

常用“蒂达”类藏药材四数獐牙菜的成分分析

苏媛¹, 刘安平¹, 刘学良², 李维业¹, 韩天楚², 杨增亮¹, 王开祥¹, 刘海青^{2*}
(1. 西宁市食品药品检验检测中心, 西宁 810007; 2. 青海省药品审评核查中心, 西宁 810007)

摘要 目的: 建立高效液相色谱法同时测定四数獐牙菜中獐牙菜苦苷、龙胆苦苷、当药苷、当药醇苷、1-羟基-3,4,5三甲氧基吡啶酮含量的方法。方法: 采用Waters SunFire C₁₈柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 以0.05%磷酸溶液-甲醇为流动相进行梯度洗脱; 柱温30 °C, 流速1.0 mL·min⁻¹, 检测波长254 nm。结果: 獐牙菜苦苷、龙胆苦苷、当药苷、当药醇苷、1-羟基-3,4,5三甲氧基吡啶酮分别在0.0320~0.3202 μg ($r=0.9997$)、0.3788~3.7881 μg ($r=0.9998$)、0.0124~0.1237 μg ($r=0.9995$)、0.0032~0.0321 μg ($r=0.9998$)、0.0031~0.0308 μg ($r=0.9994$) 进样质量范围内呈良好的线性关系, 加样回收率分别为98.69%、97.81%、92.21%、93.44%、92.77%, RSD ($r=6$) 分别为0.76%、1.77%、1.98%、1.59%、1.79%。7批样品中獐牙菜苦苷、龙胆苦苷、当药苷、当药醇苷、1-羟基-3,4,5三甲氧基吡啶酮的测定结果分别为0.1924%~0.3740%、2.1426%~4.4514%、0.1122%~0.1973%、0.0286%~0.0339%及0.0043%~0.0938%。结论: 该方法简便、高效、灵敏、准确、经济实用, 具有良好的重复性和稳定性, 对于四数獐牙菜的质量控制、综合利用提供了有效参考依据。

关键词: 四数獐牙菜; 高效液相色谱法; 獐牙菜苦苷; 龙胆苦苷; 当药苷; 当药醇苷; 1-羟基-3,4,5三甲氧基吡啶酮; 含量测定

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 1002-7777(2022)11-1280-06
doi:10.16153/j.1002-7777.2022.11.010

Component Analysis of Swertiatetraptera

Su Yuan¹, Liu Anping¹, Liu Xueliang², Li Weiye¹, Han Tianchu², Yang Zengliang¹, Wang Kaixiang¹, Liu Haiqing^{2*} (1. Xining Center for Food and Drug Inspection & Testing, Xining 810007, China; 2. Qinghai Center for Drug Evaluation and Verification, Xining 810007, China)

Abstract Objective: To establish a HPLC method for the simultaneous determination of Swertiamarin, Gentiopicrosin, Sweroside, Dangyao alcohol glycoside and 1-hydroxy-3,4,5 trimethoxydione in Swertiatetraptera. **Methods:** Waters Sunfire C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) was used; gradient elution was carried out with methanol-0.05% phosphoric acid solution as mobile phase; the column temperature was 30 °C, the flow rate was 1.0 mL·min⁻¹, and the detection wavelength was 254 nm. **Results:** Five components have shown good linear relationship within the injection quality ranges of 0.0320-0.3202 μg ($r=0.9997$), 0.3788-3.7881 μg ($r=0.9998$), 0.0124-0.1237 μg ($r=0.9995$), 0.0032-0.0321 μg ($r=0.9998$) and 0.0031-0.0308 μg ($r=0.9994$) respectively. The recovery rates were 98.69%, 97.81%, 92.21%, 93.44% and 92.77% ($n=6$), and RSDs ($r=6$) were 0.76%, 1.77%, 1.98%, 1.59% and 1.79%. The results of the determination of the five components in 7 batches of samples

基金项目: 青海省基础科研项目(编号 2020-ZJ747)

作者简介: 苏媛 Tel: (0971) 8276896; E-mail: 25530198@qq.com

通信作者: 刘海清 Tel: (0971) 8865519; E-mail: 243701613@qq.com

were 0.1924%-0.3740%, 2.1426%-4.4514%, 0.1122%-0.1973%, 0.0286%-0.0339% and 0.0043%-0.0938% respectively. **Conclusion:** The method is simple, efficient, sensitive, accurate, economical and practical with good repeatability and stability. It provides an effective reference for the quality control and comprehensive utilization of *Swertiatetraptera*.

