

· 药物研究 ·

高效液相色谱法测定藏药榜嘎中榜嘎苷 A 和榜嘎苷 C 的含量

兰钧, 旺杰次仁, 阿萍 (西藏自治区食品药品检验研究院, 拉萨 850000)

摘要 目的: 建立藏药榜嘎中榜嘎苷A和榜嘎苷C的HPLC含量测定方法。方法: 采用Agilent XDB-C18 (4.6 mm×250 mm, 5 μm) 色谱柱, 以甲醇-乙腈(9:1)和0.4%磷酸为流动相, 梯度洗脱, 流速为1.0 mL·min⁻¹, 检测波长为325 nm, 柱温为30 ℃。结果: 榜嘎苷A进样量在0.1060~6.3621 μg线性关系良好(R²=1.0000), 平均回收率为98.7%; 榜嘎苷C进样量在0.1059~10.5878 μg线性关系良好(R²=0.9995), 平均回收率为99.5%。结论: 该方法经方法学验证, 可用于藏药榜嘎的质量控制。

关键词: 榜嘎; 榜嘎苷A; 榜嘎苷C; 高效液相色谱法; 含量测定

中图分类号: R927.2; R28 文献标识码: A 文章编号: 1002-7777(2018)07-0906-07

doi:10.16153/j.1002-7777.2018.07.011

Determination of the Content of Bangga Flavonoid Glycoside A and Bangga Flavonoid Glycoside C in Tibetan Herb of Bangga by HPLC

Lan Jun, Wang Jieiren, A Ping (Tibet Institute for Food and Drug Control, Lhasa 850000, China)

Abstract Objective: To establish an HPLC method for the determination of the content of Bangga flavonoid glycoside A and Bangga flavonoid glycoside C in Tibetan herb of Bangga. **Methods:** When the chromatogram column was Agilent XDB-C18 (4.6 mm×250 mm, 5 μm), the mobile phase consisted of methanol-acetonitrile (9:1) and 0.4% phosphoric acid with the gradient elution at a flow rate of 1.0 mL·min⁻¹. The detection wavelength was 325 nm and the column temperature was 30 ℃. **Results:** The calibration curve of Bangga flavonoid glycoside A had a good linear relationship in the sample range of 0.1060-6.3621 μg (R²=1.0000) and the average recovery rate was 98.7%. The calibration curve of Bangga flavonoid glycoside C also had a good linear relationship in the sample range of 0.1059-10.5878 μg (R²=0.9995) and the average recovery rate was 99.5%. **Conclusion:** The method was validated and could be used for the quality control of Tibetan herb of Bangga.

Keywords: Bangga; Bangga flavonoid glycoside A; Bangga flavonoid glycoside C; HPLC; determination of the content

榜嘎是藏族习用药材, 为毛茛科植物乌头属植物榜嘎[船盔乌头 *Aconitum naviculare* (Bruhl.) Stapf 和甘青乌头 *Aconitum tanguticum* (Maxim.) Stapf] 的干燥全草^[1-2], 主产于西藏、青海和甘肃等

藏区海拔4000~5100米的高山上, 具有清热解毒、燥湿生肌、收口等功效, 临床常用于流行感冒导致的发热、肺胃热病及肝胆热症、血症、疮疡、蛇蝎咬伤和黄水病^[3]。目前收录的藏药成方制剂中,

有41个处方含有榜嘎, 约占藏药成方制剂20%, 如十三味榜嘎散、十三味红花丸等。由于自然资源匮乏^[4], 榜嘎现都用地上部分入药, 其主要含黄酮类和生物碱类成分。有文献报道, 榜嘎不含乌头碱类成分, 这与传统藏医用药经验关于榜嘎毒性极小一致^[5-8]。本研究主要是用高效液相色谱法同时对榜嘎中2种新黄酮类结构化合物榜嘎苷A(见图1)和榜嘎苷C(见图2)进行含量测定, 此前未有文献报道过榜嘎苷A和榜嘎苷C。本课题是在研究

