

RP-HPLC 法测定湿生扁蕾中当药黄素的含量

吉守祥 (青海民族学院药理学系, 青海西宁 810007)

摘要 [目的] 建立反相高效液相色谱法测定湿生扁蕾中有效成分当药黄素含量的方法。[方法] 采用 Kromasil- C_{18} (250 mm×4.6 mm, 5 μ m) 色谱柱, 52% 甲醇-水(含 0.04% H_3PO_4) 为流动相, 流速 0.8 ml/min, 检测波长 270 nm, 柱温 30 $^{\circ}$ C。[结果] 当药黄素在 10 min 内与其他组分达到基线分离, 当药黄素的线性范围是 0.338~2.025 μ g ($r=0.9995$), 加标回收率为 103.3% (RSD=3.2%)。[结论] 该方法测定快速, 结果准确、可靠。

关键词 反相高效液相色谱法; 湿生扁蕾; 当药黄素

中图分类号 S567.21⁺9 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)09-03734-01

Determination of Svertisin in *Gentianopsis Paludosa*(Munro) Ma with RP-HPLC

Ji Shouxiang (Department of Pharmacology, Qinghai Nationality College, Xining, Qinghai 810007)

Abstract [Objective] To establish a quantitative method determination of svertisin in *Gentianopsis paludosa* (Munro) Ma with RP-HPLC. [Methods] The sample were separated in the column of Kromasil- C_{18} (250 mm×4.6 mm, 5 μ m), which was eluted with 52% methanol and water (0.04% phosphoric acid), with detected wavelength at 270 nm, flow rate at 0.8 ml/min, column temperature at 30 $^{\circ}$ C. [Results] Effective component was baseline isolation. The linear ranges of svertisin and svertianlin were 0.338~2.025 μ g ($r=0.9995$), 0.275~1.65 μ g ($r=0.9995$) respectively. The average recoveries were 103.3% (RSD=3.2%), 99.6% (RSD=2.7%). [Conclusion] The method was rapid and precise.

Key words RP-HPLC; *Gentianopsis paludosa* (Munro) Ma; Svertisin Svertianlin

湿生扁蕾 (*Gentianopsis paludosa* (Munro) Ma), 藏语称“吉合斗”, 为一年生龙胆科草本植物, 主要分布在青海省海东、海南、海北、海西、玉树、果洛等地, 生长在海拔 2 500~4 500 m 的河滩、沼泽地、山坡草地及林缘, 是青藏高原地区已用于临床的药用植物; 藏药称“机合滴”, 具有清热、解毒、利湿消黄之功效; 主治肝炎、胆囊炎、热病发斑、泄泻、肠胃炎、结膜炎、高血压、急性肾盂肾炎、疮疥肿毒等症, 已被列入青海重要的开发藏草药项目^[1]。体外抑菌试验表明, 该植物对绿脓杆菌、巨大芽孢杆菌、金色葡萄球菌、八叠球菌、大肠杆菌、变形杆菌、梭状芽孢杆菌等均有显著的抑制作用^[2]。

当药黄素是黄酮苷类化合物, 对鼠伤寒杆菌具有中度抑制作用, 是龙胆科植物中的有效成分。有关龙胆科植物中当药黄素检测方法的报道较少^[3-4], 湿生扁蕾中当药黄素的检测方法未见报道。为客观准确地评价藏药湿生扁蕾的质量, 笔者建立了反相高效液相色谱法测定该藏药材中当药黄素含量的方法。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 仪器。 Agilent 1100 高效液相色谱仪 (配置: 手动进样器、在线脱气机、高压二元梯度泵、恒温柱温箱、DAD 检测器、Agilent 1100 色谱工作站); Kromasil- C_{18} (250 mm×4.6 mm, 5 μ m) 色谱柱; KQ3200 超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司)。

