

HPLC 法测定三种獐牙菜属植物中四种药用成分的含量

吴楠^{1,2}, 陶燕铎¹, 桂兰^{1,2}, 焦利进^{1,2}, 杨小兵³, 于瑞涛^{1*}¹中国科学院藏药研究重点实验室, 青海省藏药研究重点实验室, 中国科学院西北高原生物研究所, 西宁 810008;²中国科学院研究生院, 北京 100049; ³ 东莞市金美济药业有限公司, 东莞 523808

摘要: 建立 HPLC 测定抱茎獐牙菜、川西獐牙菜和四数獐牙菜中马钱苷酸、獐牙菜苦苷、龙胆苦苷及芒果苷含量的方法; 比较各药用成分的含量差异, 为资源开发提供依据。色谱柱为 Dubhe C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 10 μm), 以甲醇-0.2% 甲酸水 (20:80) 为流动相, 流速 1.0 mL/min, 柱温 35 °C, 检测波长为 254 nm。四种成分均达到基线分离, 且在各种植物中含量差异较大, 范围分别为 54.81 ~ 109.90、1.09 ~ 24.89、1.92 ~ 29.51、1.39 ~ 15.13 mg/g。其中, 马钱苷酸以抱茎獐牙菜和四数獐牙菜含量最高, 獐牙菜苦苷以抱茎獐牙菜含量最高, 龙胆苦苷、芒果苷以川西獐牙菜含量最高。该测定方法快速、准确, 可用于獐牙菜属植物的质量评价与控制。

关键词: 高效液相色谱法; 獐牙菜属; 药用成分; 含量测定

中图分类号: R932; Q946-3

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2018.S.021

Content Determination of Four Medicinal Components in Three Species of *Swertia* by High Performance Liquid ChromatographyWU Nan^{1,2}, TAO Yan-duo¹, GUI Lan^{1,2}, JIAO Li-jin^{1,2}, YANG Xiao-bing³, YU Rui-tao^{1*}¹Key Laboratory of Tibetan Medicine Research, Qinghai Provincial Key Laboratory of Tibetan Medicine Research, Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences,Xining 810008, China; ²Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China;³Jinmeiji Pharmaceutical Co. Ltd, Dongguan 523808, China

Abstract: This research aims to establish a high performance liquid chromatography (HPLC) method for the content determination of Loganic acid, Swertiamain, Gentiopicrosin, Mangiferin in *Swertia franchetiana*, *Swertia mussoitii* and *Swertia tetraptera*, to compare the content difference of the four medicinal components and to provide basis for the resources exploitation. Chromatographic analysis was achieved on a Dubhe C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 10 μm). The mobile phase was methanol-0.2% formic acid in water (20:80) at the flow rate of 1.0 mL/min. The column temperature was 35 °C, and the detection wavelength was 254 nm. Four compounds were base-isolated and the content varies widely among different plants, the ranges were 54.81 – 109.90, 1.09 – 24.89, 1.92 – 29.51, 1.39 – 15.13 mg/g. It can be concluded that *Swertia franchetiana* and *Swertia tetraptera* have high amounts of Loganic acid, *Swertia tetraptera* is rich in Swertiamain, *Swertia mussoitii* is rich in Gentiopicrosin and Mangiferin. The method is rapid and precise. It can be used for the quality evaluation and control of *Swertia*.

Key words: HPLC; *Swertia*; medicinal components; Content determination

獐牙菜属 (*Swertia*) 是龙胆科中的一个大属^[1], 主要分布于亚洲、北美洲和非洲。我国共有 79 种, 以青海、西藏、四川等地最为集中^[2]。具有清热解毒、清肝利胆的功效, 主治黄疸性肝炎、肝硬化等症, 此外, 对胆囊炎、胆道综合症等也有一定疗效^[3]。