榜嘎特征图谱的基础上, 对榜嘎中主要黄酮类成分进行分离提取和结构鉴定^[9-13], 并制得6种对照品Clovin、刺槐苷、榜嘎苷A、榜嘎苷B、榜嘎苷C、榜嘎苷D, 由于不同样品含量差异较大且成分复杂, 因此, 选择定位分离较好的榜嘎苷A和榜嘎苷C, 建立了HPLC法测定藏药榜嘎中榜嘎苷A和榜嘎苷C的含量, 同时对采集到的17批不同产地的榜嘎药材进行测定。该方法操作简便、准确可靠、重复性良好, 可作为榜嘎质量研究的参考。

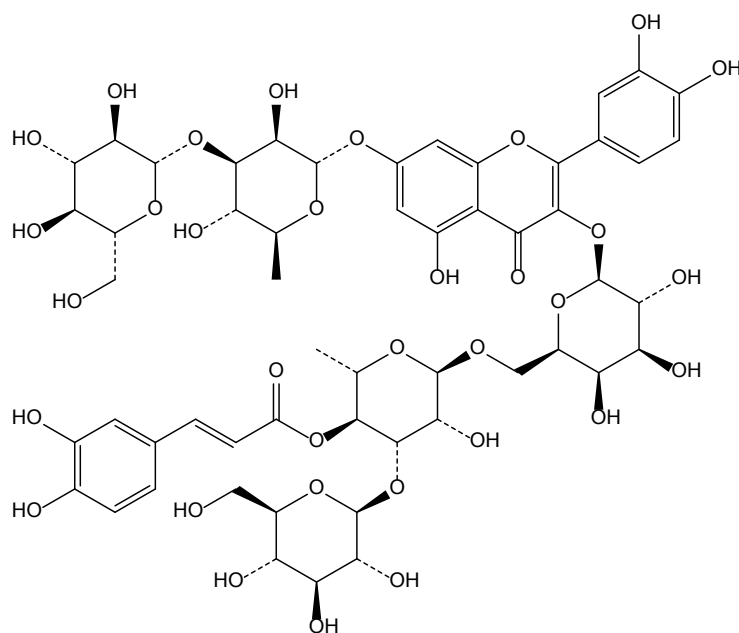


图1 榜嘎苷A结构式

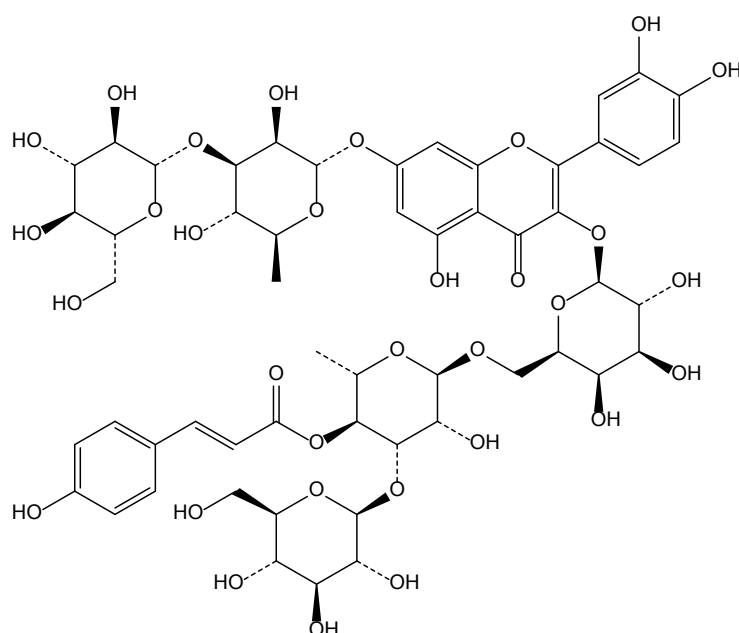


图2 榜嘎苷C结构式

1 仪器与试药

Waters 2695型高效液相色谱仪, PDA检测器, ELMA P120H型超声波清洗器(德国ELMA公司), Milli-Q 纯水系统, Mettler XS 105 Du十万分之一天平, Mettler AE240 万分之一天平。

