

獐牙菜总苷高效液相色谱指纹图谱研究

田 薇^{1,2,3}, 陈朝晖², 翟 晶², 陈立仁^{1*}, 李永民¹

(1. 中国科学院 兰州化学物理研究所, 甘肃 兰州 730000; 2. 甘肃省药品检验所, 甘肃 兰州 730000;
3. 中国科学院 研究生院, 北京 100039)

摘要: 目的 研究獐牙菜总苷的高效液相色谱指纹图谱, 为科学评价及有效控制其工艺和质量提供可靠方法。方法 利用 HPLC-DAD 方法, 梯度洗脱, 测定了 10 批獐牙菜总苷样品。色谱条件为: Kromasil C₁₈ 分析柱 (250 mm × 4.6 mm ID, 5 μm); 柱温 40 °C; 流动相 A 为 10% 甲醇-水, 流动相 B 为 80% 甲醇-水, 流动相 A 梯度洗脱 (100% → 0%), 分析时间 32 min, 0 - 15 min A: B 从 100%: 0 → 0: 100%, 15 - 32 min 保持在 0% A; 流速为 1.0 mL · min⁻¹; 检测波长为 260 nm。结果 10 批獐牙菜总苷样品得到的色谱指纹图谱有 16 个共有峰, 分为 3 个部分: 保留时间 0 - 10 min, 出现 1 个峰; 保留时间 10 - 15 min, 出现 9 个峰, 主要特征峰 1 - 7 号峰均在此区域, 保留时间 15 - 30 min 出现 5 个峰。通过与对照品的保留时间、紫外光谱及 LC/MS 所得分子量信息, 1 - 7 号峰分别鉴定为獐牙菜苦苷、龙胆苦苷、獐牙菜苷、异荛草苷、当药黄素、异当药黄素、獐牙菜山酮苷, 时间 15 - 30 min, 出现 6 个峰。通过峰面积及含量测定结果, 确定最强峰为 1 号峰。相同色谱条件下测定了不同工艺提取的獐牙菜提取物及獐牙菜药材的 HPLC 图谱, 其结果与獐牙菜总苷有很好的相关性。结论 獐牙菜总苷的指纹图谱特征性及专属性强, 可结合含量测定用于全面控制獐牙菜总苷的质量, 确保每批产品的均一性。

关键词: 獐牙菜; 总苷; 高效液相色谱; 指纹图谱

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0513 - 4870(2005)05 - 0447 - 06

HPLC fingerprinting of total glycosides of *Swertia franchetiana*

TIAN Wei^{1,2,3}, CHEN Zhao-hui², ZHAI Jing², CHEN Li-ren^{1*}, LI Yong-min¹

(1. Lanzhou Institute of Chemistry Physics, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China; 2. Gansu Institute of Drug Control, Lanzhou 730030, China; 3. Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China)

Abstract: **Aim** To establish a sensitive and specific HPLC method for controlling the quality of total glycosides from *Swertia franchetiana* H. Smith. **Methods** HPLC method was applied for quality and quantitative assessment of the pharmaceutical extracts from *Swertia franchetiana* H. Smith. The preparation of sample, the HPLC column, mobile phase, elution mode (isocratic or gradient) and gradient program were optimized in order to obtain HPLC profile. The HPLC system consisted of a SPD-10Avp pump, SPD-M10AVP photodiode-array detector (PAD), SIL-10ADVP auto injector. Data were acquired and processed with the CLASS-VP6.1 workstation. HPLC analysis was performed on a Kromasil C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm ID, 5 μm) with methanol and water as mobile phase. The column temperature was set up at 40 °C and the flow-rate was 1 mL · min⁻¹. The reference solution of chemical standards and sample were injected into HPLC system, separately. **Results** The HPLC chromatographic fingerprinting of the total glycosides, showing 16 characteristic peaks which were partitioned into three parts: one peak in 0 - 10 min of retention time, nine peaks containing main 1 - 7 peaks in 10 - 15 min of retention time, 6 peaks in 15 - 30 min of retention time, was established from 10 lots of their products. By comparison of the retention time and the on-line UV spectra and their molecule weights of chemical standards, peak 1 - 7 were identified as swertiamarin (1), gentiopicroside (2), sweroside (3), isoorientin (4), swertisin

收稿日期: 2004-08-24.

