

不同产地三花龙胆地下器官龙胆苦苷的测定

马立祥, 肖 玮, 王 臣

(哈尔滨师范大学 生物学系, 黑龙江 哈尔滨 150025)

产自东北的龙胆草药材商品俗称“关龙胆”, 由于产量大、质量佳, 在国内外颇负盛名, 具有传统的市场优势。三花龙胆 *Gentiana triflora* Pall. 是关龙胆 3 种原植物之一, 生于湿草甸、林间空地或灌丛中。历史上, 由于三花龙胆主要生于湿地及苔草草甸, 难以采挖, 加之外观质量较差, 野生资源没有受到严重破坏。近年来, 随着“关龙胆”供需矛盾的加剧以及人们对野生药材的偏好, 三花龙胆的采挖量快速提高, 而且已经成为野生“关龙胆”药材的主体。为了保护 and 开发利用野生三花龙胆种质资源, 笔者对三花龙胆进行了系统的野生变家植研究。本实验采用高效液相色谱法对不同产地的野生三花龙胆根及根茎中龙胆苦苷进行测定, 以探讨原生地条件与主要药效成分量之间的关系, 为引种栽培研究选择优良种质提供依据。

1 仪器、试剂与材料

1.1 仪器: Waters 1525 高效液相色谱泵, Waters 2487 紫外—可见光检测器, Empower Pro 工作站, Nova-Pak C₁₈ 柱 (150 mm × 3.9 mm), Anke TDL-5 型离心机, Sartorius BS-210s 电子天平, Water Code 5CH 型柱温箱。

1.2 试剂: 龙胆苦苷对照品购自中国药品生物制品检定所。甲醇为色谱纯 (美国迪马公司), 乙醇为分析纯, 水为超纯水。

1.3 材料: 在传统的药材采收期 (花、果期), 采集不同地区的三花龙胆 (经哈尔滨师范大学生物系刘鸣远教授鉴定) 各 10~15 株, 带回实验室内, 将药材部分 (根及根茎) 取下洗净泥土, 吸净附水, 分开每株的根和根茎, 合并同一采集地的根与根茎, 置通风处阴干。用研钵研磨各份样品, 过 40 目筛, 根粉备用, 测试前再用变色硅胶干燥一周。采集地点和时间见表 1。

2 方法与结果

2.1 色谱条件: Nova-Pak C₁₈ 色谱柱 (150 mm × 3.9 mm); 流动相: 甲醇-水 (25 : 75), 体积流量: 1.0

mL/min; 紫外检测波长 270 nm, 理论塔板数按龙胆苦苷峰计算不低于 9 000, 柱温 40 ℃。

2.2 对照品溶液的制备: 精密称取龙胆苦苷对照品适量, 加甲醇制成含 6 μg/mL 的溶液, 作为对照品溶液。

2.3 供试品溶液及阴性对照液的制备: 精密称取三花龙胆样品 50.0 mg, 置 50 mL 量瓶中, 加入 70% 乙醇约 45 mL, 超声提取 30~35 min, 冷却至室温, 70% 乙醇定容, 混匀, 取约 5 mL 放入离心管中, 2 500 r/min 离心 10 min。精密吸取上清液 1 mL, 加入到 10 mL 量瓶中, 用流动相稀释并定容, 混匀, 经 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液作为供试品溶液。用 70% 乙醇作阴性对照液。

在上述色谱条件下, 分别精密吸取对照品溶液、阴性对照液与供试品溶液各 5 μL, 注入液相色谱仪, 测定, 得到龙胆苦苷对照品溶液、阴性对照液与供试品溶液的色谱图 (图 1)。

2.4 标准曲线的制备: 精密称取龙胆苦苷对照品 10.0 mg 置于 25 mL 量瓶中, 以甲醇溶解并定容至刻度, 摇匀制成质量浓度为 0.40 mg/mL 的对照品贮存液。精密吸取上述贮存液 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 mL 加入到 10.0 mL 容量瓶中, 用甲醇定容至刻度, 摇匀并进样。每一质量浓度平行进样 3 次, 进样量为 5 μL。以峰面积为纵坐标, 对照品质量浓度为横坐标绘制标准曲线。回归方程为: $Y = 7.20 \times 10^6 X - 1.96 \times 10^3$, $r = 0.999\ 67$, 表明龙胆苦苷在 0.004~0.020 mg/mL 具有良好的线性关系。

2.5 精密度试验: 精密吸取 2.3 项下供试品溶液 5 μL, 重复进样 6 次, 测定峰面积积分值, RSD 为 0.96%。

2.6 稳定性试验: 精密吸取 2.3 项下供试品溶液 5 μL, 分别于制备后 0、2、4、6、8、10、12 h 进样进行测定, 结果供试品溶液中龙胆苦苷在 12 h 内稳定, RSD 为 4.1% ($n=7$)。

收稿日期: 2005-06-12

基金项目: 黑龙江省教育厅科学技术研究项目 (10531072); 黑龙江省自然科学基金资助项目 (C2004-26)

作者简介: 马立祥 (1968—), 男, 黑龙江省庆安县人, 助理研究员, 理学硕士, 1994 年 7 月毕业于哈尔滨师范大学, 同年留校任教, 主要从事药用植物生物学研究。Tel: (0451) 88060625 E-mail: MLX88@sina.com

