

RP-HPLC 测定不同海拔新疆假龙胆中 3 种有效成分的含量

阿力同其米克^{1*}, 姜湘英², 郭继娜²

(1. 新疆巴音郭楞职业技术学院, 新疆 库尔勒 841000;

2. 新疆巴音郭楞蒙古自治州食品药品检验所, 新疆 库尔勒 841000)

[摘要] 目的:建立不同海拔蒙药新疆假龙胆中 3 种有效成分的 RP-HPLC 测定方法。方法:采用 ZORBAX SB-C₁₈柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm)色谱柱,流速 1.0 mL·min⁻¹,獐牙菜苦苷、龙胆苦苷的流动相为甲醇-水(20:80),芒果苷的流动相为甲醇-0.5%乙酸(25:75),检测波长分别为獐牙菜苦苷 238 nm,龙胆苦苷 270 nm,芒果苷 254 nm,柱温 25 ℃。结果:实验所建立的测定方法简便准确,在 1 900~3 035 m 的不同海拔的新疆假龙胆中獐牙菜苦苷、龙胆苦苷、芒果苷的含量变化范围分别是 1.30%~2.48%,0.377%~0.508%,0.041%~0.071%。结论:不同海拔的新疆假龙胆中 3 种有效成分含量随海拔高度增高均呈增加趋势。

[关键词] 新疆假龙胆; 獐牙菜苦苷; 龙胆苦苷; 芒果苷; 高效液相色谱

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)24-0114-05

[doi] 10.11653/syfy2013240114

Determination of Three Kinds Effective Compositions in Herb of *Gentianella Turkestanorum* from Different Elevation by RP-HPLC

Alitongqimike^{1*}, JIANG Xiang-ying², GUO Jin-na²

(1. Xinjiang Bayinguolen Technology College, Kule 841000, China;

2. Xinjiang Bayinguolen Institute for Food and Drug Control, Kule 841000, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a RP-HPLC method for the determination of three kinds effective compositions in Mongolian medicine *Gentianella turkestanorum* from different elevation. **Method:** A Zorbax SB-C₁₈ (4.6 mm×250 mm, 5 μm) column was used with methanol-water (20:80) and methanol-0.5% acetic acid (25:75) at detection wavelengths of 238, 270 nm and 254 nm for swertiamarin, gentiopicrosin and mangiferin. The flow rate was 1.0 mL⁻¹·min⁻¹ and the column temperature was 25 ℃. **Result:** The method is simple and accurate. In *Gentianella turkestanorum* from 1 900-3 035 m, the changes of swertiamarin, gentiopicrosin and mangiferin were 1.30%-2.48%, 0.377%-0.508%, 0.041%-0.071% (g·g⁻¹). **Conclusion:** Three kinds effective compositions in *Gentianella turkestanorum* were increased with the increase of elevation.

[Key words] *Gentianella turkestanorum*; swertiamarin; gentiopicrosin; mangiferin; RP-HPLC

特木尔-地格达系蒙药中最具有代表性的常用药材品种之一,用于消“协日”热,治黄疸,泻火解

毒、利湿、健脾^[1]。经过我们的调查、整理及鉴定,新疆蒙医主要是把新疆假龙胆、肋柱花和扁蕾作为特木尔-地格达使用。不同蒙医依据自己的用药习惯使用相应品种。由于新疆假龙胆在天山南坡中部大量分布,新疆巴州地区蒙医们把它作为特木尔-地格达使用。新疆假龙胆也是维吾尔医常用药材,具有清热解毒、利湿消肿作用,常用于关节炎的治疗。民间用其全草泡茶治疗感冒、发热等症^[2]。

新疆假龙胆为龙胆科假龙胆属植物新疆假龙胆

[收稿日期] 20130826(001)

[基金项目] 新疆少数民族科技人才特殊培养计划项目(201223115);自治州科学技术研究(“星火”)(201205)

