

粗茎秦艽种子萌发过程中马钱苷酸和龙胆苦苷的含量测定

钱春生¹, 赵志礼¹, 程雪梅², 吴靳荣^{1*}

(1. 上海中医药大学, 上海 201203;

2. 上海中医药大学 中药研究所, 中药标准化教育部重点实验室, 上海 201210)

[摘要] 目的:探究粗茎秦艽种子萌发过程中马钱苷酸和龙胆苦苷的含量变化。方法:建立粗茎秦艽种子中马钱苷酸和龙胆苦苷高效液相色谱(HPLC)含量测定方法:Cat C₁₈色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 3.5 μm),流动相为乙腈(A)-0.04%乙酸水(B),梯度洗脱,流速0.8 mL·min⁻¹,检测波长为254 nm,柱温为30 ℃,进样量为5 μL。测定种子不同萌发时期马钱苷酸和龙胆苦苷的含量。结果:马钱苷酸和龙胆苦苷的线性范围分别为35.5 ~ 761.5 mg·L⁻¹($r_1 = 1.0000$), 4.8 ~ 103.1 mg·L⁻¹($r_2 = 0.9999$),线性关系良好,平均加样回收率分别为98.30% (RSD 1.9%), 99.85% (RSD 2.6%);粗茎秦艽种子在萌发过程中,马钱苷酸的含量呈不断降低的趋势,龙胆苦苷的含量呈不断上升的趋势。结论:粗茎秦艽种子萌发过程中,龙胆苦苷和马钱苷酸的含量动态变化呈负相关性趋势,且相关性程度与种子的发芽率有关。

[关键词] 粗茎秦艽; 种子萌发; 龙胆苦苷; 马钱苷酸

[中图分类号] R282 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)02-0023-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017020023

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20161117.1606.034.html>

[网络出版时间] 2016-11-17 16:06

Content Determination of Loganic Acid and Gentiopicroside During Process of Seed Germination in *Gentiana crassicaulis*

QIAN Chun-sheng¹, ZHAO Zhi-li¹, CHENG Xue-mei², WU Jin-rong^{1*}

(1. Shanghai University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Shanghai 201203, China;

2. The MOE Key Laboratory for Standardization of Chinese Medicines,

Institute of Chinese Materia Medica, Shanghai University of TCM, Shanghai 201210, China)

[Abstract] **Objective:** To determine the contents of loganic acid and gentiopicroside during seed germination in *Gentiana crassicaulis*. **Method:** HPLC method for simultaneous determination of loganic acid and gentiopicroside during seed germination in *G. crassicaulis*. The separation was done on Cat C₁₈ (4.6 mm × 150 mm, 3.5 μm) column with eluted with acetonitrile (A) - 0.04% acetic acid solution (B) as the mobile phase for gradient elution. The flow rate was 0.8 mL·min⁻¹. The detect wave length was set at 254 nm. The column temperature was kept at 30 ℃, and the sample volume was 5 μL to determine the contents of loganic acid and gentiopicroside during seed germination. **Result:** Loganic acid and gentiopicroside were well separated with ideal linear correlations within the range of 35.5 ~ 761.5 mg·L⁻¹ ($r_1 = 1.0000$) and 4.8 ~ 103.1 mg·L⁻¹ ($r_2 = 0.9999$) respectively. The average recoveries were 98.30% (RSD 1.9%) and 99.85% (RSD 2.6%) respectively. During germination, the content of loganic acid rose and the content of gentiopicroside declined gradually. **Conclusion:** A negative correlation of loganic acid and gentiopicroside is present during seed

[收稿日期] 20160205(001)

[基金项目] 国家药品标准提高暨2015版药典科研任务项目(201205);中医药标准化培育项目(ZYBZH-2014004)

[第一作者] 钱春生,在读硕士,从事中药资源与品种鉴定研究,E-mail:158235428@qq.com

[通讯作者] * 吴靳荣,副教授,硕士生导师,从事中药资源与品种鉴定研究,Tel:021-51322202,E-mail: wujinr@sina.com

germination of *G. crassicaulis*, and the correlation degree is related to seed germination percentage.