主要化学成分有黄酮、三萜、甾体、环烯醚萜类、酚类等, 其中环烯醚萜类是獐牙菜属植物中的特征化学成分之一^[4], 大多具有较强生理活性: 马钱苷酸有提高皮肤机能、促进毛发生长、抑制中枢神经等作用; 獐牙菜苦苷有解痉和镇痛作用, 还可用于脱毛症和皮肤美容剂; 龙胆苦苷可以促进胃液分泌, 具有健胃作用^[1,5-8]。作为传统藏药, 獐牙菜属植物药用成分的研究随着民族医药的迅速发展而不断深入, 需求量也日益增多, 近年来, 关于獐牙菜属植物中齐墩

收稿日期: 2017-11-05 接受日期: 2017-11-23

基金项目: 青海省重大专项 (2014-GX-A3A-01); 青海省科技项目 (2017-HZ-811); 青海省藏药研究重点实验室创新平台发展建设专项 (2017-ZJ-Y11)

* 通讯作者 Tel: 86-013897406734; E-mail: yuruitao521@163.com

果酸、獐牙菜苷含量分析的报道较多,张幸福在用 HPLC 同时测定抱茎獐牙菜中獐牙菜苦苷、龙胆苦苷和芒果苷含量的研究中指出,齐墩果酸的最大吸收处于检测器的末端吸收,稳定性差,对照品未被检测的现象时有发生;而獐牙菜苷由于半液化黏附在瓶壁上不易准确称取,两者不建议作为指标成分建立质量标准^[9]。四数獐牙菜中马钱苷酸、獐牙菜苦苷、龙胆苦苷和芒果苷四类成分的含量测定,虽有报道^[10],但以往文献中使用甲醇-0.04% 磷酸水进行梯度洗脱,峰形不好。本文在参阅相关文献的基础上^[11-16],利用 HPLC 同时测定了青海地区抱茎獐牙菜、川西獐牙菜、四数獐牙菜中马钱苷酸、獐牙菜苦苷、龙胆苦苷和芒果苷的含量并进行比较,采用在酸性条件下等度洗脱,效果更优,对于全面评价药物质量及资源合理开发利用具有重要意义。

1 材料

1.1 药材

抱茎獐牙菜(*Swertia franchetiana*)、四数獐牙菜(*Swertia tetraptera*)于2011年9月采集于青海互助、川西獐牙菜(*Swertia mussotil*)于2011年9月采集于青海省平安县,经西北高原生物研究所梅雨娟研究员鉴定为抱茎獐牙菜、四数獐牙菜和川西獐牙菜。

1.2 仪器与试剂

岛津 SHIMADZU 高效液相色谱仪(脱气机、溶液输送系统、低压梯度单元、高效液相色谱仪自动进样器、柱温箱、光电二极管阵列紫外可见光检测器),LabSolutions 系列工作站(岛津企业管理有限公司);UPI-1-520T 超纯水器(成都超纯科技有限公司);SK5200HP 超声波清洗器(上海科导超声仪器有限公司);METTLER TOLEDO XS105,分析天平(十万分之一)。色谱甲醇(江苏汉邦科技有限公司);甲酸(天津市凯通化学试剂有限公司);自制超

纯水。

对照品:马钱苷酸(含量测定用,99%,批号 ps09092603)由成都普思生物科技有限公司提供;獐牙菜苦苷(0785-200203)、龙胆苦苷(110770-200308)、芒果苷(111607-200301),均购自中国药品生物制品鉴定所。

2 方法

2.1 色谱条件

色谱柱为 Dubhe C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 10 μm);流动相为甲醇-0.2% 酸水(20:80),等度洗脱;检测波长:254 nm;流速 1.0 mL/min;柱温:35 ℃。

2.2 对照品溶液的制备

精密称取马钱苷酸、獐牙菜苦苷、龙胆苦苷、芒果苷对照品分别为 3.46、2.42、0.76、0.52 mg 置于 10 mL 容量瓶中,加入少量甲醇,超声促溶,定容至刻度,摇匀得到混合对照品溶液,浓度为马钱苷酸 0.346 mg/mL,獐牙菜苦苷 0.242 mg/mL,龙胆苦苷 0.076 mg/mL 及芒果苷 0.052 mg/mL。

