

青藏高原龙胆科植物药用有效成分的高效液相色谱分析

胡凤祖, 宋娅莉, 刘梅, 师治贤

(中国科学院西北高原生物研究所, 青海 西宁 810001)

摘要 采用高效液相色谱法,对青藏高原上9种龙胆科植物中的3种有效成分齐墩果酸、芒果甙和当药黄素进行了分离和分析。所用色谱柱为 Supelco INC C₁₈柱(150 mm×1.5 mm i.d., 5 μm),在选定的色谱条件下每种成分在各自的浓度范围内均具有较好的线性相关性。样品的加标回收率为 102.4%~106.7%,相对标准偏差为 0.55%~3.01%。

关键词 反相高效液相色谱,齐墩果酸,芒果甙,当药黄素,龙胆科

中图分类号 O658 文献标识码 A 文章编号 1000-871X(2003)01-0063-03

Analysis of Medicinal Bioactive Composition of *Gentianaceae* in Qinghai-Tibet Plateau by High Performance Liquid Chromatography

HU Fengzu, SONG Yali, LIU Mei, SHI Zhixian

(Northwest Plateau Institute of Biology, The Chinese Academy of Sciences, Xining 810001, China)

Abstract: Oleanolic acid, mangiferin and swertisin were important bioactive components in *Gentianaceae*. The contents of these compounds in nine *Gentianaceae* plants found in Qinghai-Tibet plateau were determined by reversed-phase high performance liquid chromatography. Supelco INC C₁₈ column (150 mm×1.5 mm i.d., 5 μm) was used. The good linear relationships were obtained under the optimum conditions for every component. The recoveries of the standards added were 102.4%~106.7% while the relatively standard deviations were within the range of 0.55% to 3.01%.

Key words: reversed-phase high performance liquid chromatography; oleanolic acid; mangiferin; swertisin; *Gentianaceae*

青藏高原龙胆科(*Gentianaceae*)植物,是藏医用于治疗肝、胆系统疾病的有效药物^[1,2]。其中獐牙菜属植物“晶珠本草”记载:苦寒、清目利胆,具清热解毒、消炎愈痔等功效,疗效确切。现代医学研究证明,其主要有效成分齐墩果酸可强心、抗炎、抗过敏,芒果甙和当药黄素有抗炎、利胆之疗效^[3,4]。文献^[5]报道了齐墩果酸的含量测定方法。为了更好的利用和开发青藏高原龙胆科植物,我们用高效液相色谱对龙胆科植物的獐牙菜属、花锚属、龙胆属和肋助花属特有的或重要的9种植物的药用有效成分进行了分离和分析得到了满意的结果。这将对研究青藏高原生物多样性,发现和扩大新药源具有十分重要的意义。

1 实验部分

1.1 样品的采集

龙胆科植物样品于1999年8~9月采集于青藏

高原4000米以上的玉树、果洛等地。样品除去泥沙,自然风干,粉碎后置于阴凉干燥处保存。

1.2 仪器和试剂

Waters 600E 高效液相色谱仪,486 紫外检测器,746 数据处理系统,Millipore 溶剂过滤系统;氯仿、无水乙醇、磷酸、甲酸均为 AR 级试剂,甲醇、乙腈为色谱纯,实验室用水为去离子水。

齐墩果酸(oleanolic acid)(中国药品生物制品检定所),芒果甙(mangiferin),当药黄素(swertisin)标准品由本所植化室提供。

1.3 色谱条件

齐墩果酸属三萜皂甙化合物,芒果甙是双氢黄酮,当药黄素是黄酮甙类化合物,根据三者化学结构的特性及差异,经实验选择确定了3种不同的分离和检测条件。

色谱柱:Supelco INC C₁₈柱(150 mm×1.5 mm i.d., 5 μm),分离检测齐墩果酸的流动相为乙腈-

收稿日期 2002-04-15

作者简介 胡凤祖,女,副研究员, Tel (0971) 6132750.

通讯联系人 师治贤,研究员, Tel (0971) 6132750.

基金项目 中国科学院、中央组织部西部之光资助项目(9902001).

