

RP-HPLC法测定辐状肋柱花中獐牙菜苦苷的含量^{*}

宋萍, 吴启勋, 俞学荣

(青海民族学院化学系, 西宁 810007)

摘要 目的: 建立反相高效液相色谱法分离并测定辐状肋柱花中獐牙菜苦苷的含量。方法: 采用 ZORBAX SB-C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 以甲醇-水 (含 0.04% 磷酸) 为流动相进行线性梯度洗脱 (0~15 min 23:77→30:70), 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 238 nm, 柱温 35℃。结果: 进样量在 0.093~3.72 μg 范围内, 与峰面积呈良好的线性关系 ($r=0.9998$, $n=6$); 平均回收率 ($n=5$) 为 99.7%, RSD 为 1.3%。结论: 本方法简便、快速, 结果准确、可靠。

关键词: 反相高效液相色谱; 辐状肋柱花; 獐牙菜苦苷

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2009)06-1013-03

HPLC simultaneous determination of swertiamarin in *Lamotogonium rotatum* (L.) Fries ex Fern.^{*}

SONG Ping WU Qi-xun, YU Xue-rong

(Department of Chemistry, Qinghai Nationalities Institute Xining 810007, China)

Abstract Objective To develop an HPLC quantitative method for determining the content of swertiamarin in *Lamotogonium rotatum*. **Method** The samples were separated on a ZORBAX SB-C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) eluted with methanol and water containing 0.04% phosphoric acid. The ratio of methanol and water increased from 23:77 to 30:70 in 15 min with detecting wavelength at 238 nm, flow rate at 1.0 mL·min⁻¹, column temperature at 35℃. **Result** The calibration curve was found to be linear over the range of 0.093–3.72 μg ($r=0.9998$, $n=6$); The average recovery ($n=5$) was 99.7% with RSD 1.3%. **Conclusion** The method is simple, rapid, accurate and reliable.

Key words RP-HPLC; *Lamotogonium rotatum*; swertiamarin

辐状肋柱花 [*Lamotogonium rotatum* (L.) Fries ex Fern.] 是龙胆科肋柱花属植物, 系蒙医临床常用药, 生长于海拔 3~4.1 km 的山坡草地、灌丛中^[1~4]。该属植物和龙胆科中的龙胆属和獐牙菜属植物在藏药中疗效类同, 主要用于治疗有关肝脏、胆囊及脾脏类疾病, 其味苦、性寒, 具有清热、健胃、愈伤的功效^[5]。它的主要化学成分獐牙菜苦苷具有提高皮肤机能、促进毛发生长、抑制中枢神经、镇痛和抗炎等作用, 另外, 獐牙菜苦苷等环烯醚萜类化合物对子宫平滑肌有明显的解痉作用^[6,7]。目前, 有关辐状肋柱花的文献报道^[2]较少, 而对其中有效成分獐牙菜苦苷的分析方法及含量测定更未见报道。为此, 本文建立了反相高效液相色谱法对辐状肋柱花中獐牙菜苦苷的含量进行测定。该方法具有快

速、方便、稳定、准确的特点, 适用于辐状肋柱花中獐牙菜苦苷含量的测定。

1 仪器、试剂

Agilent 1100 高效液相色谱仪 (配置: 手动进样器、在线真空脱气机、高压二元梯度泵、恒温柱温箱、DAD 检测器); Agilent 色谱工作站; KQ3200 超声波清洗器 (昆山市超声波仪器有限公司); SZ-97 自动三重水蒸馏器 (上海亚荣生化仪器厂)。

甲醇: 色谱纯; 水: 自制三重蒸馏水; 磷酸: AR 级 (北京红星化工厂); 獐牙菜苦苷对照品 (批号 0785-200203) 购自中国药品生物制品检定所。

辐状肋柱花样品采自青海互助北山林场 (编号: 200601, 200802, 200803), 由青海大学青海医学院魏全嘉教授鉴定为龙胆科肋柱花属植物辐状肋柱

* 教育部重点科技攻关项目 (项目编号: 2051675)

第一作者: (0971) 8800307 E-mail: spzhe@126.com

花 *Lamotogonium rotatum* (L.) Fries ex Fern。样品自然风干后粉碎, 过 100 目筛, 置于阴凉干燥处保存。

2 溶液制备

2.1 对照品储备液 精密称取对照品獐牙菜苦苷 1.86 mg 置 10 mL 量瓶中, 用甲醇溶解并定容至刻度, 摇匀, 配制成 $0.186 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照品储备液, 使用时稀释成所需浓度。