2.3 样品溶液的制备

将抱茎獐牙菜、川西獐牙菜、四数獐牙菜样品粉碎后过 2 mm 筛,分别称取 0.5 g 置于 250 mL 平底烧瓶中,加入 30 mL 50% 甲醇,在功率 100 W,频率 53 kHz 的条件下超声提取 0.5 h,取出后静置,待溶液温度恢复室温后过滤,滤渣重复操作,合并两次滤液,用 50% 甲醇定容至 100 mL 容量瓶中,0.45 μm 有机膜处理后待测。

2.4 标准曲线的绘制

自动进样器分别精密吸取“2.2”项下对照品溶液 1、4、8、12、16、20 μL 自动进样,记录峰面积与保留时间,以对照品进样量 x (μg) 为横坐标,峰面积 y 为纵坐标,绘制标准曲线,进行线性关系考察。结果见表 1。

表 1 四种标准品的线性关系

Table 1 lineal relation of four reference substances

化合物 Substances	线性方程 Regression equation	相关系数 r	线性范围 Linear range(μg)
马钱苷酸 Loganic acid	$y = 10812x - 396.97$	0.9998	0.346 ~ 6.92
獐牙菜苦苷 Swertiamain	$y = 392552x + 148.02$	1	0.242 ~ 4.84
龙胆苦苷 Gentiopicrin	$y = 990552x - 26768$	0.9993	0.076 ~ 1.52
芒果苷 Mangiferin	$y = 3000000x - 75286$	0.9992	0.052 ~ 1.04

2.5 精密度试验

取“2.2”项下的对照品溶液 10 μL ,按“2.1”项下色谱条件连续测定 5 次,记录马钱苷酸、獐牙菜苦苷、龙胆苦苷和芒果苷的峰面积,计算 5 次进样峰面积的 RSD 值,四种指标物质分别为 1.05%、0.25%、0.43% 和 0.52%,表明仪器的精密度良好。

2.6 重复性实验

取川西獐牙菜样品 6 份,每份 0.5 g,分别按照“2.3”项下方法操作,重复测定 6 份,记录马钱苷酸、獐牙菜苦苷、龙胆苦苷和芒果苷的峰面积,计算四种指标成分峰面积的 RSD 分别为 1.47%、0.50%、0.35% 和 0.65%,表明含量测定方法的重复性良好。

2.7 稳定性试验

取“2.3”项下的川西獐牙菜样品溶液隔 0,2,4,6,8,24 h 进样,测定马钱苷酸、獐牙菜苦苷、龙胆苦苷、芒果苷的峰面积,计算 RSD 分别为 2.15%、0.74%、0.28% 和 0.75%,表明该样品溶液在 24 h 内稳定。

2.8 加样回收率试验

精密量取已测定四种指标成分含量的川西獐牙菜样品溶液 6 份(每份 2 mL),编号(0~5),分别按编号依次加入 0、0.5、1.0、1.5、2.0 和 2.5 mL 的“2.2”项下对照品溶液,再用 50% 甲醇定容至 10 mL,混匀,按“2.1”项下色谱条件进样,以 0 号所测的含量作为加样前含量,测定加样回收率,结果见表 2。

表 2 川西獐牙菜中四种药用成分的加样回收率

Table 2 Recovery rate of four pharmaceutical components in *Swertia mussotil*

化合物 Substances	回收率 Recovery rate (%)					平均回收率 Average (%)	RSD (%)
	1	2	3	4	5		
马钱苷酸 Loganin acid	99.88	103.72	96.20	100.90	98.67	99.88	2.78
獐牙菜苦苷 Swertiamain	101.33	99.94	96.70	102.03	103.10	100.62	2.46
龙胆苦苷 Gentiopiricin	101.77	99.51	98.58	101.35	102.07	100.66	1.52
芒果苷 Mangiferin	98.78	99.43	100.75	102.49	100.46	100.38	1.41

3 结果

3.1 色谱图

按“2.1”项下色谱条件测定马钱苷酸、龙胆苦苷、獐牙菜苦苷、芒果苷,4 种成分均被洗脱且达到基线分离,保留时间分别为 10.147, 12.644, 15.924, 29.535 min,结果见图 1。

