

HPLC法测定秦艽及其不同配伍药对中两种环烯醚萜苷类成分含量研究

刘飞, 马腾茂, 王蓉, 罗奎元, 强宇靖, 杨秀娟, 高慧琴

甘肃中医药大学, 甘肃 兰州 730000

[摘要] 目的: 建立 HPLC 法同时测定秦艽及其不同配伍药对(秦艽威灵仙、秦艽桑寄生、秦艽防己)水煎液中两种环烯醚萜苷类成分含量的方法。方法: 采用 Agilent A3000250×046 Pursuit 5 C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱; 流动相为甲醇(A)-0.04%磷酸水溶液(B), 梯度洗脱: 0~28 min, A 15%→23%; 28~35 min, B 23%→35%; 流速: 0.8 mL/min; 柱温: 30℃; 检测波长 245 nm。结果: 獐牙菜苦苷、龙胆苦苷分别在 0.025 8 μg~1.032 0 μg、0.265 μg~10.60 μg 内线性关系良好, 平均加样回收率分别为 99.67% (RSD=2.55%, n=6), 101.36% (RSD=2.86%, n=6), 与单味秦艽比较, 三组药对中獐牙菜苦苷的含量均升高, 尤以秦艽威灵仙药对升高明显; 三组药对中龙胆苦苷含量亦发生了变化, 其中秦艽威灵仙药对中龙胆苦苷含量升高, 而秦艽桑寄生药对、秦艽防己药对中龙胆苦苷含量却降低, 尤以秦艽桑寄生药对降低明显。结论: 秦艽配伍用药后所含的有效成分含量发生了变化; 本研究所建立的龙胆苦苷、獐牙菜苦苷含量测定方法简便、准确、重复性较好。

[关键词] HPLC; 秦艽; 秦艽-威灵仙; 秦艽-桑寄生; 秦艽-防己; 环烯醚萜苷; 含量测定

[中图分类号] R284 [文献标志码] A [文章编号] 0256-7415 (2016) 12-0217-04

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2016.12.091

Simultaneous Content Determination of 2 kinds of Iridoid Glycosides in *Gentiana macrophylla* Pall and Its Different Double-Drugs Compatibility with HPLC

LIU Fei, MA Tengmao, WANG Rong, LUO Kuiyuan, QIANG Yujing, YANG Xiujuan, GAO Huiqin

Abstract: Objective: To establish HPLC (high performance liquid chromatography) method for simultaneous determination of 2 kinds of Iridoid glycosides' composition in *Gentiana macrophylla* Pall and its different double-drugs compatibility (*Gentiana macrophylla* Pall - *Clematis chinensis* Osbeck, *Gentiana macrophylla* Pall - *Herba taxilli*, *Gentiana macrophylla* Pall - *Radix stephaniae* tetrandrae) decoction. Methods: Adopted chromatograph column Agilent A3000250×046 Pursuit 5 C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm), mobile phase was methanol(A)-0.04% phosphoric acid solution(B), gradient elution: 0~28 min, A 15%→23%; 28~35 min, B 23%→35%; flow rate was 0.8 mL/min; column temperature was 30℃; detection wavelength was 245 nm. Results: Swertiamarin and gentiopicroside were in a good linear relationship within 0.025 8 μg~1.032 0 μg, 0.265 μg~10.60 μg separately. Average recovery rate was 99.67% (RSD=2.55%, n=6), 101.36% (RSD=2.86%, n=6) separately. Compared with single *Gentiana macrophylla* Pall, contents of swertiamarin in the three drug pairs were increased, especially in drug pair *Gentiana macrophylla* Pall - *Clematis chinensis* Osbeck. Contents of Gentiopicroside in the three groups were changed. Contents of swertiamarin in drug pair *Gentiana macrophylla* Pall - *Clematis chinensis* Osbeck was increased, but was decreased in drug pair *Gentiana macrophylla* Pall - *Radix Stephaniae* Tetrandrae, especially in drug pair *Gentiana macrophylla* Pall - *Herba Taxilli*. Conclusion: Content of active components in *Gentiana macrophylla* Pall was changed after compatibility medication. Determination method of Gentiopicroside and Swertiamarin that established in this research is simple, accurate and has good repeatability.

