

# 龙胆药材中龙胆苦苷和马钱子苷酸含量的测定及其指纹图谱研究

李文龙<sup>1</sup>, 陈军辉<sup>1,2</sup>, 殷月芬<sup>1,2</sup>, 吴凤琪<sup>1</sup>, 杨佰娟<sup>1</sup>, 杨黄浩<sup>1</sup>, 王小如<sup>1,3\*</sup>

(1. 国家海洋局第一海洋研究所 现代分析技术及中药标准化重点实验室, 山东 青岛 266061; 2. 中国海洋大学 化学化工学院, 山东 青岛 266003; 3. 厦门大学 化学化工学院 现代分析科学教育部重点实验室, 福建 厦门 361005)

关键词: 龙胆; 龙胆苦苷; 马钱子苷酸; 飞行时间质谱; 指纹图谱

中图分类号: R 284.2 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2007)05-0566-05

## Content of gentiopicroside and loganic acid in *Radix gentianae* and their fingerprints

LIW en-long<sup>1</sup>, CHEN Jun-hui<sup>1,2</sup>, YIN Yue-fen<sup>1,2</sup>, WU Feng-qi<sup>1</sup>, YANG Bai-juan<sup>1</sup>, YANG Huang-hao<sup>1</sup>, WANG Xiao-ru<sup>1,3\*</sup>

(1. Qingdao Key Lab of Analytical Technology Development and Standardization of Chinese Medicines First Institute Oceanography of State Oceanic Administration People's Republic of China, Qingdao 266061, China; 2. College of Chemistry and Chemical Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266003, China; 3. Key Laboratory of Analytical Science of Ministry of Education, College of Chemistry and Chemical Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

**Abstract** To develop a HPLC-DAD-ESI/TOF/MS analysis method for the determination of gentiopicroside and loganic acid in *Radix gentianae* samples and for the research of their fingerprints. The samples were extracted using ASE for 10 min under 100 °C and 9.65 MPa and divided into water phase and chloroform phase and analyzed them with HPLC-DAD-ESI/TOF/MS method respectively. Based on this method, the HPLC fingerprints of *Radix gentianae* were established. Comparing the spectrogram and mass spectrum of the chromatogram peak with the reference value, three compounds in water phase were identified as gentiopicroside, asafetida acid and loganic acid. There is no report of the compounds in chloroform phase. The content of gentiopicroside and loganic acid in samples of different groups were determined separately. The fingerprints were compared by the software of the similarity evaluation system for chromatographic fingerprint. The water phase fingerprint congruence coefficients of samples from six different areas were above 0.90, however, the chloroform phase fingerprint congruence coefficients were within 0.62-0.99. This method can be used for determination of potent component in *Radix gentianae* and its quality control. *Radix gentianae* from different producing areas have the largest diversities, and the diversities embodied in the content of chloroform phase compounds.

**Key words** *Radix gentianae*; gentiopicroside; loganic acid; time of flight mass spectrum; fingerprints

龙胆 (*Radix gentianae*) 又名胆草, 为龙胆科植

物龙胆 (*Gentiana scabra* Bge) 的根及根茎; 性寒, 味苦, 可用于清热燥湿, 泻肝胆火。其主要化学成分为裂环烯醚萜苷类化合物, 三萜类化合物, 多糖类化合物以及生物碱等<sup>[1,2]</sup>。龙胆苦苷 (C<sub>16</sub>H<sub>20</sub>O<sub>9</sub>) 和马钱子苷酸 (C<sub>16</sub>H<sub>24</sub>O<sub>10</sub>) 是龙胆药材中含量较高的 2 种活性成分, 属于裂环烯醚萜苷类化合物,

收稿日期: 2006-11-14

基金项目: 青岛“2004 将才计划”(04-3-JJ-11); 国家海洋局青年基金资助项目(2005602); 崂山区政府区校共建生物医药研发测试中心资助(LS-05-KJZX-76)。