基金项目: 中国科学院“百人计划”资助项目; 甘肃省科学技术攻关计划项目 (2GS035-A43-074).

* 通讯作者 Tel: 86 - 931 - 4968261, E-mail: chenlr@ns.lzb.ac.cn

(5), isoswertisin (6) and swertianolin (7), respectively. The ratios of peak area between 1 - 16 were in their extent. Moreover, comparison of the HPLC profiles of the total glycosides, the extracts prepared using another process and the plant indicated that they were closely related to each other. **Conclusion** The HPLC profiles and quantitative assessment of the total glycosides from *Swertia franchetiana* H. Smith with high specificity can be used to control their quality and assure lot to lot consistency.

Key words: *Swertia franchetiana*; total glycosides; HPLC; fingerprinting

龙胆科植物抱茎獐牙菜 (*Swertia franchetiana* H. Smith) 是一种多年生草本植物, 全草入药, 为常用藏药, 藏名“蒂达”, 也泛称“藏因陈”。有清热解毒, 舒肝利胆之功效^[1,4], 主治各种肝胆疾病, 临床对急性黄疸性肝炎、慢性肝炎、慢性胆囊炎等症疗效显著^[1]。文献^[2-7]报道其主要有效成分为山酮类、环烯醚萜类、碳键黄酮苷类等几类具有重要药理作用的化学成分。目前, 多用总苷含量(重量法)控制獐牙菜总苷质量, 但不能反映总苷中主要成分的情况, 难于真正控制其质量。

目前, 绝大多数的植物提取物没有国家标准或行业标准^[12], 产品质量的检测方法较为混乱。近年来, 指纹图谱技术被用于中药的质量控制, 其优点在于可全面反映中药复杂的化学成分及其相对比例, 在大多数中药有效成分尚未阐明的现状下, 仍可有效地表征中药质量。本文应用 RP-HPLC/PAD 方法对獐牙菜总苷的指纹图谱进行了研究, 并应用 LC-MS 对其中的主要成分的分子量进行了确定, 结合紫外光谱、保留时间在确定了其中 7 个主要成分的基础上测定了其含量。通过此方法, 考察了总苷与药材及不同工艺产品间 7 种苷性成分含量的相关性, 为全面控制獐牙菜总苷的质量提供了可靠方法。

材料与方法

材料与仪器 獐牙菜药材为 *Swertia franchetiana* H. Smith 的全草, 产于青海西宁, 由兰州大学生命科学院孙纪周教授鉴定; 獐牙菜苦苷 (1) 和龙胆苦苷 (2) 对照品购于中国药品生物制品检定所; 獐牙菜苷 (3)、异荜草苷 (4)、当药黄素 (5) 和獐牙菜山酮苷 (7) 均由中国科学院西北高原生物所藏药现代化研究中心提供; 甲醇为色谱纯 (山东禹王), Millipore 超纯水 (自制)。

岛津高效液相色谱仪: SPD-10AVP 泵系统, SPD-M10AVP 二极管阵列检测器, SIL-10ADVP 自动进样器, CTV-10AVP 柱温箱, CLASS-VP6.1 工作站。Micromass ZMD 4000 型质谱仪 (美国 Waters 公司), MasslynX 工作站。

獐牙菜总苷提取物的制备 称取獐牙菜粗粉适量, 加 95% 乙醇 8 倍量, 回流提取两次, 每次 1.5 h, 过滤, 合并滤液并浓缩至适量, 加入水适量, 混匀, 过滤, 所得滤液用正丁醇萃取, 回收正丁醇所得药膏浓缩至干即得。

