

· 基础研究 ·

新疆假龙胆的化学成分研究与含量测定[△]邹德志^{1,2,3}, 杨丹¹, 王建华⁴, 韩华锐^{1,2,3}, 白小荣^{1,2,3}, 张春红^{1,2,3*}, 李旻辉^{1,2,3,5*}

(1. 包头医学院, 内蒙古 包头 014060;

2. 内蒙古自治区特色药用植物培育与保护工程技术研究中心, 内蒙古 包头 014060;

3. 内蒙古自治区特色道地药材资源保护与利用重点实验室, 内蒙古 包头 014060;

4. 内蒙古医科大学药学院, 内蒙古 呼和浩特 010110;

5. 内蒙古自治区中医药研究所, 内蒙古 呼和浩特 010020)

[摘要] 目的: 对新疆假龙胆全草进行化学成分初步研究, 并对分离得到吡酮类化合物进行定量分析。方法: 采用75%乙醇回流法对新疆假龙胆全草进行提取, 粗提物经石油醚、乙酸乙酯、正丁醇依次梯度萃取制备不同极性部分, 将石油醚部分和乙酸乙酯部分浸膏分别用硅胶柱层析和葡聚糖凝胶 LH-20 柱层析分离纯化, 所得单体化合物经 EI-MS、¹H-NMR、¹³C-NMR 等光谱法进行结构鉴定; 建立高效液相测定方法测定新疆假龙胆中3个吡酮类化合物的含量。结果: 从新疆假龙胆中分离得到6个化合物, 分别为1, 8-二羟基-3, 5-二甲氧基吡酮(1)、1-羟基-3, 5, 8-三甲氧基吡酮(2)、1-羟基-3, 5-二甲氧基吡酮(3)、木犀草素(4)、胡萝卜素(5)和β-谷甾醇(6); 含量测定方法学结果表明1, 8-二羟基-3, 5-二甲氧基吡酮、1-羟基-3, 5, 8-三甲氧基吡酮和1-羟基-3, 5-二甲氧基吡酮3个吡酮化合物分离度较好, 分别在35.7~713.4、32~1280、34.3~686 ng 时与峰面积呈良好的线性关系, 精密度试验 RSD 分别为0.31%、0.27%、0.25%, 稳定性试验的 RSD 分别为1.05%、1.33%、1.58%, 重复性试验的 RSD 分别为2.48%、0.82%、2.63%, 加样回收率分别为103.1% (RSD = 1.25%)、100.02% (RSD = 0.93%), 95.10% (RSD = 2.62%); 1, 8-二羟基-3, 5-二甲氧基吡酮等3个化合物的含量范围分别为0.21%~0.28%、0.65%~0.77%、0.19%~0.15%。结论: 新疆假龙胆含有黄酮类、吡酮类和甾醇类化合物; 经方法学考察, 本研究建立的高效液相测定方法适合新疆假龙胆中1, 8-二羟基-3, 5-二甲氧基吡酮等3个化合物的测定; 新疆假龙胆中1, 8-二羟基-3, 5-二甲氧基吡酮等3个化合物的含量较高。

[关键词] 新疆假龙胆; 化学成分; 黄酮; 吡酮; 含量测定

Study on Chemical Composition and Xanthones Content Determination of *Gentianella turkestanorum* (Gand.) HolubZOU Dezhì^{1,2,3}, YANG Dan¹, WANG Jianhua⁴, HAN Huarui^{1,2,3}, BAI Xiaorong^{1,2,3},ZHANG Chunhong^{1,2,3*}, LI Minhui^{1,2,3,5*}

(1. Baotou Medical College, Inner Mongolia, Baotou 014060, China;

2. Inner Mongolia Research Center of Characteristic Medicinal Plants Cultivation and Protection Engineering Technology, Baotou 014060, China;

3. Inner Mongolia Key Laboratory of Characteristic Geoherb Resources Protection and Utilization, Baotou 014060, China;

4. School of Pharmacy, Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010110, China;

5. Inner Mongolia Institute of Traditional Chinese Medicine, Hohhot 010020, China)

[Abstract] **Objective:** To preliminarily study on the chemical constituents of *Gentianella turkestanorum* (Gand.) Holub and analyze the content of xanthones by HPLC for quantitative analysis. **Methods:** The herbal material of *G. turkestanorum* was reflux-extracted by 75% ethanol, the crude extracts were fractionated with petroleum ether, ethyl ace-

[△] [基金项目] “十二五”国家科技支撑计划项目(2012BAI28B02); 国家自然科学基金项目(81060372); 内蒙古自治区科技计划项目(蒙药资源保护与开发利用科研创新平台)

