

文章编号: 1006-2858(2004)02-0114-04

不同产地龙胆中龙胆苦苷的含量测定

魏 岚, 陈晓辉, 王晓辉, 毕开顺

(沈阳药科大学药学院, 辽宁 沈阳 110016)

摘要: 目的 建立龙胆中龙胆苦苷的 RP-HPLC 定量分析方法, 并对 38 批不同产地的龙胆进行含量测定。方法 采用 Diamonsil C₁₈ 色谱柱(5 μ m, 200 mm $\times$ 4.6 mm i. d.), 以乙腈-水-醋酸(V:V:V = 10:30:1)为流动相, 流速为 1.0 mL $\cdot$ min⁻¹, 紫外检测波长为 270 nm, 柱温为室温, 内标物为对羟基苯甲酸(100 mg $\cdot$ L⁻¹)。结果 龙胆苦苷在 12.8 ~ 153.6 mg $\cdot$ L⁻¹ 质量浓度内线性关系良好($r = 0.9999$), 方法回收率为 99.1%, RSD 为 0.4% ($n = 9$)。38 批龙胆中龙胆苦苷的含量差异较大。结论 该方法可用于质量控制, 并为不同产地龙胆中龙胆苦苷的含量比较提供了依据。

关键词: 反相高效液相色谱法; 龙胆; 龙胆苦苷

中图分类号: R 94 **文献标识码:** A

龙胆(Radix Gentianae)为龙胆科植物条叶龙胆(*Gentiana manshurica* Kitag.)、龙胆(*G. scabra* Bge.)、三花龙胆(*G. triflora* Pall.)、坚龙胆(*G. rigescens* Franch.)的干燥根及根茎尚有非正品龙胆草龙胆(*Veronicastrum sibiricum* (L.) Hara)的根及根茎和红花龙胆(*Gentiana rhodantha* Franch.)的全草。龙胆苦、寒;归肝、胆经;具有清热燥湿、泻肝胆火的功效^[1];主要分布于黑龙江、吉林、辽宁、内蒙古、浙江、湖南、江西、福建、江苏、广东、新疆也有分布。龙胆苦苷(gentiopicroside, GTP)是龙胆的主要有效成分,具有强烈苦味活性,是龙胆药苦寒的物质基础^[2]。作者采用正交试验设计考察了龙胆中龙胆苦苷的提取工艺,建立了龙胆中龙胆苦苷的 RP-HPLC 定量分析方法,并对 38 批不同产地的龙胆进行含量测定,从而为龙胆的质量研究提供了科学依据。

1 仪器与试药

岛津 LC-10A 高效液相色谱仪, SPD-10A 紫外检测器, N2000 色谱工作站, 岛津 UV-265FW 型紫外分光光度计, Sartorius BP210S 型电子分析天平, ZFQ85A 型旋转蒸发器。

甲醇、乙腈为色谱纯, 其他试剂为分析纯。

龙胆样品共 38 批, 由本校孙启时教授鉴定, 粉碎过 40 目筛, 置于干燥阴凉处备用, 来源情况见表 2。龙胆苦苷对照品(770-200105), 购于中

国药品生物制品检定所。

2 方法

2.1 提取工艺的考察

以龙胆苦苷含量为检测指标, 选取溶剂种类、溶剂用量、提取时间、提取次数 4 个因素, 每个因素 4 个水平, 采用 L₁₆(4⁵) 正交表进行试验, 按“2.5”条制备样品溶液, 按“2.6”条进行测定。综合直观分析和方差分析的结果, 确定最佳提取工艺为: 用 60 倍于药材量的甲醇回流提取 2 次, 每次 2 h。

2.2 检测波长的选择

取龙胆苦苷对照品适量, 用甲醇配制成质量浓度为 25 mg $\cdot$ L⁻¹ 的溶液, 在 400 ~ 200 nm 内进行紫外扫描, 结果显示最大吸收波长为 269.2 nm, 故选择 270 nm 为检测波长。