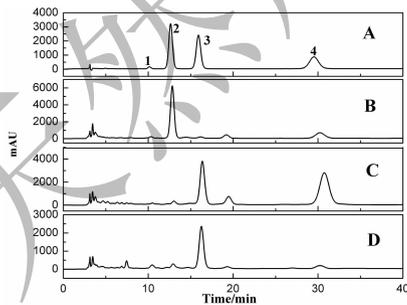


图 1 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms

注:A. 混合标准品 B. 抱茎獐牙菜 C. 川西獐牙菜 D. 四数獐牙菜;1. 马钱苷酸 2. 獐牙菜苦苷 3. 龙胆苦苷 4. 芒果苷

Note: A. mixed-reference substances; B. *Swertia franchetiana*; C. *Swertia mussotil*; D. *Swertia tetraptera*; 1. Loganic acid; 2. Swertiamain; 3. Gentiopiricin; 4. Mangiferin

3.2 样品检测结果

分别精密吸取“2.3”项下处理好的样品溶液 10 μL ,按“2.1”项下色谱条件分析不同獐牙菜样品中马钱苷酸、龙胆苦苷、獐牙菜苦苷和芒果苷,测定峰面积的积分值,根据标准曲线方程计算样品中上述四种成分的含量。结果见表 3、图 2。

4 讨论

4.1 提取方法的优化

在对样品进行提取时,采用了冷浸、超声提取、回流提取和索氏提取 4 种方法进行比较,可以发现

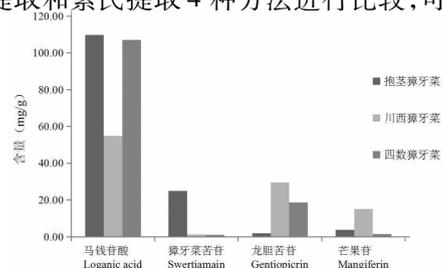


图 2 3 种獐牙菜属植物中四种药用成分含量比较

Fig. 2 Content comparison of four medicinal components in 3 species of *Swertia*

表 3 样品中四种药用成分的平均含量测定 ($n=3$)Table 3 Average contents of four pharmaceutical components in samples ($n=3$)

植物种类 Species of <i>Swertia</i>	产地 Area	马钱苷酸 Loganic acid (mg/g)	獐牙菜苦苷 Swertiamain (mg/g)	龙胆苦苷 Gentiopiricin (mg/g)	芒果苷 Mangiferin (mg/g)	总和 Total (mg/g)
抱茎獐牙菜 <i>Swertia franchetiana</i>	青海互助 Huzhu, Qinghai	109.90	24.89	1.92	3.83	140.54
川西獐牙菜 <i>Swertia mussotil</i>	青海平安 Ping'an, Qinghai	54.81	1.19	29.51	15.13	100.64
四数獐牙菜 <i>Swertia tetraptera</i>	青海互助 Huzhu, Qinghai	107.02	1.09	18.66	1.39	128.16

冷浸提取结果较差,而超声提取较后两种方法提取结果无明显差异,且操作简便,效率高,适用范围广,因此最终采取超声波提取的方法。通过单因素试验和正交试验,从甲醇浓度、料液比、提取次数、提取时间、超声功率等方面优化超声提取条件,发现用50%甲醇溶液,料液比1:60,重复提取2次,每次30 min时,可以得到较为理想的提取率^[11]。

4.2 流动相和检测波长的选择

实验中分别使用了甲醇-水(10:90,20:80)、乙腈-水(10:90,20:80)作为流动相,从峰形、出峰时间等因素初步选择了甲醇-水(20:80),然而四种药用成分由于极性较大,易溶于水和稀醇,导致色谱峰发生拖尾现象,在水中加入体积分数0.2%的甲酸可有效改善峰形,因此最终确定了“2.1”项下的流动相条件^[17]。取配置好的对照品溶液和样品溶液,以流动相为空白,采用日本岛津SPD-M20A二极管阵列检测器在190~800 nm内进行全波长扫描,马钱苷酸、獐牙菜苦苷、龙胆苦苷和芒果苷的最大吸收波长分别为231、238、270和260 nm,根据扫描结果选择254 nm作为同时检测四种药用成分的波长,且此时色谱图基线平稳,色谱峰峰形较好^[18,19]。