试剂: 提取用甲醇为分析纯, 流动相体系中所用磷酸为色谱纯, 甲醇、乙腈为色谱纯, 水为超纯水。

榜嘎昔A(批号: PS010277, 纯度: 97.28%, 采用液相面积归一法)和榜嘎昔C(批号: PS010279, 纯度: 99.09%, 采用液相面积归一法)由成都普思生物科技股份有限公司分离提纯结构鉴定制备。药材主要是采购和野外采集, 产地见表1, 经西藏自治区食品药品检验研究院次旦多吉鉴定为毛茛科植物乌头属植物榜嘎[船盔乌头 *Aconitum naviculare* (Bruhl.) Stapf和甘青乌头 *Aconitum tanguticum* (Maxim.) Stapf]的地上部分。

表 1 榜嘎样品来源

编号	名称	收(采)集地点
1	榜嘎(甘青乌头)	山南/雄巴拉曲
2	榜嘎(甘青乌头)	山南/区藏药厂
3	榜嘎(甘青乌头)	青海黄南
4	榜嘎(甘青乌头)	青海/雄巴拉曲
5	榜嘎(甘青乌头)	山南/区藏药厂
6	榜嘎(甘青乌头)	青海/区藏药厂
7	榜嘎(甘青乌头)	甘肃合作
8	榜嘎(甘青乌头)	青海/久美
9	榜嘎(甘青乌头)	昌都/昌都藏药厂
10	榜嘎(甘青乌头)	青海/金河
11	榜嘎(甘青乌头)	青海海北
12	榜嘎(船盔乌头)	山南增期乡
13	榜嘎(甘青乌头)	山南隆子县
14	榜嘎(甘青乌头)	雄巴拉曲藏药厂
15	榜嘎(船盔乌头)	山南错那县

续表 1

编号	名称	收(采)集地点
16	榜嘎(甘青乌头)	青海
17	榜嘎(甘青乌头)	甘南合作市

2 方法和结果

2.1 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱: Agilent XDB-C18 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相A: 甲醇-乙腈(9:1)和流动相B: 0.4%磷酸, 梯度洗脱(见表2); 流速: 1 mL · min⁻¹; 检测波长: 325 nm; 柱温: 30 °C; 进样量: 10 μL。色谱图见图3。

表 2 梯度洗脱程序

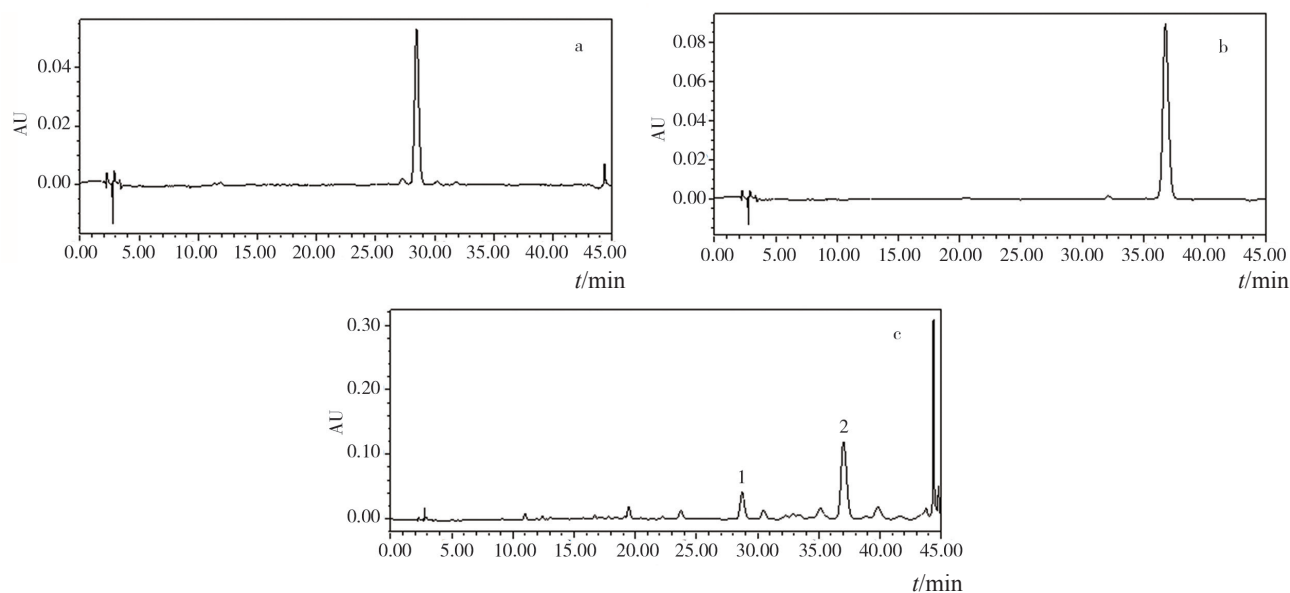
时间 /min	流动相 A/%	流动相 B/%
0	10	90
10	30	70
20	31	69
30	33	67
40	33	67
41	50	50
45	10	90