色谱分析 色谱柱: Kromasil C₁₈ 分析柱 (250 mm × 4.6 mm ID, 5 μm); 流动相 A 为 10% 甲醇-水; 流动相 B 为 80% 甲醇-水, 流动相 A 梯度洗脱 (100% → 0%), 分析时间 32 min, 0 - 15 min A: B 从 100%: 0 → 0: 100%, 15 - 32 min 保持在 0% A; 流速为 1.0 mL · min⁻¹; 色谱峰光谱采集范围: 190 - 370 nm; 检测波长: 260 nm; 柱温: 40 °C; 进样量: 10 μL。以獐牙菜苦苷的色谱峰 (1 号) 计算理论塔板数为 5 000。

对照品溶液的制备 分别精密称取对照品 1 - 5 和 7, 加甲醇, 分别使成为 1.48, 1.18, 1.05, 3.43, 1.25, 0.35 mg · mL⁻¹。备用。

供试品溶液的制备 精密称取獐牙菜总苷提取物约 0.025 g, 加甲醇溶解, 定溶于 25 mL。过 0.45 μm 膜, 备用。精密称取獐牙菜粉末约 0.5 g, 加甲醇浸泡过夜, 定容至 50 mL, 静置后, 取上清液, 过 0.45 μm 膜, 备用。

结果

1 流动相及洗脱方式的考察优化

等度洗脱时, 分离效果较差, 经过多次摸索, 以梯度洗脱法在 32 min 内可使全部色谱峰流出, 且达到基线分离。实验时, 以梯度洗脱程序运行 32 min 然后以终浓度等度洗脱运行到 42 min 后回到起始浓度。为确保下次分析时色谱峰的峰形及分离度, 每次运行后柱平衡时间至少需要 15 min。

2 检测波长的选择

对 190 - 370 nm 扫描的各波长下的色谱图进行分析比较, 在 260 nm 波长得到的峰数目较多, 且各峰的比例基本与实际情况吻合 (除獐牙菜苷), 同时结合獐牙菜总苷所含主要成分的吸收波长, 确定检测波长为 260 nm。

3 精密度与重现性^[8,9]

样品按“供试品溶液的制备方法制备”项下处理后,连续进样 5 次,检测指纹图谱。结果表明,以獐牙菜苦苷为对照,各色谱峰的保留时间和峰面积大于 5%总峰面积的相对比值基本一致(RSD 为 1.6% - 3.9%),符合指纹图谱要求(表 1)。

取同样批号的样品 5 份,同上操作检测指纹图谱。结果表明,各色谱峰的相对保留时间和峰面积大于 5%总峰面积的相对比值基本一致(RSD 为 1.6% - 3.9%),符合指纹图谱的要求。

4 样品稳定性考察

取上述同一供试品,分别在 0, 2, 4, 8 和 24 h 连续测定 5 次,检测指纹图谱。结果表明,各色谱峰的相对保留时间和主要峰的峰面积比值基本没有明显变化。

5 主要色谱峰的鉴定

为增加最具代表性的苷的可信性,7 个色谱峰被鉴定。

5.1 对照品与样品的 HPLC-UV 分析 按照与样品相同的色谱条件分析得到 6 种苷的混合对照品 HPLC 色谱图(图 2B),采用保留时间对照法和对照品追加法进行初步定性,进而用二极管阵列紫外检测技术采集各色谱峰的紫外光谱,将所得图谱的形状、吸收带位置及相对强度与对照品图谱比较定性。

5.2 HPLC/MS 分析鉴定 7 种苷 为确证 7 种苷的结构,应用 HPLC/MS 得到对照品的相应峰的分子量。HPLC/MS 色谱(图 2)分析表明:色谱峰 1 - 7 分别为(1)獐牙菜苦苷(分子量为 374);(2)龙胆苦苷(分子量为 356);(3)獐牙菜苷(分子量为 358);(4)异荛草苷(分子量为 448);(5)当药黄素(分子量为 446);(6)异当药黄素(分子量为 446);(7)獐牙菜山酮苷(分子量为 436)。其结构见图 1。

Table 1 Relative retention (relative areas) of common peaks for 5 shares of a injection sample

