2.2.1”项下混合对照品溶液 1、3、5、7、9 mL 甲醇定容于 10 mL 量瓶中。分别注入高效液相色谱仪，测定色谱峰的峰面积。以峰面积为纵坐标（Y），对照品质量浓度为横坐标（X），进行线性回归，得出各个化合物的回归方程及相关系数，见表 1。

表 1 黄花獐牙菜根中 8 个化合物的回归方程、相关系数及线性范围

Table 1 Regression equation, correlation coefficient and linear range of eight compounds in roots of *S. kingii*

化合物	回归方程	<i>r</i>	线性范围/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
獐牙菜苷	$Y=16\,332.1\,X+321.37$	0.999 6	3.84~96.0
龙胆苦苷	$Y=5\,827.4\,X+116.79$	0.999 2	3.36~84.0
异荭草苷	$Y=54\,133.8\,X+133.48$	0.999 8	5.92~148.0
1,3,7,8-四羟基吡酮-1- <i>O</i> - β -D-葡萄糖	$Y=30\,935.3\,X+136.85$	0.999 2	4.81~118.0
当药醇苷	$Y=16\,235.7\,X+110.61$	0.999 3	4.32~108.0
1,3,7,8-四羟基吡酮	$Y=11\,742.8\,X+58.94$	0.999 2	4.16~104.0
去甲基维菊叶龙胆酮	$Y=126\,221.4\,X+325.53$	0.999 4	5.12~128.0
1,5,8-三羟基-3-甲氧基吡酮	$Y=49\,713.5\,X+99.9$	0.999 6	4.80~120.0

2.4 精密度试验

取上述同一对照品溶液按上述色谱条件重复 6 次,每次进样 20 μL ,样品峰面积 RSD 分别为獐牙菜苷 0.86%、龙胆苦苷 1.26%、异荭草苷 1.11%、1,3,7,8-四羟基吡酮-1-*O*- β -D-葡萄糖 0.87%、当药醇苷 1.59%、1,3,7,8-四羟基吡酮 1.38%、去甲基维菊叶龙胆酮 1.43%及 1,5,8-三羟基-3-甲氧基吡酮 0.68%。结果表明,仪器精密度良好。

2.5 重复性试验

取同一批样品 6 份,制备供试品溶液,进样,每次 20 μL ,样品峰面积 RSD 分别为獐牙菜苷 1.46%、龙胆苦苷 1.62%、异荭草苷 0.34%、1,3,7,8-四羟基吡酮-1-*O*- β -D-葡萄糖 0.53%、当药醇苷 1.35%、1,3,7,8-四羟基吡酮 1.49%、去甲基维菊叶龙胆酮 0.92%及 1,5,8-三羟基-3-甲氧基吡酮 1.14%。结果表明,本方法的重复性良好。

2.6 稳定性试验

取一份样品制备供试品溶液,分别在 0、4、8、16、24、48 h 进样分析,每次 20 μL ,记录峰面积,结果獐牙菜苷、龙胆苦苷、异荭草苷、1,3,7,8-四羟基吡酮-1-*O*- β -D-葡萄糖、当药醇苷、1,3,7,8-四羟基吡酮、去甲基维菊叶龙胆酮及 1,5,8-三羟基-3-甲氧基吡酮峰面积的 RSD 分别为 0.47%、1.25%、1.39%、0.48%、1.33%、0.71%、1.29%、1.19%。

基吡酮峰面积的 RSD 分别为 0.47%、1.25%、1.39%、0.48%、1.33%、0.71%、1.29%、1.19%。

2.7 加样回收率试验

精密称取已测定的样品黄花獐牙菜粉末约 0.05 g,共 5 份,每两份分别精密加入高、中、低 3 个质量浓度分别为 1.471、0.889、0.454 mg/mL 的混合对照品溶液适量,按“2.2.2”项下供试品方法制备溶液,每次进样 20 μL ,计算加样回收率,结果獐牙菜苷、龙胆苦苷、异荭草苷、1,3,7,8-四羟基吡酮-1-*O*- β -D-葡萄糖、当药醇苷、1,3,7,8-四羟基吡酮、去甲基维菊叶龙胆酮和 1,5,8-三羟基-3-甲氧基吡酮平均回收率分别为 99.59%、98.95%、98.61%、99.63%、99.31%、99.50%、99.80%、98.50%,RSD 分别为 0.99%、3.37%、1.87%、1.93%、1.21%、1.62%、0.54%、1.87%。

2.8 样品测定

取 3 批黄花獐牙菜根粉末 0.5 g,按“2.2.2”项下供试品制备方法进行制备。每个样品平行 3 份。进样,每次 20 μL ,得到獐牙菜苷、龙胆苦苷、异荭草苷、1,3,7,8-四羟基吡酮-1-*O*- β -D-葡萄糖、当药醇苷、1,3,7,8-四羟基吡酮、去甲基维菊叶龙胆酮和 1,5,8-三羟基-3-甲氧基吡酮的峰面积值,计算质量分数结果见表 2。

表 2 黄花獐牙菜根中 8 种化学成分测定结果 ($n=3$)Table 2 Determination of eight components in roots of *S. kingii* ($n=3$)

批次	质量分数/%							
	獐牙菜苷	龙胆苦苷	异荭草苷	1,3,7,8-四羟基吡酮-1- <i>O</i> - β -D-葡萄糖	当药醇苷	1,3,7,8-四羟基吡酮	去甲基维菊叶龙胆酮	1,5,8-三羟基-3-甲氧基吡酮
1	7.16	0.12	4.81	3.93	5.06	1.46	7.97	4.61
2	6.95	0.19	4.73	3.71	5.11	1.52	7.95	4.68
3	7.41	0.15	4.57	3.66	4.92	1.39	8.04	4.79
均值	7.17	0.15	4.70	3.77	5.03	1.46	7.99	4.69