2.2 对照品溶液的制备

精密称取榜嘎昔A对照品21.80 mg和榜嘎昔C对照品21.37 mg, 分别置10 mL量瓶中, 用甲醇溶解并定容至刻度, 即得各对照品储备液; 分别取各对照品储备液适量, 置10 mL量瓶中, 加甲醇配制成含榜嘎昔A 101.79 μg · mL⁻¹和榜嘎昔C 101.64 μg · mL⁻¹的混合溶液, 作为对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备

精密称取榜嘎药材粉末(过三号药筛)1 g, 置具塞锥形瓶, 精密加入甲醇10 mL, 称定重量, 超声处理(功率: 300 W, 频率: 40 kHz) 30 min, 取出, 放置室温, 称重, 用甲醇补足减失的重量, 摇匀, 用0.45 μm的微孔滤膜过滤, 取续滤液, 作为供试品溶液。



a. 榜嘎昔 A 对照品溶液; b. 榜嘎昔 C 对照品溶液; c. 供试品; 1. 榜嘎昔 A; 2. 榜嘎昔 C。

图 3 榜嘎 HPLC 色谱图

2.4 线性关系考察

精密吸取榜嘎昔 A 对照品储备液 0.05、0.1、1.0、3.0、5.0 mL，榜嘎昔 C 对照品储备液 0.05、0.1、1.0、3.0、5.0 mL，分别置 5 个 10 mL 量瓶中，加甲醇定容至刻度，制成不同浓度的混合对照品溶液，按上述色谱条件测定，以对照品的进样量

X (μg) 为横坐标，以峰面积 Y 为纵坐标，进行线性回归，各被测成分回归方程和线性范围见表 3。结果表明，榜嘎昔 A 进样量在 0.1060~6.3621 μg 与峰面积呈良好的线性关系；榜嘎昔 C 进样量在 0.1059~10.5878 μg 与峰面积呈良好的线性关系。

表 3 各被测成分的回归方程、相关系数和线性范围

成分	回归方程	R^2	线性范围 / ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)
榜嘎昔 A	$Y=11261X-10426$	1.0000	10.6035~636.2112
榜嘎昔 C	$Y=14204X-107258$	0.9995	10.5878~1058.7767

2.5 精密度试验

精密吸取“2.2”节混合对照品溶液 10 μL ，连续进样 6 次，记录峰面积。结果榜嘎昔 A 和榜嘎昔 C 峰面积的 RSD ($n=6$) 分别为 0.42% 和 0.60%，表明仪器精密度良好。

2.6 重复性试验

取样品粉末 (9 号样品) 6 份，分别按照“2.3”节方法制备供试品溶液，按“2.1”节色谱条件测定，记录峰面积，计算含量。结果供试品溶液中榜嘎昔 A 和榜嘎昔 C 的 RSD 分别为 1.34% 和 1.53%，表明重复性良好。

2.7 稳定性试验

取同一份供试品溶液 (9 号样品)，分别于配制后 0、2、4、8、12、24 h 进样测定。结果榜嘎昔 A 峰面积的平均值为 191.5346，RSD 为 1.01%，榜嘎昔 C 峰面积的平均值为 417.8482，RSD 为 1.08%，表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.8 加样回收试验

取已知含量的样品粉末 (9 号样品) 6 份，每份各约 0.50 g，精密称定，置具塞锥形瓶中，分别精密加入浓度为 0.8483 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的榜嘎昔 A 对照品溶液和浓度为 1.694 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的榜嘎昔 C 对照品溶

液各1.0 mL, 加入提取溶液甲醇8 mL, 按照“2.3”节方法平行制备供试品溶液, 进样分析, 计算回收

率, 结果见表4、5, 表明该方法加样回收试验结果良好。

表4 榜嘎苷 A 加样回收率试验结果 ($n=6$)