1.1.2 试剂。 甲醇: 高效液相色谱专用试剂 (山东禹王实业有限公司禹城化工厂); 水: 娃哈哈纯净水 (杭州娃哈哈集团公司); 磷酸: AR 级 (北京红星化工厂)。

对照品: 当药黄素由青海民族学院药理学系林鹏程教授提供, 经归一化法检测, 纯度大于 98%。

1.1.3 样品采集。 2005 年采于青海省互助北山林场, 经青海民族学院药理学系毛继祖教授鉴定。样品阴干后粉碎至 80 目, 冷藏备用。

1.2 方 法

1.2.1 对照品溶液的配制。 精密称取当药黄素对照品 2.7 ng, 置于 10 ml 容量瓶中, 以甲醇溶解并定容至 10 ml, 配制成相应浓度的对照品储备液, 使用时稀释成所需浓度。

1.2.2 样品溶液的制备。 精密称取 0.5 g 样品, 加 10 ml 甲醇超声 60 min, 过滤, 滤渣重复提取两次, 合并滤液, 浓缩后定容至 25 ml, 过 0.45 μ m 滤膜, 在选定色谱条件下测定峰面积。

2 结果与分析

2.1 不同提取方法对分析结果的影响

2.1.1 不同提取方法对当药黄素提取率的影响。 精密称取 9 份湿生扁蕾样品, 每份重 0.5 g, 分别用甲醇热回流 (2 h)、超声 (20 min)、冷浸 (24 h), 分别测定不同提取法下当药黄素的含量, 结果发现, 超声提取方法提取时间短, 提取率最高, 因此试验选用超声提取法。

2.1.2 不同提取溶剂对当药黄素提取率的影响。 精密称取 9 份湿生扁蕾样品, 每份重 0.5 g, 分别用甲醇、乙醇、水超声提取 20 min, 测定甲醇、乙醇、水对当药黄素提取率的影响, 结果发现, 甲醇提取率最高, 故选用甲醇为提取溶剂。

2.2 检测波长的确定 利用 DAD 检测器在 220~400 nm 扫描其吸收光谱, 当药黄素对照品在 270 和 337 nm 处有较高的吸收 (图 1), 结合文献 [4] 选择 270 nm 为检测波长。

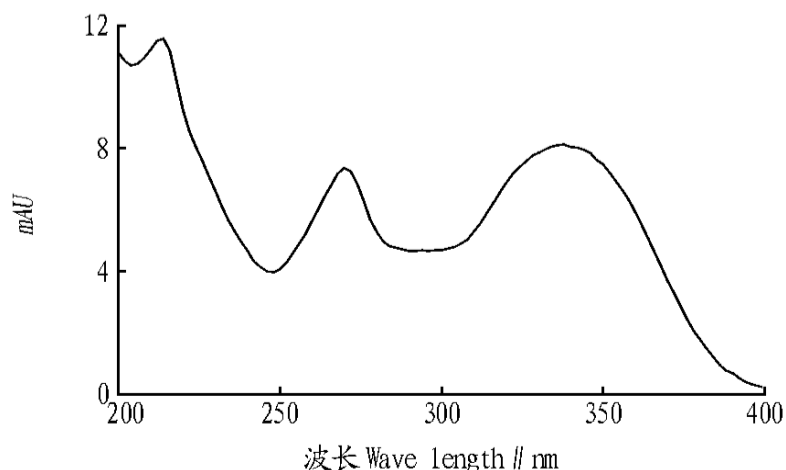


图 1 当药黄素的紫外吸收光谱

Fig.1 UV spectrum of svertisin

作者简介 吉守祥 (1962-), 男, 土族, 青海民和人, 副教授, 从事药物化学研究。

收稿日期 2008-02-19

(下转第 3751 页)

表2 桃一点斑叶蝉在桃树西面、北面树冠的聚集度指标

Table 3 Aggregation indices of *Erythroneura sura* D. on west and north of peach crown