* [通信作者] 张春红, 教授, 研究方向: 中蒙药活性成分分析, E-mail: zchlhh@126.com; 李旻辉, 教授, 研究方向: 蒙药资源保护与利用, E-mail: li_minhui@aliyun.com

tate, and *n*-BuOH, respectively. The petroleum ether and ethyl acetate part were extracted by silica gel column chromatography and Sephadex LH-20 column chromatography gradually to obtain the purified compounds, which were identified by spectral data EI-MS, ¹H-NMR and ¹³C-NMR. An HPLC method for the content determination of Xanthenes compounds **1-3** was established. **Results:** Six compounds were isolated and identified from *G. turkestanorum*, respectively, swerchirin (**1**), 1-hydroxy-3, 5, 8-trimethoxyxanthone (**2**), 1-hydroxy-3, 5- demethoxyxanthone (**3**), luteolin (**4**), daucosterol (**5**) and β - sitosterol (**6**). The results showed that the conditions of the experiment exhibited better performance of separation for compounds **1-3**. Compounds **1-3** formed a good linear relationship at 35.7 ~ 713.4, 32 ~ 1280, 34.3 ~ 686 ng, respectively. Precision RSD were 0.31%, 0.27%, 0.25% and the stability experiments of RSD were 1.05%, 1.33%, 1.58%, respectively. Repeated experiments RSD were 2.48%, 0.82% and 2.63%. Meanwhile, the recovery rate were 103.1% (RSD = 1.25%), 100.02% (RSD = 0.93%), 95.10% (RSD = 2.62%), respectively. The content of compounds **1-3** were 0.21% ~ 0.28%, 0.65% ~ 0.77%, 0.19% ~ 0.15%, respectively. **Conclusion:** The chemical compositions of *G. Turkestanorum* were mainly flavonoids, xanthenes and sterols. The established HPLC method is suitable for the determination of compounds **1-3** isolated from *G. turkestanorum*. Moreover, the contents of compounds **1-3** were shown in the higher level.

[**Keywords**] *Gentiana turkestanorum*; chemical composition; flavonoids; xanthenes; determination
doi:10.13313/j.issn.1673-4890.2017.6.005

新疆假龙胆, 又称新疆阿帕斯, 为龙胆科假龙胆属植物新疆假龙胆 *Gentiana turkestanorum* (Gand.) Holub 一年或两年生草本植物, 全草入药, 主要分布于新疆、内蒙古等地, 前苏联、蒙古等地也有分布^[1]。新疆假龙胆是维医常用药材, 具有清热解毒、利湿消肿等功效, 常用于关节炎的治疗, 民间用其全草泡茶治疗感冒、发热等症。据文献报道和走访调查, 假龙胆属植物全世界约有 125 种, 我国有 9 种, 主要分布于东北、西北、及西南部地区, 其中有 5 种作为药用, 除了新疆假龙胆另外 4 种分别为: 尖叶假龙胆, 全草入蒙药, 味苦、性凉, 具有清热、利湿的功效; 黑边假龙胆, 全草入藏药, 具有清热解毒、去除肝胆之火的功效; 紫红假龙胆, 全草入药, 味苦性寒, 具有清热利湿、解毒消肿等功效; 矮假龙胆, 全草入藏药, 具有清热解毒、舒肝利胆的功效^[2-4]。

目前对新疆假龙胆的研究较少, 仅有对新疆假龙胆中龙胆苦苷、芒果苷、獐牙菜苦苷等环烯醚萜类化合物进行了含量测定^[5-7], 本文采用现代科学的提取、分离纯化、鉴定及含量测定手段对新疆假龙胆干燥全草进行了化学成分的初步研究, 为阐明新疆假龙胆的化学组成, 合理利用资源提供科学依据。

1 材料与仪器

1.1 仪器

UltiMate 3000 高效液相色谱仪 (Thermo Fisher Scientific); TSQ Quantum 液质联用色谱仪 (Thermo Fisher); Labofuge 400R 离心机 (Thermo Fisher Scien-

tific); 冷冻干燥机 (北京博医康实验仪器有限公司); MSA224S-100-DU 电子精密天平 (德国赛多利斯); KQ 300V 超声波清洗机 (上海绿宇精密仪器); RE-2000E 旋转蒸发仪 (上海亚荣公司); 电热恒温水浴锅 (北京市电热恒温水浴锅); SHZ-D (III) 循环水真空泵 (天津华鑫仪器厂); HC. TP11B5 架盘药物天平 (量程 0 ~ 500 g, 北京市宣武区天平厂); BSZ-100 馏分收集器 (上海沪西仪器有限公司)。

