

抱茎獐牙菜中当药黄素的 HPLC 测定研究

马玉花¹, 纪兰菊², 陈桂琛², 卢学峰²

(1. 青海民族学院化学系, 青海西宁 810007; 2. 中国科学院西北高原生物研究所, 青海西宁 810001)

摘要 [目的]采用反相高效液相色谱法对抱茎獐牙菜中当药黄素的含量进行测定。[方法]色谱柱为 Kromasil C18(250 mm×4.60 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-浓度 0.02% 磷酸水溶液, 梯度洗脱, 流速为 1 ml/min, 检测波长为 260 nm。[结果]当药黄素在 0.92~4.60 μg 范围内线性关系良好, $r=0.9995$ 。平均加样回收率为 98.73%, RSD 为 0.31%。[结论]抱茎獐牙菜中当药黄素在花的部位含量最高。该测定方法适应性广, 可用于测定抱茎獐牙菜中的当药黄素。

关键词 反相高效液相色谱法; 抱茎獐牙菜; 当药黄素

中图分类号 S567.2 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)08-03248-02

Determination on Swertisin in Different Parts of Swertia franchetiana H. Smith

MA Yu-hua et al (Department of Chemistry, Qinghai Nationalities University, Xining, Qinghai 810007)

Abstract [Objective] The research aimed to determine the content of swertisin in different parts of Swertia franchetiana H. Smith by reversed-phase high performance liquid chromatography. [Method] The analysis was performed on a Kromasil C18 (250 mm×4.60 mm, 5 μm). The mobile phase consisted of CH₃OH and 0.02% phosphoric acid in water. The flow rate was 1 ml/min. The detection wavelength was at 260 nm. [Result] The linear range of swertisin was within 0.92- 4.60 μg($r=0.9995$). The average recovery was 98.73%, RSD was 0.31%. [Conclusion] The content of swertisin was most high in flowers.

Key words Reversed-phase high performance liquid chromatography; Swertia franchetiana H. Smith; Swertisin

抱茎獐牙菜 (*Swertia franchetiana* H. Smith) 为龙胆科 (*Gentianaceae*) 獐牙菜属植物, 为藏族民间常用的一种草药, 被称为上品“藏茵陈”。该品性凉味苦, 有清热解毒, 利胆退黄的功能, 对黄疸性肝炎有显著疗效, 民间药用全草治疗肝胆系统疾病^[1]。抱茎獐牙菜主要含黄酮苷和酮类化合物^[2-3], 其中黄酮苷类化合物主要是当药黄素。该化合物具有重要的生理活性^[4]。为了探寻当药黄素的分布规律, 该试验采用 HPLC 法对抱茎獐牙菜的全草及根、茎、叶、花中当药黄素进行测定, 旨在为科学利用抱茎獐牙菜提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器 抱茎獐牙菜药材来自于青海西宁北山, 由中国科学院西北高原生物研究所卢学峰研究员鉴定。当药黄素对照品为中国科学院西北高原生物研究所植化室孙洪发教授所赠(经 UV、IR、MS、NMR 鉴定与文献一致, HPLC 检测为单峰, 纯度在 98% 以上)。甲醇(山东禹王试剂公司)为色谱纯, 其他试剂均为分析纯。试验中所用水为重蒸馏水。

仪器: LC-10ATVP 二元泵(岛津公司); Rheodyne 7725 进样器(美国); SPD-M10AVP 二极管阵列检测器(岛津公司); Class-VP 液相色谱工作站(岛津公司)。

1.2 方法

1.2.1 色谱条件及系统适用性检测。 色谱柱: Kromasil C18 (250 mm×4.60 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-浓度 0.02% 磷酸水溶液, 梯度洗脱, 洗脱条件为 0~30 min, 甲醇浓度: 20%~56%; 流速: 1 ml/min; 检测波长: 260 nm; 柱温为室温。在该色谱条件下绘制对照品与供试品的色谱图。

1.2.2 供试品溶液的制备。 分别将样品置超微粉碎机中粉碎 20 min, 称取 0.5 g, 置 100 ml 锥形瓶中, 加甲醇 20 ml, 置 80 °C 水浴锅上回流 1 h; 过滤, 置 25 ml 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 备用。