调查日期 Investigation date	调查叶片数 No. of leaves investigated	西面 West								北面 North							
		聊	S ²	m*	I	m*/m	Ca	C	k	聊	S ²	m*	I	m*/m	Ca	C	k
05-21	90	0.200	0.274	0.571	0.371	2.854	1.854	1.371	0.539	0.067	0.085	0.348	0.281	5.213	4.213	1.281	0.237
06-01	90	0.389	0.555	0.816	0.427	2.098	1.098	1.427	0.911	0.233	0.271	0.394	0.161	1.688	0.688	1.161	1.454
06-08	90	0.333	0.404	0.547	0.213	1.640	0.640	1.213	1.561	0.067	0.085	0.348	0.281	5.213	4.213	1.281	0.237
06-14	90	0.278	0.360	0.574	0.297	2.068	1.068	1.297	0.936	0.478	0.657	0.852	0.375	1.784	0.784	1.375	1.275
06-25	90	1.022	1.325	1.319	0.297	1.290	0.290	1.297	3.447	0.633	0.819	0.927	0.293	1.463	0.463	1.293	2.150
07-05	90	0.611	0.802	0.924	0.313	1.511	0.511	1.313	1.955	0.622	0.844	0.979	0.357	1.574	0.574	1.357	1.742
07-15	90	0.867	1.308	1.376	0.509	1.587	0.587	1.509	1.702	0.656	0.768	0.827	0.171	1.261	0.261	1.171	3.833
07-25	90	0.667	1.011	1.184	0.517	1.775	0.775	1.517	1.290	0.578	0.629	0.666	0.088	1.153	0.153	1.088	6.554
07-31	90	1.289	2.050	1.880	0.591	1.458	0.458	1.591	2.181	1.711	2.545	2.198	0.487	1.285	0.285	1.487	3.512
08-08	90	2.622	7.901	4.635	2.013	1.768	0.768	3.013	1.303	2.344	9.824	5.535	3.190	2.361	1.361	4.190	0.735
08-14	90	0.322	0.468	0.775	0.453	2.404	1.404	1.453	0.712	0.500	0.837	1.174	0.674	2.348	1.348	1.674	0.742
08-20	90	0.133	0.162	0.347	0.213	2.601	1.601	1.213	0.625	0.156	0.178	0.298	0.143	1.918	0.918	1.143	1.080
08-28	90	0.556	0.834	1.057	0.501	1.902	0.902	1.501	1.109	0.411	0.514	0.663	0.251	1.612	0.612	1.251	1.635
09-05	90	0.156	0.223	0.587	0.432	3.776	2.776	1.432	0.360	0.133	0.162	0.347	0.213	2.601	1.601	1.213	0.625
09-13	90	0.156	0.178	0.298	0.143	1.918	0.918	1.143	1.089	0.144	0.192	0.476	0.332	3.298	2.298	1.332	0.435
09-19	90	0.178	0.260	0.641	0.463	3.607	2.607	1.463	0.384	0.211	0.326	0.754	0.543	3.572	2.572	1.543	0.380
09-28	90	0.056	0.076	0.415	0.360	7.472	6.472	1.360	0.155	0.056	0.076	0.415	0.360	7.472	6.472	1.360	0.155
10-08	90	0.356	0.591	1.018	0.663	2.864	1.864	1.663	0.536	0.567	1.035	1.393	0.826	2.458	1.458	1.826	0.686

3 结论

(1) 自5月下旬到10月上旬,桃一点斑叶蝉在桃树树冠东、南、西、北4个方向上均呈聚集分布。

(2) 桃一点斑叶蝉在桃树树冠上呈聚集分布是由环境条件引起的。

参考文献

[1] 丁岩钦. 昆虫数学生态学[M]. 北京: 科学出版社, 1994: 22-134.

[2] 北京农业大学, 华南农业大学, 福建农业大学, 等. 果树昆虫学[M]. 2版. 北京: 农业出版社, 1996: 170-172.