称样量 /g	样品中的量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD/%
0.5011	0.8569	0.8483	1.684	97.50	98.7	1.0
0.5021	0.8586	0.8483	1.694	98.48		
0.5032	0.8605	0.8483	1.706	99.67		
0.5019	0.8582	0.8483	1.691	98.17		
0.5027	0.8596	0.8483	1.695	98.48		
0.5038	0.8615	0.8483	1.710	100.02		

表5 榜嘎苷 C 加样回收率试验结果 ($n=6$)

称样量 /g	样品中的量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD/%
0.5011	1.6637	1.694	3.342	99.08	99.5	0.4
0.5021	1.6670	1.694	3.350	99.35		
0.5032	1.6706	1.694	3.361	99.79		
0.5019	1.6663	1.694	3.344	99.04		
0.5027	1.6690	1.694	3.354	99.47		
0.5038	1.6726	1.694	3.368	100.08		

2.9 样品的测定

每个样品取2份, 分别按“2.3”节方法制备供试品溶液。精密吸取各供试品溶液10 μ L, 按“2.1”节色谱条件进行测定, 用外标法计算17批榜嘎中2个有效成分的含量, 结果见表6。

3 讨论

3.1 测定波长的选择

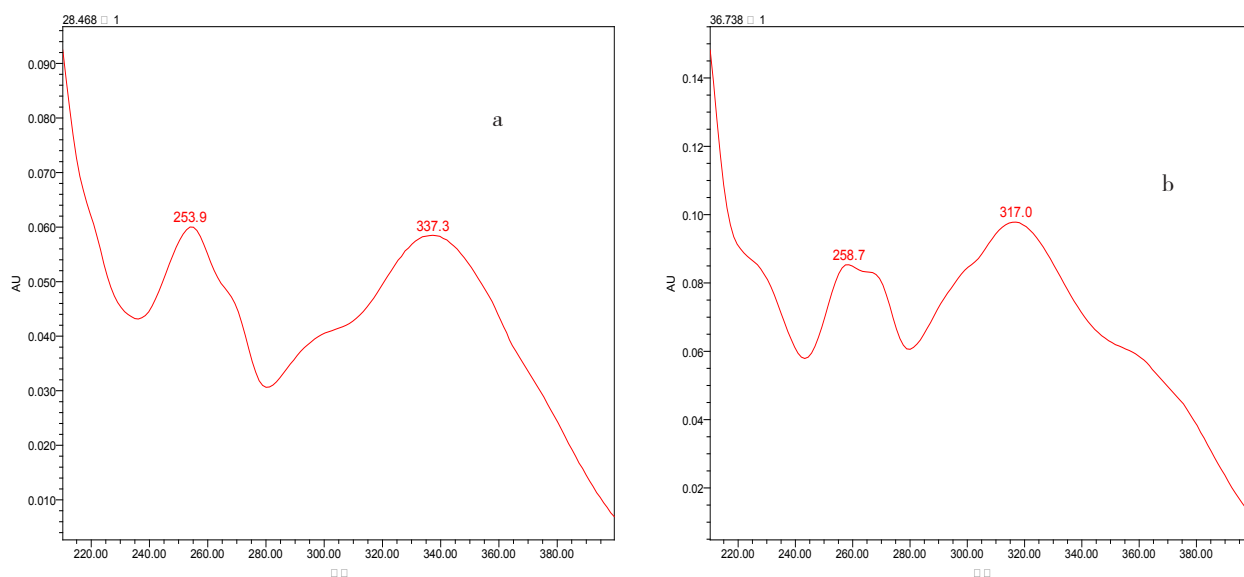
榜嘎苷A和榜嘎苷C在325 nm处均有较高吸收, 故选择检测波长为325 nm。见图4。

表6 榜嘎中2种成分含量测定结果

编号	样品来源	榜嘎苷 A/%	榜嘎苷 C/%
1	山南 / 雄巴拉曲	0.303	0.292
2	山南 / 区藏药厂	0.253	0.202
3	青海黄南	0.095	0.121
4	青海 / 雄巴拉曲	0.034	0.054