2.2 供试品溶液 精密称取辐状肋柱花干粉 1.0 g 加入甲醇 10 mL, 超声提取 (150 W, 40 kHz) 30 min 滤过, 滤渣再加入甲醇 10 mL 超声提取, 如此反复 3 次, 合并所得滤液, 并将滤液浓缩后用甲醇定容至 10 mL 量瓶中, 经 $0.45 \mu\text{m}$ 微孔滤膜滤过, 即得。

3 色谱条件

采用 ZORBAX SB-C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 以甲醇-水 (含 0.04% 磷酸) 为流动相, 进行梯度洗脱 [0~15 min 23:77 $\rightarrow$ 30:70]; 流速 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 检测波长为 238 nm; 柱温 35 $^{\circ}\text{C}$; 在该色谱条件下獐牙菜苦苷保留时间为 12.1 min, 与其他成分达到良好的基线分离, 见图 1。

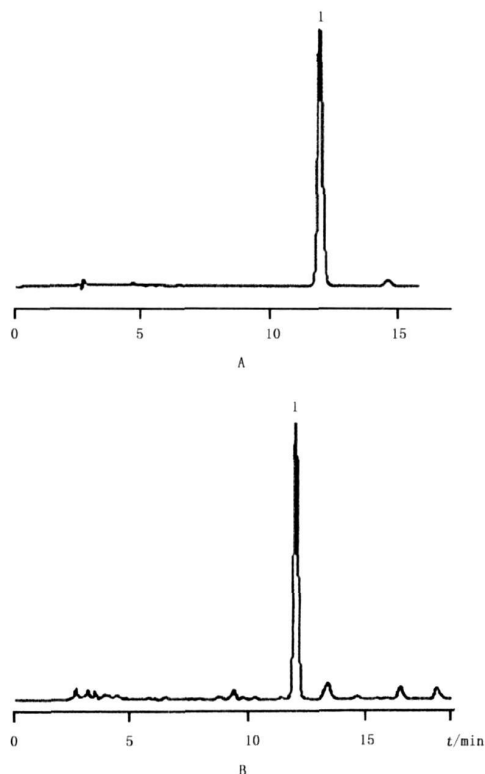


图 1 獐牙菜苦苷对照品 (A) 与辐状肋柱花样品 (B) 的色谱图

Fig 1 Chromatograms of swertiamarin reference substance (A) and sample of *Lamotogonium rotatum* (B)

1. 獐牙菜苦苷 (swertiamarin)

4 线性关系考察

精密量取浓度为 $0.186 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的獐牙菜苦苷对照品溶液 0.5, 2, 4, 10, 14, 20 μL , 进样测定。以色谱峰面积 Y 为纵坐标, 以进样量 X (μg) 为横坐标, 绘制工作曲线, 得线性回归方程:

$$Y = 1.798 \times 10^3 X - 38.49 \quad r = 0.9998$$

线性范围为 0.093~3.72 μg 。在选定的色谱条件下, 当信噪比 $SN = 3$ 时, 测得獐牙菜苦苷的检出限为 0.25 ng。

5 精密度试验

精密吸取浓度为 $0.186 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的獐牙菜苦苷对照品溶液 4 μL 连续进样 6 次, 在选定的色谱条件下测定色谱峰的峰面积, 计算 RSD ($n = 6$) 为 0.72%, 表明仪器精密度良好。

6 稳定性试验

精密称取辐状肋柱花样品 (编号: 200601) 1.0 g 按“2.2”项下方法制备供试品溶液, 在 0, 3, 6, 10, 20, 24 h 分别进样 0.5 μL , 测定獐牙菜苦苷的峰面积, 计算 RSD ($n = 6$) 为 0.68%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

7 重复性试验

精密称取 5 份辐状肋柱花干粉 (编号: 200601) 各 1.0 g 按“2.2”项下方法制备供试品溶液, 并在选定的色谱条件下进样 0.5 μL , 测定獐牙菜苦苷的含量。结果平均含量 ($n = 5$) 为 4.21%, RSD 为 0.6%, 表明该方法的重复性满足要求。

8 回收率试验

精密称取 5 份已测知獐牙菜苦苷含量的辐状肋柱花样品 (编号: 200601) 0.5 g 分别加入獐牙菜苦苷对照品 21 mg 按“2.2”项下方法制备所需溶液, 进样 0.5 μL , 测得獐牙菜苦苷平均回收率 ($n = 5$) 为 99.7%, RSD 为 1.3%。

9 样品含量测定

按“2.2”项下方法制备供试品溶液 3 份, 在选定色谱条件下进样测定辐状肋柱花中獐牙菜苦苷的含量。通过测定峰面积, 由线性方程计算出 3 批辐状肋柱花样品 (编号: 200601, 200802, 200803) 中獐牙菜苦苷的平均含量 ($n = 3$) 分别为 4.21%, 4.28%, 4.16%; RSD 分别为 0.6%, 1.4%, 1.3%。符合测定要求。