[Key words] *Gentiana crassicaulis*; seed germination; loganic acid; gentiopicroside

秦艽是我国的一种常用中药材,具有良好的祛风湿作用^[1],其基源植物主要分布于我国的西部高海拔地区,在藏药和蒙药等民族药中均有广泛应用^[2-3]。随着市场用药需求量增加、过度采挖以及生态环境的改变等多种原因^[4-6],包括粗茎秦艽在内的 4 种基源植物均被列入《国家重点保护野生药材物种名录》。为了满足市场需求,许多秦艽药材栽培基地已初具规模^[7-8],种质资源直接影响药材的产量和质量。秦艽由于其特殊的生长环境,其种子的自然繁殖率较低^[9],近年来国内外对秦艽的种子生物学做了大量研究,激素、盐酸、热水浸种或者变温培养等可以适当提高秦艽种子的发芽率^[10];同时秦艽种子低繁殖率的物质基础研究也引起了学术界的关注,秦艽种子提取物对萌发具有一定的抑制作用^[11],但秦艽种子的主要化学成分是否具有调节种子萌发作用尚未见报道。

秦艽药材内主要含有环稀醚萜类成分,其中龙胆苦苷和马钱苷酸在秦艽药材中含量较高^[12-13]。龙胆苦苷属于裂环稀醚萜苷类化合物,具有保肝、利胆、抗炎和抗溃疡等作用^[14]。马钱苷酸属于环稀醚萜苷类化合物,具有抗炎等作用^[15]。2015 年版《中国药典》将这 2 个化合物作为秦艽药材质量评价的指标性成分。课题组前期工作中,已经对粗茎秦艽的种子生物学及其胚的发育过程进行了研究^[16-17],并发现粗茎秦艽种子中主要含有这 2 种环稀醚萜类成分。本研究在建立粗茎秦艽种子中龙胆苦苷和马钱苷酸含量测定方法的基础上,测定不同贮藏时间粗茎秦艽种子萌发过程中这 2 种化合物的含量,以期研究马钱苷酸和龙胆苦苷对种子萌发的调节作用提供一定的基础资料。

1 材料

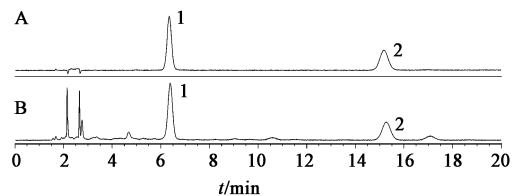
试验材料于 2014 年 10 月购自云南丽江,经上海中医药大学吴靳荣副教授鉴定为粗茎秦艽 *Gentiana crassicaulis* 的种子,凭证标本(标本号 2015YN004)保存于上海中医药大学中药学院药用植物标本室。从粗茎秦艽的成熟果实中取出种子,除杂阴干后置于纸袋中室温贮藏。

e2695 型高效液相色谱仪(美国 Waters 公司),Mettler 200 型电子天平(瑞士梅特勒-托利多仪器有限公司),KQ-250DB 型数控超声波清洗仪(昆山市超声仪器有限公司),DZF-6050 型真空干燥箱(上海

慧泰仪器制造有限公司),Milli-Q 型纯水仪(美国 Millipore 公司),SHP-250 型生化培养箱(上海森信实验仪器有限公司),SMZ-168 型解剖镜(麦克奥迪事业集团有限公司)等。甲醇(分析纯,国药集团化学试剂有限公司),乙腈、乙酸(色谱纯, Fisher Scientific 公司)。龙胆苦苷(gentiopicroside,纯度 > 98%,批号 101003),马钱苷酸(loganic acid,纯度 > 98%,批号 101006)均购自上海中药标准化研究中心。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Cat C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 3.5 μm),流动相乙腈(A)-0.04% 乙酸水(B),梯度洗脱(0 ~ 10 min, 9% ~ 10% A; 10 ~ 20 min, 10% A),流速为 0.8 mL · min⁻¹,检测波长为 254 nm,柱温为 30 °C,进样量为 5 μL。在上述色谱条件下,各成分之间分离度良好,色谱图见图 1。