[通讯作者] *阿力同其米克,硕士研究生,从事药用植物化学研究, E-mail: altqmkok @ 163. com, Tel:15858992551

Gentianella turkestanorum (Gand.) Holub 的干燥全草,主要分布于新疆地区,前苏联、蒙古亦有分布^[3-4]。化学成分研究表明,龙胆科假龙胆属植物大多含有獐牙菜苦苷、龙胆苦苷等裂环烯醚萜类成分,齐墩果酸及芒果苷等化合物^[5],现代药理研究表明,这几种成分具有抗炎、保肝利胆等作用。虽然新疆假龙胆在蒙医和维医中广泛应用且疗效确切,但其有效成分含量报道极少。为更全面地了解新疆假龙胆有效成分含量和海拔对新疆假龙胆中主要药用成分的影响,笔者采集了巴音布鲁克草原与巩乃斯林场 10 个不同海拔地区的新疆假龙胆,采用高效液相色谱法进行獐牙菜苦苷、龙胆苦苷和芒果苷含量测定并分析比较,以期新疆假龙胆药材的质量控制、人工种植和合理应用提供一定的理论依据。

1 材料

SHIMADZU 型高效液相色谱仪(DGO-20A5R 在线脱气机、LC-20AT 四元梯度泵、CTO-10A 柱温箱、SPD-M20A 检测器、LC-Solutions 色谱工作站)(日本岛津公司),B5200S-DT 型超声波清洗仪(上海必能信超声有限公司,功率 160 W,频率 50 KHz);纯水仪(成都越纯科技有限公司)。

对照品獐牙菜苦苷(中国药品生物制品检定所,批号 0785-200203,供鉴别用,利用面积归一化法测得其纯度为 79.2%)、龙胆苦苷(中国药品生物制品检定所,批号 110770-201013,供含量测定用,纯度为 96.9%)。甲醇为色谱纯(Fisher Scientific 公司),水为超纯水。

新疆假龙胆样品共 10 批,分别于 2012 年 7 月采自巴音布鲁克草原以及巩乃斯林场,经武汉植物园杨春峰研究员和新疆巴音技术学院阿力同其米克鉴定为龙胆科假龙胆属植物新疆假龙胆 *Gentianella turkestanorum* (Gand.) Holub 的干燥全草,见表 1。

2 方法与结果^[6-14]

2.1 色谱条件

2.1.1 獐牙菜苦苷 ZORBAX SB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),流速 1.0 mL·min⁻¹,柱温 25 ℃,进样量 10 μL,检测波长 238 nm,流动相甲醇-水(20:80)。

2.1.2 龙胆苦苷 ZORBAX SB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),流速 1.0 mL·min⁻¹,柱温 25 ℃,进样量 10 μL,检测波长 270 nm,流动相甲醇-水(20:80)。

2.1.3 芒果苷 ZORBAX SB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×

表 1 不同海拔新疆假龙胆样品采集地点和采集时间

No.	样品采集地点	海拔/m	采集时间
1	巴音布鲁克天鹅湖区	2 481	2012-7
2	巴音布鲁克达坂	2 531	2012-7
3	巴音布鲁克二乡	2 603	2012-7
4	巴音布鲁克巴西力克草原	2 678	2012-7
5	巴音布鲁克二乡山口大桥	2 756	2012-7
6	巩乃斯阿尔先沟	1 900	2012-7
7	巩乃斯陈地	2 190	2012-7
8	巩乃斯达坂下坡	2 800	2012-7
9	巩乃斯达坂反修桥	2 710	2012-7
10	巩乃斯达坂顶	3 035	2012-7

250 mm,5 μm),流速 1.0 mL·min⁻¹,柱温 25 ℃,进样量 10 μL,检测波长 254 nm,流动相甲醇-0.5%乙酸(25:75)。

2.2 对照品溶液的制备

2.2.1 獐牙菜苦苷 精密称取 1.81 mg,置于 25 mL 量瓶中,加入少量甲醇,超声溶解,定容至刻度,摇匀,即得 0.072 4 g·L⁻¹的对照品储备液。

2.2.2 龙胆苦苷 精密称取 2.07 mg,置于 20 mL 量瓶中,加入少量甲醇,超声溶解,定容至刻度,摇匀,作为对照品储备液,质量浓度为 0.103 5 g·L⁻¹。

2.2.3 芒果苷 精密称取 4.10 mg,置于 100 mL 量瓶中,加入少量甲醇,超声溶解,定容至刻度,摇匀,作为对照品储备液,质量浓度为 0.041 0 g·L⁻¹。

