

基于 HPLC 特征图谱和主要成分含量测定的龙胆药材干燥方法研究

刘姝静, 刘玉强, 戚晓杰, 刘育含, 吕新, 孙建之, 才谦* (辽宁中医药大学药学院, 辽宁 大连 116600)

摘要: 目的 通过测定龙胆药材不同干燥方法所得样品的 HPLC 特征图谱及 3 种主要成分的含量, 确定龙胆药材的最佳干燥方法。方法 采用 Welchrom C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-水, 梯度洗脱; 流速: 1.0 mL·min⁻¹; 进样量: 10 μL; 检测波长: 240 nm; 柱温: 25 ℃。结果 建立了龙胆药材鲜品及不同方法干燥后样品的 HPLC 特征图谱, 同时测定了样品中 3 种主要成分的含量。结论 龙胆药材的最佳干燥方法为阴干法。

关键词: 龙胆; 干燥方法; 特征图谱; 含量测定; 龙胆苦苷; 獐牙菜苦苷; 獐牙菜苷

中图分类号: R284.1 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2018)07-1012-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2018.07.015

引用本文: 刘姝静, 刘玉强, 戚晓杰, 等. 基于 HPLC 特征图谱和主要成分含量测定的龙胆药材干燥方法研究[J]. 中国现代应用药学, 2018, 35(7): 1012-1015.

Study on Drying Methods of *Gentiana Scabra* Bge. Based on HPLC Characteristic Fingerprints and Content Determination of Main Components

LIU Shujing, LIU Yuqiang, QI Xiaojie, LIU Yuhang, LYU Xin, SUN Jianzhi, CAI Qian* (College of Pharmacy, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To confirm the optimal drying method of *Gentiana scabra* Bge. based on HPLC characteristic fingerprint and contents determination of three main components in the samples. **METHODS** The condition was as follows: Welchrom C₁₈ column(4.6 mm×250 mm, 5 μm); mobile phase: methanol-water with gradient elution; flow rate: 1 mL·min⁻¹; injection volume: 10 μL; detection wavelength: 240 nm; column temperature: 25 ℃. **RESULTS** The HPLC characteristic fingerprint of *Gentiana scabra* Bge. was established, while the contents of 3 main components in samples of fresh and different drying methods were determined. **CONCLUSION** The shade drying is the optimal drying method of *Gentiana scabra* Bge. **KEY WORDS:** *Gentiana scabra* Bge.; drying methods; characteristic fingerprint; content determination; gentiopicroside; swertiamarin; sweroside

龙胆为龙胆科植物条叶龙胆 *Gentiana manshurica* Kitag.、龙胆 *Gentiana scabra* Bge.、三花龙胆 *Gentiana triflora* Pall.或坚龙胆 *Gentiana rigescens* Franch.的干燥根和根茎^[1], 味苦、寒, 具有清热燥湿, 泻肝胆火的功效。现代研究显示, 龙胆中富含以单萜类化学成分为主要组成的裂环环烯醚萜苷, 以及多糖、生物碱、黄酮、甾体、香豆素、挥发油及内酯等多种成分^[2-5], 具有显著的生物活性, 是发挥传统功效的主要物质基础^[6-9]。

龙胆一般于春、秋两季植株枯萎或新芽萌动前采收, 采收后采用阴干或晒干的方法进行干燥^[10-11]。本实验比较传统的晒干法、阴干法以及微波干燥法、真空冷冻干燥法等现代多种干燥方法对龙胆化学成分的影响, 采用 HPLC 建立不同干燥方法所得样品的特征图谱, 并测定不同样品中龙胆苦

苷、獐牙菜苦苷和獐牙菜苷 3 个主成分的含量, 通过比较确定龙胆药材的最佳干燥方法。

1 仪器和试剂

1.1 仪器

Agilent 1100 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司); SG-3300H 型超声波清洗器(上海冠特超声仪器有限公司); CP225D 型电子天平(十万分之一, 德国 Sartorius 公司); DHG-9070A 型电热恒温鼓风干燥箱(上海精宏实验设备有限公司); FD-1A-55 型真空冷冻干燥机(北京博医康实验仪器有限公司); MZC-2070M1 型微波炉(青岛海尔家电服务有限公司)。

1.2 试剂

甲醇(色谱醇, 天津市科密欧化学试剂有限公司); 纯净水(杭州娃哈哈集团有限公司); 龙胆苦

基金项目: 国家中药标准化项目(ZYBZH-Y-TJ-43)

作者简介: 刘姝静, 女, 硕士生 Tel: 13709883405
(0411)85890122 E-mail: caiqianmail@sina.com

E-mail: 631711116@qq.com

*通信作者: 才谦, 女, 博士, 教授 Tel:

苷对照品(批号: 20160630, 供含量测定用)、獐芽菜苦苷对照品(批号: 20160413, 供含量测定用)、獐牙菜苷对照品(批号: 20160611, 供含量测定用)均购自江苏永健医药科技有限公司。

1.3 药材

龙胆药材购于辽宁省清原县, 经辽宁中医药大学鉴定教研室李峰教授鉴定为龙胆 *Gentiana scabra* Bge. 的干燥根和根茎。

2 方法与结果

2.1 龙胆生品预处理及其干燥处理

取新鲜龙胆, 流水清洗干净, 沥干, 切成长短为 15 mm 的段状, 待干燥处理。将预处理的龙胆鲜品平均分成 6 份, 其中 5 份分别进行自然阴干(S2)、自然晒干(S3)、热风烘干(S4)、真空冷冻干燥(S5)和微波干燥(S6)处理至恒重, 粉碎过 4 号筛, 置干燥器中。另一份为龙胆鲜品(S1, 折干率为 33.63%)。样品制备前, 逐个测定样品的实际水分含量。5 种干燥方法的干燥条件和折干率见表 1。

表 1 5 种干燥方法下的干燥条件

Tab. 1 The conditions of five drying methods

干燥方法	干燥条件	折干率/%
自然阴干(S2)	置阴凉通风处晾干	26.16
自然晒干(S3)	置通风处晒干	29.39
热风烘干(S4)	置 45 °C 烘箱中干燥 28 h	36.82
真空冷冻干燥(S5)	置真空冷冻干燥机(10 Pa, -47 °C)中干燥 11 h	35.03
微波干燥(S6)	置微波炉中用中低火干燥 4.5 h	32.45

2.2 龙胆不同干燥方法所得样品 HPLC 特征图谱的建立

2.2.1 色谱条件 色谱柱: Welchrom C₁₈(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇(A)-水(B), 梯度洗脱(0~25 min, 8%→45%A; 25~35 min, 45%→48%A; 35~45 min, 48%→65%A; 45~50 min, 65%→90%A); 流速: 1.0 mL·min⁻¹; 进样量: 10 μL; 柱温: 25 °C; 检测波长: 240 nm。

2.2.2 溶液的制备 对照品溶液的制备: 取龙胆苦苷、獐牙菜苦苷、獐牙菜苷 3 种对照品适量, 精密称定, 分别加甲醇制成浓度为 0.48 mg·mL⁻¹、60 μg·mL⁻¹ 及 30 μg·mL⁻¹ 的对照品溶液。分别精密量取各对照品溶液适量, 加甲醇制成浓度为 0.16 mg·mL⁻¹, 20, 10 μg·mL⁻¹ 的混合对照品溶液。

供试品溶液的制备: 称取各样品粉末(过 4 号筛)0.5 g, 精密称定, 精密加入甲醇 25 mL, 称定质量, 超声提取 30 min, 放冷, 再次称重, 甲醇补足减失的质量, 摇匀, 过滤, 滤液经 0.45 μm 微

孔滤膜滤过, 取续滤液制成供试品溶液。另取龙胆鲜品搅拌粉碎, 称取同等质量, 精密称定后同法操作。所有供试品溶液均避光冷藏备用。

2.2.3 仪器精密度试验 取同一份供试品溶液, 按“2.2.1”项下色谱条件连续进样 6 次, 每次 10 μL, 记录特征图谱, 测定各主要色谱峰的峰面积。测定结果显示, 各主要色谱峰的峰面积 RSD 为 2.41%~2.81%, 表明仪器精密度良好。

2.2.4 稳定性试验 取同一批次的龙胆粉末, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 于 0, 4, 8, 12, 24, 48 h 精密吸取供试品溶液 10 μL 分别进样, 按“2.2.1”项下色谱条件测定, 记录特征图谱, 测定各主要色谱峰面积。测定结果显示, 各主要色谱峰的峰面积 RSD 为 0.27%~1.76%, 均符合要求, 表明 48 h 内供试品溶液稳定。

2.2.5 重复性试验 取同一批次的龙胆粉末, 平行精密称定 6 份, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.2.1”项下色谱条件测定, 记录特征图谱, 测定各主要色谱峰的峰面积 RSD 为 0.10%~0.42%, 说明本试验重复性良好。