Keywords: *Swertiatetraptera*; HPLC; Swertiamarin; Gentiopicrin; Sweroside; Dangyao alcohol glycoside; 1-hydroxy-3,4,5 trimethoxydione; content determination

四数獐牙菜 *Swertiatetraptera* Maxim. 为龙胆科獐牙菜属植物，一年生草本，高5~30 cm，主根呈黄褐色且粗壮，产于青海、西藏、四川、甘肃等地，主要生长于海拔2000~4000 m的潮湿山坡、河滩、树林下等地^[1]；叶长圆形，花黄色，4数，花果期7~9月，全草入药^[2]，具有清肝利胆之功效，主要用于治疗黄疸型肝炎、胆囊炎等肝胆疾病^[3]。据《藏药志》^[4]记载：四数獐牙菜（译音：桑滴），现青海所用桑滴，其原植物为虎耳草科的唐古特虎耳草，但西藏及青海藏医更多地应用龙胆科獐牙菜属植物入药，虽与上述记载甚为不合，但使用已久，也较广泛。四数獐牙菜为“桑滴”的基原之一，归为“蒂达”类药材，是藏医传统使用的“蒂达”类药材的代表性品种和主要来源之一。

现代药理试验研究表明，獐牙菜属植物中含有的獐牙菜苦苷具有抑制中枢神经、促进毛发生长、镇痛抗炎等作用^[5-6]；龙胆苦苷具有保肝、抑菌、抗原虫和抗病毒，促进胃液分泌等作用^[7-8]；当药醇苷具有降血糖、保肝、抗菌、抗疟疾、治疗心血管疾病、抗氧化性等作用^[9]；吡啶类化合物主要表现出抗抑郁、抗白血病、抗肿瘤、利胆、利尿、抗菌、抗真菌、抗炎症、抗血小板、抗病毒、强心、降血糖、抗结核等活性^[10]。四数獐牙菜的主要化学成分有獐牙菜苦苷、龙胆苦苷、獐牙菜苷、芒果苷、齐墩果酸、当药黄素等^[11]，其含量测定方法已有报道^[11-12]，但未曾见用1种方法同时测定环烯醚萜苷类、黄酮类、吡啶类成分含量的相关文献。本研究通过HPLC方法的建立，首次同时测定了四数獐牙菜中獐牙菜苦苷、龙胆苦苷、当药苷、当药醇苷、1-羟基-3,4,5三甲氧基吡啶5个有效成分的含量，以期建立快速有效的含量测定方法，为

今后进一步研究四数獐牙菜提供有效试验依据，为药材质量评价及开发利用提供理论依据。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Waters2695型高效液相色谱仪、Waters 2998 PDA detector型二极管阵列检测器（沃特斯有限公司），ME204梅特勒-托利多电子天平（感量0.1 mg，梅特勒-托利多仪器（上海）有限公司），XS105DU梅特勒-托利多超越系列专业型XS分析天平（感量0.01 mg，梅特勒-托利多仪器有限公司），SB25-12DT新芝超声波清洗机（宁波新芝生物科技股份有限公司），Milli-Q2355超纯水机（密理博公司）。

1.2 对照品及试剂

獐牙菜苦苷对照品（批号 110785-201404，含量 98.3%）、龙胆苦苷对照品（批号110770-201918，含量 97.1%）购自中国食品药品检定研究院；当药苷对照品（批号 111742-200501，含量 99.27%）和1-羟基-3,4,5三甲氧基吡啶对照品（批号 111744-200501，含量 100.0%）购自中国药品生物制品检定所；当药醇苷对照品（批号 19041505，含量 99.27%）购自成都普菲德生物技术有限公司。