2.3 样品溶液的制备

2.3.1 獐牙菜苦苷样品溶液的制备 取本品粉末(过三号筛)约 0.2 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇 50 mL,密塞,称定质量,超声处理(功率 250 W,频率 40 kHz)30 min,放冷,再称定质量,用甲醇补足缺失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.3.2 龙胆苦苷样品溶液的制备 取本品粉末(过三号筛)约 2.0 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇 50 mL,密塞,称定质量,超声处理(功率 250 W,频率 40 kHz)30 min,放冷,再称定质量,用甲醇补足缺失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.3.3 芒果苷样品溶液的制备 取本品粉末(过三号筛)约 2.0 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇 50 mL,密塞,称定质量,超声处理(功率 250 W,频率 40 kHz)30 min,放冷,再称定质量,用甲醇补足缺失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.4 线性关系考察 分别精密吸取上述獐牙菜苦苷、龙胆苦苷、芒果苷对照品储备液,在各自色谱条件下按 1,2,5,10,15,20 μL 体积进样,测定峰面积。以相应组分的峰面积 (Y) 和对照品溶液的浓度 (X) 绘制标准曲线,得线性方程如下 $Y_{\text{獐牙菜苦苷}} = 907\ 311.9X + 13\ 639.171 (r = 0.999\ 2)$; $Y_{\text{龙胆苦苷}} = 1\ 191\ 315.3X + 7\ 088.004 (r = 0.999\ 8)$; $Y_{\text{芒果苷}} = 3\ 382\ 214.4X + 5\ 507.435 (r = 0.999\ 7)$ 。獐牙菜苦苷、龙胆苦苷、芒果苷的线性范围分别 0.07 ~ 1.448,0.10 ~ 2.00,0.04 ~ 0.80 μg 。

2.5 精密度试验 取上述獐牙菜苦苷、龙胆苦苷、芒果苷对照品储备液,分别重复进样 5 次,测定峰面积,RSD 分别为 0.61%,0.36%,1.3%,表明仪器的精密度良好。

2.6 稳定性试验 分别精密吸取 2.3 项下处理好的在巩乃斯达坂顶采集的 10 号样品(采集地点巩乃斯达坂顶)溶液 10 μL ,分别于配制后 0,2,4,8,12,24 h,测定獐牙菜苦苷、龙胆苦苷、芒果苷含量,计算 RSD 分别为 1.1%,1.2%,1.2%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.7 重复性试验 獐牙菜苦苷:精密称取 6 份 10 号样品(采集地点巩乃斯达坂顶)药材粉末 0.2 g;龙胆苦苷及芒果苷:精密称取 6 份 10 号样品(采集地点巩乃斯达坂顶)药材粉末 2.0 g,按 2.3 项下方法制备供试品液,进样分析,计算上述 3 个成分的含量,其含量的 RSD 分别为 1.1%,1.6%,1.1%,表明仪器的重复性良好。

2.8 加样回收率试验 取已测定 3 种指标成分獐牙菜苦苷、龙胆苦苷、芒果苷的 10 号样品(采集地点巩乃斯达坂顶),分别精密称取药材粉末适量。

2.8.1 獐牙菜苦苷 取 0.05 g,精密称定,共取 6 份,按相当于药材含量的 100% 量分别加入獐牙菜苦苷对照品,按 2.3.1 项下方法制备供试品液,采用 2.1.1 项下色谱条件进行分析,计算供试品獐牙菜苦苷的加样回收率,结果见表 2。

2.8.2 龙胆苦苷 取 0.2 g,精密称定,共取 6 份,按相当于药材含量的 100% 量分别加入龙胆苦苷对照品,按 2.3.2 项下方法制备供试品液,采用 2.1.2 项下色谱条件进行分析,计算供试品龙胆苦苷的加样回收率,结果见表 3。

2.8.3 芒果苷 取 1.5 g,精密称定,共取 6 份,按相当于药材含量的 100% 量分别加入芒果苷对照品,按 2.3.3 项下方法制备供试品液,采用 2.1.3 项下色谱条件进行分析,计算供试品芒果苷的加样回

