

HPLC 法测定西藏秦艽花与川西秦艽花中 7 种成分的量

李荣娇, 杨凤仙, 袁绿益, 王晓玲*

西南民族大学少数民族药物研究所, 四川 成都 610041

摘要: **目的** 建立测定西藏秦艽花和川西秦艽花中落干酸、6'-O-β-D-葡萄糖基龙胆苦苷、獐芽菜苦苷、龙胆苦苷、獐芽菜苷、异荭草苷、异牡荆黄素 7 种成分的 HPLC 方法。**方法** 采用 Agilent Zorbax ODS (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 流动相为乙腈-0.4%醋酸水溶液梯度洗脱, 体积流量 0.4 mL/min, 检测波长 254 nm, 柱温 30 ℃。**结果** 落干酸、6'-O-β-D-葡萄糖基龙胆苦苷、獐芽菜苦苷、龙胆苦苷、獐芽菜苷、异荭草苷和异牡荆黄素分别在 0.228~2.280、0.680~6.800、0.220~2.200、1.476~14.760、0.200~2.000、0.436~4.360、0.276~2.760 μg 进样量与峰面积积分值线性关系良好 ($R^2 \geq 0.999\ 2$), 落干酸、6'-O-β-D-葡萄糖基龙胆苦苷、獐芽菜苦苷、龙胆苦苷、獐芽菜苷、异荭草苷及异牡荆黄素的平均回收率 ($n=9$) 分别为 100.9%、99.4%、101.0%、105.7%、103.1%、98.4%、104.2%。**结论** 该法简便、准确、专属性强, 可用于西藏秦艽花和川西秦艽花中 7 种成分的测定。

关键词: 西藏秦艽; 川西秦艽; HPLC; 落干酸; 6'-O-β-D-葡萄糖基龙胆苦苷; 獐芽菜苦苷; 龙胆苦苷; 獐芽菜苷; 异荭草苷; 异牡荆黄素

中图分类号: R286.6

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2015)08-1227-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.08.024

Determination of seven components in flowers of *Gentiana tibetica* and *Gentiana dendrologi* by HPLC

LI Rong-jiao, YANG Feng-xian, YUAN Lv-yi, WANG Xiao-ling

Ethnic Pharmaceutical Institute, Southwest University for Nationalities, Chengdu 610041, China

Abstract: **Objective** To establish an HPLC method for simultaneously determining seven components, such as loganic acid, 6'-O-β-D-glucopyranosyl gentiopicroside, swertiamarine, gentiopicroside, swertiamarin, isoorientin, and isovitexin, from the flowers of *Gentiana tibetica* and *G. dendrologi*. **Methods** Chromatographic analysis was achieved on an Agilent Zorbax ODS column (150 mm × 4.6 mm, 5 μm) by gradient elution of acetonitrile-0.4% acetic acid in water at 30 ℃. The flow rate was 0.4 mL/min and the detection wavelength was 254 nm. **Results** The calibration curves of all the seven constituents showed good linearity in a relatively wide concentration range. The linear ranges of loganic acid, 6'-O-β-D-glucopyranosyl gentiopicroside, swertiamarine, gentiopicroside, gentiopicroside, isoorientin, and isovitexin were 0.228—2.280, 0.680—6.800, 0.220—2.20, 1.476—14.760, 0.200—2.000, 0.436—4.360, and 0.276—2.760 μg ($R^2 \geq 0.999\ 2$), respectively. The recoveries ($n=9$) of loganic acid, 6'-O-β-D-glucopyranosyl gentiopicroside, swertiamarine, gentiopicroside, gentiopicroside, isoorientin, and isovitexin were 100.9%, 99.4%, 101.0%, 105.7%, 103.1%, 98.4%, 104.2%. **Conclusion** This method is simple, accurate, and specific, and can be used for the determination of seven constituents in the flowers of *G. tibetica* and *G. dendrologi*.