试验用甲醇、乙腈、磷酸均为进口色谱纯；其余试剂为分析纯；水为超纯水。

1.3 样品

7批试验用四数獐牙菜样品，均经青海省药品审评核查中心刘海青主任药师鉴定为龙胆科四数獐牙菜 *Swertiatetraptera* Maxim. 的干燥全草，样品来源见表1。

表1 样品来源表

样品编号	产地	收集时间	供样单位
S1	贵德县尕让乡	2020年8月	青海海西州蒙藏医院
S2	同德县肯穆达	2020年8月	青海海南州藏医院
S3	黄南泽库那沙和	2020年8月	青海共和县岗拉藏医院
S4	玉树州囊谦县	2020年8月	青海大学
S5	果洛州玛沁县	2020年8月	青海久美藏医院
S6	贵德县尕让乡	2020年8月	青海晶珠藏药高新技术有限公司
S7	同德县肯穆达	2020年9月	青海帝玛尔药业提供

2 方法与结果

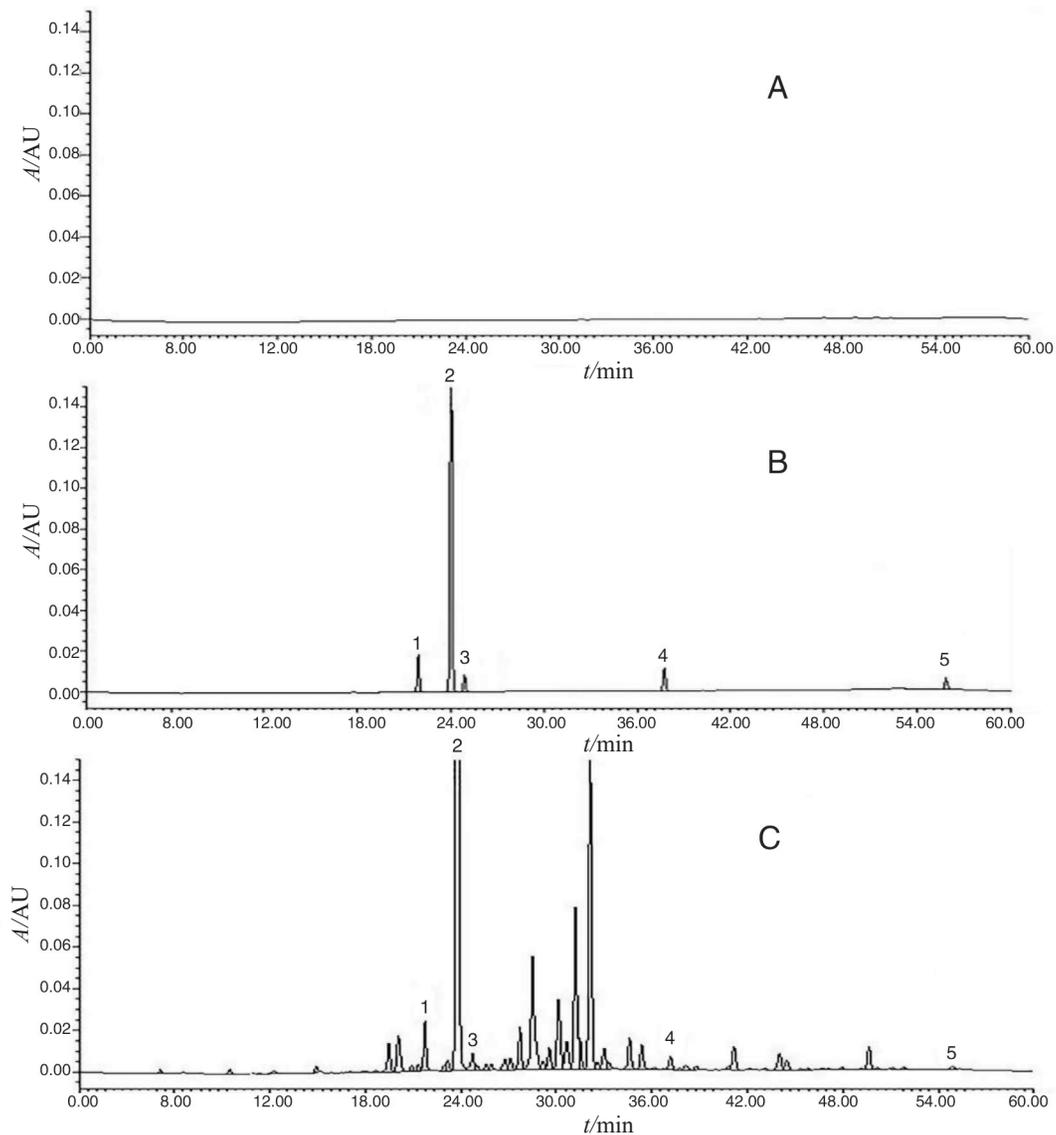
2.1 色谱条件与系统适用性试验

采用Waters SunFire C₁₈色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm), 以0.05%磷酸溶液为流动相A, 甲醇为流动相B, 进行梯度洗脱, 见表2; 流速 1.0 mL · min⁻¹; 检测波长254 nm; 柱温30 °C; 进样

量10 μL。在此色谱条件下, 獐牙菜苦苷、龙胆苦苷、当药苷、当药醇苷、1-羟基-3,4,5三甲氧基吡啶酮与样品中其他成分分离度均大于1.5, 理论板数按獐牙菜苦苷、龙胆苦苷、当药苷、当药醇苷、1-羟基-3,4,5三甲氧基吡啶酮峰计算分别不低于73820、84436、92888、164042、462155, 见图1。

表2 梯度洗脱表

时间 /min	比例 /%	
	流动相 A	流动相 B
0	90	10
7	80	20
15	65	35
30	45	55
40	35	65
45	25	75
50	25	75
55	90	10
60	90	10



A. 空白溶剂; B. 对照品; C. 供试品;

1. 獐牙菜苦苷; 2. 龙胆苦苷; 3. 当药苷; 4. 当药醇苷; 5. 1-羟基-3,4,5-三甲氧基吡啶酮。

图1 四数獐牙菜 HPLC 色谱图

2.2 对照品储备溶液的制备