1.2 材料

药材: 新疆假龙胆药材于 2013 年购自新疆药材公司, 经包头医学院李旻辉教授鉴定为新疆假龙胆干燥全草。

对照品: 1, 8-二羟基-3, 5-二甲氧基吡啶、1-羟基-3, 5, 8-三甲氧基吡啶、1-羟基-3, 5-二甲氧基吡啶均为本实验室自制, 经 HPLC-DAD 检测纯度 $\geq 98\%$ 。

试剂: 石油醚、乙酸乙酯、氯仿、正丁醇、无水乙醇及甲醇 (分析纯, 天津市福晨化学试剂厂); 甲醇 (色谱纯, 天津市风船化学试剂三厂); 纯净水 (娃哈哈纯净水); 薄层层析硅胶板 (GF254, 青岛海洋化工厂); 柱层析硅胶 (100-200、200-300 目, 青岛海洋化工厂理化分厂); 葡聚糖凝胶 (SephadexTM LH-20, GE Healthcare), 碘 (分析纯, 成都麦卡希化工有限公司)。

2 方法

2.1 提取、分离纯化与结构鉴定

2.1.1 提取、分离纯化 称取新疆假龙胆药材粗粉

2.0 kg, 加70%乙醇12 L, 热回流提取2 h, 过滤, 残渣重复提取4次(每次加70%乙醇12 L, 提取2 h), 合并滤液, 减压浓缩近干, 即为70%乙醇提取浸膏。将浸膏用3倍体积水40℃超声溶解后, 依次用石油醚、乙酸乙酯、正丁醇进行梯度萃取, 将各萃取液及剩余水层浓缩并冷冻干燥, 分别得到石油醚部分浸膏(35 g)、乙酸乙酯部分浸膏(53 g)、正丁醇部分浸膏(82 g)和水部分浸膏(185 g)。

称取硅胶(200~300目, 300 g)干法装柱, 将石油醚部分浸膏(30 g)溶于少量甲醇, 加入硅胶(100~200目, 30 g)搅拌并挥去溶剂, 上样, 以流动相石油醚-乙酸乙酯(15:1~3:1)为洗脱剂梯度洗脱, 洗脱液用自动部分收集器分段收集(每管15 mL), 并用薄层层析法点板跟踪(薄层板: GF254; 展开剂: 石油醚-乙酸乙酯=7:1; 显色: 碘显色), 将得到的组分A(20~70管合并浓缩)按上述方法重复进行柱层析分离纯化, 合并20~45瓶和56~77瓶, 浓缩, 得到化合物**1**(黄色针晶, 51 mg)和化合物**2**(黄色粉末, 44 mg)。

称取硅胶(200~300目, 210 g)干法装柱, 取乙酸乙酯部分(25 g)溶于少量甲醇中, 加入硅胶(100~200目, 30 g)拌样, 挥去甲醇后上样, 以石油醚-乙酸乙酯(5:1~1:3)为洗脱剂进行梯度洗脱, 洗脱液用自动部分收集器分段收集(每管15 mL), 并用薄层层析法点板跟踪(薄层板: GF254; 展开剂: 石油醚-乙酸乙酯=7:1; 显色: 碘显色), 分别合并10~84、115~178管, 得到组分B和C。将组分B上葡聚糖凝胶LH-20柱(取100 g, 湿法装柱), 用80%甲醇洗脱, 按硅胶柱层析方法收集洗脱液, 并用薄层层析法点板跟踪(薄层板: GF254; 展开剂: 石油醚-乙酸乙酯=3:1; 显色: 碘显色), 合并并减压浓缩11~33和75~94管, 得到化合物**3**(淡黄色结晶, 35 mg)和化合物**4**(白色粉末, 15 mg); 将组分C按上述硅胶柱层析法上样, 合并35~87管, 经葡聚糖凝胶柱洗脱纯化, 其中3~26管减压浓缩得到化合物**5**(白色粉末, 8 mg), 31~54管合并得到化合物**6**(灰白色的粉末, 10 mg)。

2.1.2 新疆假龙胆化合物结构鉴定 化合物**1**: 黄色针状结晶 mp 186~187℃(丙酮)。IR (KBr) ν_{\max} : 3200~2800、1670、1640、1608、1582、1490 cm^{-1} 。EI-MS m/z : 288 $[M]^+$ 。¹H-NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 11.98 (1H, s, C_1 -OH), 11.39 (1H, s, C_8 -OH), 7.24 (1H, d, $J = 8.5\text{ Hz}$, C_6 -H), 6.72

