

HPLC法测定不同海拔长柄秦艽中龙胆苦苷、马钱酸、獐牙菜苦苷和獐牙菜苷

杨慧玲¹, 司庆文^{1,2}, 侯勤正^{1,2}, 刘建全¹, 周党卫^{*}

(1 中国科学院西北高原生物研究所 高原生物进化与适应院重点实验室, 青海 西宁 810001;

2 中国科学院研究生院, 北京 100039)

摘要:目的 测定西藏产长柄秦艽 *Gentiana waltonii* 中指征性成分龙胆苦苷、马钱酸、獐牙菜苦苷和獐牙菜苷, 分析其与海拔的关系, 为开发秦艽替代性资源, 发展中藏药产业提供依据。方法 Alltech C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相为甲醇 0.5% 乙酸水溶液 (25: 75); 体积流量为 1.0 mL/min; 柱温: 25 °C; 检测波长 238 nm (马钱子酸和獐牙菜苦苷)、246 nm (龙胆苦苷和獐牙菜苦苷); 进样量: 10 μL, 按外标法计算。结果 西藏不同产地长柄秦艽中均能检测到秦艽中的指征性成分, 其中龙胆苦苷的量在 4 种组分中最高, 马钱酸次之, 獐牙菜苦苷最低。不同地区长柄秦艽中龙胆苦苷的量均高于或接近《中国药典》2005 年版标准。4 种指征性成分的量与海拔无明显相关性, 随海拔升高活性成分呈钟状变化。其中海拔 4 000 m 左右地区的长柄秦艽品质最优。结论 西藏产长柄秦艽含有秦艽所具有的 4 种指征性成分, 可以作为中藏药秦艽的替代性开发资源, 其中海拔 4 000 m 左右区域的品质最优。

关键词: 长柄秦艽; 马钱酸; 獐牙菜苦苷; 龙胆苦苷; 獐牙菜苷

中图分类号: R286.02

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2010)10-1720-03

秦艽是我国中藏药中的传统药物, 对于治疗风湿性关节炎、肺病发烧、黄疸、皮疹、水肿及二便不通等病症具有显著疗效^[1-5]。现代化学分析研究表明, 其主要化学成分有马钱酸、龙胆苦苷等^[6-7]。其中, 龙胆苦苷对化学性及免疫性肝损伤有明显保护作用^[1,3], 而马钱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酯引起的小鼠耳肿胀具有抑制作用^[8]。目前国内外已从秦艽的根中提取了龙胆苦苷糖和挥发油等多种成分, 并发现其具有抗炎、镇痛、降压、升血糖等作用^[1]。因此, 秦艽的药用价值也逐渐被现代医学界所公认。

随着秦艽药用价值研究的不断深入及新药的开发, 其药用资源近年来逐渐减少^[9], 而过度挖掘和生境的破坏, 也对物种的生存构成潜在的威胁^[10]。《中国药典》规定秦艽的药材来源有秦艽 *Gentiana macrophylla* Pall、麻花秦艽 *G. straminea* Maxim.^[11]、粗茎秦艽又称粗茎龙胆 *G. crassicaulis* Duthie ex Burk 和小秦艽 *G. dahurica* Fisch.^[12]。目前在青海、甘肃、陕西等地有少量栽培的秦艽, 但产量少、效益低^[10]。因此, 从龙胆属植物中寻找新的替代性资源植物对发展中藏药产业和保护高山生

态环境具有重要意义。

长柄秦艽 *G. waltonii* Burk 为多年生草本, 植株高 10~30 cm, 根粗大, 为秦艽组中的重要物种。主要分布在我国西藏东南部及南部的山坡、山坡砾石地和林下, 海拔 3 400~4 800 m 的地带^[12]。有研究发现, 该种与大叶秦艽具有很近的亲缘关系^[13], 但多年来, 对该物种的潜在药用成分缺乏研究。本实验采用 HPLC 法对青藏高原不同海拔地区长柄秦艽根中的指征性成分马钱酸、龙胆苦苷、獐牙菜苦苷和獐牙菜苷进行了定量分析, 并对其与海拔的关系进行了探讨。以期选择合适的地道栽培物种代替麻花秦艽入药和深度开发该物种提供科学依据。

1 材料

1.1 仪器与试剂: Waters 515E 高效液相色谱仪, Waters 2996 紫外检测器, Empower (Waters) 数据处理系统, Waters Empower pro 液相色谱工作站, Millipore 溶剂过滤系统; 2200B 超声波仪; M: I: Q 超纯水装置。