表 2 獐牙菜苦苷回收率试验

No.	取样量 /g	样品中含量/mg	总测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
1	0.051 1	1.267 3	2.442 2	97.8	99.0	1.0
2	0.050 3	1.247 4	2.430 7	98.5		
3	0.051 5	1.277 2	2.466 5	99.0		
4	0.051 3	1.272 2	2.460 3	98.9		
5	0.050 9	1.262 3	2.470 8	100.6		
6	0.050 6	1.254 9	2.445 4	99.1		

注:加入量均为 1.201 3 mg。

表 3 龙胆苦苷回收率试验

No.	取样量 /g	样品中含量 /mg	总测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
1	0.200 6	1.019 0	1.964 6	96.0	96.7	1.7
2	0.201 2	1.022 1	1.993 3	98.6		
3	0.203 3	1.032 8	1.961 6	94.3		
4	0.202 0	1.026 2	1.974 7	96.3		
5	0.202 5	1.028 7	1.977 3	96.3		
6	0.202 2	1.027 2	1.997 4	98.5		

注:加入量均为 0.985 0 mg。

收率,结果见表 4。

表 4 芒果苷回收率试验

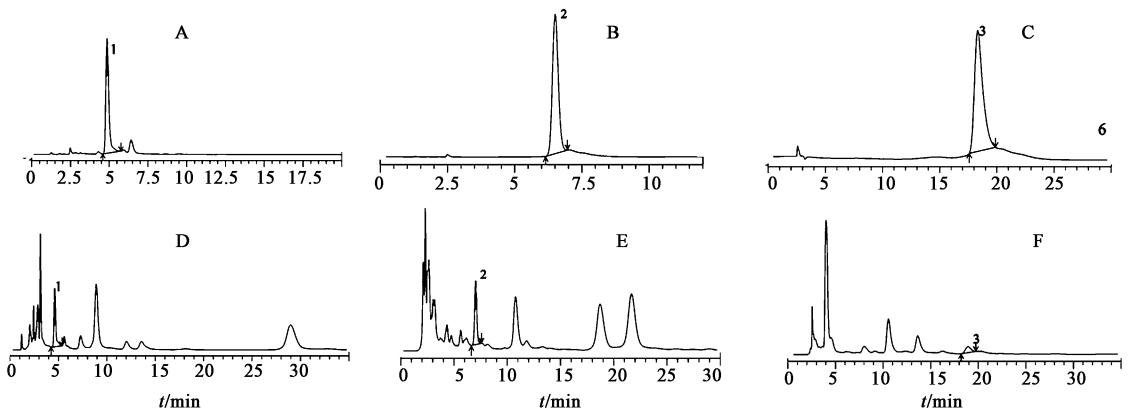
No.	取样量 /g	样品中含量 /mg	总测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
1	1.502 1	1.066 5	2.067 1	98.2	96.2	1.4
2	1.503 0	1.067 1	2.038 2	95.3		
3	1.503 5	1.067 5	2.059 0	97.3		
4	1.503 9	1.067 8	2.039 9	95.4		
5	1.502 5	1.066 8	2.032 8	94.8		
6	1.501 1	1.065 8	2.042 0	95.8		

注:加入量均为 1.019 0 mg。

3 结果与分析

3.1 色谱图 按 2.1 项下色谱条件,测定供试品中獐牙菜苦苷、龙胆苦苷、芒果苷,保留时间分别为 4.7,6.5,18.2 min,色谱图见图 1。

3.2 样品检测结果 分别精密吸取 2.3 项下处理好的 1 ~ 10 号不同的样品溶液 10 μL ,按 2.1 项下色谱条件,分析新疆假龙胆样品中獐牙菜苦苷、龙胆苦苷、芒果苷的含量,测定峰面积的积分值,按外标法计算,结果见表 5。由于巴音布鲁克草原与巩乃斯林场自然条件有一定区别,故对在两处采集的样品



1. 獐牙菜苦苷;2. 龙胆苦苷;3. 芒果苷

图1 对照品(A,B,C)及新疆假龙胆全草(D,E,F)