1. 马钱苷酸; 2. 龙胆苦苷

图 1 对照品(A)和粗茎秦艽种子样品(B) HPLC

Fig. 1 HPLC chromatograms of standard solution (A) and sample solution (B)

2.2 对照品溶液制备 分别取马钱苷酸和龙胆苦苷适量,精密称定,加 80% 甲醇定容至量瓶中,分别制备成质量浓度为 761.5 mg · L⁻¹ 的马钱苷酸贮备溶液和质量浓度为 103.1 mg · L⁻¹ 的龙胆苦苷贮备溶液。

2.3 供试品溶液制备 将粗茎秦艽种子粉碎后过 4 号筛,取约 1 g 种子粉末,精密称定,置于具塞锥形瓶中,精密加入 80% 甲醇 25 mL,称定质量,超声处理(功率 250 W, 40 kHz) 30 min,静置放冷后,再称定质量,用 80% 甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.4 线性关系的考察 将对照品溶液按不同质量浓度依次稀释,HPLC 分析,进样量 5 μL。分别以对照品的浓度(X)为横坐标,峰面积积分值(Y)为纵坐标,绘制标准曲线,得到线性回归方程和线性范围。马钱苷酸和龙胆苦苷的线性回归方程分别为

$Y_{\text{马钱苷酸}} = 7\ 418\ 359.426\ 9 X + 42\ 444.518\ 4 (r = 1.000\ 0)$; $Y_{\text{龙胆苦苷}} = 6\ 461\ 913.086\ 5 X + 7\ 246.824\ 9 (r = 0.999\ 9)$; 结果表明, 马钱苷酸和龙胆苦苷分别在 $35.5 \sim 761.5\ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $4.8 \sim 103.1\ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 与峰面积呈良好的线性关系。

2.5 精密度试验 分别取马钱苷酸和龙胆苦苷对照品高、中、低 3 种浓度溶液, HPLC 分析, 进样量 $5\ \mu\text{L}$, 连续进样 6 次, 记录色谱峰的峰面积。马钱苷酸峰面积的 RSD 分别为 1.1%, 0.7%, 2.7%; 龙胆苦苷峰面积的 RSD 分别为 0.9%, 2.4%, 2.3%, 说明其日内精密度良好。连续 3 d 进样, 计算日间精密度结果, 马钱苷酸峰面积的 RSD 分别为 0.2%, 1.0%, 0.6%; 龙胆苦苷峰面积的 RSD 分别是 1.7%, 1.9%, 1.2%, 表明其日间精密度良好。

2.6 重复性试验 取同一批粉碎后的粗茎秦艽种子 6 份, 每份约 1 g, 精密称定, 按 2.3 项下方法制

备, 分别进样后记录色谱峰的峰面积。测得粗茎秦艽种子中马钱苷酸和龙胆苦苷质量分数的均值分别是 $14.825\ 5, 1.112\ 4\ \text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, RSD 分别为 0.9%, 1.5%, 表明样品制备方法重复性良好。

2.7 稳定性试验 取供试品溶液, 在室温下放置, 分别于 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 进样 6 次。测得粗茎秦艽种子中马钱苷酸和龙胆苦苷峰面积的 RSD 分别为 1.3%, 1.9%, 说明样品在 24 h 内稳定性良好。

2.8 回收率试验 取已知含量的同一批粉碎后的粗茎秦艽种子样品(含马钱苷酸 $15.418\ 9\ \text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 龙胆苦苷 $1.152\ 7\ \text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$) 9 份, 每份约 0.5 g, 精密称定, 分别加入马钱苷酸和龙胆苦苷对照品溶液适量, 按 2.3 项下制备。每个浓度平行样 3 份, 使用外标法计算粗茎秦艽种子中马钱苷酸和龙胆苦苷的含量, 计算加样回收率, 结果见表 1。

