

MAPKs)级联是细胞内重要的信号转导系统,细胞运用这一系统可将胞外刺激信号传递给胞核,从而参与细胞增殖、分化、转化及凋亡等一系列生理、病理过程。P38MAPK通路是MAPKs级联系统中的重要一支,其表达和活性的变化可有效调节和阻断关键的信号通路,调节细胞凋亡^[3,4]。本实验采用免疫组化法检测了不同浓度β-榄香烯作用下,胃癌BAC823细胞内P-P38MAPK的表达情况。实验结果显示,各药物处理组P-P38MAPK的表达均强于空白对照组($P < 0.01$)。且随药物浓度的增加,P-P38MAPK的表达亦增强。由P38MAPK的活化情况说明β-榄香烯在作用于BAC823细胞时可激活胞内的P38MAPK通路,且此激活作用随药物浓度的增加而增强。由此我们推测β-榄香烯在诱导肿瘤细胞凋亡的过程,很可能与P38MAPK通路的参与有关。但P38MAPK通路在β-榄香烯诱导肿瘤细胞BAC823凋

亡的过程中是否确实起到了促凋亡调控作用,对其他MAPK通路的影响如何,P38MAPK通路与β-榄香烯的抗耐药性间有没有关系,对细胞凋亡与细胞阻滞周期是否同时起作用等问题还有待于进一步深入的研究与证实。

参考文献:

- [1] 花文峰,蔡绍晖. β-榄香烯抗肿瘤作用的基础与临床研究[J]. 中药材, 2006, 29(1): 93.
- [2] 邹丽娟,李杰,于丽敏,等. β-榄香烯抗癌作用与诱发肿瘤细胞凋亡的研究[J]. 大连医科大学学报, 1998, 20(2): 9.
- [3] 章必成,杜光祖. P38MAPK在细胞凋亡中的作用[J]. 华南国防医学杂志, 2002, 16(1): 22.
- [4] 梁先敏,杨克敌. Caspase和JNK/SAPK、P38MAPK与细胞凋亡[J]. 国外医学·卫生学分册, 2008, 35(1): 5.

云南不同产地滇龙胆中龙胆苦苷的含量测定

来国防^{1,2},程宾²,罗士德¹,王易芬^{*}

(1. 云南省食品药品检验所, 云南昆明 650011;

2. 中国科学院昆明植物研究所, 植物化学与植物资源持续利用国家重点实验室, 云南昆明 650204)

摘要:目的 建立HPLC法测定云南不同产地滇龙胆中龙胆苦苷的方法。方法 色谱柱为Waters Sunfire RP₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm)柱,流动相为甲醇-水溶液(20:80),柱温35℃,体积流量1.0 ml/min,检测波长270 nm。结果 龙胆苦苷在0.0774~1.1604 mg($r = 0.9998$)线性关系良好,平均回收率为98.8% ($RSD = 1.86\%$, $n = 9$),检测10批样品其龙胆苦苷的含量在2.75%~4.87%之间。结论 该方法简便快速、准确,可为评价滇龙胆药材质量提供依据。

关键词: 高效液相色谱法; 滇龙胆; 龙胆苦苷

DOI标识: doi:10.3969/j.issn.1008-0805.2010.08.009

中图分类号: R284.2 文献标识码: A 文章编号: 1008-0805(2010)08-1867-02

Determination of Gentiopicroside in the Plant of *Gentiana rigescens* from Different Regions in Yunnan Province by HPLC

LAIGUO-fang^{1,2}, CHENG Bin², LUO Shide¹, WANG Yifan^{*}

(1. Yunnan Institute for Food and Drugs Control, Kunming 650011, China; 2. State Key Laboratory of Phytochemistry and Plant Resources in West China, Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650204, China)

Abstract Objective To establish the method of the gentiopicroside in the plant of *Gentiana rigescens* from different regions in Yunnan province by HPLC. **Methods** The Waters Sunfire C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) was used with mixture liquid of methanol and water (20:80) as mobile phase. The detection wavelength was 270 nm, the column temperature was 35°C, and the flow rate was 1.0 ml/min. **Results** Gentiopicroside showed a good linear relationship within the range of 0.0774~1.1604 mg ($r = 0.9998$), the recovery rate was 98.8%, and RSD was 1.86% ($n = 9$). The gentiopicroside content of *Gentiana rigescens* in 10 different regions was within the range of 2.75%~4.87%. **Conclusion** The method is simple and accurate and can be used to identify and evaluate the quality of *Gentiana rigescens*.

Key words HPLC; *Gentiana rigescens*; Gentiopicroside

龙胆为常用中药,《中国药典》收载龙胆 *Gentiana scabra*

Bge, 条叶龙胆 *G. manshurica* Kitag, 三花龙胆 *G. triflora* Pall. 或坚龙胆 *G. rigescens* Franch 的干燥根及根茎,前3种习称“龙胆”,后一种习称“坚龙胆”。坚龙胆主产云南又称为滇龙胆。滇龙胆含多种化学成分,如环烯醚萜类,生物碱类,挥发油类等,其中环烯醚萜类是其特征性成分,其功效有清肝火、除湿热、健胃等^[1]。为充分利用云南丰富的龙胆药材资源,本实验以龙胆苦苷为指标成分,采用HPLC法测定了来自云南不同地区的10份滇龙胆样品,为评价滇龙胆药材质量提供一定的科学依据。