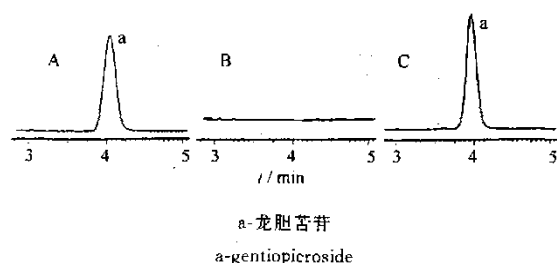


图1 对照品(A)、阴性对照(B)和样品(C)HPLC图谱

Fig. 1 HPLC Chromatograms of reference substance

(A), negative control (B), and sample (C)

2.7 重现性试验:精密称取三花龙胆根粉(6号样品)50.0 mg,共5份,按2.3项下方法制备成样品溶液,测定龙胆苦苷质量分数,结果RSD为1.6%。

2.8 加样回收率试验:精密称取已知量的三花龙胆根粉(6号样品)样品6份,分别精密加入龙胆苦苷对照品溶液,按2.3项下方法制备样品溶液并进行测定,计算加样回收率,结果平均回收率为98.19%,RSD为4.22%。

2.9 样品测定:三花龙胆样品按2.3项下方法制备样品溶液,结果见表1。

表1 不同产地三花龙胆根茎及根中龙胆苦苷测定结果(n=6)

Table 1 Determination of gentiopicroside in rhizomes and roots of *G. triflora* from three different habitats (n=6)

材料 编号	药材 属性	采集地点	采集 时间	龙胆苦 苷/%
1	根茎	黑龙江五常市凤凰山顶湿地	08-24	10.85
2	根	黑龙江五常市凤凰山顶湿地	08-24	5.02
3	根茎	黑龙江尚志市老山镇“踏头”湿地	09-16	4.63
4	根	黑龙江尚志市老山镇“踏头”湿地	09-16	3.55
5	根茎	黑龙江尚志市老山镇林缘	09-16	6.76
6	根	黑龙江尚志市老山镇林缘	09-16	5.55
7	根茎	内蒙古根河草甸湿地	09-16	5.92
8	根	内蒙古根河草甸湿地	09-16	4.53
9	根茎	黑龙江通北林业局乌斯孟湿地	09-25	4.67
10	根	黑龙江通北林业局乌斯孟湿地	09-25	3.99

3 讨论

3.1 不同产地三花龙胆药材中龙胆苦苷的量存在一定差异,其中采自凤凰山顶湿地的药材量最高。观察发现,采自凤凰山山顶的三花龙胆植株年龄通常都在10年以上,根茎上保留的不定根为1~7龄,

其他采集点的植株一般为3~6年。可见“高龄”三花龙胆植株药材的龙胆苦苷量较高,量与年龄成正相关。

3.2 植物次生代谢产物的种类和分布通常表现出明显的种属、器官、组织及生育时期的特异性^[1]。本实验5个不同采集地点的药材,均表现为根茎中龙胆苦苷量明显高于根,说明根茎和根的器官异质性影响龙胆苦苷的量。文献报道,地上茎与根茎属于同源器官,而地上茎中龙胆苦苷量却很低,二者相差为17.5倍^[2],根茎作为地上器官与不定根的过渡结构,其龙胆苦苷的量却明显偏高。

3.3 自然条件下,三花龙胆生于草甸子、林缘或疏林中。草甸子(湿地)主要特点是土壤水分充足,根际温度较低,不利于根系的发育。采自黑龙江尚志市老山镇林缘的药材龙胆苦苷量高于“踏头”湿地,并且林缘植株的地下器官(包括根和根茎)发育也好于湿地上的植株。可以认为,林缘的土壤条件较好而有利于根系的发育和龙胆苦苷的积累。

3.4 有报道指出,来自哈尔滨郊区的二年生三花龙胆药材(未说明生产条件:栽培或野生)龙胆苦苷量随采集时间不同而变化,波动幅度在9.45%~16.30%;另有报道指出(亦是来自哈尔滨郊区,未说明生产条件),随采收期不同龙胆苦苷量在9.45%~17.34%^[4]。龙胆苦苷作为一种次生代谢产物,量如此之高其意义何在呢?同时,野生药材的测定结果也与前述报道的相去甚远,可见环境差异和采收期不同可以显著影响龙胆苦苷的积累,但量的差异如此悬殊值得进一步研究。

References:

- [1] Yan X F. Ecology of plant secondary metabolism [J]. *Acta Phytoecol Sin* (植物生态学报), 2001, 25 (5): 639-640.
- [2] Shen Z B, Wang X L, Li J F, et al. Determination of gentiopicroside in different parts of *Gentiana triflora* Pall. (Gentianaceae) [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2003, 34 (3): 272-273.
- [3] Lin Z Y, Yao L N, Yan G H. Determination of gentiopicroside in *Gentiana triflora* Pall. collected from different seasons [J]. *Res Practice Chin Med* (现代中药研究与实践), 2004, 18 (4): 37-38.
- [4] Jiang W X, Shen Z B, Xue B Y. Study of accumulating regular on gentiopicroside of *Gentiana triflora* Pall. and *G. manshurica* Kitag. (Gentianaceae) [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2004, 35 (5): 521-522.