10 讨论

10.1 检测波长的确定 上述配制的对照品溶液进样后, 利用检测器在 220~260 nm 扫描其吸收光谱, 发现对照品在 238 nm 处有最大的吸收, 则选择此波

长为本实验检测波长。

10.2 提取方法确定 对于獐牙菜苦苷的提取, 参照文献[8~ 10], 比较了不同提取方法(超声波振荡和热回流)、提取溶剂(甲醇、乙醇、水)、溶剂用量(5, 10, 15 mL)、提取时间(15, 30, 45, 60 min)、提取次数(1, 3, 5次)对提取率的影响。结果表明, 超声波提取法优于热回流提取法, 且用 10 mL 甲醇作溶剂, 反复 3次用超声波提取 30 min即可将样品中有效成分提取完全。

10.3 流动相的选择 分析测定时獐牙菜苦苷色谱峰易拖尾, 经试验, 当在水中加入磷酸时可改善其峰形。故选择甲醇和含磷酸的水做流动相。

10.4 小结 通过对辐状肋柱花中獐牙菜苦苷含量的测定, 发现辐状肋柱花中獐牙菜苦苷的含量较高, 这对于在一定程度上揭示辐状肋柱花用于治疗肝胆疾病的物质基础具有重要意义, 同时也为以肋柱花为代表的该属药用植物资源的进一步开发利用提供了依据。

参考文献

- 1 LU Shang-wu(刘尚武), HE Ting-nong(何廷农). Papers with author title or the keyword like(肋柱花属的系统研究). *Acta Phytotaxon Sin*(植物分类学报), 1992, 30(4): 289
- 2 LI Yu-lin(李玉林), DING Chen-xu(丁晨旭), WANG Hong-lun(王洪伦). Glycosides of *Lomatogonium rotatum* ((辐状肋柱花的苷类成分). *Acta Bot Boreal- Occident Sin*(西北植物学报), 2006, 26(1): 197
- 3 BAI Cui-lan(白翠兰), BAI Gen-na(巴根那), WANG Xiu-lan(王秀兰). Identification of Mongolian medicinal material *Herba Lomatognii*(蒙药肋柱花的鉴别研究). *Chin J Ethnomed Ethnopharm* (中国民族民间医药杂志), 2002, 57: 236

- 4 ZHAO Yi-zhi(赵一之). The research on classification and geographical distribution of *Lomatogonium* in Inner Mongolia(内蒙古肋柱花属植物分类及其地理分布研究). *Bull Bot Res*(植物研究), 2004, 24(1): 8
- 5 YANG Wei-xia(杨维霞), ZHOU Le(周乐), GENG Hui-ling(耿会玲), et al. A survey of study of chemical components of medicinal plants of Gentianaceae(龙胆科药用植物化学成分的研究现状). *Acta Bot Boreal- Occident Sin*(西北植物学报), 2003, 23(12): 2235
- 6 WU Qi-zhu(吴柒柱), BAO Ba-te-er(包巴特尔), BAI Hai-hua(白海花). Research development of traditional Mongolian medicine *Herba Lomatognii*(蒙药辅肋柱花的研究进展). *Lishichen Med Mater Med Res*(时珍国医国药), 2004, 15(6): 366
- 7 SUN Wen-ji(孙文基), SHENG Jin-fang(绳金房). Handbook of Natural Active Components(天然活性成分简明手册). Beijing(北京): China Medicinal Science and Technology Publishing House(中国医药科技出版社), 1998. 256, 367, 539
- 8 HU Feng-zu(胡凤祖), SONG Ya-li(宋娅莉), LU Mei(刘梅). Analysis of medicinal composition of Gentianaceae in Qinghai-Tibet Plateau by high performance liquid chromatography(青藏高原龙胆科植物药用成分的高效液相色谱分析). *Chin J Chromatogr*(色谱), 2003, 23(1): 63
- 9 Tatsuhan Miyakawa(宫川辰治), Toshiyuki Osanina(大岛俊幸), Hisayoshi Hirayama(平山 良), et al. Determination of two main bitter secoiridoid glycosides in Gentianaceae(龙胆科生药中 2种苦苷的含量测定). *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志), 1997, 17(4): 241
- 10 TIAN Cheng-wang(田成旺), ZHANG Tie-jun(张铁军). Determination of swertianin and gentiopicroside in *Zangyincheng* by HPLC(HPLC测定藏茵陈中獐牙菜苦苷和龙胆苦苷). *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药), 2006, 37(3): 442

(本文于 2008年 5月 17日收到)