精密称取獐牙菜苦苷对照品0.04072 g置50 mL量瓶中, 精密称取龙胆苦苷对照品0.09753 g置10 mL量瓶中, 精密称取当药苷对照品0.03114 g、当药醇苷对照品0.07028 g、1-羟基-3,4,5-三甲氧基吡啶酮对照品0.07692 g分别置100 mL量瓶中, 加甲醇超声使溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得。

2.3 供试品溶液的制备

取样品粉末(过3号筛)约0.2 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇25 mL, 称量, 超声(功率250 W, 频率50 kHz)处理30 min, 取

出, 放至室温, 再称量, 用甲醇补足减失的量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.4 线性关系考察

分别精密量取“2.2”项下獐牙菜苦苷对照品储备液(质量浓度 $0.8144 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)、龙胆苦苷对照品储备液(质量浓度 $9.7530 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)、当药苷对照品储备液(质量浓度 $0.3114 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)各0.20、0.40、0.80、1.00、1.60、2.00 mL, 当药醇苷对照品储备液(质量浓度 $0.7028 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)、1-羟基-3,4,5-三甲氧基吡啶酮对照品储备液(质量浓度 $0.7692 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)各0.02、0.04、0.08、0.10、

0.16、0.20 mL置50 mL量瓶中，加甲醇定容，摇匀，得不同浓度混合对照品溶液。分别取上述溶液10 μ L，按“2.1”项下色谱条件，注入液相色谱仪，测得峰面积，以峰面积 (y) 为纵坐标，对照