1.2.3 对照品溶液的制备。 称取当药黄素对照品 2.0 mg, 置于 10 ml 容量瓶中, 用甲醇定容至刻度, 摇匀, 备用。

1.2.4 线性关系考察。 吸取 0.199 2 mg/ml 当药黄素对照品溶液 4、8、12、16、20 μl, 分别进样测定。以当药黄素进样量为横坐标, 峰面积积分为纵坐标, 计算回归方程。

1.2.5 精密度试验。 吸取对照品溶液 (0.199 2 mg/ml) 20 μl, 注入高效液相色谱仪, 进行分析, 测定 5 次, 计算峰面积的 RSD。

1.2.6 重现性试验。 称取同一批样品, 按供试品溶液制备方法分别制备 5 份供试品溶液, 分别进样分析, 测定当药黄素峰面积积分值, 计算 RSD。

1.2.7 稳定性试验。 吸取同一份供试品溶液 20 μl, 每隔 2 h 进样 1 次, 测定当药黄素峰面积积分值, 计算 RSD。

1.2.8 回收率试验。 取已知含量 (0.14%) 样品 5 份, 粉碎成细粉, 精密称定, 分别加入对照品一定量, 按供试品溶液制备方法操作, 制得回收率试验供试品溶液。进样 20 μl 进行测定。

1.2.9 样品测定。 精密称取抱茎獐牙菜的全草及根、茎、叶、花 (均为细粉) 各 0.5 g, 制成供试品溶液, 按上述色谱条件进样 20 μl, 测定峰面积值, 外标两点法计算当药黄素质量分数。

2 结果与分析

2.1 系统适应性 图 1 表明, 无溶剂峰干扰主峰, 系统适用性良好。

2.2 线性关系 线性关系考察所得的回归方程为: $Y=178736+996605.5X$, $r=0.9995$ 。可见当药黄素在 0.92~4.60 μg 与峰面积呈良好的线性关系。

2.3 精密度 精密度试验所得峰面积的 RSD 为 2.42%, 表明试验精密度良好。

2.4 稳定性 根据试验测定的当药黄素峰面积积分值得 RSD 为 1.29%, 表明供试品溶液在 10 h 内基本稳定。

2.5 回收率 试验结果得平均加样回收率为 98.73%, RSD 为 0.31% (表 1), 表明回收率高。

基金项目 国家中西部重点项目 (2001BA901A47) 资助。

作者简介 马玉花 (1978-), 女, 青海西宁人, 硕士, 从事药用植物学的教学和科研工作。

收稿日期 2008-02-14

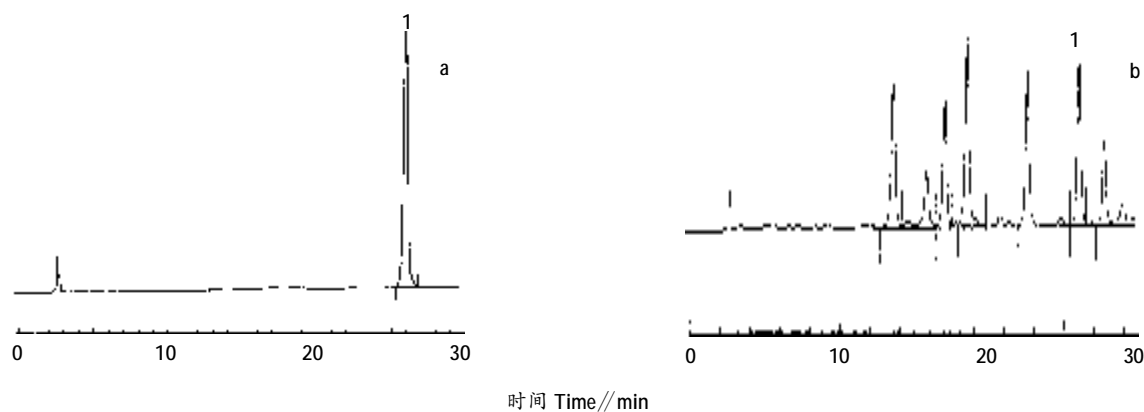


图 1 对照品(a)与样品(b)色谱图

Fig. 1 Chromatograms of reference substance (a) and samples (b)