分别按海拔高度进行3种有效成分的比较。在巴音布鲁克草原与巩乃斯林场两处采集的新疆假龙胆样品中,3种有效成分均以獐牙菜苦苷的含量最高,龙胆苦苷居中,芒果苷的含量最低,3种有效成分的含量均随海拔高度的增高呈现出增高的趋势,但芒果苷的含量随海拔增高有一定波动。在海拔2 756 m的巴音布鲁克二乡山口大桥及在海拔3 035 m的巩乃斯达坂顶采集的样品中3种有效成分的含量在相应组中均为最高。

表5 不同海拔地区新疆假龙胆样品中3种有效成分含量比较

No.	采集地	海拔 /m	獐牙	龙胆	芒果
			菜苦苷 /%	苦苷 /%	苷 /%
1	巴音布鲁克天鹅湖区	2 481	1.3	0.377	0.041
2	巴音布鲁克达坂	2 531	1.47	0.439	0.034
3	巴音布鲁克二乡	2 603	1.66	0.482	0.035
4	巴音布鲁克巴西力克草原	2 678	1.95	0.492	0.051
5	巴音布鲁克二乡山口大桥	2 756	2.62	0.506	0.068
6	巩乃斯阿尔先沟	1 900	1.70	0.459	0.055
7	巩乃斯陈地	2 190	1.72	0.370	0.046
8	巩乃斯达坂下坡	2 800	1.84	0.415	0.058
9	巩乃斯达坂反修桥	2 710	2.11	0.436	0.047
10	巩乃斯达坂顶	3 035	2.48	0.508	0.071

4 讨论

4.1 检测波长的确定 对按照2.2配置的对照品溶液,以流动相为空白,在200~400nm内进行DAD全波长扫描,根据扫描结果,獐牙菜苦苷在238 nm,龙胆苦苷在270 nm处有最大吸收,所以选择以上波长为各自检测波长。

4.2 流动相的优化 对比了乙腈-水、甲醇-水、甲

醇-水-冰醋酸系统,选择了对新疆假龙胆中獐牙菜苦苷、龙胆苦苷等指标成分有较好分离效果,分析成本较低的甲醇-水系统,并通过多次实验优化,选出了2.1项下的流动相条件。

4.3 供试品提取条件的确定 对比了超声提取及超声处理后过中性氧化铝柱的提取方法,结果显示超声处理后过中性氧化铝柱的方法并不能减少杂峰的出现,与仅用超声提取比较,测得的龙胆苦苷及獐牙菜苦苷含量偏低,故采用了超声提取法。对比了甲醇及70%的乙醇做溶剂的提取效果,70%的乙醇溶出的杂质较多,特别是对基线的影响较大,所以采用甲醇做溶剂。

5 小结

实验结果表明,新疆假龙胆全草中3个测定成分的含量有明显差别,其中獐牙菜苦苷的含量最高,是龙胆苦苷的3~5倍,是芒果苷30~45倍。采用同一生长期,不同海拔地区的新疆假龙胆作为实验材料,避免了不同生长期新疆假龙胆有效成分含量明显变化的因素对实验结果的影响。在本次实验中,巴音布鲁克草原与巩乃斯林场不同海拔地区新疆假龙胆中獐牙菜苦苷、龙胆苦苷、芒果苷的含量随海拔的增高而增加,这与文献报道的同科植物抱茎獐芽菜中獐牙菜苦苷的含量随海拔的升高而增加的结果相一致。

从植物化学分类学角度分析,本属植物化学成分与獐牙菜属和肋柱花属植物化学活性成分具有相似性,相互替代用药有一定的科学依据。因此新疆假龙胆被新疆蒙医们用为特木尔-地格达有一定的科学道理,但应该更深入进行相应的药理学研究。本研究为我国传统蒙药资源进一步的挖掘提供科学参考,也有利于扩大龙胆科药用植物资源应用。

气相色谱法测定人参皂苷 R_{g1} 中的有机溶剂残留量

张建民¹, 张宇佳², 相莉², 陈少华², 郑稳生^{2*}, 王锦玉³

(1. 首都儿科研究所, 北京 100020; 2. 中国医学科学院北京协和医学院药物研究所药物传输技术及新型制剂北京市重点实验室, 北京 100050; 3. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700)