1.2 对照品, 龙胆苦苷、獐牙菜苦苷 (色谱纯) 购自中国药品生物制品检定所 (批号 200308、0785-200303)、马钱酸和獐牙菜苷 (中国科学院西北高原

①收稿日期: 2010-03-20

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30572329, 31070208); 中科院知识创新项目 (KSCX2-SW-106); 中科院西北高原生物研究所知识创新前沿项目 (0954051211, 0954061211)

作者简介: 杨慧玲 (1975—), 女, 吉林松原人, 博士, 主要从事高山植物资源与生态学研究。

Tel: (0971) 6143282 E-mail: yanghui玲@nwipb.ac.cn

* 通讯作者 周党卫 Tel: (0971) 3526807 E-mail: dangweizhou@sina.com

生物研究所藏药中心李玉林副研究员提供), 经归一化法测定, 质量分数达到 98%。

1.3 药材: 长柄秦艽于 2006 年 8 月底至 2006 年 9 月初, 采自青藏高原不同海拔地区(表 1)。标本存于中国科学院西北高原生物研究所标本馆, 所有标本均由

表 1 长柄秦艽样品来源

Table 1 Sample source of *G. waltonii*

编号	来源	经度	纬度	海拔/m
Liu2006199	羊卓雍湖, 西藏	83°35'93"	29°11'44"	4 550
Liu2006229	南木林, 西藏	89°14'36"	29°45'23"	4 080
Liu2006301	左贡, 西藏	97°23'76"	30°08'32"	4 070
Liu2006293	然乌, 西藏	96°45'80"	29°30'29"	3 950
Liu2006275	拉萨, 西藏	91°08'53"	29°36'79"	3 730
Liu2006284	宫布达, 西藏	93°16'59"	29°53'36"	3 410

4.6 mm, 5 μ m); 流动相: 甲醇-0.5% 乙酸水(25:75)。进样量: 10 μ L; 体积流量为 1.0 mL/min; 柱温: 室温。在 238 nm 下检测马钱酸和獐牙菜苦苷, 在 246 nm 下检测龙胆苦苷和獐牙菜苷。

2.2 对照品溶液的制备: 精确称取 31.8 mg 龙胆苦苷、19.5 mg 马钱酸、5.125 mg 獐牙菜苦苷、12.05 mg 獐牙菜苷对照品, 置 5 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 过 0.45 μ m 微孔滤膜, 得对照品溶液, 备用。

2.3 供试品溶液的制备: 将长柄秦艽根部粉碎, 取待测样品粉末(过 40 目筛), 精密称定 0.2 g, 置量瓶中, 精密加入甲醇 20 mL, 60 $^{\circ}$ C 超声 30 min, 滤过, 滤液用甲醇定容至 25 mL, 摇匀, 溶液过 0.45 μ m 滤膜, 得供试品溶液。

2.4 线性关系考察: 精密吸取储备液 0.5、5、7.5、10、15 mL 于 25 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 制成 5 个不同系列质量浓度的对照品溶液, 分别吸取 10 μ L 进样。按上述色谱条件测定峰面积, 以进样量为横坐标, 峰面积值为纵坐标, 得到马钱酸的回归方程为 $Y = 13\,204\,316X - 407\,775$, $r = 0.999\,0$; 獐牙菜苦苷为 $Y = 5\,131\,437X - 1\,077$, $r = 0.999\,2$; 龙胆苦苷为 $Y = 8\,686\,153X - 338\,681$, $r = 0.999\,1$; 獐牙菜苷为 $Y = 2\,589\,599X - 3\,118$, $r = 0.998\,9$ 。结果表明马钱酸在 2~47 μ g/mL, 獐牙菜苦苷在 0.4~12 μ g/mL, 龙胆苦苷在 2.5~76 μ g/mL, 獐牙菜苷在 0.9~29 μ g/mL 线性关系良好。

2.5 精密度试验: 取同一批样品溶液按上述色谱条件重复进样 5 次, 每次 10 μ L, 样品峰面积 RSD 分别为龙胆苦苷 2.66%、马钱酸 1.76%、獐牙菜苦苷 2.43%、獐牙菜苷 2.54%。