2.3 对照品溶液的制备

取龙胆苦苷对照品约 6.4 mg, 精密称定, 置 25 mL 量瓶中, 甲醇超声溶解定容, 摇匀, 作为对照品贮备溶液。

2.4 内标溶液的制备

取对羟基苯甲酸约 5.0 mg, 精密称定, 置 50 mL 量瓶中, 甲醇超声溶解定容, 摇匀, 得到质量浓度为 100 mg $\cdot$ L⁻¹ 的内标溶液。

2.5 供试品溶液的制备

取龙胆药材粉末 0.45 g, 加入 27 mL 甲醇, 70 $^{\circ}$ C 水浴回流 2 次, 每次 2 h, 合并提取液并过滤,

收稿日期: 2003-08-28

作者简介: 魏岚(1978-), 女(汉族), 辽宁沈阳人, 硕士研究生, 主要从事中药现代化研究, Tel: (024) 23843711-3363, E-mail: ksbi@mail.sy.ln.cn。

回收溶剂后用甲醇溶解并转移至10 mL量瓶中,定容,摇匀,从中精密吸取0.5 mL溶液置于10 mL量瓶中,再精密加入2 mL内标溶液,定容并摇匀,经微孔滤膜(0.45 μm)滤过,作为样品溶液。

2.6 色谱条件

色谱柱: Diamonsil C₁₈ (5 μm, 200 mm × 4.6 mm i. d.);流动相:乙腈-水-醋酸(V :V :V = 10 :80 :1);流速:1.0 mL ·min⁻¹;紫外检测波长:270 nm;柱温:室温;进样量:10 μL;内标:对羟基苯甲酸(ρ=100 mg ·L⁻¹)。

2.7 系统适用性实验

在上述色谱条件下,各峰的分离度均大于1.5,拖尾因子介于0.95~1.05之间,理论塔板数以龙胆苦苷计算不低于7 000。

3 结果

3.1 线性关系

从对照品贮备液中精密吸取0.5、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0 mL,分别置于10 mL量瓶中,精密加入内标溶液2 mL,用甲醇定容摇匀,制成质量浓

度依次为12.8、25.6、51.2、76.8、102.4、128.0、153.6 mg ·L⁻¹的标准溶液。经微孔滤膜(0.45 μm)滤过,按“2.6”条测定。以对照品溶液质量浓度为横坐标,对照品与内标峰面积比为纵坐标,得回归方程 $Y = 13.274 X + 0.007 4$ ($r = 0.999 9$)。龙胆苦苷在12.8~153.6 mg ·L⁻¹内,线性关系良好。

3.2 仪器精密度实验

精密吸取同一对照品溶液10 μL,按“2.6”条测定,连续进样6次,测得结果的RSD为0.3%($n = 6$)。

3.3 方法重复性实验

精密称取同一产地(黑龙江省依兰县)的龙胆药材粉末0.45 g,按“2.5”条制备6份样品溶液,按“2.6”条测定,测得结果的RSD为1.5%($n = 6$)。

3.4 加样回收率实验

精密称取已测得含量的龙胆药材粉末(产于黑龙江省依兰县)9份各0.225 g,每3份分别准确加入高、中、低3个不同量的龙胆苦苷对照品,按“2.5”条制备样品溶液,按“2.6”条测定,结果见表1。

Table 1 The result of recovery

Added/μg	Found/μg	Recovery/ %	Mean/ %	RSD/ %
5600	5546	99.0	99.1	0.4
5600	5556	99.2		
5600	5538	98.9		
11200	11078	98.9		
11200	11026	98.4		
11200	11130	99.4		
16800	16718	99.5		
16800	16746	99.7		
16800	16642	99.1		

3.5 样品测定

取各产地的龙胆样品粉末0.45 g,按“2.5”条

制备样品溶液,按“2.6”条测定,结果见表2,图1。

Table 2 The results of the sample deteminations(mg ·g⁻¹)