表 1 回收率试验结果

Table 1 Test result of recovery rate

编号 No.	样品取样量 Sampling weight g	样品含量 Sample content mg	对照品加入量 Adding amount of reference substance mg	实测量 Measured amount mg	回收率 Recovery rate %	平均值 Mean %	RSD %
1	0.500 3	0.70	0.42	1.13	102.38	98.73	0.31
2	0.501 2	0.71	0.45	1.14	95.56		
3	0.502 0	0.70	0.50	1.18	96.00		
4	0.500 6	0.70	0.47	1.18	102.13		
5	0.499 8	0.70	0.41	1.10	97.56		

2.6 样品测定结果 表 2 表明,抱茎獐牙菜不同部位当药黄素的量差异较大,花中含量最高,根和茎中未检测到当药黄素。

表 2 抱茎獐牙菜不同部位中当药黄素的测定结果

Table 2 Determination results of swertisin in different parts of *Swertia franchetiana* H. Smith

部位 Part	当药黄素 Swertisin//%	RSD//%
全草 Whole grass	0.140	1.28
根 Root	-	-
茎 Stem	-	-
叶 Leaf	0.050	2.22
花 Flower	0.320	0.94

注:n=5。Note: n=5.

3 结论与讨论

(1)在流动相选择中,比较了甲醇-水、乙腈-水及甲醇-磷酸水溶液(浓度 0.02%~0.10%)系统,发现后者梯度洗脱

(上接第 3227 页)

动物红细胞发生凝集^[9]。在该研究中,用浓度 1%的胰酶、卵磷脂酶 C 和浓度 10%的乙醚处理该病毒尿囊液可以凝集鸡、绵羊、人、小鼠和兔的红细胞,而未处理的病毒尿囊液则无此凝集活性,表明无禽类的正粘和副粘病毒污染,血凝特性具有典型的 IBV 特点。

(3)在鸡胚矮小试验和动物回归试验中,发现分离的病毒株 IBV-HN05 能引起鸡胚和病鸡典型的临床症状和病理变化;RT-PCR 能扩增出 IBV 特异的 M 基因,从这些方面能证明所分离的病毒为 IBV。关于所分离病毒的一些其他生物学特性和基因特性有待进一步研究。

系统具有较好的分离效果,因此甲醇-磷酸水溶液(浓度 0.02%)梯度洗脱系统为该试验的流动相。

(2)试验结果显示,抱茎獐牙菜不同部位中当药黄素的量差异较大。其花中当药黄素的含量明显高于其他部位,说明当药黄素主要集中于抱茎獐牙菜花的部位,并且在根和茎中当药黄素没有分布,这有待进一步研究。

参考文献

- [1] 中国科学院西北高原生物研究所.藏药志[M]. 西宁:青海人民出版社,1991:110.
- [2] 丁经业,樊淑芬,胡伯林,等.抱茎獐牙菜酮成分分离与鉴定[J].高原生物学集刊,1982(5):267-270.
- [3] 丁经业,樊淑芬,胡伯林,等.抱茎獐牙菜的酮甙和黄酮甙[J].植物学报,1988,30(4):414-419.
- [4] 季宇彬.中药有效成分药理与应用[M].哈尔滨:黑龙江科学技术出版社,1994:211.

参考文献

- [1] 王红宁.禽呼吸系统疾病[M].北京:农业出版社,2002.
- [2] DE W J J. Detection of infectious bronchitis virus [J]. Avian Pathology, 2000, 29(1):71-93.
- [3] PEITIS J S M, LAI S T, POON L L M, et al. Cotanavirus as a possible cause of severe acute respiratory syndrome [EB/OL]. (2003-03-08)[2007-11-17]http://image.thelancet.com/extras/03art3477web.pdf.
- [4] 殷震,刘景华.动物病毒学[M].2版.北京:科学出版社,1997.
- [5] LIU S W, KONG X G, LIU Y F, et al. Isolation and identification of an avian infectious bronchitis virus strain LD3/01/07 from China[J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2003, 25(2):121-126.