\* 通讯作者 Tel/Fax 86-532-8963253,

E-mail: m2ek@fjnu.org.cn

2005版药典以龙胆苦苷为指标性成分对龙胆进行鉴别和含量测定。目前对龙胆的研究主要集中在龙胆苦苷的HPLC测定和从中分离纯化出各种不同的化合物<sup>[3-6]</sup>。加速溶剂提取法(accelerated solvent extraction, ASE)是一种在较高温度和压力的条件下提取的自动化方法。与其他提取方法相比,具有溶剂用量少、快速、提取效率高等优点<sup>[7,8]</sup>。本文将ASE技术应用于龙胆活性成分的提取研究;采用HPLC-DAD-ESI/TOF/MS联用技术对龙胆苦苷和马钱子苷酸进行含量测定和化合物鉴别,并在此基础上建立了龙胆药材的二元特征指纹图谱。

## 材料与方法

**仪器与试剂** Agilent 1100型高效液相色谱仪(美国Agilent公司), G1969A型电喷雾飞行时间质谱仪(美国Agilent公司), ASE-100型加速溶剂萃取系统(美国DNEX公司)。甲醇、乙醇、氯仿等为分析纯试剂(上海化学试剂厂), 乙腈、冰醋酸为色谱纯试剂(Fisher公司), 实验用水为Milli-Q超纯水。龙胆苦苷和马钱子苷酸对照品购自中国药品生物制品检定所, 纯度为95%。本文所采用的龙胆样品由山东绿叶制药集团提供。

**液相色谱条件** 色谱柱: Altima C<sub>8</sub>柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为0.2%乙酸溶液(A), 色谱纯乙腈(B), 梯度洗脱 t<sub>0</sub>-20-40 min, B%: 10% - 40% - 100%, 进样量为20 μL, 流速1.0 mL · min<sup>-1</sup>, 水相测定波长238 nm, 氯仿相测定波长246 nm。

**质谱检测条件** 正离子电离模式, 毛细管电压4500 V, 喷雾气压310 kPa, 干燥气(N<sub>2</sub>)流速10.0 L · min<sup>-1</sup>, 干燥气温度350 °C, 破碎电压(fragmentor)100 V, 实验过程采用质荷比(*m/z*)121.050 9 922.009 8为参比离子对测定结果进行时时校正, 以保证结果的准确性, 分辨率*m/z*在922.009 8处为11 300, 全扫描(scan)质荷比(*m/z*)范围为120~1 000。

**对照品溶液的制备** 准确称取龙胆苦苷和马钱子苷酸对照品各10.08 mg放入10 mL量瓶中, 用甲醇溶解定容, 制成1.008 mg · mL<sup>-1</sup>储备液。

**供试品溶液的制备** 供试样品(粉碎, 过60目筛)在50 °C烘箱中干燥10 h, 准确称取1.0 g以乙醇-水(80:20)为溶剂, 进行加速溶剂萃取, 萃取池体积为34 mL, 萃取温度为100 °C, 压力为9.65 MPa, 萃取10 min, 提取液经旋转蒸发至无醇味, 用20

mL氯仿萃取3次, 氯仿相旋转蒸发至干后用甲醇定容到50 mL, 剩余水相用超纯水定容至50 mL, 两相溶液分别过0.20 μm滤膜后作为供试品溶液。

## 结果

### 1 提取条件优化

本文采用了煎煮回流法(95 °C, 1 h)、超声辅助提取(1 h)和加速溶剂萃取3种方法对样品进行提取, 以龙胆苦苷的提取率为指标, 对3种提取方法进行比较, 结果表明, 加速溶剂萃取法效率最高, 且操作简单方便、提取时间较短、各操作参数可控、提取过程重现性好, 有助于实现指纹图谱的高重现性。对加速溶剂萃取的各参数进行优化设计, 最终确定以乙醇-水(80:20)为萃取溶剂, 萃取温度为100 °C, 压力为9.65 MPa, 萃取时间为10 min, 萃取1次, 系统冲洗体积为提取溶剂体积的60%。