(1H, d, $J = 8.5\text{ Hz}$, C_7 -H), 6.55 (1H, d, $J = 2.10\text{ Hz}$, C_4 -H), 6.36 (1H, d, $J = 2.1\text{ Hz}$, C_2 -H), 3.96 (3H, s, OCH_3), 3.90 (3H, s, OCH_3)。 ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-d_6) δ : 162.9 (C-1), 97.3 (C-2), 167.5 (C-3), 93.1 (C-4), 139.9 (C-5), 120.4 (C-6), 109.3 (C-7), 154.3 (C-8), 184.6 (C-9), 157.9 (C-4a), 145.5 (C-4b), 108.2 (C-8a), 102.8 (C-8b), 57.4 (C_3 - OCH_3), 56.2 (C_7 - OCH_3)。数据经鉴定与1, 8-二羟基-3, 5-二甲氧基吡啶数据基本符合^[8], 故鉴定为1, 8-二羟基-3, 5-二甲氧基吡啶。

化合物**2**: mp 206~207℃(MeOH)。IR (KBr) ν_{\max} : 3100~2600、1660、1610、1576、1485 cm^{-1} 。EI-MS m/z : 302 $[M]^+$ 。¹H-NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 13.9 (1H, s, C_1 -OH), 7.17 (1H, d, $J = 9.00\text{ Hz}$, C_6 -H), 6.70 (1H, d, $J = 9.00\text{ Hz}$, C_7 -H), 6.49 (1H, d, $J = 2.40\text{ Hz}$, C_4 -H), 6.32 (1H, d, $J = 2.40\text{ Hz}$, C_2 -H), 3.98 (3H, s, C_8 - OCH_3), 3.97 (3H, s, C_3 - OCH_3), 3.87 (3H, s, C_5 - OCH_3)。 ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 163.6 (C-1), 97.6 (C-2), 166.5 (C-3), 92.3 (C-4), 142.1 (C-5), 116.9 (C-6), 104.5 (C-7), 156.9 (C-8), 181.5 (C-9), 153.7 (C-4a), 147.6 (C-4b), 111.9 (C-8a), 104.4 (C-8b), 57.0 (C_8 - OCH_3), 56.5 (C_7 - OCH_3), 55.9 (C_3 - OCH_3)。数据与1-羟基-3, 5, 8-三甲氧基吡啶数据基本一致^[8], 鉴定为1-羟基-3, 5, 8-三甲氧基吡啶。

化合物**3**: 黄色针状结晶, EI-MS m/z : 272.25 $[M]^+$ 。¹H-NMR (400 MHz, CDCl_3): 12.83 (1H, s, 1-OH), 7.82 (1H, dd, $J = 8.0, 1.5\text{ Hz}$, H-8), 7.31 (1H, t, $J = 8.0\text{ Hz}$, H-7), 7.24 (1H, dd, $J = 8.0, 1.5\text{ Hz}$, H-6), 6.56 (1H, d, $J = 2.2\text{ Hz}$, H-4), 6.37 (1H, d, $J = 2.2\text{ Hz}$, H-2), 4.04 (3H, s, OCH_3), 3.90 (3H, s, OCH_3); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl_3): 180.8 (C=O), 166.7 (C-3), 163.3 (C-1), 157.6 (C-4a), 148.3 (C-5), 146.3 (C-4b), 123.6 (C-7), 121.5 (C-8a), 116.7 (C-8), 115.6 (C-6), 103.9 (C-4b), 97.5 (C-2), 92.8 (C-4)。数据与1-羟基-3, 5-二甲氧基吡啶数据基本一致^[9], 故鉴定为1-羟基-3, 5-二甲氧基吡啶。

化合物**4**: 白色粉末, mp 328~330℃(乙醇)。EI-MS m/z : 286 $[M]^+$ 。¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6)

d_6) δ : 12.98 (1H, s, C₅-OH), 10.79 (1H, s, C₇-OH), 9.88 (1H, s, C_{3'}-OH), 9.38 (1H, s, C_{4'}-OH), 7.43 (1H, dd, $J = 8.2, 2.2$ Hz, C_{6'}-H), 7.41 (1H, d, $J = 2.22$ Hz, C_{2'}-H), 6.92 (1H, d, $J = 8.16$ Hz, C_{5'}-H), 6.67 (1H, s, C₈-H), 6.46 (1H, d, $J = 2.01$ Hz, C₃-H), 6.20 (1H, d, $J = 2.01$ Hz, C₆-H). ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 164.3 (C-2), 103.3 (C-3), 181.8 (C-4), 157.6 (C-5), 99.2 (C-6), 164.4 (C-7), 94.2 (C-8), 161.6 (C-9), 104.0 (C-10), 119.4 (C-1'), 113.5 (C-2'), 150.0 (C-3'), 146.1 (C-4'), 116.4 (C-5'), 121.6 (C-6'). 数据与木犀草素基本数据一致^[8], 故化合物**4**鉴定为木犀草素。