Keywords: High performance liquid chromatography (HPLC); *Gentiana macrophylla* Pall; *Gentiana macrophylla* Pall - *Clematis chinensis* Osbeck; *Gentiana macrophylla* Pall - *Herba Taxilli*; *Gentiana macrophylla* Pall - *Radix Stephaniae* Tetrandrae; Iridoid glycosides; Content determination

秦艽味辛、苦, 性平, 归胃、肝、胆经, 具有祛风除湿、
 伸不利等, 素有风寒湿三痹要药之称^[1]。本研究在中医理论指
 导下, 以性平祛风湿中药秦艽为基本药, 分别配伍威灵仙、桑

伸不利等, 素有风寒湿三痹要药之称^[1]。本研究在中医理论指
 导下, 以性平祛风湿中药秦艽为基本药, 分别配伍威灵仙、桑

[收稿日期] 2016-07-06

[基金项目] 国家自然科学基金地区基金项目 (81360648)

[作者简介] 刘飞 (1989-), 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 中药及复方应用的研究。

[通讯作者] 高慧琴, E-mail: ghq@gszy.edu.cn.

寄生、防己,组成平温相配(秦艽+威灵仙)、平平相配(秦艽+桑寄生)、平寒相配(秦艽+防己)的配伍关系,通过前期秦艽寒热不同配伍药对对类风湿性关节炎模型大鼠作用的观察,发现其作用强弱有别^[2]。《中华人民共和国药典》2015年版(一部)标准对祛风湿中药秦艽中的龙胆苦苷进行定量测定,相关文献亦有关于单味秦艽中的龙胆苦苷、獐芽菜苦苷同时含量测定的方法^[2-4],但关于秦艽配伍药对中龙胆苦苷、獐芽菜苦苷同时含量测定方法的研究尚未见报道。本研究采用HPLC法测定单味秦艽及秦艽药对中的龙胆苦苷及獐芽菜苦苷的含量变化,为秦艽及其寒热不同配伍药对的祛风湿作用及化学成分的相关性研究奠定基础。

1 材料与仪器

1.1 药材 实验所用药材均购自兰州惠仁堂药店,经甘肃中医药大学中药鉴定教研室李成义教授鉴定:秦艽为龙胆科植物秦艽 *Gentiana macrophylla* Pall.的干燥根,威灵仙为毛茛科植物威灵仙 *Clematis chinensis* Osbeck 的干燥根及根茎,桑寄生为桑寄生科植物桑寄生 *Taxillus chinensis* (DC.) Danser 的干燥带叶茎枝,防己为防己科植物粉防己 *Stephania tetrandra* S. Moore 的干燥根。

1.2 仪器与试剂 Agilent1100 高效液相色谱仪(美国安捷伦科技公司);SK3300H 型超声清洗器(上海科导超声仪器有限公司);BT125D 型电子天平(赛多利斯科学仪器(北京)有限公司);102 电热鼓风干燥箱(海口市先科仪器公司);500mLMYB 型电子调温电热套(天津市中实验电炉有限公司)。獐芽菜苦苷对照品(批号 PY20150915GF),龙胆苦苷对照品(批号 PY20150908AT),以上对照品纯度均为 98%,均购自南京普怡生物科技有限公司。甲醇、乙腈均为色谱纯(德国默克公司);水为超纯水;磷酸及其他试剂均为市售分析纯(广州化学试剂公司)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱为 A3000250×046 Pursuit 5 C₁₈ 柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm);流动相 A: 甲醇;流动相 B: 0.04% 磷酸水溶液,梯度洗脱(0~28 min, A 相 15%→23%; 28~35 min, B 相 23%→35%);流速 0.8 mL/min;柱温 30℃;检测波长 245 nm;进样量 5 μL。

2.2 对照品溶液的配制 高浓度对照品溶液的制备:精密称取獐芽菜苦苷、龙胆苦苷对照品 1.032 mg、10.60 mg 分别置于 10 mL 量瓶中,加甲醇定容至刻度,分别制成对照品高浓度溶液。低浓度对照品溶液的制备:分别精密量取獐芽菜苦苷、龙胆苦苷高浓度对照品溶液各 1 mL,分别置于 10 mL 量瓶中,加甲醇定容至刻度,分别制成对照品低浓度溶液。精密量取上述高浓度对照品溶液各 1 mL 置于 10 mL 量瓶中,加甲醇定容至刻度,即得 0.010 32 mg/mL 獐芽菜苦苷、0.106 0 mg/mL 龙胆苦苷的混合对照品溶液,置 4℃ 冰箱保存,备用。

2.3 供试品溶液的制备 分别称取秦艽 1 g, 秦艽-威灵仙(质量比 1:1)2 g, 秦艽-防己(质量比 1:1)2 g, 秦艽-桑寄生(质量比 1:1)2 g。分别置于 50 mL 圆底烧瓶中,精密加入十倍量纯水,回流加热提取 60 min,稍冷后过滤于 100 mL 容量瓶中,药渣再加八倍量纯水,回流加热提取 30 min,稍冷后过滤于原 100 mL 容量瓶中,加纯净水稀释至刻度,摇匀,0.45 μm 微孔滤膜过滤,取续滤液 5 μL 进样分析。