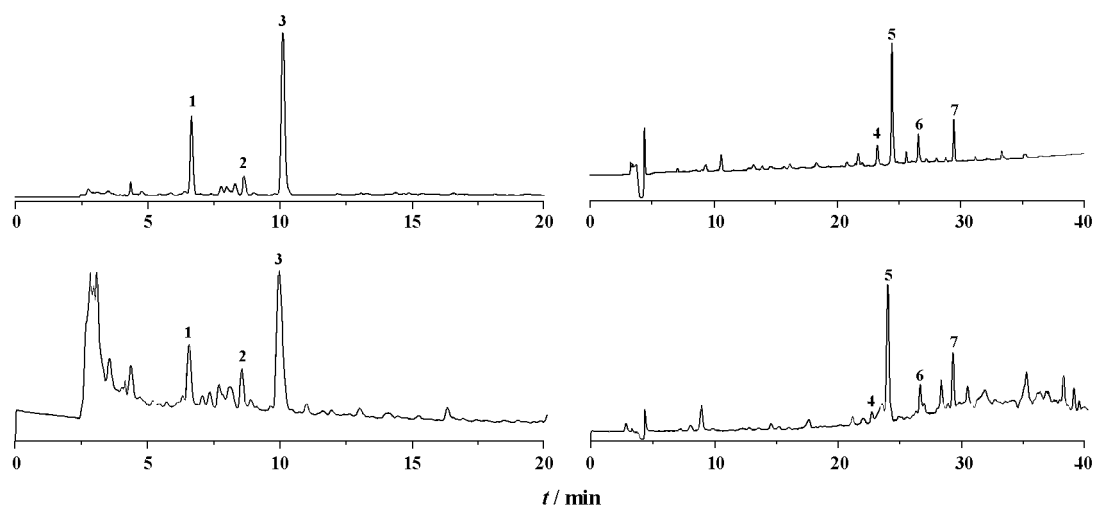
### 2 ESI/TOF MS鉴定龙胆药材提取液中的主要化合物

按照本文所建立的色谱条件和质谱条件进样分析, 水溶相和氯仿相的色谱图和总离子流图见图1。

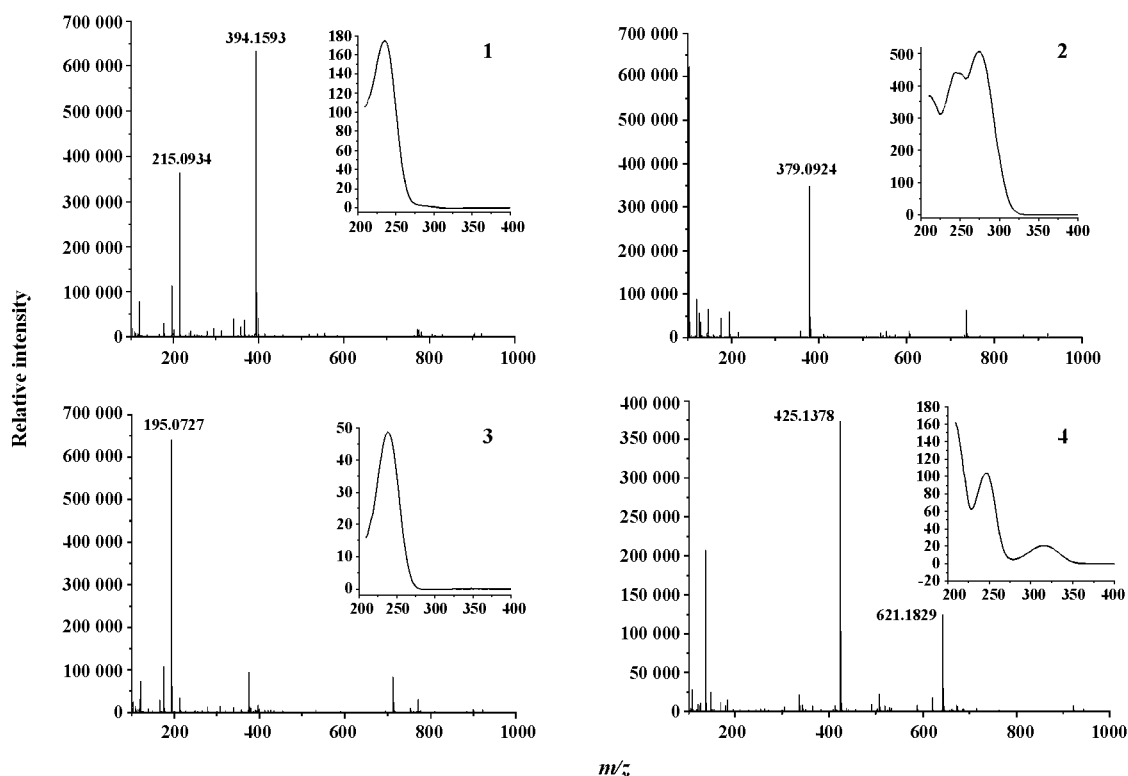
对色谱图中的主要组分进行质谱分析, 可得到各化合物的精确相对分子质量, 利用ESI/TOF MS系统自带的Analyst QS软件可对其分子式进行推测, 利用该软件的同位素匹配功能对各离子峰的同位素峰高和位置进行匹配, 可以进一步确认推测结果的可靠性, 参考相关文献<sup>[9]</sup>, 结合DAD光谱图对各化合物进行鉴别, 可鉴定出水溶相中含有马钱子苷酸, 阿魏酸和龙胆苦苷, 对应峰位为图1中的1, 2, 3号峰。氯仿相中4个特征峰(图1中的4, 5, 6, 7号峰)具有相似的光谱图和质谱图, 在246 nm和315 nm处有最大吸收, 准分子离子峰均为621.182 9 [M+H]<sup>+</sup>, 643.163 0 [M+Na]<sup>+</sup>, 主要碎片峰均为425.173 8(4种化合物的质谱峰的质量数在小数点后第3位才出现差异, 本文取其平均值), 推测得分子式为C<sub>29</sub>H<sub>32</sub>O<sub>15</sub>, 应为同分异构体, 仅凭质谱数据难以确定其结构, 也未见有文献报道, 具体结构有待今后推导。以上化合物的质谱图和光谱图见图2。