化合物**5**: 无色颗粒状结晶, mp 300 ~ 302 °C。该化合物硫酸-乙醇显色显紫红色, 长时间放置变成灰绿色, Liebermann-Burchard 反应阳性, Molish 反应阳性, 推测该化合物为甙体苷类化合物。EI-MS m/z : 576 [M]⁺。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 5.33 (1H, H-6), 4.42 (1H, t, H-3), 4.22 (1H, d, H-1'); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ : 38.8 (C-1), 29.7 (C-2), 77.2 (C-3), 40.6 (C-4), 140.9 (C-5), 121.7 (C-6), 33.8 (C-7), 31.9 (C-8), 50.1 (C-9), 25.9 (C-10), 21.1 (C-11), 28.3 (C-12), 42.3 (C-13), 56.7 (C-14), 24.3 (C-15), 42.3 (C-16), 55.9 (C-17), 12.1 (C-18), 19.6 (C-19), 36.7 (C-20), 19.4 (C-21), 36.0 (C-22), 37.3 (C-23), 45.6 (C-24), 29.2 (C-25), 19.1 (C-26), 20.2 (C-27), 23.1 (C-28), 12.3 (C-29), 101.3 (C-1'), 73.9 (C-2'), 77.4 (C-3'), 70.6 (C-4'), 77.3 (C-5'), 61.6 (C-6')。数据与胡萝卜苷数据对照基本一致^[10], 故确定化合物**5**为胡萝卜苷。

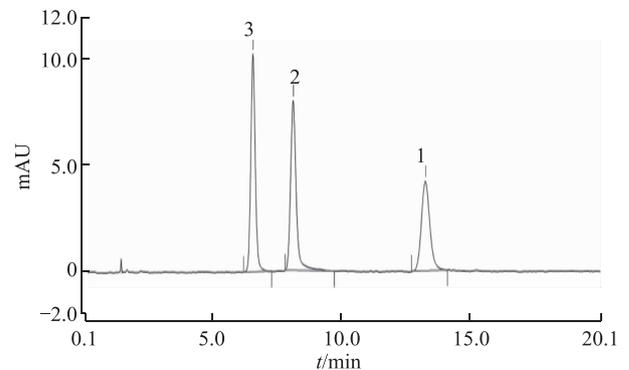
化合物**6**: 白色针状结晶, mp 119 ~ 121 °C。10% 硫酸乙醇溶液显色呈紫红色斑点。EI-MS m/z : 414 (M⁺)。¹H-NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 5.32 (1H, 6-H), 4.42 (1H, t, 3-H), 4.21 (1H, d, 1'-H); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 38.3 (C-1), 29.3 (C-2), 76.8 (C-3), 40.3 (C-4), 140.4 (C-5), 121.2 (C-6), 33.3 (C-7), 31.4 (C-8), 49.6 (C-9), 25.5 (C-10), 20.6 (C-11), 27.8 (C-12), 41.8 (C-13), 56.2 (C-14), 23.9 (C-15), 41.7 (C-16), 55.4 (C-17), 11.7 (C-18), 19.1 (C-19), 36.4 (C-20), 19.0 (C-21), 35.4 (C-

22), 36.8 (C-23), 45.1 (C-24), 28.8 (C-25), 18.9 (C-26), 19.7 (C-27), 22.6 (C-28), 11.8 (C-29), 102.5 (C-1'), 73.4 (C-2'), 76.9 (C-3'), 70.0 (C-4'), 76.7 (C-5'), 61.0 (C-6')。数据与 β -谷甾醇数据基本一致^[11], 故鉴定为 β -谷甾醇。