	Injection					Relative retention time (area) RSD/%
	1	2	3	4	5	
Peak 1	1.000(1.000)	1.000(1.000)	1.000(1.000)	1.000(1.000)	1.000(1.000)	0.0(0.0)
Peak 2	1.053(0.466)	1.053(0.461)	1.053(0.452)	1.053(0.448)	1.053(0.455)	0.0(1.6)
Peak 3	1.085(0.889)	1.085(0.877)	1.085(0.836)	1.085(0.851)	1.085(0.866)	0.0(2.4)
Peak 4	1.133(0.237)	1.133(0.175)	1.133(0.195)	1.133(0.210)	1.134(0.200)	0.0(11.2)
Peak 5	1.219(0.152)	1.219(0.109)	1.219(0.122)	1.219(0.131)	1.220(0.119)	0.0(5.7)
Peak 6	1.193(0.186)	1.188(0.160)	1.184(0.187)	1.183(0.192)	1.188(0.189)	0.1(7.1)
Peak 7	1.376(0.516)	1.375(0.463)	1.351(0.455)	1.375(0.432)	1.376(0.505)	0.4(3.6)
Peak 8	1.291(0.298)	1.291(0.264)	1.291(0.245)	1.292(0.251)	1.293(0.262)	0.0(3.5)
Peak 9	1.352(0.221)	1.348(0.144)	1.347(0.150)	1.347(0.157)	1.348(0.188)	0.1(8.4)
Peak 10	1.684(0.169)	1.684(0.158)	1.684(0.129)	1.684(0.135)	1.686(0.144)	0.0(0.7)
Peak 11	1.899(0.138)	1.901(0.117)	1.902(0.098)	1.903(0.086)	1.901(0.111)	0.0(8.0)
Peak 12	1.940(0.599)	1.940(0.582)	1.940(0.532)	1.940(0.527)	1.941(0.529)	0.0(2.8)
Peak 13	2.122(0.298)	2.123(0.307)	2.122(0.269)	2.123(0.254)	2.122(0.310)	0.0(3.9)
Peak 14	2.160(0.292)	2.161(0.189)	2.161(0.133)	2.161(0.124)	2.162(0.200)	0.0(16.0)
Peak 15	2.298(0.180)	2.299(0.180)	2.299(0.167)	2.299(0.165)	2.300(0.166)	0.0(2.0)
Peak 16	0.270(0.187)	0.270(0.182)	0.270(0.177)	0.270(0.165)	0.270(0.171)	0.0(2.2)

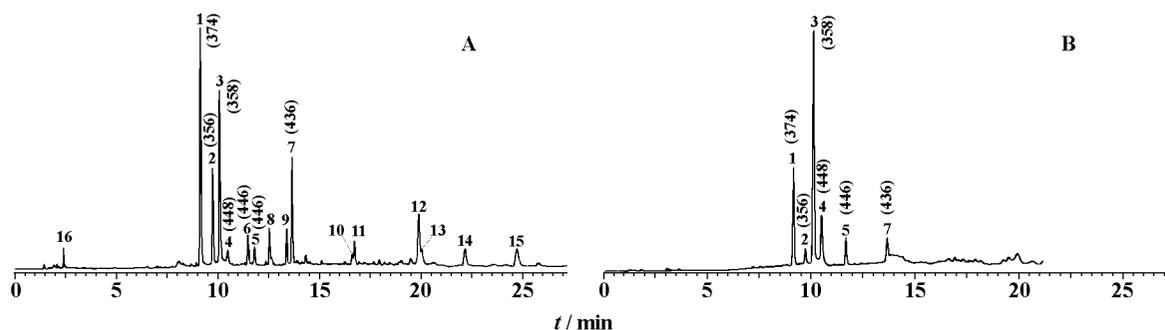


Figure 2 HPLC/MS chromatogram of major glycosides of the total glycosides (A) and the standards compounds of the glycosides (B)