2.3 不同干燥方法所得样品 HPLC 特征图谱的测定 分别将供试品溶液(S1~S6)按照“2.2.1”项下色谱条件进样分析, 每次 10 μL, 测定样品的特征图谱, 应用国家药典委员会中药指纹图谱评价系统(2012 版), 生成龙胆鲜品及不同干燥方法所得样品的特征图谱, 进行各样品间的相似度评价, 经色谱图匹配共获取 17 个共有峰。经过与混合对照品比对, 指认其中的 3 个共有峰, 分别为 5 号峰(獐牙菜苦苷)、7 号峰(龙胆苦苷)、9 号峰(獐牙菜苷)。结果见图 1~2, 表 2。

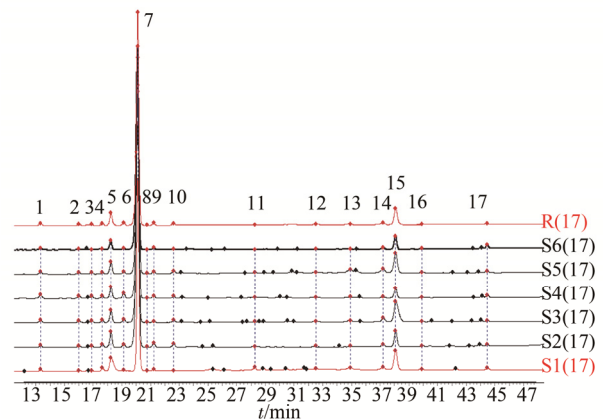


图 1 龙胆鲜品及不同干燥方法所得样品的 HPLC 特征谱图
Fig. 1 The HPLC characteristic fingerprints of fresh and different drying methods of *Gentiana scabra* Bge.

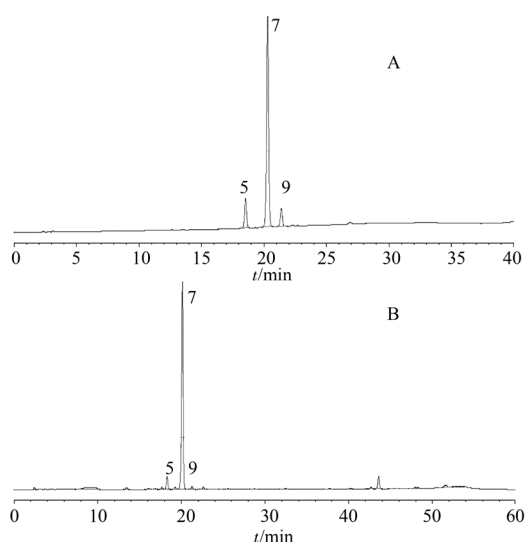


图2 高效液相色谱图

A-混合对照品溶液; B-供试品溶液; 5-獐牙菜苦苷; 7-龙胆苦苷; 9-獐牙菜苷。

Fig. 2 HPLC chromatograms

A-mixed standard solution; B-standard solution; 5-swertiamarin; 7-gentiopicroside; 9-sweroside.

表2 龙胆鲜品及龙胆不同干燥方法 HPLC 特征图谱相似度评价

Tab. 2 Similarity evaluation for HPLC characteristic fingerprints of fresh and different drying methods of *Gentiana scabra* Bge.

	S1	S2	S3	S4	S5	S6	对照 指纹图谱
S1	1	0.999	0.999	0.999	0.999	0.997	0.999
S2	0.999	1	0.999	0.999	0.999	0.998	1
S3	0.999	0.999	1	0.999	1	0.998	1
S4	0.999	0.999	0.999	1	0.999	0.997	0.999
S5	0.999	0.999	1	0.999	1	0.998	1
S6	0.999	0.998	0.998	0.997	0.998	1	0.998
对照指 纹图谱	0.999	1	1	0.999	1	0.998	1

由表2可知,与对照指纹图谱相比,鲜品及5种干燥方法得到的样品相似度均>0.9,说明5种干燥方法对龙胆药材中的化学成分影响较小,样品间差异相对较小。

2.4 不同干燥方法样品中龙胆苦苷、獐牙菜苦苷和獐牙菜苷的含量测定

2.4.1 色谱条件 同“2.2.1”项下色谱条件。

2.4.2 线性范围考察 精密称取龙胆苦苷对照品12.00 mg,加甲醇定容至5 mL,制成浓度为2.4 mg·mL⁻¹的对照品储备液,分别精密吸取该储备液0.1,0.2,0.3,0.4,0.5,1.0 mL定容至1 mL量瓶中,加甲醇定容至刻度,依次精密吸取10 μL注入高效液相色谱仪,测定色谱峰面积。以龙胆苦苷对照品进样量为横坐标(x, μg),色谱峰面积为纵坐标(y),绘制标准曲线,经线性回归,方程