水(体积比为 85:15)检测波长 215 nm;分离检测芒果甙的流动相为甲醇-水(体积比为 10:90)(其中含 0.2%的甲酸),检测波长 254 nm;分离检测当药黄素的流动相为甲醇-水(体积比为 45:55)(其中含 0.2%的磷酸),检测波长 270 nm。流速:1 mL/min。柱温:室温。进样量:10 μL。

1.4 标准溶液的配制

精确称取齐墩果酸对照品 5.0 mg、芒果甙对照品 5.0 mg 和当药黄素对照品 4.5 mg,分别用体积分数为 100%、50%和 75%的甲醇溶解并定容在 5 mL 容量瓶中,得 1.0 g/L的齐墩果酸、1.0 g/L的芒果甙和 0.9 g/L的当药黄素对照品贮备液。

1.5 样品的制备

精确称取 3 份粉碎的植物样品各 5.00 g,分别置于 100 mL 蒸馏烧瓶中,用氯仿提取齐墩果酸、50%乙醇提取芒果甙、75%乙醇提取当药黄素。在水浴上回流提取 3 次(每次 2 h),冷却,过滤,收集滤液。将滤液置水浴锅上浓缩至干,残留物分别用 100% 甲醇、50% 甲醇和 75% 甲醇溶解并定容至 100 mL 容量瓶中,置于冰箱中待用。

2 结果与讨论

2.1 色谱条件的选择

2.1.1 齐墩果酸

齐墩果酸是脂溶性成分,易溶于氯仿、乙醚等有机溶剂,由于齐墩果酸在紫外吸收区的吸收波长较低(215 nm),使用甲醇洗脱,背景值高,易造成基线漂移。因此本实验选用了透光率较好的乙腈为流动相,收到了较为理想的分析结果。色谱图见图 1。

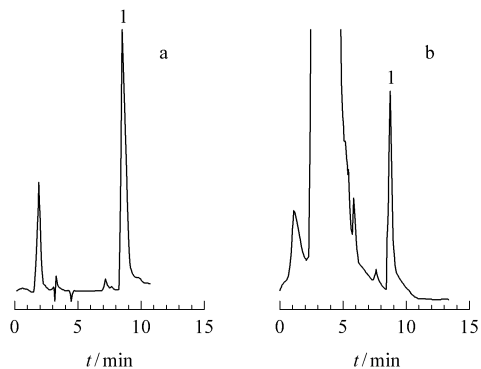


图 1 齐墩果酸标准品(a)与川西獐牙菜样品(b)的色谱图
Fig.1 Chromatograms of oleanolic acid standard (a) and sample of *Swertia mussotii* (b)
1. oleanolic acid.

2.1.2 芒果甙

芒果甙易溶于水和稀醇,极性较大。仅选择甲醇-水为洗脱系统时,峰形拖尾。经比较,在流动相中加入 0.2%(体积分数)的甲酸后,分离度大为改

善。色谱图见图 2。

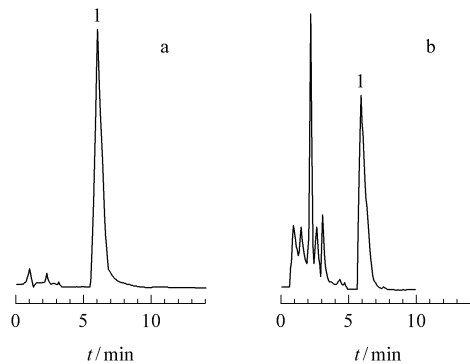


图 2 芒果甙标准品(a)与川西獐牙菜样品(b)的色谱图
Fig.2 Chromatograms of mangiferin standard (a) and sample of *Swertia mussotii* (b)
1. mangiferin.

2.1.3 当药黄素

当药黄素在醇及稀醇中的溶解度较大,较大吸收波长在 270 nm 和 336 nm 处。实验选择 270 nm 为检测波长,在此波长处,样品中的杂质峰对测定干扰小。在流动相的选择实验中发现,在甲醇-水系统中加入 0.2%(体积分数)的磷酸,其分离效果较好,色谱图见图 3。

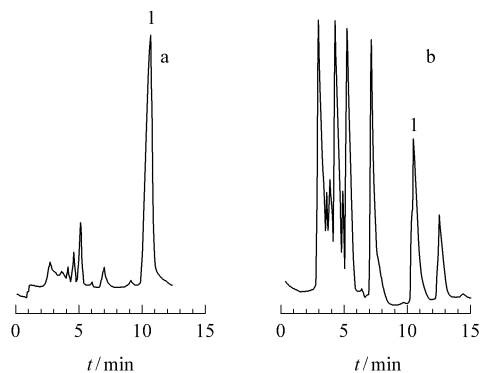


图 3 当药黄素标准品(a)与四数獐牙菜样品(b)的色谱图
Fig.3 Chromatograms of swertisin standard (a) and sample of *Swertia tetraptera* (b)
1. swertisin.