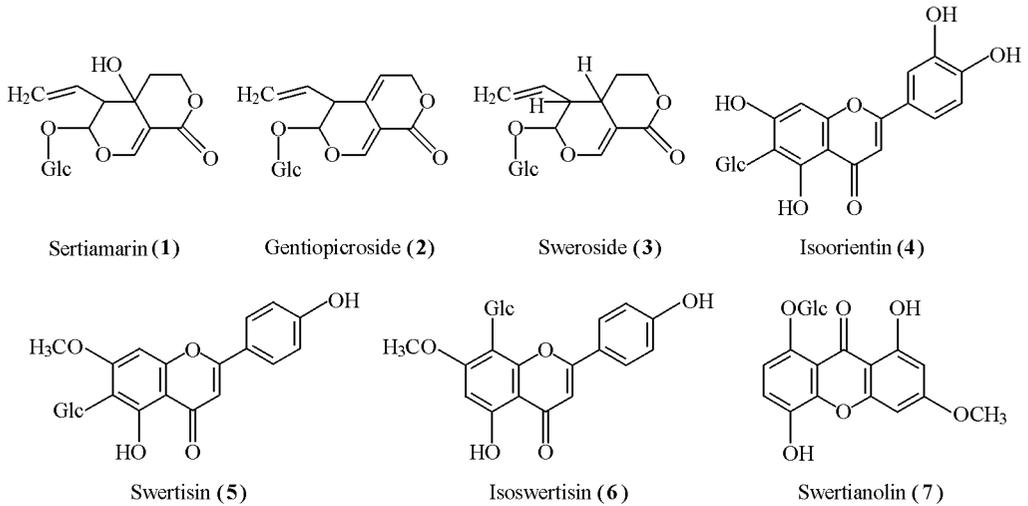


Figure 1 Components identified in the total glycosides of *Swertia franchetiana* H. Smith

6 獐牙菜总苷的指纹图谱

测定了 10 批獐牙菜总苷样品 (图 3), 有 16 个共有峰。其中, 1 号峰为獐牙菜苦苷, 作为参照物, 以其保留时间、含量及峰面积为 1, 计算各峰的相对保留时间及峰面积比值和已知 1 - 7 号峰的含量。

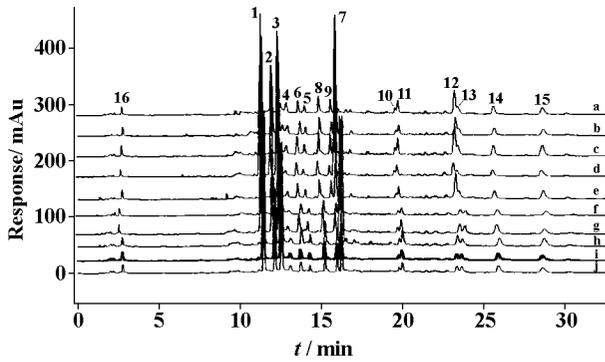


Figure 3 Fingerprint graphics of the ten batches (a - j) samples from the total glycosides

对照指纹图谱见图 2A, 可分为 3 部分: 保留时间 0 - 5 min 有 1 个峰; 保留时间 5 - 16 min, 有 9 个

峰, 其主要特征峰均在此区域, 比较 10 批样品其 1 - 7 号峰代表的苷的含量分别为 10.98% - 28.88%, 8.12% - 18.10%, 1.71% - 2.79%, 0.50% - 1.34%, 0.09% - 0.15%, 0.12% - 0.23%, 3.02% - 13.62%; 保留时间 16 - 30 min, 共有 6 个峰, 其中, 11 和 12, 13 和 14 有时不能达到基线分离。最强峰为 1 号峰, 其次为 7, 2 和 3 号峰; 4, 8, 9, 5 和 6 为次小峰, 其中 5 和 6 号峰分子量相同可能为同分异构体, 6 号峰面积大于 5 号峰面积。

7 抱茎獐牙菜的 HPLC 分析

应用相同色谱条件分析抱茎獐牙菜药材, 通过与獐牙菜总苷的指纹图谱进行比较, 可以看出, 獐牙菜总苷的指纹图谱中主要特征峰 1 - 16 均可在药材中找到相应的峰, 药材中的最强峰与总苷不同, 其最强峰为 7 号峰 (獐牙菜山酮苷)。