为: $y=876.45x-18.319$, $r=0.999$ 。测定结果显示龙胆苦苷在2.4~24 μg内线性关系良好。

另精密称取獐牙菜苦苷对照品7.54 mg,加甲醇定容至25 mL,制成浓度为0.3016 mg·mL⁻¹的对照品储备液,分别精密吸取该储备液0.5,1.0,2.0,3.0,4.0,5.0 mL,置于10 mL量瓶中,加甲醇定容至刻度,依次精密吸取10 μL注入高效液相色谱仪,测定峰面积。以獐牙菜苦苷对照品进样量为横坐标(x, μg),色谱峰面积为纵坐标(y),绘制标准曲线,经线性回归,回归方程为: $y=1668.4x+0.5613$, $r=0.9998$ 。测定结果显示獐牙菜苦苷在0.1508~1.5080 μg内线性关系良好。

另精密称取獐牙菜苷对照品7.53 mg,加甲醇定容至250 mL,制成浓度为30.12 μg·mL⁻¹的对照品储备液,分别精密吸取该储备液2,3,4,5,6,7 mL,分别置10 mL量瓶中,加甲醇定容至刻度,摇匀,各精密吸取10 μL注入高效液相色谱仪,测定峰面积。以獐牙菜苷对照品进样量为横坐标(x, μg),色谱峰面积为纵坐标(y),绘制标准曲线,经线性回归,回归方程为: $y=1864.4x-17.728$, $r=0.9991$ 。测定结果显示獐牙菜苷在0.06024~0.21084 μg内线性关系良好。

2.4.3 仪器精密度试验 取同一份供试品溶液,按“2.4.1”项下色谱条件连续进样6次,每次10 μL,记录特征图谱,分别测定龙胆苦苷、獐牙菜苦苷及獐牙菜苷色谱峰的峰面积。测定结果显示,龙胆苦苷、獐牙菜苦苷与獐牙菜苷色谱峰的峰面积RSD分别为0.87%、1.06%及0.97%,说明仪器精密度良好。

2.4.4 稳定性试验 取同一批次的龙胆粉末,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,于0,4,8,12,24,48 h精密吸取供试品溶液10 μL分别进样,按“2.4.1”项下色谱条件测定龙胆苦苷、獐牙菜苦苷及獐牙菜苷色谱峰的峰面积。结果提示:龙胆苦苷、獐牙菜苦苷及獐牙菜苷色谱峰的峰面积RSD分别为0.31%、0.47%与0.98%,均符合要求。说明48 h内供试品溶液稳定性良好。

2.4.5 重复性试验 取同一批次的龙胆粉末6份,精密称定,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.4.1”项下色谱条件进样,测定龙胆苦苷、獐牙菜苦苷、獐牙菜苷色谱峰的峰面积,并计算其含量。结果显示,龙胆苦苷、獐牙菜苦苷及獐牙菜苷的含量RSD分别为0.06%,0.49%,1.27%,表明本试验重复性良好。

2.4.6 加样回收率试验 称取已知含量的样品 6 份, 每份 0.25 g, 精密称定, 分别精密加入一定量的对照品溶液, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 测定回收率。测得龙胆苦苷平均回收率为 99.37%, RSD 为 0.53%; 獐牙菜苦苷的平均回收率为 97.59%, RSD 为 1.43%; 獐牙菜苷的平均回收率为 97.36%, RSD 为 1.47%, 本试验加样回收率符合有关规定。

2.4.7 含量测定 取龙胆鲜品及不同干燥方法的龙胆供试品溶液, 按照“2.4.1”项下色谱条件分别测定, 计算各供试品溶液中龙胆苦苷、獐牙菜苦苷、獐牙菜苷的含量(结果折合成干燥品计算)。结果见表 3。

表 3 样品含量测定结果($n=3$)

Tab. 3 Results of sample determination($n=3$)

样品	含量/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$		
	龙胆苦苷	獐牙菜苦苷	獐牙菜苷
S1	129.69	4.67	0.60
S2	120.67	3.72	0.88
S3	92.31	3.06	0.37
S4	97.16	2.90	0.61
S5	94.15	2.30	0.51
S6	99.33	2.86	0.56

由表 3 可知, 5 种干燥方法对龙胆中 3 种主要成分的含量均有不同程度的影响, 其中龙胆苦苷的含量是自然晒干<真空冷冻干燥<热风烘干<微波干燥<自然阴干, 獐牙菜苦苷的含量是真空冷冻干燥<微波干燥<热风烘干<自然晒干<自然阴干, 獐牙菜苷的含量是自然晒干<真空冷冻干燥<微波干燥<热风烘干<自然阴干。综上所述, 自然阴干样品中 3 种指标性成分含量最高, 故选用自然阴干方法。