表 1 马钱苷酸和龙胆苦苷的加样回收率

Table 1 Recoveries of loganic acid and gentiopicoside

化合物	样品中量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均值/%	RSD/%
马钱苷酸	7.706 4	3.807 5	11.445 2	98.20	98.30	1.9
	7.718 7	3.807 5	11.560 0	100.89		
	7.718 7	3.807 5	11.589 7	101.67		
	7.721 8	7.615 0	15.092 3	96.79		
	7.714 1	7.615 0	15.181 6	98.06		
	7.721 8	7.615 0	15.244 0	98.78		
	7.724 9	11.422 5	18.823 8	97.17		
	7.717 2	11.422 5	18.705 4	96.20		
	7.720 2	11.422 5	18.796 2	96.97		
龙胆苦苷	0.514 3	0.260 0	0.769 3	98.06	99.85	2.6
	0.513 9	0.260 0	0.785 2	104.35		
	0.514 1	0.260 0	0.776 5	100.91		
	0.514 6	0.500 0	1.019 3	100.93		
	0.514 3	0.500 0	1.002 7	97.67		
	0.514 8	0.500 0	1.007 7	98.56		
	0.514 8	0.760 0	1.250 9	96.85		
	0.514 3	0.760 0	1.260 8	98.22		
	0.514 3	0.760 0	1.297 7	103.08		

2.9 萌发过程中粗茎秦艽种子的含量测定

2.9.1 发芽试验 取饱满粗茎秦艽种子适量(共计 14 份样品), 4 月 27 日蒸馏水浸种 24 h 后, 取第 1 份样品(每份 500 粒, 2 份)。4 月 28 日将粗茎秦艽种子均匀置于放有双层湿润滤纸的培养皿内, 于 $21\ ^\circ\text{C}$ 培养箱内避光培养^[16], 每隔 3 d 取 1 次样品

(每份 500 粒, 2 份), 共取 7 次样品。7 月 21 日蒸馏水浸种 24 h 后, 进行发芽试验后同法取 7 次样品。样品取出后置于冰箱内冷冻保存。

2.9.2 含量测定 所有样品在 $40\ ^\circ\text{C}$ 下真空减压干燥 24 h 后粉碎, 精密称定, 按 2.3 项下制备, 进样后记录色谱峰的峰面积。按外标法计算含量, 结果见

图 2。

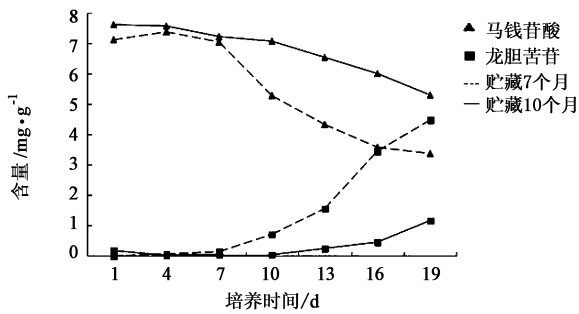


图 2 不同贮藏时间粗茎秦艽种子萌发过程中中马钱苷酸和龙胆苦苷质量分数变化

Fig. 2 Contents of loganic acid and gentiopicoside during seed germination of *Gentiana crassicaulis*

3 讨论

建立粗茎秦艽种子中马钱苷酸和龙胆苦苷含量测定的方法时,对色谱条件进行了优化,所得谱图在峰型、理论板数、保留时间和分离效果上均良好。分别对提取方法、提取时间、提取次数、溶剂倍量等参数进行单因素考察,确立了供试品的制备方法。考察提取溶剂时,50% 甲醇和 80% 甲醇的提取效果都较好。但是由于种子中脂肪性成分含量较高,80% 甲醇提取的样品溶液更加澄清,故选择 80% 甲醇作为提取溶剂。发芽过程中每份样品为 500 粒种子(约 0.15 g),提取溶剂调整至 10 mL 80% 甲醇溶液。