2.4 阴性样品液的制备 分别称取威灵仙、防己、桑寄生药材各 1 g,按 2.3 项下方法分别制成威灵仙、防己、桑寄生单煎阴性样品液。

2.5 系统适用性试验 精密吸取混合对照品溶液、供试品溶液及阴性样品液各 5 μL,在上述选定的色谱条件下分别进样测定,HPLC 色谱图见图 1。结果獐芽菜苦苷、龙胆苦苷的保留时间分别在 23.4 min、27.8 min,峰分离度良好,阴性样品

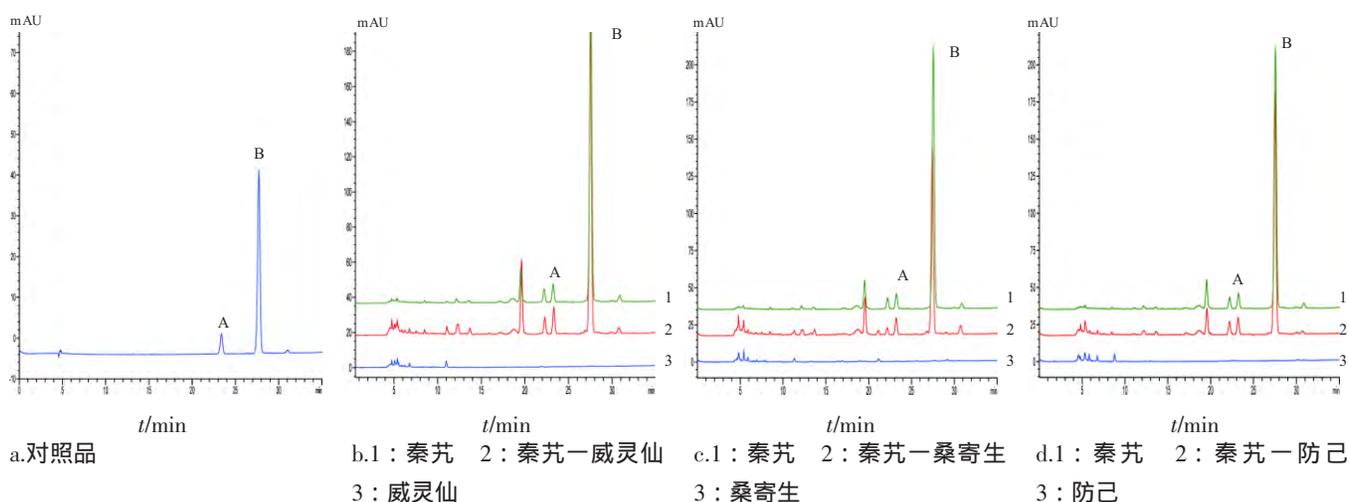


图1 高效液相色谱图(A:獐芽菜苦苷,B:龙胆苦苷)

无干扰。

2.6 线性关系 分别依次精密吸取 2.2 项下的高浓度对照品溶液各 2.5 μL、5 μL、10 μL 及低浓度对照品溶液各 2.5 μL、5 μL、10 μL、15 μL 进样，按上述色谱条件测定峰面积，以对照品进样量(μg)X 为横坐标，峰面积值 Y 为纵坐标，绘制标准曲线，獐芽菜苦苷的回归方程为： $Y=2\ 205.1X-27.099$ ，($r=0.999\ 7$)，龙胆苦苷的回归方程为： $Y=1\ 964.5X-169.25$ ，($r=0.999\ 8$)。结果表明獐芽菜苦苷在 0.025 8 μg~1.032 0 μg、龙胆苦苷在 0.265 μg~10.60 μg 的含量范围内具有良好的线性关系。

2.7 精密度试验 分别精密吸取獐芽菜低浓度苦苷对照品溶液、龙胆苦苷低浓度对照品溶液各 5 μL，连续进样 6 次，记录色谱图，测得獐芽菜苦苷、龙胆苦苷的峰面积 RSD 值分别为 1.96%、2.06%，结果表明精密度良好。

2.8 重复性试验 称取秦艽 1 g，平行 6 份，按 2.3 项下方法制备供试品溶液，5 μL 进样检测分析，煎液中獐芽菜苦苷、龙胆苦苷含量的 RSD 分别为 2.16%、1.48%，表明实验重复性良好。