4.3 结果分析

在不同种类獐牙菜中,各药用成分含量有较大差异,其中马钱苷酸以抱茎獐牙菜和四数獐牙菜含量最高,獐牙菜苦苷以抱茎獐牙菜含量最高(约为川西獐牙菜中含量的21倍),龙胆苦苷、芒果苷以川西獐牙菜含量最高(其中芒果苷约为抱茎獐牙菜中含量的4倍)。这与胡凤祖研究的青藏高原龙胆科植物药用有效成分中,芒果苷含量最高的为川西獐牙菜(*Swertia mussotil*),最低的为四数獐牙菜(*Swertia tetraptera*)的实验结果一致^[17]。近年来关于獐牙菜属植物质量方面的研究较多,本文所测得含量较部分文献中测得含量存在明显差异^[20,21],例

如:杨慧玲在用HPLC法研究9种藏茵陈原植物中7种有效化学成分的报道中,得到抱茎獐牙菜中的獐牙菜苦苷是川西獐牙菜的近70倍,川西獐牙菜的芒果苷是抱茎獐牙菜的6倍以上的结论^[22];赵英在用HPLC法测定青海互助地区四数獐牙菜中獐牙菜苦苷、龙胆苦苷含量的报道中,所测得数据与也与本文存在差异^[23]。分析原因,獐牙菜属植物中药用成分含量同时与地域、生长期、采摘期、储藏时间和储藏方式等方面有关。

4.4 小结

本实验所建立的方法具有简便快速、结果可靠等特点,可用于同时检测獐牙菜属植物中马钱苷酸、獐牙菜苦苷、龙胆苦苷和芒果苷四种药用成分,在35 min内完全出峰,且各成分都能达到基线分离,不仅对于评价药物质量、资源合理开发利用具有重要意义,也可为区别原药材以及成方制剂中獐牙菜提供方法依据^[9]。此外,从三种獐牙菜属植物的色谱图中看到,在19 min左右均有1个组分峰,峰形好、分离度较高,因此如果获得这个组分的对照品,在同一色谱条件下进行分析,可进一步提高獐牙菜属植物的质量控制水平^[18]。

参考文献

- 1 Tatsuharu Miyakawa(宫川辰治), Toshiyuki Osnima(大岛俊幸), Husayoshi Hirayama(平山総良), et al. Determination of two main bitter secoiridoid glycosides in Gentianaceae [J]. *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 1997, 17: 241-244.
- 2 Flora Republicae Popularis Sinicae Editorial Committee of CAS(中国科学院中国植物志编辑委员会). *Flora Republicae Popularis Sinicae* (中国植物志) [M]. Beijing: Science Press, 1988: 353.
- 3 Zhu YY(朱钰叶), Zhang XD(张喜德), Zhang HQ(张洪泉). Progress on pharmacological activities of Tibetan *Swert-*