Key words: *Gentiana tibetica* King ex Hook; *Gentiana dendrologi* Marq.; HPLC; loganic acid; 6'-O-β-D-glucopyranosyl gentiopicroside; swertiamarine; gentiopicroside; swertiamarin; isoorientin; isovitexin

秦艽 *Gentiana macrophylla* Pall. 为龙胆科 (Gentianaceae) 龙胆属 *Gentiana* L. 植物, 其根秦艽是我国重要的传统中药材, 是治疗风湿关节炎、结

核病潮热、黄疸、皮疹、水肿及二便不通等证的主要中药^[1-5]。随着秦艽药用资源的开发, 《中国药典》2010 年版收录的 4 种秦艽野生资源均处于濒危状态^[6]。

收稿日期: 2014-11-26

基金项目: 西南民族大学 2014 级研究生“创新型科技项目”(CX2014SZ47)

作者简介: 李荣娇 (1988—), 女, 彝族, 云南文山山人, 在读硕士, 研究方向为天然药物化学。E-mail: cocojiao88@163.com

*通信作者 王晓玲 (1969—), 女, 教授, 博士, 研究方向为天然药物化学。E-mail: wxl3232@sina.com

《中国植物志》中记载了龙胆科龙胆属 *Gentiana* L. 秦艽组多种近缘非药典收载植物在地方临床用药中被用作秦艽药材^[7]。西藏秦艽 *Gentiana tibetica* King ex Hook 和川西秦艽 *Gentiana dendrologi* Marq. 为龙胆科龙胆属秦艽组药材, 主要分布在高海拔的青藏高原区。西藏秦艽的藏药名“解吉嘎保”, 是西藏特有品种^[8]。西藏秦艽的花在传统藏药中被当作清热、止痛的良药, 用于治疗关节炎、肺结核和肝炎^[9]。经文献报道^[10]和本课题组研究发现西藏秦艽花和川西秦艽花主要含有大量黄酮、环烯醚萜、裂环环烯醚萜、甾醇及挥发油, 目前关于西藏秦艽花和川西秦艽花的主要化学成分研究在国内外均未见文献报道。本实验采用 HPLC 法对以上 2 种植物的主要化学成分进行测定, 为这些药用植物的质量标准建立提供理论依据。

1 材料与试剂

1.1 仪器

美国 Waters 高效液相色谱仪, Waters 2996 型 PDA 检测器, Empower2 色谱工作站; 0.45 μm 微孔滤膜 (天津市色谱科学技术公司); 电子分析天平 [XP6, 梅特勒-托利多 (上海) 有限公司]; 电子天平 (AE 240, 瑞士 Mettler Toledo 公司); 电热恒温鼓风干燥箱 (GHG-9240A 型, 上海精密实验设备有限公司); 超声波清洗器 (KQ-250B, 昆山市超声仪器有限公司); 旋转蒸发仪 (SENCO, 上海申生科技有限公司)。

1.2 试剂

乙腈 (色谱纯, 美国 Sigma 试剂公司); 甲醇 (色谱纯, Sigma 试剂公司); 无水乙醇, 冰醋酸为国产分析级。

1.3 药品

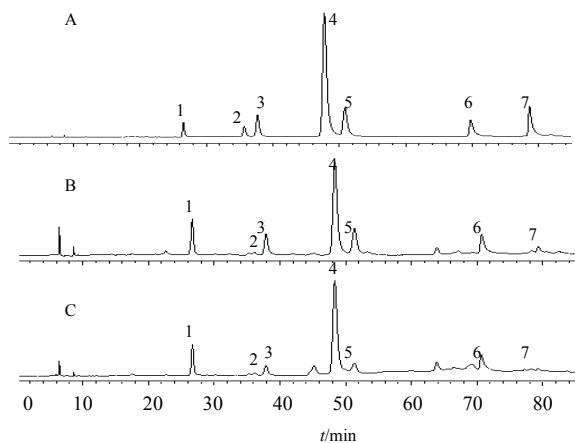
对照品落干酸、獐芽菜苷、獐芽菜苦苷由成都普思生物科技有限公司赠予, 经面积归一化法测定, 质量分数均大于 99.0%; 龙胆苦苷、6'-O- β -D-葡萄糖基龙胆苦苷、异荛草苷及异牡荆黄素均为自行分离精制, 并经 UV、IR、¹H-NMR、¹³C-NMR 鉴定结构, HPLC 检测, 面积归一化法计算质量分数均大于 98%。乙腈、冰醋酸均为色谱纯, 水为乐百氏纯净水并经 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 西藏秦艽花分别采自西藏墨竹工卡和林芝县, 川西秦艽花采自四川阿坝藏族自治州, 经西藏自治区药检所达瓦卓玛副主任药师鉴定为龙胆科龙胆属西藏秦艽 *Gentiana tibetica* King ex Hook 和川西秦艽 *Gentiana*

dendrologi Marq., 在 50 $^{\circ}\text{C}$ 的电热恒温鼓风干燥箱中烘干至质量恒定, 粉末过 50 目筛。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