[摘要] 目的: 建立气相色谱法测定人参皂苷 R_{g1} 中有机残留量的方法。方法: 采用气相色谱法, FID 检测器, DB-624 (30 m × 0.32 mm, 0.25 μm), 载气为氮气, 柱温为恒温 50 °C, 进样口温度 200 °C, 检测器温度 200 °C, 以水为溶剂配制对照溶液及供试品溶液。结果: 在所考察的浓度范围内具有良好的线性, 乙醇的检测限为 1.0 μg · L⁻¹, 精密密度 RSD < 1.0%。平均回收率为 90% ~ 105%。结论: 经方法学验证, 该检测方法简便灵敏, 结果准确可靠, 适用于人参皂苷 R_{g1} 原料药中有机溶剂残留量的检测。

[关键词] 人参皂苷 R_{g1}; 有机溶剂残留量; 气相色谱

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)24-0118-03

[doi] 10.11653/syfy2013240118

Determination of Residual Solvents in R_{g1} by Gas Chromatograph

ZHANG Jian-min¹, ZHANG Yu-jia², XIANG Li², CHEN Shao-hua²,
ZHENG Wen-sheng^{2*}, WANG Jin-yu³

[收稿日期] 20130916(196)

[基金项目] 国家科技重大专项“重大新药创制”项目(2009ZX09301-005)

[第一作者] 张建民, 副主任药师, 从事医院制剂新药研发, Tel:13910733577, E-mail: zjm051525@126.com

[通讯作者] * 郑稳生, 博士, 副研究员, 硕士生导师, 从事药物传输技术及新型制剂, Tel:13601084817, E-mail: zhengwensheng@imm.ac.cn

[参考文献]

- [1] 罗布桑. 蒙药学[M]. 北京: 民族出版社, 1989:321.
- [2] 刘勇民. 维吾尔药志. 下册[M]. 乌鲁木齐: 新疆科技卫生出版社, 1999:892.
- [3] 中国科学院《中国植物志》编辑委员会. 中国植物志. 62卷[M]. 北京: 科学出版社, 1988:313, 314.
- [4] 杨红霞, 魏立新, 杜玉枝, 等. 不同海拔川西獐牙菜中药用成分的 HPLC 分析[J]. 中药材, 2010, 33(6):867.
- [5] 霍丽云, 王燕飞. 高寒藏药材-白花假龙胆药效成分的高效液相色谱测定[J]. 山东教育学院学报, 2005, 20(2):86.
- [6] 王秀梅, 巴根那, 白明纲. 高效液相色谱法测定肋柱花中獐牙菜苦苷的含量[J]. 内蒙古民族大学学报, 2007, 22(3):320.
- [7] 李冬鸣, 曾阳. 藏药川西獐牙菜人工栽培与野生品种有效成分比较研究[J]. 青海科技, 2008(1):15.
- [8] 丁兰, 谭桂山, 李福双, 等. 两种獐牙菜属植物中两种

苦苷的含量分析[J]. 中药材, 2008, 31(4):533.

- [9] 徐康平, 李福双, 谭健兵, 等. 高效液相色谱法测定川东獐牙菜属植物中多种成分的含量[J]. 药物分析杂志, 2005, 25(1):14.
- [10] 丁文雅, 张婷婷, 王强. 7种龙胆科蒙药药材中龙胆苦苷的含量测定[J]. 中药材, 2008, 39(1):52.
- [11] 张兴旺, 陶燕铎, 梅丽娟, 等. HPLC 测定 7 种龙胆科植物花中龙胆苦苷与獐牙菜苦苷的含量[J]. 中国野生植物资源, 2010, 29(2):38.
- [12] 胡杰, 陈刚, 田华咏, 等. 民族药獐牙菜生药学研究[J]. 中国民族医药杂志, 2010, 16(8):44.
- [13] 李福双, 徐康平, 谭健兵, 等. 高效液相色谱法测定川东獐牙菜中獐牙菜苦苷和去甲当药苷的含量[J]. 中南药学, 2003, 1(3):141.
- [14] 张元忠, 陈刚, 田华咏, 等. 显脉獐牙菜植物器官獐牙菜苦苷含量分布规律研究[J]. 中国民族医药杂志, 2007, 13(12):34.

[责任编辑 顾雪竹]