用 30 mL 蒸馏水浸泡粗茎秦艽种子(约 1 g) 24 h 后,发现浸泡液中含有马钱苷酸 0.26 mg,龙胆苦苷 0.48 mg。结果显示在种子浸泡过程中,马钱苷酸和龙胆苦苷存在不同程度从种子内流出现象。这种流出现象是否有调节种子萌发的作用,笔者会在今后试验中进一步关注。

粗茎秦艽种子中马钱苷酸含量远高于龙胆苦苷含量。萌发过程中马钱苷酸含量呈不断下降的趋势,而龙胆苦苷含量呈不断上升的趋势,二者的含量动态变化有负相关性。粗茎秦艽种子的寿命为一年,试验过程中发现贮藏前期种子的萌发率均在 70% 以上,而随着时间推移,贮藏 10 个月后种子的萌发率仅为 21%;测定这 2 个萌发过程中的龙胆苦苷和马钱苷酸的含量变化,发现随着种子发芽率降低,种子内龙胆苦苷和马钱苷酸的含量变化趋缓。但马钱苷酸和龙胆苦苷是否对种子萌发具有一定的调节作用,还需要进一步实验。

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:458-459.
- [2] 海潭,松林. 蒙药与中药交叉品种的药用部位对比探讨[J]. 中国民族医药杂志,2013,19(6):41-42.
- [3] 国家中医药管理局中华本草编委会. 中华本草. 藏药卷[M]. 上海:上海科学技术出版社,2008:68.
- [4] 李瑶,陈兴福,孟杰,等. 玉龙秦艽质量综合评价方法研究与应用[J]. 药物分析杂志,2015,32(10):1782-1789.
- [5] 张美,方清茂,周先建,等. 青藏高原粗茎秦艽资源调查[J]. 资源开发与市场,2014,30(4):448-450.
- [6] DUAN Y W, ZHANG T F, LIU J Q. Interannual fluctuations in floral longevity, pollinator visitation and pollination limitation of an alpine plant (*Gentiana straminea* Maxim. Gentianaceae) at two altitudes in the Qinghai-Tibetan Plateau[J]. Plant System Evol, 2007, 267(1):255-265.
- [7] 和顺荣,和朝元. 迪庆高寒地区秦艽栽培技术研究[J]. 农民致富之友,2015(12):164-165.
- [8] 吴靳荣,赵志礼,王妍妍,等. 云南丽江产粗茎秦艽栽培品种的品质评价[J]. 中成药,2010,32(2):250-252.
- [9] 王馨,严世武,杜智红,等. 粗茎秦艽种子检验方法[J]. 西南农业学报,2014,27(1):311-316.
- [10] 滕红梅,曹晓燕,王喆. 不同培养条件及预处理对秦艽种子萌发的影响[J]. 种子,2008,27(11):87-91.
- [11] 郭江帆,孙佳,魏朔南. 秦艽种子内源萌发抑制物的初步探究[J]. 种子,2013,32(7):39-49.
- [12] 王妍妍,赵志礼,吴靳荣,等. 粗茎秦艽药材 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中草药,2009,40(1):120-123.
- [13] 吴靳荣,吴立宏,赵志礼,等. 中药秦艽和习用品中 5 种环烯醚萜类成分的 HPLC 含量测定[J]. 中国中药杂志,2014,39(4):715-720.
- [14] LIAN L H, WU Y L, WAN Y, et al. Anti-apoptotic activity of gentiopicoside in *D*-galactosamine/lipopolysaccharide-induced murine fulminant hepatic failure[J]. Chem Bio Inter, 2010, 188(1):127-133.
- [15] WEI S H, Kodama H, CHEN G. Anti-inflammatory effect of three iridoids in human neutrophils [J]. Nat Prod Res, 2013, 27(10):911-915.
- [16] 吴靳荣,赵志礼,孟千万,等. 粗茎秦艽种子生物学研究[J]. 中国中药杂志,2011,36(5):552-555.
- [17] 倪梁红,赵志礼,吴靳荣,等. 藏药解吉 4 种高山基原植物种胚发育特性的初步研究[J]. 中药材,2015,38(8):1571-1575.

[责任编辑 邹晓翠]