[3] 牟吉元, 徐洪富, 李火苟. 昆虫生态与害虫预测预报[M]. 北京: 中国农业科技出版社, 1991: 75-86.

[4] 赵志模, 周新远. 生态学引论[M]. 重庆: 科学技术出版社重庆分社, 1984: 93-120.

(上接第3734页)

2.3 流动相的选择 经实验, 当流速为0.8 ml/min时, 以流动相 MeOH-H₂O(含0.04% H₃PO₄) 为52:48进行等度洗脱, 柱温30℃, 当药黄素与其他组分在10 min内达到基线分离; 水中加入0.04%的磷酸, 可抑制上述成分的拖尾。

2.4 色谱条件 色谱柱: Kromasil-C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱; 流动相: MeOH-H₂O(含0.04% H₃PO₄) 为52:48等度洗脱; 流速0.8 ml/min, 柱温30℃, 检测波长270 nm。该色谱条件下当药黄素与其他成分达到基线分离。

2.5 系统适应性实验

2.5.1 线性关系的考察。 分别取0.27 ng/ml的当药黄素对照品溶液, 稀释20倍, 后分别进样2.5、5.0、7.5、10.0、12.5、15 μl, 以绝对进样量对峰面积作图, 测得当药黄素标准工作曲线为: A=3 029.6X+16.6, 相关系数为r=0.9995。线性范围为0.338~2.025 μg。

2.5.2 检测限。 在选定的色谱条件下, 当信噪比S/N=3时, 测得该条件下当药黄素的最低检测限为0.27 ng。

2.5.3 精密度实验。 分别取0.027 ng/ml的当药黄素对照品溶液, 在选定色谱条件下测定色谱峰的峰面积, 计算得RSD为0.73%(n=5), 表明仪器精密性良好。

2.5.4 重复性实验。 精密称取湿生扁蕾干粉0.5 g共5份, 按“1.2.2”方法操作, 在选定色谱条件下, 测定当药黄素的含

量, 计算得RSD为1.4%(n=5), 表明方法的重复性良好。

2.5.5 稳定性实验。 精密称取湿生扁蕾干粉0.5 g, 按“1.2.2”方法操作, 在选定色谱条件下, 分别在0、2、4、6、8 h进样, 测定当药黄素的峰面积, 计算得RSD为1.4%(n=5), 表明样品溶液在8 h内稳定。

2.5.6 回收实验。 精密称取湿生扁蕾样品0.5 g 3份, 各添加当药黄素0.027 ng/ml溶液0.8 ml, 按“1.2.2”方法操作, 测得当药黄素的平均回收率为103.3%, RSD为3.2%(n=3)。

2.6 测定结果 精密称取0.5 g样品, 按“1.2.2”方法操作, 在给定色谱条件下分析, 经DAD检测器检测待测组分的峰纯度且紫外光谱与对照品一致后, 外标法定量, 测得样品中当药黄素的含量为0.072%。

3 小结

笔者所建方法具有提取完全, 分析方法简便、快速、结果准确、可靠等特点, 对全面评价藏药材湿生扁蕾的质量有重要的参考作用。

参考文献

[1] 曹长年, 米琴, 赵宙兴, 等. 藏药湿生扁蕾有效成分的研究[J]. 青海农林科技, 2004(3): 12-13.

[2] 米琴, 曹长年, 王慧春, 等. 湿生扁蕾有效成分抑菌活性的测定[J]. 青海大学学报: 自然科学版, 2004, 22(2): 84-85.

[3] 胡凤祖, 宋娅莉, 刘梅, 等. 青藏高原龙胆科植物药用有效成分的高效液相色谱分析[J]. 色谱, 2003, 21(1): 63-65.

[4] 纪兰菊, 保怡, 陈桂琛, 等. 15种獐牙菜属植物中主要药用成分的高效液相色谱测定[J]. 西北植物学报, 2004, 24(7): 1298-1302.