品进样量 (x) 为横坐标，进行线性回归分析，回归方程见表3。结果表明，5个成分在相应范围内线性关系良好。

表3 5个成分的线性回归方程

成分	回归方程	线性范围/ μ g	r
獐牙菜苦苷	$y = 19,341,167.85x + 1,140.09$	0.0320 ~ 0.3202	0.9997
龙胆苦苷	$y = 30,487,850.37x + 103,201.75$	0.3788 ~ 3.7881	0.9998
当药苷	$y = 23,489,896.42x + 1,947.42$	0.0124 ~ 0.1237	0.9995
当药醇苷	$y = 71,109,823.71x + 1,418.20$	0.0032 ~ 0.0321	0.9998
1-羟基-3,4,5三甲氧基吡啶	$y = 97,320,904.29x + 151.00$	0.0031 ~ 0.0308	0.9994

2.5 精密度试验

精密吸取“2.4”项下最高浓度混合对照品溶液，按“2.1”项下色谱条件连续进样，进样体积均为10 μ L，计算峰面积RSD ($n=6$)，分别为獐牙菜苦苷0.41%、龙胆苦苷0.12%、当药苷0.34%、当药醇苷0.47%、1-羟基-3,4,5三甲氧基吡啶0.34%。结果表明仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验

取同一样品粉末 (样品编号S1)，按“2.3”项下方法制备成供试品溶液，按“2.1”项下色谱条件分别在0、2、4、8、16、24 h时进行测定，进样体积均为10 μ L，计算峰面积RSD ($n=6$)，分别为獐牙菜苦苷0.78%、龙胆苦苷0.13%、当药苷0.47%、当药醇苷0.42%、1-羟基-3,4,5三甲氧基吡啶1.25%。结果表明供试品在24 h内稳定性良好。

2.7 重复性试验

取同一样品粉末 (样品编号S1) 平行6份，按“2.3”项下方法制备成供试品溶液，按“2.1”项下色谱条件进行分析，测定獐牙菜苦苷、龙胆苦苷、当药苷、当药醇苷、1-羟基-3,4,5三甲氧基吡啶的平均含量分别为0.377%、4.449%、0.144%、0.029%、0.004%，计算得RSD ($n=6$) 分别为0.87%、0.16%、1.18%、1.64%、2.07%。结果表明该方法重复性良好。

2.8 加样回收试验

取同一样品粉末 (样品编号 S1) 6份，每份约

0.1 g，精密称定，置锥形瓶中，分别在每份中加入獐牙菜苦苷、龙胆苦苷、当药苷、当药醇苷、1-羟基-3,4,5三甲氧基吡啶对照品储备溶液0.50、0.50、0.50、0.04、0.01 mL，按“2.3”项下方法制成供试溶液，按“2.1”项下色谱条件进行分析，测定獐牙菜苦苷、龙胆苦苷、当药苷、当药醇苷、1-羟基-3,4,5三甲氧基吡啶含量，计算平均回收率分别为98.69%、97.81%、92.21%、93.44%、92.77%，RSD ($n=6$) 分别为0.76%、1.77%、1.98%、1.59%、1.79%。表明该方法的回收率良好。

2.9 样品含量测定

分别取7批样品粉末约0.2 g，精密称定，按“2.3”项下方法制备供试品溶液，然后按“2.1”项下色谱条件进样分析，按外标法以峰面积计算，得5个待测组分的百分含量，见表4。

3 讨论

3.1 检测波长的确定

对5个化合物甲醇溶液进行全波长扫描，结果选择254 nm为检测波长时测定可兼顾5个成分最大吸收，且色谱图基线平稳，色谱峰峰形较好。故确定254 nm作为本试验的检测波长。

3.2 提取溶剂、提取方法和色谱条件的优化

对不同溶剂、提取方法、色谱条件等因素进行考察。提取溶剂上，分别以乙腈、甲醇、水、75%乙醇、75%甲醇、50%甲醇进行提取，结果以

表4 样品中5个待测成分的测定结果(%, n=3)