2.9 稳定性试验 取同一份供试品溶液，分别于 0、4、6、8、12 h 进样测定，獐芽菜苦苷、龙胆苦苷峰面积 RSD 值分别为 1.64%、1.40%。表明供试品溶液在 12 h 内稳定性良好。

2.10 加样回收率试验 见表 1、表 2。称取已知含量的同一批号秦艽样品 6 份，分别加入一定量的獐芽菜苦苷对照品、龙胆苦苷对照品，按 2.3 项下方法制备供试品溶液，在上述色谱条件下进样 5 μL，记录色谱峰，计算加样回收率。

表 1 獐芽菜苦苷加样回收率结果

序号	样品量(mg)	加入量(mg)	测定量(mg)	回收率(%)	平均回收率(%)	RSD(%)
1	0.844 2	0.877 2	1.72	99.28		
2	0.861 8	0.877 2	1.76	102.44		
3	0.859 3	0.877 2	1.72	98.59	99.67	2.55
4	0.860 5	0.877 2	1.70	95.36		
5	0.862 2	0.877 2	1.75	101.37		
6	0.863 9	0.877 2	1.75	100.97		

表 2 龙胆苦苷加样回收率结果

序号	样品量(mg)	加入量(mg)	测定量(mg)	回收率(%)	平均回收率(%)	RSD(%)
1	16.145 3	16.010	32.79	103.99		
2	16.482 7	16.003	32.27	98.62		
3	16.434 5	15.943	32.52	100.89	101.39	2.86
4	16.457 0	15.809	33.03	104.82		
5	16.489 1	15.988	32.87	102.43		
6	16.521 2	16.001	32.13	97.57		

2.11 样品的测定 见表 3。取 4 种样品(秦艽、秦艽-威灵仙、秦艽-防己、秦艽-桑寄生)按 2.3 项下方法平行制备 3

份供试品溶液，在上述色谱条件下进样 5 μL，测得獐芽菜苦苷、龙胆苦苷峰面积并代入回归方程计算獐芽菜苦苷、龙胆苦苷的含量。

表 3 不同配伍样品中獐芽菜苦苷、龙胆苦苷含量的测定结果 (n=3)

供试液	獐芽菜苦苷(mg/g)	龙胆苦苷(mg/g)
秦艽	1.68	32.13
秦艽-威灵仙	2.32	32.44
秦艽-桑寄生	1.91	23.72
秦艽-防己	1.79	31.27

3 讨论

3.1 检测波长的选择 分别取獐芽菜苦苷对照品、龙胆苦苷对照品适量，在 190 nm~400 nm 波长范围内进行紫外光谱波长扫描，结果显示獐芽菜苦苷、龙胆苦苷的最大吸收波长分别为 236 nm、270 nm，综合考虑，在 245 nm 波长处，獐芽菜苦苷、龙胆苦苷的灵敏度均较高，杂质干扰少，故选择 245 nm 为检测波长。

3.2 色谱条件的选择 在参考文献的基础上^[5-9]，根据指标性成分的理化性质和色谱行为，我们分别对柱温，流动相，进样量等条件进行了摸索。比较了多种柱温，优选出柱温为 30℃；比较了甲醇-磷酸水、乙腈-磷酸水多种洗脱系统，分别进行等度与梯度的洗脱方式，结果表明，采用甲醇-磷酸水系统进行梯度洗脱，各成分的分离效果较好；比较了多种进样量，结果显示 5 μL 较合理。

3.3 样品的制备方法 本实验结合临床给药模式，采用经典而传统的水煎煮样品制备方法，煎煮后又采用三种处理方法，第一种方法，直接用纯净水定容至刻度；第二种方法，浓缩到定量，精密移取少量用甲醇定容至刻度；第三种方法，浓缩至干，加甲醇定容至刻度，结果显示，第一种处理方法得到的色谱峰分离度良好，有效成分含量高，故选择第一种方法。

3.4 含量测定的讨论 本实验建立了 HPLC 法同时测定秦艽及其配伍药对中的两种有效成分，方法简便、有效，与单味秦艽相比，三组药对中獐芽菜苦苷的含量均升高，尤以秦艽威灵仙药对升高明显；三组药对中龙胆苦苷含量亦发生了变化，其中秦艽威灵仙药对中龙胆苦苷含量升高，而秦艽桑寄生药对、秦艽防己药对中龙胆苦苷含量却降低，尤以秦艽桑寄生药对降低明显。含量测定结果显示，秦艽配伍用药后，有效成分含量确实有所改变，这种有效成分含量的改变，与其临床药效之间的关联性还需进一步研究。