续表 6

编号	样品来源	榜嘎苷 A/%	榜嘎苷 C/%
5	山南 / 区藏药厂	0.078	0.382
6	青海 / 区藏药厂	0.052	0.061
7	甘南合作	0.054	0.079
8	青海 / 久美	0.136	0.272
9	昌都 / 昌都藏药厂	0.171	0.332
10	青海 / 金河	0.138	0.045
11	青海海北	0.149	0.182
12	山南增期乡	0.117	0.253
13	山南隆子县	0.046	0.434
14	雄巴拉曲藏药厂	0.408	0.780
15	山南错那县	0.076	0.282
16	青海	0.015	0.039
17	合甘南作市	0.016	0.037



a. 榜嘎苷 A 紫外吸收光谱图; b. 榜嘎苷 C 紫外吸收光谱图。

图 4 紫外吸收光谱图

3.2 流动相的选择

针对榜嘎昔A和榜嘎昔C属于黄酮类化合物的性质,分别考察了不同流动相系统甲醇-水、甲醇-磷酸水溶液、乙腈-水、乙腈-磷酸水溶液的分离效果,发现甲醇-磷酸水溶液的分离效果较好,进而优选确定甲醇-乙腈(9:1)和0.4%磷酸作为流动相梯度洗脱,各色谱峰保留时间适中,分离较好。

3.3 供试品溶液制备方法的确定

在试验过程中,分别考察了以100%、70%、50%甲醇作为溶剂的提取效果,结果显示:100%甲醇作为溶剂提取效果最佳。又以100%甲醇作为提取溶剂,比较了超声20、30、40 min的提取效率,结果显示:超声30 min提取较完全。故选择甲醇作为提取溶剂,超声30 min作为前处理条件。

3.4 结果分析

榜嘎样品中不同成分的含量差异较大,但是17批样品中均含有榜嘎昔A和榜嘎昔C,为共有化合物。因此,本文选择分离度较好、特征性较强的这两种成分,建立了HPLC含量测定方法。17批样品中有1批样品榜嘎昔A含量高达0.408%,榜嘎昔C含量高达0.780%。

参考文献:

- [1] 中国药典:一部[S]. 2010: 附录285-286.
- [2] 罗达尚. 新修晶珠本草[M]. 成都: 四川科学技术出版社, 2004: 245-247.
- [3] 国家药典委员会. 中华人民共和国卫生部药品标准藏药: 第一册[S]. 1995: 85.

- [4] 刘志明. 藏药榜嘎那的资源调查和药用合理性评价[D]. 北京: 北京中医药大学, 2013.
- [5] 罗明. 藏药榜嘎化学成分和药理作用的研究进展[J]. 中国实验方剂学, 2012, 18(12): 299.
- [6] 赵翡翠, 李杰. 我国乌头属药用植物中生物碱分析方法的研究进展[J]. 中药材, 2010, 33(8): 1351.
- [7] 贾庆文, 闫滨. 乌头类药物的毒性研究及唐古特乌头的研究概述[J]. 食品与药品, 2012, 14(7): 300.
- [8] 康慧, 骆桂法, 杨凤梅, 等. 藏药榜嘎中的双酯型和内酯型生物碱分析方法研究[J]. 西北药学杂志, 2014, 29(5): 443-446.
- [9] 李艳茸, 李春, 王智明, 等. 藏药甘青乌头化学成分研究: III[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(7): 1163-1167.
- [10] 兰钧, 夏柯, 李启发, 等. 藏药榜嘎中黄酮类化学成分的研究[J]. 药物分析杂志, 2018, 38(6): 965-974.
- [11] 叶敏, 阎玉凝, 乔梁, 等. 中药菟丝子化学成分研究[J]. 中国中药杂志, 2002, 27(2): 115-117.
- [12] Bharat B. S., Dall'Acqua S., Gewali MB., et al. New Flavonoid Glycosides from Aconitum Naviculare (Brühl) Stapf, a Medicinal Herb from the Trans-Himalayan Region of Nepal[J]. Carbohydrate Research, 2006, 341, 2161-2165.
- [13] Mariani C, Braca A, Vitalini S, et al. Flavonoid Characterization and in vitro Antioxidant Activity of Aconitum Anthora L. (Ranunculaceae) [J]. Phytochemistry, 2008, 69(5): 1220-1226.

(收稿日期 2017年10月26日 编辑 王雅雯)