2.2 标准曲线制作与检出限

将对照品储备液逐级稀释,分别配制一系列浓度在 40~200 mg/L、18~90 mg/L、0.5~3 mg/L 的齐墩果酸、当药黄素和芒果甙对照品溶液,取各标准溶液按相应色谱条件分别进样 10 μL,以相应组分的色谱峰面积(Y)对其浓度(X, mg/L)进行线性回归,计算回归方程如下: $Y = -23.9 + 490.1X$, $r = 0.9974$ (齐墩果酸); $Y = 97.5 + 192\,000.5X$, $r = 0.9998$ (芒果甙); $Y = 31.3 + 133.5X$, $r = 0.9994$ (当药黄素)。

以信噪比为 2 作为标准确定检出限,则齐墩果酸的最小检出限为 78 ng,当药黄素的最小检出限为

3.2 ng, 芒果甙的最小检出限为 0.17 ng。

2.3 精密度和回收率实验

在已知含量样品中定量加入标准品溶液,按“1.5”节方法制备样品液,进样测定。每个样品重复测定 3 次,求平均值,对方法的准确度进行考察,实验结果见表 1。

表 1 回收率的测定 ($n=3$)
Table 1 Results of recovery ($n=3$)

Compound	Background/ (mg/L)	Added/ (mg/L)	Found/ (mg/L)	Average recovery/%	RSD/ %
Oleanolic acid	48.0	20.0	69.0	105.1	1.19
Mangiferin	168.0	40.0	209.0	102.4	0.55
Swertisin	65.0	9.0	74.6	106.7	3.01

表 2 样品测定结果 ($n=3$)

Table 2 Determination results of samples ($n=3$)

Species	Oleanolic acid		Mangiferin		Swertisin	
	$w/\%$	RSD/%	$w/\%$	RSD/%	$w/\%$	RSD/%
<i>Swertia mussotii</i>	0.480	1.17	1.680	1.10	0.065	2.49
<i>Swertia franchetiana</i>	0.289	1.21	0.199	0.86	0.225	2.87
<i>Swertia peyewalskii</i>	0.175	0.98	0.291	0.97	0.263	3.12
<i>Swertia erythrosticta</i>	0.365	1.27	0.056	0.78	0.360	3.24
<i>Swertia tetraptera</i>	0.018	1.34	0.006	1.17	0.251	2.91
<i>Gentianopsis paludosa</i>	0.130	1.28	0.192	1.12	0.110	2.78
<i>Halenia elliptica</i>	0.159	1.21	0.158	0.95	0.417	2.34
<i>Lomatogonium rotatum</i>	0.173	1.16	0.161	0.87	0.840	2.52
<i>Gentiana ferrerii</i>	0.172	1.19	0.178	0.96	0.114	2.78

参考文献:

- [1] Yang Yongchang, He Tingnong, Lu Shenglian, Huang Rongfu, Wang Zuxiang. Tibetan Medicines. Xining: Qinghai People's Press, 1991. 111
杨永昌, 何廷农, 卢生莲, 黄荣福, 王祖祥. 藏药志. 西宁: 青海人民出版社, 1991. 111
- [2] Northwest Plateau Institute of Biology, The Chinese Academy of Sciences. Qinghai Economic Flora. Xining: Qinghai People's Press, 1987. 446
中国科学院西北高原生物研究所. 青海经济植物志. 西宁: 青

2.4 样品分析

在选定的色谱条件下,以保留时间和标准样加入法定性,外标法定量,分别测定了龙胆科 9 种植物中的 3 种有效成分,结果见表 2。

从得到的结果来看,每种龙胆科植物各具特色。齐墩果酸和芒果甙含量最高的为川西獐牙菜 (*Swertia mussotii*),最低的为四数獐牙菜 (*Swertia tetraptera*);而当药黄素最高的为辐花肋助花 (*Lomatogonium rotatum*),最低的为川西獐牙菜。从样品测定的回收率和相对标准偏差来考察,该方法对龙胆科植物药用有效成分的分析简单、准确、可靠。可用于药材和药物制剂的质量控制,对鉴定龙胆科的真假药材是一种方便、快速、准确的方法。

海人民出版社, 1987. 446

- [3] Ji Yubin. Pharmacology and Applications of Bioactive Compounds of Traditional Chinese Medicine. Harbin: Heilongjiang Science Press, 1995. 211
季宇彬. 中药有效成分药理与应用. 哈尔滨: 黑龙江科学出版社, 1995. 211
- [4] Ding Jingye, Sun Hongfa. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 1980, 11(9): 391
丁经业, 孙洪发. 中草药, 1980, 11(9): 391
- [5] Sun Hongfa, Fan Shufen, Ding Jingye. Acta Biologica Plateau Sinica, 1987, 6: 243
孙洪发, 樊淑芬, 丁经业. 高原生物学集刊, 1987, 6: 243

地 址: 河北省永年县

电 话: 0310-6935888

董 事 长: 李庆民

公司网址: <http://www.rui-feng.com>

邮 编: 057150

传 真: 0310-6935588

销售经理: 李彦周