### 3 标准曲线的绘制

分别自动进样对照品溶液2, 5, 10, 15和20 μL, 记录色谱图, 以峰面积对进样量回归, 得龙胆苦苷线性回归方程为:  $Y = 6435.52X + 87.36$ ,  $r = 0.9996$  马钱子苷酸线性回归方程为:  $Y = 5899.18X + 102.55$ ,  $r = 0.9985$ , 2种对照品在0.2~20 μg与峰面积值呈良好的线性关系。



**Figure 1** The DAD (up) and TIC (down) chromatograms of *Radix gentianae* extracts in water phase (left) and chloroform phase (right)



**Figure 2** The mass spectrum and spectrogram of loganic acid (1), gentiopicoside (2), asafetida acid (3) and unidentified four compounds (4) in chloroform phase extract

**4 精密度试验**

对龙胆苦苷和马钱子苷酸对照品溶液进行 6 次重复进样分析, 测得其峰面积和保留时间, 分别计算其标准偏差, 龙胆苦苷峰面积和保留时间 RSD 值分别为 0.32% 和 0.18%, 马钱子苷酸峰面积和保留时

间 RSD 值分别为 0.29% 和 0.24%, 表明仪器精密度良好。

**5 稳定性试验**

将供试品溶液分别在 0, 2, 4, 8, 12, 24, 36 和 48 h 时进样测定, 结果显示供试品溶液中龙胆苦苷

和马钱子苷酸在 48 h 内峰面积和保留时间无明显变化,龙胆苦苷峰面积和保留时间的 RSD 值分别为 1.21% 和 0.46%,马钱子苷酸峰面积和保留时间 RSD 值分别为 0.85% 和 0.94%,说明供试品溶液在 48 h 内化学性质稳定。

## 6 重复性试验

精密称取同一种样品 5 份,测得龙胆苦苷和马钱子苷酸峰面积和保留时间,并计算其标准偏差,龙胆苦苷峰面积和保留时间的 RSD 值分别为 2.55% 和 0.62%,马钱子苷酸峰面积和保留时间 RSD 值分别为 1.82% 和 0.77%,表明该方法重复性良好。