No	Species	Habitats	GTP
1	<i>Gentiana rigescens</i> Franch.	Hebei	11.19
2	<i>G. rigescens</i> Franch.	Tianjin	26.02
3	<i>G. rigescens</i> Franch.	Guangzhou, Guangdong	9.11
4	<i>G. rigescens</i> Franch.	Liaoning	20.27
5	<i>Veronicastrum sibiricum</i> (L.) Hara	Anhui	7.22
6	<i>G. rigescens</i> Franch.	Dandong, Liaoning	10.29
7	<i>G. rigescens</i> Franch.	Datong, Shanxi	15.92
8	<i>G. rigescens</i> Franch.	Guizhou	30.72
9	<i>G. rigescens</i> Franch.	Guiyang, Guizhou	38.25
10	<i>V. sibiricum</i> (L.) Hara	Shanxi	7.80

(to be continued)

Continued Table 2

No	Species	Habitats	GTP
11	<i>G. rhodantha</i> Franch.	Sichuan	ND
12	<i>G. scabra</i> Bge.	Zhuanghe , Liaoning	8. 16
13	<i>G. scabra</i> Bge.	Jiamusi , Heilongjiang	32. 08
14	<i>G. scabra</i> Bge.	Heilongjiang	22. 68
15	<i>G. rigescens</i> Franch.	Tongliao , Neimenggu	3. 15
16	<i>G. rigescens</i> Franch.	Yuncheng , Shanxi	13. 54
17	<i>G. rigescens</i> Franch.	Yunnan	18. 68
18	<i>G. rigescens</i> Franch.	Anhui	14. 64
19	<i>G. rigescens</i> Franch.	Heilongjiang	21. 20
20	<i>G. scabra</i> Bge.	Qiqihaer , Heilongjiang	59. 44
21	<i>G. scabra</i> Bge.	Yilan , Heilongjiang	45. 43
22	<i>G. rigescens</i> Franch.	Xinyang , Henan	15. 95
23	<i>V. sibiricum</i> (L.) Hara	Yunnan	8. 64
24	<i>G. scabra</i> Bge.	Huadian , Jilin	47. 22
25	<i>G. rigescens</i> Franch.	Heilongjiang	10. 72
26	<i>G. rigescens</i> Franch.	Shanghai	21. 32
27	<i>V. sibiricum</i> (L.) Hara	Huhehot , Nei Monggol	19. 21
28	<i>V. sibiricum</i> (L.) Hara	Bozhou , Anhui	14. 07
29	<i>V. sibiricum</i> (L.) Hara	Panjin , Liaoning	7. 17
30	<i>G. rigescens</i> Franch.	Hubei	14. 88
31	<i>V. sibiricum</i> (L.) Hara	Yangxin , Hubei	11. 68
32	<i>G. scabra</i> Bge.	Jinan , Shandong	23. 29
33	<i>G. rigescens</i> Franch.	Fujian	16. 73
34	<i>G. rigescens</i> Franch.	Anshun , Guizhou	17. 58
35	<i>G. rigescens</i> Franch.	Yunnan	9. 60
36	<i>V. sibiricum</i> (L.) Hara	Hebei	8. 55
37	<i>G. rigescens</i> Franch.	Qinghai	54. 69
38	<i>G. scabra</i> Bge.	Jilin , Jilin	11. 34