8 定量测定

8.1 标准曲线制备 基于对照品色谱的稳定性、精密性、重复性和保留时间变化的考察, 制得 6 种苷的标准曲线, 结果见表 2。

Table 2 Quantitative analysis data of the standard glycosides (n = 3)

Standard	Calibration	r	Measure limit /mg • L ⁻¹	Recovery /%
Swertiamarin	Y = 3 × 10 ⁷ X + 2.968 × 10 ⁵	0.999 6	7.40 - 740	98.3
Gentiopicroside	Y = 4 × 10 ⁶ X + 6.598 × 10 ⁴	0.998 1	14.75 - 590	106.7
Sweeroside	Y = 4 × 10 ⁷ X - 3.818 × 10 ⁵	0.997 5	5.25 - 525	92.3
Isoorientin	Y = 9 × 10 ⁷ X - 5.054 × 10 ⁴	0.999 9	4.25 - 343	88.2
Swertisin	Y = 1 × 10 ⁸ X + 1.688 × 10 ³	0.999 6	0.312 - 125	80.0
Swertianolin	Y = 2 × 10 ⁷ X - 2.289 × 10 ⁵	0.997 9	1.07 - 171	107.3

Table 3 Contents of the glycosides swertiamarin (1), gentiopicroside (2), sweroside (3), isoorientin (4), swertisin (5), isoswertisin (6) and swertianolin (7) in the total glycosides of ten batches, the extracts prepared using another process (Sample I) and plant from *Swertia franchetiana* H. Smith. (Sample II)

Assay sample	Batch No.	Amount of glycosides /%							Total glycoside /%
		1	2	3	4	5	6	7	
The pharmaceutical	1	27.55	12.31	2.58	1.02	0.25	0.23	13.62	57.56
Extract	2	28.88	13.47	2.78	1.03	0.08	0.12	10.04	56.40
	3	19.98	8.39	1.73	0.58	0.15	0.14	6.90	37.87
	4	24.50	10.37	2.12	0.93	0.08	0.12	3.46	41.58
	5	23.89	10.59	2.20	0.84	0.086	0.16	5.80	43.57
	6	27.41	13.05	2.79	0.46	0.13	0.18	10.68	54.70
	7	19.60	8.12	1.71	0.50	0.10	0.12	9.72	39.87
	8	10.98	10.61	2.13	1.34	0.10	0.14	10.50	35.80
	9	18.57	18.10	2.22	1.15	0.12	0.14	3.02	43.32
	10	13.89	10.63	1.86	1.61	0.14	0.18	5.16	33.47
	Sample I	Some Batch	3.57	3.96	5.28	0.49	0.76	0.51	10.74
Sample II	Plant	1.81	0.73	0.10	0.038	0.005	0.01	0.86	3.65

8.2 样品测定 假定当药黄素与异当药黄素紫外响应值相似,以上述色谱条件测定了 10 批样品及 1 批不同工艺生产所得样品 (Sample I) 和药材 (Sample II) 中 7 种苷的含量,结果表明 10 批样品中每种苷的含量差别不大,但明显与 Sample I 和 Sample II 不同; Sample II 中 1 - 7 的含量均低于总苷提取物中 1 - 7 的含量;而 Sample I 中 1 和 2 的含量明显低于总苷提取物中 1 和 2 的含量,而 3 - 7 含量几无差别。由此可见,通过该指纹图谱及相应 7 种苷的含量测定可以监控总苷提取工艺,同时控制产品质量。结果见表 3。

讨论

在相同色谱条件下测定獐牙菜药材的 HPLC 图谱,并与总苷的含量及色谱图比较,发现两者有很好的相关性。獐牙菜总苷的指纹图谱中主要特征峰 1 - 9 等均可在药材中找到相应的峰,而且总苷经过提取纯化,杂质少,相对含量较高。同时,也说明指纹图谱必须结合含量测定才能全面控制植物提取物的质量。

在相同色谱条件下测定一种不同工艺生产的提取物的 HPLC 图谱,并与总苷的含量及色谱图比较,发现,除了有很好的相关性外,其 1 和 2 的相对含量是明显不同的,由此得到提示,指纹图谱结合含量测定,可以监控生产工艺过程。