## 7 回收率试验

精密称取 6 种不同产地的龙胆药材各 1.0 g 定量加入对照品,测定回收率。龙胆苦苷的回收率为 101.4%,RSD 为 2.09%,马钱子苷酸的回收率为 98.9%,RSD 为 2.18%。表明本法回收率高,测定结果准确,方法可行。

## 8 不同产地龙胆中龙胆苦苷和马钱子苷酸含量测定结果

取不同产地龙胆样品,按照本文所建立的方法测定其中龙胆苦苷和马钱子苷酸的含量,每批样品进行 3 次平行测定,结果见表 1。

## 9 龙胆药材指纹图谱的建立

本文将 6 种不同产地的龙胆药材,分别对水相和氯仿相进行色谱分析,同样的方法分别对两相溶液进行分析。所得指纹图谱见图 3 从图中可以看出,水相中,各共有峰数量和峰面积之间不存在明显

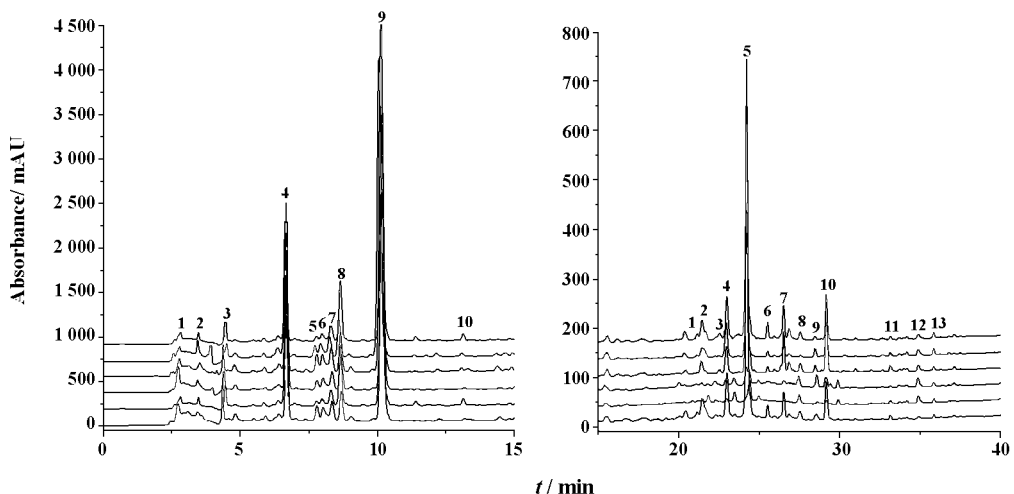
差异,而氯仿相提取物无论是色谱峰数量还是峰面积,均存在较大差异。

**Table 1** Contents of gentiopicoside and loganic acid in *Radix gentianae* of six different regions

Producing area	Gentiopicoside		Loganic acid	
	Content/%	RSD/%	Content/%	RSD/%
Neimenggu	1.65	1.96	1.38	2.27
Henan	2.50	1.26	1.00	3.19
Jilin	2.74	2.21	0.99	1.03
Sichuan	1.99	3.09	0.82	2.92
Gansu	2.79	0.98	1.41	0.86
Hubei	1.81	2.57	1.38	2.77
Average	2.25	2.01	1.11	2.17

## 讨论

从本文的定量分析结果可以看出:不同产地龙胆药材中龙胆苦苷和马钱子苷酸的含量之间存在一定的差异,仅以龙胆苦苷含量为标准,6 种不同产地的龙胆药材均能满足 2005 版药典规定的质量标准(龙胆苦苷含量 > 1.0%)。众所周知,仅靠测定单一有效成分的含量已经不能准确地对药材进行质量控制,指纹图谱概念的提出<sup>[10-11]</sup>符合现代质量控制体系的要求,而且符合中药协同作用的理念。如何得到中药材更为详尽和更能反映差异的信息,成为指纹图谱技术发展的一个关键。本文提出将药材提取液分为两相,分别进行色谱分析,分析不同产地龙胆药材的共性和个性,从而为龙胆中药材质量控制