2.6 重现性试验: 取同一批样品 5 份, 制备供试品

兰州大学生命科学学院刘建全教授鉴定。为避免生长年限(以根大小为标准)对活性成分的影响, 野外采集时, 挖取大小一致的根, 风干、切片后进行分析。

2 方法与结果

2.1 色谱条件: Alltech C₁₈ 色谱柱(250 mm $\times$

溶液, 进样, 每次 10 μ L, 计算得 4 组分质量分数的 RSD 分别为龙胆苦苷 0.24%、马钱酸 1.12%、獐牙菜苦苷 1.15%、獐牙菜苷 2.34%。

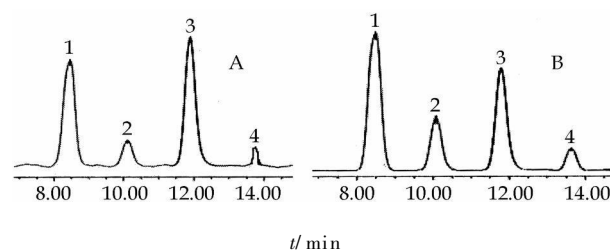
2.7 回收率试验: 取药材适量, 加入一定量的混合对照品溶液, 按照上述样品处理方法制备, 进样量 10 μ L, 计算加样回收率, 得到龙胆苦苷、马钱酸、獐牙菜苦苷、獐牙菜苷分别为 99.54%、98.87%、97.97%、99.51%, RSD 分别为 1.28%、2.39%、2.74%、3.46% ($n = 5$)。

2.8 稳定性试验: 精密称取样品 0.2 g, 分别于 0、4、8、12、18、24 h 进样分析, 测定马钱酸、獐牙菜苦苷、龙胆苦苷和獐牙菜苷的峰面积, RSD 分别为 4.28%、1.51%、1.17% 和 2.42%, 表明供试品溶液 24 h 内稳定性良好。

2.9 样品测定: 取上述制备好的样品溶液, 吸取 10 μ L 进样测定, 每个样品至少重复进样 3 次, 得到龙胆苦苷、马钱酸、獐牙菜苦苷、獐牙菜苷的峰面积值, 色谱图见图 1, 计算质量分数结果见表 2。

3 讨论

长柄秦艽为龙胆属秦艽组中的重要成员, 其植



1-马钱酸 2-獐牙菜苦苷 3-龙胆苦苷 4-獐牙菜苷

1-loganic acid 2-swetiamarin 3-geatiopicroside 4-sweroside

图 1 对照品(A)和长柄秦艽样品(B)的 HPCL 图谱

Fig 1 HPLC Chromatograms of reference substances (A) and *G. waltonii* samples (B)

表 2 长柄秦艽不同样品 4 种活性成分的测定结果($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 2 Determination of four chemical constituents in <i>G. waltoni</i> from different habitats ($\bar{x} \pm s, n=3$)					
编 号	马钱酸/(mg·g ⁻¹)	獐牙菜苷/(mg·g ⁻¹)	龙胆苦苷/(mg·g ⁻¹)	獐牙菜苦苷/(mg·g ⁻¹)	总量/%
Liu2006199	0.630±0.030	0.172±0.006	1.598±0.094	0.1093±0.010	2.5093
Liu2006299	0.544±0.097	0.1000±0.046	1.601±0.045	0.0673±0.011	2.3113
Liu2006301	0.990±0.015	0.982±0.032	9.091±0.072	0.1245±0.036	11.063
Liu2006293	1.388±0.038	0.916±0.032	7.164±0.174	0.2037±0.041	9.6717
Liu2006275	0.439±0.011	0.083±0.024	1.282±0.035	0.0317±0.005	1.8357
Liu2006284	0.345±0.018	1.108±0.190	0.984±0.056	0.0449±0.014	3.9349

株与麻花秦艽接近,约 30 cm,根茎粗大,系统关系与大叶秦艽相近^[13],但其指征性组分的量与变化尚不清楚。采用 HPLC 法,对分布于西藏地区的长柄秦艽中的龙胆苦苷、马钱酸、獐牙菜苷和獐牙菜苦苷的量进行了测定。从表 2 中可见,尽管长柄秦艽中 4 种化学成分量的变化存在差异,但均含有麻花秦艽和大叶秦艽中的指征性成分^[6,14-15]。在所有化学组分中,除宫布达居群外,不同居群长柄秦艽中龙胆苦苷的量最高,马钱酸次之,而獐牙菜苦苷最低,这与孙菁等^[14]的结果相似。且不同地区长柄秦艽中龙胆苦苷的量高于或接近《中国药典》中的要求^[12],因此,长柄秦艽可以作为一种重要的秦艽类植物资源加以利用。