3 讨论

龙胆药材的提取方法考察中分别采用了超声、回流的方法, 结果发现 2 种提取方法对龙胆苦苷含量的影响较小, 但超声提取中獐牙菜苦苷和獐牙菜苷的含量明显高于回流提取, 故本试验选择超声提取方法。

本试验分别对龙胆苦苷、獐牙菜苦苷和獐牙菜苷对照品溶液进行全波长扫描, 结果显示, 龙胆苦苷的最大吸收波长在 270 nm, 獐牙菜苦苷和獐牙菜苷的最大吸收波长分别在 236 nm 和 245 nm。中国药典 2015 年版中选用 270 nm 作为龙胆苦苷的检测波长, 而在 270 nm 处獐牙菜苦苷和獐牙菜苷吸收不明显, 因此为便于 3 种成分的同时测定, 选用 240 nm 作为检测波长。

本试验建立了同时测定龙胆药材中龙胆苦苷、獐牙菜苦苷及獐牙菜苷含量的 HPLC 方法, 该方法对龙胆中 3 种指标性成分的分离度高, 峰形良好, 符合含量测定的要求。

由本试验结果可知, 采用自然阴干的方法, 龙胆中龙胆苦苷、獐牙菜苦苷及獐牙菜苷含量最高, 而采用自然晒干、热风烘干与微波干燥这 3 种干燥方法时含量较低, 这可能是由于干燥时的温度促使龙胆苦苷、獐牙菜苦苷及獐牙菜苷中的缩醛结构发生变化或温度升高促使药材自身的酶解加快^[12-13]。真空冷冻方法相对于鲜品来说含量变化较大, 且成本较高。综合以上因素, 建议龙胆鲜品最佳干燥方法为阴干法。

REFERENCES

- [1] 中国药典. 一部[S]. 2015: 96.
- [2] SHEN T, JIN H, WANG Y Z, et al. Research progress in the chemical constituents of Radix Gentianae [J]. J Anhui Agric Sci(安徽农业科学), 2010, 38(30): 16868-16870.
- [3] WANG C J, WANG Z M, WANG W H, et al. Advances in chemical components and pharmacology of genus *Gentiana* [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2009, 34(23): 2987-2994.
- [4] WANG Y Y, WANG Y P, WANG X J, et al. The research progress of the chemical components and the pharmacology of *Gentiana scabra* Bge. [J]. Spec Wild Econ Anim Plant Res(特产研究), 2006, 28(3): 68-70.
- [5] 刘涛, 才谦, 付玉芹. 中药龙胆的研究进展[J]. 辽宁中医杂志, 2004, 31(1): 85-86.
- [6] 曾文雪, 宋小玲, 张尧, 等. 龙胆苦苷药理学活性及药理学研究进展[J]. 江西中医药, 2014, 45(375): 69-71.
- [7] LYU L J, WANG Y F, YAN T, et al. Preparation of swertianolin from *Gentianella acuta* and its effects on arrhythmia induced by aconitine in mice [J]. Chin J New Drugs Clin Rem(中国新药与临床杂志), 2015, 34(8): 630-635.
- [8] YANG L F, PAN R X, LIU D, et al. Clinical efficacy and mechanism study of Shiwei Longdanhua granula on the patients with acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease[J]. Pharm Today(今日药学), 2017, 27(2): 105-108.
- [9] ZHU H Y, ZHANG L, FENG B. Comparison of ultrasonic method and smashing tissue extraction process of gentiopicroside from *Gentianae Radix et Rhizoma* [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2011, 28(5): 395-398.
- [10] 李爱民, 张悦, 张正海. 关龙胆规范化栽培技术[J]. 吉林林业科技, 2014, 43(2): 60-62.
- [11] 王喜军, 徐英红, 吴修红. 规范化种植龙胆最适加工方法研究[J]. 中医医学报, 2004, 32(2): 19-21.
- [12] XU Q X, LI X F, SHU Y, et al. Influence of drying methods on the content of gentiopicroside in *Gentiana scabra* processed products [J]. China Pharm(中国药房), 2013, 24(7): 622-624.
- [13] RAO G X, PU J Y, GAO Y L, et al. Effect of processing methods on the quantity of gentiopicroside of *Radix Gentianae* [J]. J Yunnan Coll Tradit Chin Med(云南中医学院学报), 2002, 25(2): 1-2.

收稿日期: 2017-09-01

(本文责编: 李艳芳)