采用 Agilent Zorbax ODS (150 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 流动相为乙腈 (A) -0.4% 醋酸水溶液 (B), 梯度洗脱: 0~13 min, 5%~10% A; 13~48 min, 10%~12.5% A; 48~70 min, 12.5%~20% A; 70~75 min, 20% A; 75~80 min, 20%~15% A; 80~85 min, 15% A。体积流量为 2 mL/min; 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$; 检测波长 254 nm。在此条件下, 对照品及样品的色谱图见图 1。理论塔板数按落干酸峰计算不低于 3 500, 按龙胆苦苷峰计算不低于 3 000。



1-落干酸 2-6'-O- β -D-葡萄糖基龙胆苦苷 3-獐芽菜苦苷 4-龙胆苦苷 5-獐芽菜苷 6-异荛草苷 7-异牡荆黄素
1-loganic acid 2-6'-O- β -D-glucopyranosyl gentiopicroside 3-swertiamarin 4-gentiopicroside 5-swertiamarin 6-isoorientin 7-isovitexin

图 1 混合对照品 (A)、西藏秦艽花 (B) 和川西秦艽花 (C) 的 HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC of mixed reference substances (A), *G. tibetica* (B), and *G. dendrologi* (C)

2.2 混合对照品溶液制备

精密称取落干酸 1.133 mg、6'-O- β -D-葡萄糖基龙胆苦苷 3.396 mg、獐芽菜苦苷 1.103 mg、龙胆苦苷 7.378 mg、獐芽菜苷 1.001 mg、异荛草苷 2.177 mg 及异牡荆黄素 1.384 mg, 置于 10 mL 量瓶中, 70% 甲醇溶解并定容至刻度, 摇匀, 即得质量浓度分别为 113.3、339.6、110.3、737.8、100.1、217.7、138.4 $\mu\text{g/mL}$ 的混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液制备

称取西藏秦艽花和川西秦艽花样品粉末约 0.5 g, 精密称定, 置具塞三角瓶中, 精密加入甲醇 20

mL, 超声处理 (500 W, 40 kHz) 0.5 h, 放置至室温, 滤过, 滤液用甲醇定容至 25 mL, 摇匀, 用 0.45 μm 滤膜滤过, 即得。

2.4 线性关系考察

精密吸取混合对照品溶液 2、4、8、12、16、20 μL 分别注入高效液相色谱仪, 测定色谱峰的峰面积以进样量 (X) 对峰面积积分值 (Y) 进行线性回归, 绘制标准曲线。得到回归方程落干酸为 $Y=728\ 215.693\ X-39\ 430.753$, $R^2=0.999\ 9$; 6'- O - β -D-葡萄糖基龙胆苦苷 $Y=258\ 956.789\ X-44\ 700.685$, $R^2=0.999\ 7$; 獐芽菜苦苷 $Y=1\ 992\ 439.801\ X-122\ 350.907$, $R^2=0.999\ 8$; 龙胆苦苷 $Y=2\ 295\ 849.790\ X-643\ 067.167$, $R^2=0.999\ 9$; 獐芽菜苷 $Y=4\ 092\ 283.493\ X-289\ 857.110$, $R^2=0.999\ 6$; 异荭草苷 $Y=984\ 149.202\ X-206\ 543.436$, $R^2=0.999\ 2$; 异牡荆黄素 $Y=2\ 565\ 237.344\ X-278\ 714.452$, $R^2=0.999\ 3$ 。结果表明落干酸在 0.228~2.280 μg , 6'- O - β -D-葡萄糖基龙胆苦苷在 0.680~6.800 μg , 獐芽菜苦苷在 0.220~2.20 μg , 龙胆苦苷在 1.476~14.760 μg , 獐芽菜苷在 0.200~2.000 μg , 异荭草苷在 0.436~4.360 μg , 异牡荆黄素在 0.276~2.760 μg 内呈良好的线性关系。