- tia genus[J]. *Chin J Wild Plant Res* (中国野生植物资源), 2008, 27(1): 5-7.
- 4 Li ZY(李兆云), Wang ZY(王志远), Xiao H(肖怀), et al. Progress on *Swertia* genus[J]. *J Anhui Agri Sci* (安徽农业科学), 2015, 43(30): 51-53.
 - 5 Neerja Pant, Jain DC, Bhakuni RS. Phytochemicals from genus *Swertia* and their biological activities [J]. *Indian J Chem*, 2000, 39: 565-586.
 - 6 Sun WJ(孙文基), Sheng FJ(绳金房). Directory of plant substance(天然活性成分简明手册) [M]. Beijing: China Medicine Science Technology Press, 1998.
 - 7 Yu FZ(余放争), Dong GP(董光平). Review on the pharmacological and chemical study of medicinal components in *Swertia* [J]. *Chin J Ethnomed Ethnopharm* (中国民族民间医药杂志), 1999, 36(2): 53.
 - 8 Ji YB(季宇彬). Pharmacology and applications of bioactive compounds of traditional Chinese medicine (中药有效成分药理与应用) [M]. Harbin: Heilongjiang Science Press, 1995: 211.
 - 9 Zhang XF(张幸福), Luo GF(骆桂法), Wang Y(王燕). Simultaneous determination of Swertiamarin, Gentiopicroside and Mangiferin in *Swertia franchetiana* by HPLC[J]. *Chin J Exp Tradit Med Form* (中国实验方剂学杂志), 2014, 20(12): 61-64.
 - 10 Liang YX(梁永欣), Lin PC(林鹏程), Lu YC(卢永昌), et al. Simultaneously determination of four effective components in *Swertia tetraptera* Maxim. by HPLC[J]. *J Anhui Agri Sci* (安徽农业科学), 2006, 34: 2163-2164.
 - 11 Chen T(陈涛), Jia J(贾静), Zhao XH(赵晓辉), et al. Research on ultrasonic wave extraction of active components in *Swertia mussotii* [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2010, 22: 146-150, 133.
 - 12 Yang HX(杨红霞), Wei LX(魏立新), Du YZ(杜玉芝), et al. Analysis of medicinal composition of *Swertia mussotii* at different altitudes by HPLC [J]. *Chin Med Mat* (中药材), 2010, 33: 867-869.
 - 13 Zhou L(周利), Wang XF(王先飞), Shi CO(施超欧), et al. Analysis and research on oleanolic acid in *Swertia* genus of wild and cultivated [J]. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 2011, 33: 1068-1070.
 - 14 Yu LM(余丽梅), Xiao Q(肖庆), Li Y(李艳), et al. Content detecting of oleanolic acid in different species of *Swertia* by HPLC [J]. *J DaLi Univ* (大理学院学报), 2007, 6(10): 3-4, 12.
 - 15 Song P(宋萍), Wu QX(吴启勋), Yu XR(俞学荣). HPLC simultaneous determination of swertiamarin in *Lomatogonium rotatum* (L.) Fries ex Fern [J]. *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 2009, 29: 1013-1015.
 - 16 Cui CL(崔春利), Wang JT(王继涛), Wang M(王敏), et al. Simultaneous determination of loganic acid and gentiopicroside in *Gentiana apitatae Herba* by Dual-wavelength HPLC [J]. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 2012, 34: 1315-1318.
 - 17 Hu FZ(胡凤祖), Song YL(宋娅莉), Liu M(刘梅), et al. Analysis of medicinal bioactive composition of *Gentianaceae* in Qinghai-Tibet plateau by high performance liquid chromatography [J]. *Chin J Chrom* (色谱), 2003, 21(1): 63-65.
 - 18 Feng B(冯波), Zhu HY(朱鹤云), Guan J(关皎), et al. Simultaneous determination of four active components in *Radix Gentiana* by HPLC [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form* (中国实验方剂学杂志), 2013, 19(13): 82-85.
 - 19 Chinese Pharmacopoeia Commission (国家药典委员会). Pharmacopoeia of People's Republic of China; Vol I (中华人民共和国药典: 第一部) [S]. Beijing: China Medical Science Press, 2015: 270.
 - 20 Tian CW(田成旺), Zhang TJ(张铁军), Jiang LH(蒋伶活). Quality control of traditional Tibetan medicine *Swertia mussotii* [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form* (中国实验方剂学杂志), 2013, 19(4): 75-78.
 - 21 Ji LJ(纪兰菊), Bao Y(保怡), Chen GC(陈桂琛), et al. Determination of active constituents in fifteen species *Swertia* of genus by high performance liquid chromatography [J]. *Acta Bot Boreal-Occident Sin* (西北植物学报), 2014, 24: 1298-1302.
 - 22 Yang HL(杨慧玲), Liu JQ(刘建全). Seven constituents in nine species used as Tibetan medicine "Zangyinchen" [J]. *Chin Tradit Herb Drug* (中草药), 2005, 36: 1233-1237.
 - 23 Zhao Y(赵英), Liu XC(刘小翠), Liao ZM(廖志明), et al. Simultaneously determination of three effective components in *Swertia tetraptera* Maxim. [J]. *J Guangxi Teach Univ* (广西师范大学学报: 自科版), 2016, 34: 118-121.