3 讨论

本研究建立了黄花獐牙菜中 8 种化合物的 HPLC 测定方法,该方法分离度好,结果准确,具有良好的重复性和稳定性。采用该方法对 3 批黄花獐牙菜药材进行了定量测定。

3.1 检测波长的确定

对 8 种化合物甲醇溶液进行全波长扫描,獐牙菜苷、龙胆苦苷、异荛草苷、1,3,7,8-四羟基吡酮-1-*O*- β -D-葡萄糖、当药醇苷、1,3,7,8-四羟基吡酮、去甲基维菊叶龙胆酮及 1,5,8-三羟基-3-甲氧基吡酮的最大吸收波长分别为 250、275 nm, 240 nm, 270、348 nm, 250、310 nm, 246、322 nm, 260 nm, 248、278 nm, 250、278 nm。结果在 254 nm 下测定可兼顾 8 个成分最大吸收,且色谱图基线平稳,色谱峰峰形较好。故确定 254 nm 作为本实验的检测波长。

3.2 提取方法和色谱条件的优化

通过对不同溶媒的考察,结果以甲醇溶剂提取效率最高。在提取方法上,通过对超声、回流和索式提取 3 种方法进行考察,发现采用甲醇超声提取效果最佳。在提取时间的选择上,对超声提取 20、30、40、50 min 进行考察,结果发现超声提取 30 min 各成分提取完全,且随着时长的增加,对结果并无显著影响。所以最终采用甲醇超声处理 30 min。选择色谱条件时,实验过程中选择了甲醇-水、甲醇-0.1% 磷酸水、乙腈-水、乙腈-0.3% 磷酸水、乙腈-0.5% 磷酸水等流动相,从分离情况和出峰稳定性等综合分析选择乙腈-0.5% 磷酸水溶液为流动相较为合适。

3.3 结果分析

本实验首次建立了同时测定黄花獐牙菜根中 8 种主要有效成分量的 HPLC 法,并进行了系统的方法学考察,该方法具有简便、高效、准确,重复性好等特点。混合对照品色谱图中有许多较为明显的杂峰信号,可能存在些许杂质;也可能是由于分离过程中个别化合物的极性太过相似,导致分离效果不是很理想。本实验测定的黄花獐牙菜根中的 8 种主要成分中量最高的化合物为去甲基维菊叶龙胆酮,在 3 个批次中所测得的平均质量分数为 7.99%,獐牙菜苷的量也较高,在 3 个批次中的平均质量分数为 7.17%。这 2 种化合物分别占 8 种主要化合物质量分数总和的 22.85% 和 20.51%。当药醇苷、异荛草苷、1,5,8-三羟基-3-甲氧基吡酮和 1,3,7,8-四羟

基吡酮-1-*O*- β -D-葡萄糖,这 4 种化合物分别占 8 种主要成分质量分数总和的 14.39%、13.44%、13.42% 和 10.78%。其余 2 种化合物量较少。可见,黄花獐牙菜中的吡酮及其苷类成分占主要部分,而其吡酮类成分的药理活性颇为丰富,因此本实验不仅为吡酮化化合物的来源提供参考,同时为全面评估黄花獐牙菜这种药用植物的质量和新药研究开发提供了一定的参考。

参考文献

- [1] 中国科学院中国植物志编委会. 中国植物志 (第 62 卷) [M]. 北京: 科学出版社, 1988.
- [2] 唐晓莹, Brian M C G, 常 颜, 等. 黄花獐牙菜中的吡酮类化学成分研究 [J]. 中草药, 2017, 48(6): 1099-1102.
- [3] 张海涛, 张小龙, 代东海, 等. 黄花獐牙菜的化学成分研究 [J]. 中草药, 2010, 41(9): 1430-1432.
- [4] 肖 怀, 刘光明, 王 卓, 等. 丽江獐牙菜化学成分研究 [J]. 中国现代应用药学杂志, 2007, 24(2): 120-129.
- [5] Ashida S, Noguchi S F, Suzuki T. Antioxidative components, xanthone derivatives, in *Swertia japonica* Makino [J]. *Jaocs*, 1994, 71(10): 1095-1099.
- [6] 匡海学, 王知斌, 王秋红, 等. 一种治疗心律失常的尖叶假龙胆提取物及其制备方法和用途: CN 103638096 A [P]. 2012-10-24.
- [7] 李旻辉, 吕丽娟. 1,5,8-三羟基-3-甲氧基吡酮在制备防治心律失常药物中的应用: 中国, CN102743374A [P]. 2012-10-24.
- [8] Tian L Y, Bai X, Chen X H, *et al.* Anti-diabetic effect of methyl-swertianin and bellidifolin from *Swertia punicea* Hemsl and its potential mechanism [J]. *Phytomedicine*, 2010, 17: 533-539.
- [9] Urbain A, Marston A, Grilo L S, *et al.* Xanthones from *Gentianella amarella* ssp. *acuta* with acetylcholinesterase and monoamine oxidase inhibitory activities [J]. *J Nat Prod*, 2008, 71(5): 895-897.
- [10] 张剑辉, 宋慧君, 李淑媛. 维菊叶龙胆酮对局灶性脑缺血损伤的保护作用及机制探讨 [J]. 中国药理学通报, 2005, 21(2): 220-224.
- [11] 宋慧君, 张建辉, 闫 平. 维菊叶龙胆酮对缺血性脑损伤保护作用的实验研究 [J]. 大连医科大学学报, 2007, 29(2): 110-112.
- [12] Peres V, Nagem T J, Oliveira F F, *et al.* Tetraoxygenated naturally occurring xanthones [J]. *Phytochemistry*, 2000, 55(10): 683-710.