2.5 精密度试验

取上述同一混合对照品溶液按上述色谱条件重复 5 次, 每次 10 μL , 样品峰面积 RSD 分别为落干酸 1.08%、6'- O - β -D-葡萄糖基龙胆苦苷 1.73%、獐芽菜苦苷 1.25%、龙胆苦苷 0.42%、獐芽菜苷 0.57%、异荭草苷 1.29% 及异牡荆黄素 1.57%。

2.6 重复性试验

取同一批样品西藏秦艽花 (墨竹工卡) 5 份, 制备供试品溶液, 进样, 每次 10 μL , 样品质量

分数 RSD 分别为落干酸 1.23%、6'- O - β -D-葡萄糖基龙胆苦苷 1.24%、獐芽菜苦苷 0.72%、龙胆苦苷 0.52%、獐芽菜苷 0.78%、异荭草苷 1.58% 及异牡荆黄素 1.04%, 结果表明, 本方法的重复性良好。

2.7 稳定性试验

取一份样品西藏秦艽花 (墨竹工卡) 制备供试品溶液, 分别在 0、6、16、24、48、72 h 进样分析, 每次进样 10 μL , 记录峰面积, 结果落干酸、6'- O - β -D-葡萄糖基龙胆苦苷、獐芽菜苦苷、龙胆苦苷、獐芽菜苷、异荭草苷及异牡荆黄素峰面积的 RSD 分别为 1.03%、1.53%、0.43%、0.75%、1.03%、1.29%、1.13%。

2.8 加样回收率试验

精密称取已测定的样品西藏秦艽花 (墨竹工卡) 约 0.5 g, 共 9 份, 每 3 份分别精密加入高、中、低 3 个质量浓度的混合对照品溶液适量, 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 每次进样 10 μL , 计算加样回收率, 得结果落干酸、6'- O - β -D-葡萄糖基龙胆苦苷、獐芽菜苦苷、龙胆苦苷、獐芽菜苷、异荭草苷及异牡荆黄素的平均回收率分别为 100.9%、99.4%、101.0%、105.7%、103.1%、98.4%、104.2%, RSD 分别为 0.51%、0.94%、0.50%、0.40%、0.93%、0.64%、0.87%。

2.9 样品测定

分别精密称取西藏秦艽花 (墨竹工卡、林芝) 与川西秦艽花 (阿坝) 约 0.5 g, 按供试品制备方法进行制备。每个样品平行 3 份。进样, 每次 10 μL , 得到落干酸、6'- O - β -D-葡萄糖基龙胆苦苷、獐芽菜苦苷、龙胆苦苷、獐芽菜苷、异荭草苷及异牡荆黄素的峰面积值, 计算质量分数结果见表 1。

表 1 西藏秦艽花和川西秦艽花中 7 种化学成分的测定结果 ($n=3$)

Table 1 Determination of seven chemical components in flowers of *G. tibetica* and *G. dendrologi* ($n=3$)

样品	质量分数/%						
	落干酸	6'- O - β -D-葡萄糖基龙胆苦苷	獐芽菜苦苷	龙胆苦苷	獐芽菜苷	异荭草苷	异牡荆黄素
西藏秦艽花 (墨竹工卡)	1.95	1.27	1.22	6.79	0.41	4.10	0.29
西藏秦艽花 (林芝)	1.92	0.81	0.66	2.98	0.52	1.39	0.24
川西秦艽花 (阿坝)	1.97	0.87	0.39	4.16	0.36	1.52	0.16

3 讨论

本研究建立了 2 种秦艽花中 7 种化合物的 HPLC 定量测定方法, 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 批秦

艽花药材进行了定量测定。

3.1 检测波长的确定

对 7 种化合物甲醇溶液进行全波长扫描, 落干酸、6'- O - β -D-葡萄糖基龙胆苦苷、獐芽菜苦苷、龙

胆苦苷、獐芽菜苷、异荛草苷及异牡荆黄素的最大吸收波长分别是 240 nm; 250、275 nm; 250 nm; 240 nm; 250、275 nm; 270、348 nm; 270、332 nm。结果在 254 nm 处测定可兼顾 7 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