**Figure 3** Water phase (left) and chloroform phase (right) fingerprints of *Radix gentianae* extracts from six different producing areas

提供一种更为有效的手段。本文采用浙江大学制药工程研究所研发的“中药指纹图谱相似度计算软件”对测定结果进行计算。结果表明：6种不同产地的龙胆药材水相指纹图谱相似度均在0.89以上，而氯仿相指纹图谱相似度则在0.57~0.96不等，表明不同产地的龙胆药材质量之间存在较大差异，而其差异主要体现在脂溶性成分的含量上。药典规定的龙胆药材质量控制方法，仅能对不同药材的个别属性进行区别，而不能反映整体差异，而本文所建立的二元指纹图谱则能反映出不同产地龙胆药材的共同特点和个体差别。

## References

- [1] Yang SB, Wang C. The research of chemical constituent and pharmaceutical action of gentianaceae [J]. J Chin Med Pharmacol (中医药学报), 2005, 33: 54–56
- [2] Yang WX, Zhou L, Geng HL, et al. A survey of study of chemical components of medicinal plants of Gentianaceae [J]. Acta Bot Boreo Occident Sin (西北植物学报), 2003, 23: 2235–2240
- [3] Liang XY, Tian Q, Li CF, et al. Gentiopicroside content in violet Gentian by LC-MS and HPLC [J]. Chin Tradit Pat Med (中成药), 2006, 28: 548–552
- [4] Zhou L, Wang N, Miao F, et al. Chemical constituents of gentiana apurita NEBr [J]. Chin J Org Chem (有机化学), 2004, 24: 1249–1252
- [5] Rie K, Takeyoshi I, Yasunori Y, et al. Triterpenoids from *Gentiana scabra* [J]. Phytochemistry, 2002, 59: 791–794
- [6] Liu MT, Han ZC, Zhang Z, et al. Study on the chemical constituents of *Gentiana scabra* Bge [J]. J Shenyang Pharm Univ (沈阳药科大学学报), 2005, 22: 547–548
- [7] Giergielewicz MH, Dabrowski L, Namiesnik J. Accelerated solvent extraction (ASE) in the analysis of environmental solid sample—some aspects of theory and practice [J]. Anal Chem, 2001, 31: 149–165
- [8] Brachet A, Rudaz S, Mateus L, et al. Optimization of accelerated solvent extraction of cocaine and benzoylecgonine from coca leaves [J]. J Sep Sci, 2001, 24: 865–873
- [9] Jiang RW, Wong KL, Chan YM, et al. Isolation of iridoil and secoiridoil glycosides and comparative study on *Radix gentianae* and related adulterants by HPLC analysis [J]. Phytochemistry, 2005, 66: 2674–2680
- [10] Xie PS. The Proceedings of International Symposium of Herbal Drug Quality Assessment by Chromatographic Fingerprint (国际色谱指纹图谱评价中药质量研讨会论文集) [C]. Guangzhou, 2001: 52
- [11] Xie PS. Chromatographic Fingerprints of Traditional Chinese Medicine (中药色谱指纹图谱) [M]. Beijing People's Medical Publishing House, 2004: 131

## • 信息 •

今年5月在北京举办A chemAsia展,该展览是化学领域的一个知名展会,众多国际客户参展,荷兰千思板国际近日宣布将联合其合作伙伴丹麦布罗因实验室集团(BROEN)和德国飞利亚特实验室技术公司(FRIATEC)共同参展,在本次展会上,这三家国际公司将在北京国际展览中心5号馆的B10展位共同展示最新实验室建造解决方案。使用千思板TopLabPLUS面板能轻而易举的使您的实验室保持完整无缺的状态.; BROEN实验室集团公司是实验用液体和气体介质用设备配件以及应急喷淋器的主要生产商之一; FRIDURIT实验室技术公司是 FRIATEC AG 公司的业务部门。以 FRIDURIT 品牌设计、生产和销售的产品有工业陶瓷和聚丙烯制成的工作台面和水池,烟道清洗器,烟过滤器和中和器。更多信息请访问: [www.trespa.com](http://www.trespa.com)