青藏高原环境复杂,气候多变,这种条件往往对植物的生长发育产生重要影响,也严重影响到植物体内次生代谢产物的变化。对不同海拔长柄秦艽中 4 种化学成分量比较发现,高海拔地区的左贡(3 950 m)马钱酸、龙胆苦苷、獐牙菜苷和獐牙菜苦苷的量均高于宫布达(3 400 m)(表 2)。但不同海拔居群间,活性成分的变化较大。不同海拔长柄秦艽的不同活性成分与海拔高度的相关分析显示,其皮尔森相关系数分别为:0.291、-0.464、0.165、0.470($P>0.05$),表明 4 种活性成分的量与海拔之间并不相关。这与 Mossi 等^[16]对鞣酸和三萜类化合物的分析结果相似。在采收季节,长柄秦艽中 4 种组分的变化随海拔均呈现出钟状变化的趋势,在 4 000 m 左右达到最大,而后随海拔升高呈降低趋势。有研究表明,由于高海拔处生长季短,光合作用平均速率降低而导致初级生产量随海拔升高而呈现曲线变化的趋势,即随着海拔升高生产量先升高,达到一定的海拔后再降低^[17]。因此,长柄秦艽主要指征性化合物的这种变化趋势,可能与其初级代谢的影响有关,其影响因素值得进一步研究。

尽管在青藏高原不同海拔地区,都有长柄秦艽

分布,生长于海拔 4 000 m 左右区域的长柄秦艽根中有效成分的量明显高于其他区域。这为在高原地区利用优良的野生秦艽资源,在合适的区域建立人工种植基地提供了重要依据。

参考文献:

[1] 吕琴霞. 秦艽、麻花苣的研究近况[J]. 中华临床医学杂志, 2008, 14(8): 1203-1204

[2] 中国科学院西北高原生物研究所. 青海经济植物志[M]. 西宁: 青海人民出版社, 1987

[3] 芦启琴, 娄灯吉, 沈建伟, 等. 秦艽化学成分及药理作用研究进展[J]. 安徽农业科学, 2007, 35(29): 9299-9301

[4] 齐香君, 陈如意, 王 薇. 秦艽细胞悬浮培养(I)[J]. 中草药, 2010, 41(3): 472-475

[5] 齐香书, 孙如意, 王 薇. 秦艽细胞悬浮培养(II)[J]. 中草药, 2010, 41(4): 636-638

[6] 纪兰菊, 孙洪发, 丁经业, 等. 青藏高原四种龙胆属植物化学成分初步研究[J]. 高原生物学集刊, 1992, 11(6): 113-118

[7] 纪兰菊, 马玉花, 陈桂琛, 等. 藏药麻花秦艽中苦苷类成分的含量测定及品质评价[J]. 西北植物学报, 2004, 24(2): 292-295

[8] Recio M C, Giner R M, Manez S, et al. Structural considerations on the iridoids as anti-inflammatory agents[J]. *Planta Med*, 1994, 60(3): 232-233

[9] 张西玲, 晋 玲, 刘丽莎. 濒危药用植物秦艽的资源利用与保护[J]. 中药研究与信息, 2003, 5(9): 27-29

[10] 郭伟娜, 熊文勇, 魏朔南. 秦艽及其近缘种植物资源在我国的分布[J]. 中国野生植物资源, 2009, 28(2): 21-28

[11] 危士虎, 喻长远, 卢立明, 等. 麻花秦艽非环烯醚萜成分的研究[J]. 中草药, 2010, 41(8): 1242-1245

[12] 中国药典[S]. 一部. 2005

[13] Zhang X L, Wang Y J, Ge X J, et al. Molecular phylogeny and biogeography of *Gentiana* sect. *Cruciata* (Gentianaceae) based on four chloroplast DNA datasets[J]. *DNA Datasets. Taxon*, 2009, 58(3): 1-9

[14] 孙 菁, 李玉林, 纪兰菊, 等. 不同生长季节下藏药麻花秦艽活性成分含量研究[J]. 云南植物学研究, 2006, 28(2): 219-222

[15] 李勇慧, 曹晓燕, 李向民, 等. 大叶秦艽不同采收期中龙胆苦苷的分析[J]. 中草药, 2007, 38(6): 933-936

[16] Mossi A J, Mazutti M, Paroul N, et al. Chemical variation of tannins and triterpenes in Brazilian populations of *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss[J]. *Braz J Biol*, 2009, 69(2): 339-345

[17] 李文华, 廖俊国, 译. 高山林线生理生态[M]. 北京: 中国环境科学出版社, 1986