Lin 等^[11]已经证实甲醇超声提取率高且出峰较好; 贾娜等^[12]通过实验表明落干酸、龙胆苦苷采用 100% 甲醇 20 mL 较其他溶剂效率更高, 且提取 30 min 后落干酸、龙胆苦苷提取率趋于稳定, 这均与《中国药典》2010 年版相符, 所以采用甲醇超声提取法。选择色谱条件时, 实验过程中选择了甲醇-水、甲醇-0.1% 乙酸水溶液、乙腈-水、乙腈-0.1% 乙酸水溶液、乙腈-0.4% 乙酸水溶液等流动相, 从分离情况和出峰稳定性等综合分析选择乙腈-0.4% 乙酸水溶液为流动相较为合适。

3.3 2 种秦艽花结果比较

西藏秦艽花(墨竹工卡、林芝)与川西秦艽花(阿坝)中龙胆苦苷均为 7 种成分中量最高的化合物, 质量分数为 2.98%~6.79%, 龙胆苦苷占 7 种主要化合物质量分数总和的 35.0%~44.1%, 落干酸占 7 种化合物质量分数总和的 12.2%~22.5%, 2 种黄酮占 7 种化合物质量分数总和的 17.8%~27.4%。《中国药典》2010 年版规定按秦艽干燥品计算, 含龙胆苦苷和落干酸的总量不得少于 2.5%^[13]。可见, 西藏秦艽花与川西秦艽花中龙胆苦苷和落干酸的总量均远远高于《中国药典》要求, 并且墨竹工卡的西藏秦艽花中 7 种化合物量均大于林芝的西藏秦艽花和川西秦艽花。

西藏秦艽花和川西秦艽花为非《中国药典》收载品种药材, 主要分布在西南地区, 在西藏、四川等地资源丰富, 西藏秦艽花和川西秦艽花为新的药

用部位, 若能用它们代替《中国药典》收载品种秦艽的根, 这将是解决《中国药典》收载秦艽野生资源均处于濒危状态最直接、最有效的办法。然而迫在眉睫的是对西藏秦艽花和川西秦艽花的药理作用进行深入研究, 最终确定其能否作为秦艽替代品。

参考文献

- [1] 吕琴霞. 秦艽、麻花艽的研究近况 [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. 秦艽细胞悬浮培养研究 (I) [J]. 中草药, 2010, 41(3): 472-475.
- [5] 齐香书, 孙如意, 王 薇. 秦艽细胞悬浮培养研究 (II) [J]. 中草药, 2010, 41(4): 636-638.
- [6] 周秀佳, 徐宏发, 顺庆生. 中药资源学 [M]. 上海: 上海科学技术文献出版社, 2007.
- [7] 赵志礼, 苏 洁, 王峥涛. 管花秦艽的生药学研究 [J]. 中草药, 2006, 37(12): 1875-1878.
- [8] Zhao Z L, Gaawe D, Wang Z T. Identification of medicinal plants used as tibetan traditional medicine Jie-Ji [J]. *J Ethnopharm*, 2010, 132(1): 122-126.
- [9] 江苏省中国科学院植物研究所. 新华本草纲要 [M]. 上海: 上海科技出版社, 1990.
- [10] Zhang Y J, Yang C R. Two triterpenoids from *Gentiana tibetica* [J]. *Phytochemistry*, 1994, 36(4): 997-999.
- [11] Lin P C, Ye Z H, Lu Y C. Content determination of loganic acid and gentiopicoside in Tibetan herbal medicines *Gentiana macrophylla* and *G. straminea* by HPLC [J]. *J Chin Med Mater*, 2004, 27(11): 819.
- [12] 贾 娜, 张雅惠, 王 斌, 等. 麻花秦艽中落干酸和龙胆苦苷的含量测定及麻花秦艽药材 HPLC 特征图谱的研究 [J]. 药物分析杂志, 2009, 29(9): 1585-1589.
- [13] 中国药典 [S]. 一部. 2010.