样品编号	獐牙菜苦苷		龙胆苦苷		当药苷		当药醇苷		1-羟基-3,4,5-三甲氧基吡啶酮	
	含量	RSD	含量	RSD	含量	RSD	含量	RSD	含量	RSD
S1	0.3740	0.28	4.4514	0.27	0.1455	0.81	0.0286	0.10	0.0043	1.98
S2	0.1924	0.48	2.8063	0.68	0.1122	0.95	0.0339	0.51	0.0318	0.69
S3	0.1881	0.37	2.1426	0.65	0.1203	0.85	0.0308	0.39	0.0158	1.41
S4	0.2360	0.35	2.1709	0.32	0.1257	0.80	0.0287	2.04	0.0162	1.43
S5	0.3658	0.75	3.0473	0.57	0.1293	0.89	0.0307	1.87	0.0084	1.49
S6	0.1974	0.71	2.1895	0.28	0.1362	0.79	0.0315	1.93	0.0163	1.74
S7	0.2506	0.34	2.5970	0.99	0.1973	0.87	0.0296	1.71	0.0938	1.83

甲醇溶剂提取效果显著。在提取方法上,通过对超声20、30、40、60 min提取,回流和索式提取30、60、120、180、240 min提取,对3种提取方法进行考察,发现采用超声提取30 min各成分提取完全、效率高,且随着时长的增加,对结果并无显著影响,所以最终采用甲醇超声处理30 min。选择色谱条件时,试验过程中选择了甲醇-水、甲醇-0.1%磷酸水、甲醇-0.05%磷酸水、乙腈-水、乙腈-0.5%磷酸水、乙腈-0.1%磷酸水、乙腈-0.05%磷酸水等流动相,从分离情况和出峰稳定性等综合分析选择甲醇-0.05%磷酸水溶液为流动相较为合适。

3.3 结论

本研究首次建立了同时测定四数獐牙菜中獐牙菜苦苷、龙胆苦苷、当药苷、当药醇苷、1-羟基-3,4,5-三甲氧基吡啶酮5个有效成分的HPLC测定方法,并进行了方法学考察,该方法简便、高效、准确、经济实用,具有良好的重复性和稳定性,为四数獐牙菜的质量评价,综合利用开发药用资源提供了重要参考依据。

参考文献:

[1] 中国科学院中国植物志编委会.中国植物志(第62卷)[M].北京:科学出版社,1988.
 [2] 中科院西北高原生物研究所.青海经济植物志[M].西宁:青海人民出版社,1987:463-465.
 [3] 西藏、青海、四川、甘肃、云南、新疆卫生局.藏药标

准[S].1979:82.

[4] 中国科学院西北高原生物研究所编著.藏药志[M].西宁:青海人民出版社,1991:111.
 [5] 孙文基,绳金房.天然活性成分简明手册[M].北京:中国医药科技出版社,1998.
 [6] 陈雷,王海波,孙晓丽,等.龙胆苦苷镇痛抗炎药理作用研究[J].天然产物研究与开发,2008,20:903-906.
 [7] 周文平,赵洪峰,王亚飞,等.秦艽种质资源主要生物学特性与龙胆苦苷含量的相关分析[J].中药材,2015,38(5):933-936.
 [8] 宫川辰治,大岛俊幸,平山总良,等.龙胆科2种苦苷的含量测定[J].药物分析杂志,1997,17(4):241.
 [9] 杨雁宾.天然产物酮类化合物[J].云南植物研究,1980,2(3):345-369.
 [10] 周永福,黄琼俭,吴明珠等.吡啶类化合物在獐牙菜属植物中的研究进展[J].广州化工,2014,42(11):9-11.
 [11] 梁永欣,林鹏程,卢永昌,等.高效液相色谱法同时测定四数獐牙菜中4种有效成分含量[J].安徽农业科学,2006(10):2163-2164.
 [12] 赵英,刘小翠,廖志明,等.HPLC同时测定四数獐牙菜中3种有效成分含量[J].广西师范大学学报(自然科学版),2016,34(1):118-121.

(收稿日期 2022年4月11日 编辑 郑丽娥)