液相色谱-质谱联用技术 (LC/MS) 是 20 世纪 90 年代成熟起来的一项新技术,具有灵敏度高、选

择性强、分离和结构确证一次完成等特点^[10,11],结合现代 LC/MS 这一技术可以更全面、准确、可信地制定产品的标准指纹图谱。

本实验曾选用 Waters Nova-Pak C₁₈ (3.9 mm × 150 mm, 5 μm), 采用各种洗脱方式分别进行了色谱条件的考察,结果表明,本文的实验条件可以满足分析要求。等度洗脱测定时分离效果较差,如以梯度洗脱法则在 35 min 内可使大部分色谱峰得到基线分离。实验表明,以梯度洗脱程序运行 32 min,然后以终浓度等度洗脱运行到 42 min 后回到起始浓度。可基本除去残留样品,不影响下次分离。另外,每次运行后柱平衡时间至少需要 15 min,才能确保下次分析时色谱峰的峰形及分离度。

以上含量测定和图谱比较 (相对峰面积、相对保留时间) 结果说明:在抱茎獐牙菜提取物的指纹图谱具备相似性的情况下,必须对其中的有效指标成分进行定量,这样才能全面地反映出复杂成分混和物的整体质量,单一指标则很难反映其内在的质量。采用该法可以在一个色谱条件下同时实现整体定性、多指标成分定量的功能,用于质量控制。该法也可以用于药材及本属植物的质量控制。

References

- [1] Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences. *Tibetan Medicine Glossary (藏药志)* [M]. Xining: Qinghai People's Publishing House, 1991. 112 - 113.
- [2] Wang SS, Xiao HB, Liu XM, *et al.* Study on xanthones

- from *Swertia franchitiana* H. Smith [J]. *Chin Tmdit Herb Drugs* (中草药) . 2003, **34**(10): 878 - 898.
- [3] Ding JY, Fan SF, Hu BL. Xanthones glycosides and flavonoids glycosides from *Swertia franchitiana* H. Smith [J]. *Acta Bot Sin* (植物学报) , 1988, **30**(40): 414 - 419.
- [4] Wang JN, Hou CY. Study on chemical constituents of *Swertia franchitiana* H. Smith [J]. *Chin Tmdit Herb Drugs* (中草药) , 1994, **25**(8): 401 - 403.
- [5] Hostettmann K, Guillaumod AJ. Xanthones et C-glucosides flavoniques du Genre *Gentiana* (section *cyclostigma*) [J]. *Phytochemistry*, 1977, **16**(4): 481 - 482.
- [6] Liu HQ, Liu YR. Protecting and development of *Swertia* family in Qinghai [J]. *Chin Tmdit Herb Drugs* (中草药) , 1996, **27**(2): 112 - 123.
- [7] Ohishi N, Suzuki T, Ogasawara T, *et al.* Xanthone derivatives as inhibitors for monoamine oxidase [J]. *J Mol Cataly B: Enzymatic*, 2000, **10**(1 - 3): 291 - 294.
- [8] Ren DQ. Significance about fingerprint technology of quality controlling of traditional medicine [J]. *Chin Tmdit Pat Med* (中成药) , 2001, **24**(4): 235 - 237.
- [9] SDA. Technical request about fingerprint technology of injection of traditional medicine [J]. *Chin Tmdit Pat Med* (中成药) , 2001, **22**(10): 671 - 675.
- [10] Wolfender JL, Rodriguez S, Hostettmann K. Liquid chromatography coupled to mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectroscopy for the screening of plant constituents [J]. *J Chromatogr A*, 1998, **794**(1 - 2): 299 - 316.
- [11] Niessen WMA. Advances in instrumentation in liquid chromatography-mass spectrometry and related liquid-introduction techniques [J]. *J Chromatogr A*, 1998, **794**(1 - 2): 407 - 435.
- [12] Hou TZ, Zeng JG. Preliminary attempt in pursuit of industrialization of Chinese herbal extract [J]. *Chin Tmdit Herb Drugs* (中草药) , 2001, **32**(6): 481 - 483.