[参考文献]

- [1] 黄芳. 中药学[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2012.
- [2] 高慧琴, 吴国泰, 孙少伯, 等. 秦艽不同配伍对风湿痹证模型大鼠血清炎症因子水平的影响[J]. 中医杂志,

- 2013, 54(9): 785- 788.
- [3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 1 部. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 270- 271.
- [4] 吴新荣, 吴立宏, 赵志礼, 等. 中药秦艽和习用品中 5 种环烯醚萜类成分的 HPLC 含量测定[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(4): 715- 720.
- [5] 李荣娇, 杨凤仙, 袁绿益, 等. HPLC 法测定西藏秦艽花与川西秦艽花中 7 种成分的量[J]. 中草药, 2015, 46(8): 1227- 1230.
- [6] 董琦, 吉文鹤, 肖远灿, 等. HPLC 法同时测定藏药岷县龙胆中 4 种有效成分的含量[J]. 天然产物研究与开发, 2014, 26(4): 561- 563.
- [7] 徐敏, 张振秋. HPLC 法同时测定青叶胆中獐牙菜苦苷、龙胆苦苷和獐牙菜苦苷的含量[J]. 辽宁中医杂志, 2013, 40(1): 145- 147.
- [8] 张兴旺, 陶燕铎, 梅丽娟, 等. HPLC 测定 7 种龙胆科植物花中龙胆苦苷与獐牙菜苦苷的含量[J]. 中国野生植物资源, 2010, 29(2): 38- 40.
- [9] 徐康平, 申健, 李福双, 等. 多波长 HPLC 同时测定 3 种獐牙菜属植物中 6 种活性成分[J]. 中国中药杂志, 2009, 34(11): 1384- 1389.
- (责任编辑: 冯天保, 郑锋玲)

岭南特色炮天雄和传统炮附片的成分比较

覃军, 龚又明, 郑显辉, 邓广海

广东省中医院药学部, 广东 广州 510120

[摘要] 目的: 比较炮附片与炮天雄有效成分和毒性成分的差异, 从化学成分上阐述岭南炮天雄物质基础, 为其临床应用及后期研究提供参考依据。方法: 采用 HPLC 法同时测定炮天雄和炮附片中 6 种单、双酯型生物碱含量, 比较两者成分含量差异。实验采用 Kromasil C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 以乙腈-四氢呋喃 (25:15)、0.1 mol/L 醋酸铵溶液为流动相, 采用梯度洗脱, 流速: 1 mL/min, 检测波长: 235 nm, 柱温: 30℃。结果: 与传统炮附片比较, 岭南特色炮天雄中单酯型生物碱含量较高, 毒性成分双酯型生物碱含量较低。结论: 炮天雄是一种“低毒高效”岭南特色的炮制品, 具有一定的药用价值。

[关键词] 炮天雄; 炮附片; 岭南炮制; 生物碱; 含量测定; HPLC

[中图分类号] R284 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0256-7415 (2016) 12-0220-04

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2016.12.092

Component Comparison Between Processed Tianxiong of Lingnan Characteristic and Traditional Processed Aconite Tablets

QIN Jun, GONG Youming, ZHENG Xianhui, DENG Guanghai

Abstract: Objective: To compare the difference between effective components and toxic components of processed aconite tablets and processed Tianxiong, and to illustrate the material basis of Lingnan processed Tianxiong in terms of chemical components in order to provide reference for clinical application and later research. Methods: Applied High Performance Liquid Chromatography (HPLC) to determine the six kinds of mono and double ester-alkaloids content in processed Tianxiong and processed aconite tablets at the same time, and compared the difference between the components. The experiment applied Kromasil C₁₈ column (250 mm×4.6 mm, 5 μm) and used acetonitrile-tetrahydrofuran (25:1500), 0.1 mol/L ammonium acetic acid solution as mobile phase. Gradient elution was performed. Velocity: 1 mL/min; determination of wavelength: 235 nm; column temperature: 30℃. Results: Compared with traditional processed aconite tablets, the mono ester-alkaloids content in Tianxiong of Lingnan characteristic was higher, while the double ester-alkaloids of toxic component in Tianxiong of Lingnan characteristic was lower. Conclusion: Processed Tianxiong is a kind of “less toxic and more

[收稿日期] 2016-07-12

[基金项目] 广东省科技计划项目 (2016A040403104)

[作者简介] 覃军 (1976-), 男, 副主任中药师, 研究方向: 中药饮片质量管理与控制。

[通讯作者] 邓广海, E-mail: handsomehai@126.com。