2.2 1, 8-二羟基-3, 5-二甲氧基吡酮等化合物含量测定

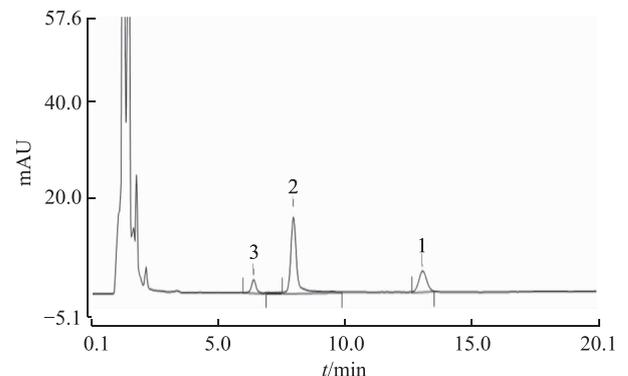
2.2.1 色谱条件 色谱柱: Agilent Eclipse XDB-C₈ (4.6 mm × 150 mm, 5 μ m) 柱; 流动相: 甲醇-0.05% 磷酸水 (65:35); 流速: 1.0 mL · min⁻¹; 检测波长: 254 nm; 柱温: 室温。理论板数不低于 3000。

分别精密吸取对照品溶液、供试品溶液各 5 μ L, 注入液相色谱仪, 按以上色谱条件进行测定, 记录色谱图。从图 1、图 2 可以看出, 1, 8-二羟基-3, 5-二甲氧基吡酮等 3 个吡酮化合物的分离度较好。



注: 1. 1, 8-二羟基-3, 5-二甲氧基吡酮; 2. 1-羟基-3, 5, 8-三甲氧基吡酮; 3. 1-羟基-3, 5-二甲氧基吡酮。

图 1 对照品的液相色谱图



注: 1. 1, 8-二羟基-3, 5-二甲氧基吡酮; 2. 1-羟基-3, 5, 8-三甲氧基吡酮; 3. 1-羟基-3, 5-二甲氧基吡酮。

图 2 供试品的液相色谱图

2.2.2 对照品溶液的制备 精密称取1,8-二羟基-3,5-二甲氧基吡啶酮1.07 mg、1-羟基-3,5,8-三甲氧基吡啶酮0.96 mg和1-羟基-3,5-二甲氧基吡啶酮1.03 mg标准品置于10 mL容量瓶中,用甲醇溶解定容,配制成浓度分别为0.107、0.096、0.103 mg·mL⁻¹,并等体积混合对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液的制备 精密称取新疆假龙胆0.1 g(粉碎,过80目筛),放入具塞试管中,精密加入甲醇10 mL,精密称定,浸渍过夜,超声45 min(功率为260 W,频率为40 KHz),放冷,取出补重,微孔滤膜滤过(0.45 μm),取续滤液作为供试品溶液。

2.2.4 线性关系考察 取2.2.2项下制备的1,8-二羟基-3,5-二甲氧基吡啶酮、1-羟基-3,5,8-三甲氧基吡啶酮和1-羟基-3,5-二甲氧基吡啶酮混合对照品溶液1、2、5、10、20 μL,按2.2.1项下色谱条件进样,测定色谱峰面积,以进样质量为横坐标(X),峰面积为纵坐标(Y),进行线性回归,得回归方程:1,8-二羟基-3,5-二甲氧基吡啶酮为 $Y = 48\ 303X - 0.043$ ($r = 0.999\ 7$),1-羟基-3,5,8-三甲氧基吡啶酮为 $Y = 68\ 848X - 0.09$ ($r = 0.999\ 7$),1-羟基-3,5-二甲氧基吡啶酮为 $Y = 63\ 397X - 0.069$ ($r = 0.999\ 8$)。结果表明:1,8-二羟基-3,5-二甲氧基吡啶酮的进样量在35.7~713.4 ng;1-羟基-3,5,8-三甲氧基吡啶酮进样量在32~1280 ng;1-羟基-3,5-二甲氧基吡啶酮进样量在34.3~6860 ng时线性关系良好。

2.2.5 精密度试验 精密吸取2.2.3项下供试品溶液20 μL,按2.2.1项下色谱条件连续进样6次,测得1,8-二羟基-3,5-二甲氧基吡啶酮、1-羟基-3,5,8-三甲氧基吡啶酮和1-羟基-3,5-二甲氧基吡啶酮峰面积的RSD($n = 6$)分别为0.31%、0.27%、0.25%。表明该方法精密度良好。

2.2.6 稳定性试验 取同一供试品溶液10 μL,按2.2.1项下色谱条件下,分别于0、2、4、8、12、24 h进样,测得1,8-二羟基-3,5-二甲氧基吡啶酮、1-羟基-3,5,8-三甲氧基吡啶酮、1-羟基-3,5-二甲氧基吡啶酮的RSD分别为1.05%、1.33%、1.58%,表明供试液中3种成分在24 h内稳定性良好。