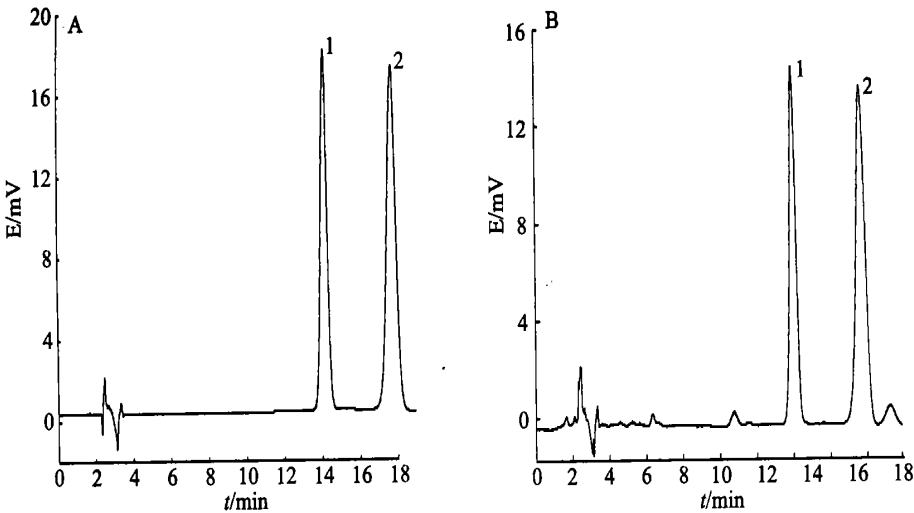


Fig. 1 HPLC chromatograms

A —Standard of gentiopicroside ; B —Sample ; 1 —*p*-Hydroxybenzoic acid (internal standard) ;2 —Gentiopicroside

4 讨论

a. 采用正交试验设计考察最佳提取工艺前，

首先比较了回流提取法、索氏提取法、超声法、室温浸渍法这四种提取方法对龙胆苦苷提出率的影响。若以回流提取法的含量为 100 %计,索氏提

取法和室温浸渍法为其含量的 90 % (w) 左右,超声法为其含量的 80 % (w) 左右。因此,回流提取法提取效率最高。

b. 流动相的选择:曾实验比较了甲醇-水、乙腈-水、甲醇-乙腈-水、乙腈-水-醋酸等不同比例流动相的分离效果,结果表明当以甲醇-水($V:V = 3:7$)为流动相时^[3],龙胆苦苷与相邻峰的分离度小于 1.5,并且峰形不对称;而以乙腈-水-醋酸($V:V:V = 10:30:1$)为流动相时,保留时间适中、分离效果好,故选其为流动相。

c. 实验结果表明,38 批龙胆样品中龙胆苦苷的含量差异很大。龙胆苦苷含量最高的四个产地依次为齐齐哈尔市、吉林市、桦甸市和黑龙江省依兰县,且均高于 $45 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$;而四川的龙胆中未检

出龙胆苦苷。这与形态学鉴定结果一致,含量最高的 4 个产地的龙胆样品是龙胆 *Gentiana scabra* Bge., 属于道地药材,且均来源于主产地;四川的龙胆样品为红花龙胆 *Gentiana rhodantha* Franch., 且为全草,与药典规定的有效部位不符,因此推测红花龙胆的全草中不含龙胆苦苷或者龙胆苦苷的含量很低。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部 [Z]. 北京:人民出版社,2000. 72 - 73.
- [2] 郑虎占,董泽宏,余靖. 中药现代研究与应用:第二卷 [M]. 北京:学苑出版社,1997. 1398 - 1408.
- [3] 高海,金惠敏,孙文基,等. 龙胆药材中龙胆苦苷的 HPLC 法测定 [J]. 西北药学杂志,1998,13(3):140.

Determination of the contents of gentiopicroside of *Radix Gentianae* from different habitats

WEI Lan, CHEN Xiao-hui, WANG Xiao-hui, BI Kai-shun

(School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

Abstract : Objective To establish a RP-HPLC method for the determination of the content of gentiopicroside in 38 samples of *Radix Gentianae* from different habitats. **Methods** A Diamonsil- C_{18} column ($5 \mu\text{m}$, $200 \text{ mm} \times 4.6 \text{ mm i. d.}$) was used with the mobile phase being acetonitrile-water-acetic acid ($V:V:V = 10:30:1$), the flow rate being $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. The detection wavelength was set at 270 nm, the column temperature was room temperature and the internal standard was *p*-hydroxybenzoic acid ($100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$). **Results** The calibration curve was linear ($r = 0.9999$) in the range of $12.8 \sim 153.6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ for gentiopicroside, the average recovery of the method was 99.1 %, with RSD 0.4 % ($n = 9$). The contents in 38 samples of *Radix Gentianae* of gentiopicroside differ greatly. **Conclusions** This method can be used for the quality study of *Radix Gentianae* and for the contrast of contents of gentiopicroside from different habitats.

Key words : RP-HPLC; *Radix Gentianae*; gentiopicroside