2.2.7 重复性试验 取同一批样品6份,精密称定,按2.2.3项下方法制备供试品溶液,进样10 μL,测得1,8-二羟基-3,5-二甲氧基吡啶酮、1-羟基-3,5,8-三甲氧基吡啶酮和1-羟基-3,5-二甲氧基吡啶酮峰面积的RSD($n = 6$)分别为2.48%、0.82%、2.63%。结

果表明该方法重复性较好。

2.2.8 加样回收率 精密称取已知含量的假龙胆样品粉末6份,精密称定,分别精密加入混合对照品溶液各2 mL,按2.2.3项下的方法制备供试品溶液,进样10 μL测定,计算回收率,结果1,8-二羟基-3,5-二甲氧基吡啶酮、1-羟基-3,5,8-三甲氧基吡啶酮和1-羟基-3,5-二甲氧基吡啶酮的平均回收率($n = 6$)分别为103.10%、100.02%、95.10%,RSD分别为1.25%、0.93%、2.62%,表明该方法准确度良好。具体数据见表1~3。

2.2.9 样品测定 取5批样品粉末,精密称定,按2.2.3项下方法制备供试品溶液,按2.2.1项下所述色谱条件进样10 μL,用外标法计算1,8-二羟基-3,5-二甲氧基吡啶酮、1-羟基-3,5,8-三甲氧基吡啶酮和1-羟基-3,5-二甲氧基吡啶酮的含量,结果见表4。

表1 1,8-二羟基-3,5-二甲氧基吡啶酮加样回收率实验结果

样品	样品含量/mg	加入对照品量/mg	实测总量/mg	回收率(%)	平均回收率(%)	RSD
1	0.025 66	0.024 58	0.050 63	101.62	103.10	1.25%
2	0.026 04	0.024 58	0.051 07	101.88		
3	0.025 50	0.024 58	0.050 97	103.66		
4	0.025 50	0.024 58	0.050 76	102.80		
5	0.025 58	0.024 58	0.051 01	103.48		
6	0.025 78	0.024 58	0.051 62	105.13		

表2 1-羟基-3,5,8-三甲氧基吡啶酮加样回收率实验结果

样品	样品含量/mg	加入对照品量/mg	实测总量/mg	回收率(%)	平均回收率(%)	RSD
1	0.070 48	0.069 12	0.139 54	99.91	100.02	0.93%
2	0.071 53	0.069 12	0.139 57	98.44		
3	0.070 06	0.069 12	0.139 89	101.03		
4	0.070 06	0.069 12	0.139 73	100.79		
5	0.070 27	0.069 12	0.139 61	100.32		
6	0.070 83	0.069 12	0.139 68	99.61		

表3 1-羟基-3,5-二甲氧基吡啶酮加样回收率实验结果

样品	样品含量/mg	加入对照品量/mg	实测总量/mg	回收率(%)	平均回收率(%)	RSD
1	0.011 43	0.011 77	0.022 26	92.01	95.10	2.62%
2	0.011 60	0.011 77	0.023 08	97.54		
3	0.011 37	0.011 77	0.022 82	97.28		
4	0.011 37	0.011 77	0.022 72	96.43		
5	0.011 4	0.011 77	0.022 61	95.24		
6	0.011 49	0.011 77	0.022 33	92.09		

表4 新疆假龙胆中3种吡啶类成分含量($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

批次	1, 8-二羟基-3, 5-二甲氧基吡啶	1-羟基-3, 5, 8-三甲氧基吡啶	1-羟基-3, 5-二甲氧基吡啶
1	0.27 ± 0.007 2	0.77 ± 0.004 9	0.15 ± 0.002 5
2	0.20 ± 0.006 4	0.69 ± 0.010 3	0.10 ± 0.003 8
3	0.21 ± 0.008 5	0.75 ± 0.036 3	0.12 ± 0.008 3
4	0.25 ± 0.004 2	0.65 ± 0.008 5	0.11 ± 0.004 7
5	0.28 ± 0.007 4	0.72 ± 0.021 6	0.10 ± 0.005 3

3 讨论

本文对从新疆假龙胆中分离得到的三个吡啶化合物1, 8-二羟基-3, 5-二甲氧基吡啶、1-羟基-3, 5, 8-三甲氧基吡啶和1-羟基-3, 5-二甲氧基吡啶进行了含量分析, 建立了高效液相含量测定方法, 结果表明该方法线性关系、重复性及稳定性好, 精密度和准确度高, 适合新疆假龙胆中1, 8-二羟基-3, 5-二甲氧基吡啶等3个吡啶化合物的含量测定, 为制定新疆假龙胆的质量标准奠定了基础。

本文将新疆假龙胆醇提物用石油醚、乙酸乙酯和正丁醇进行梯度萃取, 得到石油醚部分、乙酸乙酯部分、正丁醇部分和水部分, 但本文只对其中的石油醚和乙酸乙酯极性部分进行了分离纯化, 在接下来的实验中我们将利用现代先进的分离纯化及鉴定手段对正丁醇部分和水部分进行系统研究, 全面阐明新疆假龙胆的化学组成, 为进一步探索新疆假龙胆中药效物质基础研究提供化学材料, 这对于开发新疆假龙胆药用植物资源具有重要意义。

参考文献

- [1] 中国科学院《中国植物志》编辑委员会. 中国植物志:62卷[M]. 北京:科学出版社,1988:313-314.
- [2] 李旻辉,孙亚红,宋晓玲. 中国假龙胆属植物传统药物学的调查研究[J]. 包头医学院学报. 2010,26(3):3-5.
- [3] 霍丽云,王燕飞. 高寒藏药材—白花假龙胆药效成分的高效液相色谱测定[J]. 山东教育学院学报,2005,20(2):86-87,93.
- [4] 阿力同其米克. 蒙药材“特木日-地格达”的资源概况及有效成分对比研究[J]. 中国民族医药杂志,2013,5(5):31-34.
- [5] 阿力同其米克,姜湘英,郭继娜. RP-HPLC测定不同海拔新疆假龙胆中3种有效成分的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(24):114-118.
- [6] 杨建华,萨力塔娜提·热马赞,朱丹丹,等. RP-HPLC法同时测定新疆假龙胆中5种活性成分含量[J]. 中药新药与临床药理,2015(6):837-840.
- [7] 努尔拉江,吐鲁洪卡地尔,阿达来提,等. 新疆假龙胆中有效成分提取工艺的研究[J]. 中国民族医药杂志,2011,17(3):57-60.
- [8] Shikl, Wang YQ, Jiang Q, et al. Chemical Constituents of *Gentiana azurea*[J]. Chin J Nat Med Nov,2010,8(6):425-428.
- [9] 李兆云,王聪,张楨,等. 宾川獐牙菜化学成分研究[J]. 时珍国医国药,2011,5(22):1086-1087.
- [10] 康小东,吴学芹,张鹏. 薤白的化学成分研究[J]. 现代药物与临床,2012,27(2):97-99.
- [11] 周大颖,杨小生,杨波,等. 黔产毛子草化学成分研究[J]. 天然产物研究与开发,2007,19(5):807-808.

(收稿日期 2016-01-05)

(上接第757页)

- [5] 黄玲. 雷公藤药理作用研究进展[J]. 江西中医药,2000(2):45-46.
- [6] 水光兴,万毅刚,蒋春明,等. 雷公藤及其活性成分药理学和药理学研究的若干进展[J]. 中国中药杂志,2010,35(4):515.
- [7] Tong Y R, Su P, Zhao Y J, et al. Molecular cloning and characterization of *DXS* and *DXR* genes in terpenoid biosynthetic pathway from *Tripterygium wilfordii*. [J]. Int J Mol Sci, 2015,16:25516-25535.
- [8] Zhang M, Su P, Zhou Y J, et al. Identification of geranylgeranyl diphosphate synthase genes from *Tripterygium wilfordii* [J]. Plant Cell Rep, 2015,34:2179-2188.
- [9] 张萌,苏平,刘雨佳,等. 雷公藤牻牛儿苗牻牛儿苗基焦磷酸合酶基因全长 cDNA 的获得及生物信息学分析[J].

中国中药杂志,2015,40(6):1066-1070.

- [10] 童宇茹,苏平,张萌,等. 雷公藤 MCT 基因的全长克隆与表达分析[J]. 中国中药杂志,2015,40(22):4378-4383.
- [11] Zhao Y J, Chen X, Zhang M, et al. Molecular cloning and characterisation of farnesyl pyrophosphate synthase from *Tripterygium wilfordii* [J]. PLoS One, 2015,10:1-13.
- [12] 赵瑜君,张萌,刘雨佳,等. 雷公藤乙酰 CoA 酰基转移酶基因全长 cDNA 克隆及表达分析[J]. 中国中药杂志,2015,40(5):847-852.
- [13] 陈铭祥,冯玉静,王定勇,等. 雷公藤红素的研究进展[J]. 中成药,2010,32(3):473-476.
- [14] Zhang L X, Yu F K, Zheng Q Y, et al. Immunosuppressive and anti-inflammatory activities of tripteryrine [J]. Acta Pharm Sin, 1990,25:573-577.

(收稿日期 2016-09-30)