1 材料

1.1 样品来源 实验所用滇龙胆样品,经中国科学院昆明植物研究所罗士德研究员鉴定,为龙胆科滇龙胆 *G. rigescens* Franch 的

收稿日期: 2009-09-20 修订日期: 2010-03-28

基金项目: 国家自然科学基金(N020872148);

云南省中药现代化研究项目(N02002Y-6);

云南省技术创新人才培养对象第九批项目(N02009C1107)

作者简介: 来国防(1973-),男(汉族),河南柘城人,现任云南省食品药品检验所副主任药师,博士学位,主要从事中草药活性成分及中药质量标准研究工作。

* 通讯作者简介: 王易芬(1974-),女(汉族),四川合江人,现任中国科学院昆明植物研究所副研究员,硕士研究生导师,博士学位,主要从事中草药活性成分及中药质量标准研究工作。

干燥根及根茎,其植物标本存放于中国科学院昆明植物研究所。

1.2 仪器与试剂 美国 Waters 2695 高效液相色谱仪及其配套工作站, DAD 检测器检测, 甲醇为色谱纯 (美国 Fisher 公司), 水为二次蒸馏水, 0.45 μm 针式微孔滤膜, 其他试剂均为分析纯, 龙胆苦苷对照品由中国药品生物制品检定所提供, 批号: 110770-20051Q 供含量测定用。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱为 Waters Sunfire RP₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相为甲醇-水溶液 (20: 80), 柱温 35℃, 体积流量 1.0 ml/min, 检测波长 270 nm。

2.2 对照品溶液的制备 精密称取龙胆苦苷对照品 9.67 mg 置入 25 ml 容量瓶中, 加甲醇超声溶解, 定容至刻度, 即得。

2.3 供试品溶液的制备 取滇龙胆干燥的根粉碎后过 4 号筛, 取约 0.5 g 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加甲醇 25 ml 称定重量, 超声处理 (功率 250 W, 频率 20 kHz) 15 min 后放冷, 再称定重量, 用甲醇补足减失的重量, 混匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.4 线性关系考察 精密吸取龙胆苦苷对照品溶液 2.5, 10, 15, 20, 30 μl 注入液相色谱仪进行测定。以峰面积 (Y) 对进样浓度 (X) 进行回归处理, 得到龙胆苦苷回归方程为: $Y = 12.887230X - 147.037.8$ ($r = 0.9998$), 线性范围为 0.0774 ~ 1.1604 mg/ml 见图 1~2。

质量分数, RSD 为 1.43%, 表明在本实验条件下供试品溶液在室温下放置 10 h 内基本稳定。

2.8 回收率实验 取云南 (通海) 滇龙胆样品粉末 9 份各约 0.25 g 精密称定, 分别按其质量分数的 80%, 100%, 120% 精密加入龙胆苦苷对照品适量, 按“2.3”项下的方法制备供试品溶液, 进行测定, 计算加样回收率, 结果平均加样回收率为 98.8%, RSD 为 1.86%, 表明本法回收率较好。

2.9 样品测定 取云南 10 个不同地域的滇龙胆样品的根, 按“2.3”项下的方法制备供试品溶液, 进行测定, 以外标法计算龙胆苦苷的质量分数。结果见表 1。

表 1 云南不同地域滇龙胆中龙胆苦苷的测定结果

| 编号 | 产地 | 龙胆苦苷 (%) |
|----|-------|----------|
| 1 | 嘎洒 | 4.87 |
| 2 | 墨江 | 3.03 |
| 3 | 石屏 | 3.86 |
| 4 | 新平 | 3.79 |
| 5 | 玉溪洛和 | 4.34 |
| 6 | 玉溪小石桥 | 4.00 |
| 7 | 通海 | 2.75 |
| 8 | 玉溪秧草塘 | 2.85 |
| 9 | 大理 | 3.62 |
| 10 | 普洱 | 3.57 |

n = 2

3 讨论

3.1 提取条件的考察 以龙胆苦苷为指标, 采用正交实验考察了药材粒度、提取溶剂、溶剂用量、提取方法等因素对实验结果的影响, 结果表明提取溶剂、加热回流对试验结果有显著影响, 其余因素影响甚微, 优选出的最佳提取条件为药材粉碎成中粉, 加 50 倍量的甲醇超声处理 15 min。

3.2 检测波长的选择 参考《中国药典》2005 年版 I 部龙胆药材含量测定项下的检测波长为 270 nm, 故本实验检测波长仍选用 270 nm。

3.3 流动相的考察 根据文献报道^[2-4], 目前测定龙胆苦苷是 HPLC 方法, 所采用流动相系统有甲醇-水, 乙腈-水, 甲醇-0.4% 磷酸溶液等, 再根据具体的仪器及色谱柱调节流动相比例, 本实验参照《中国药典》2005 年版 I 部龙胆药材含量测定项下流动相系统, 即: 甲醇-水, 并在此基础上进行适当调节, 最终选择甲醇-水 (20: 80)。

参考文献:

[1] 吴征镒, 周太炎, 肖培根, 等. 新华本草纲要, 第 2 册 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1991: 392.
 [2] 国家药典委员会. 中国药典, I 部 [S]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 64.
 [3] 吴志平, 张发成, 毛志英. HPLC 法测定骨刺消痛胶囊中龙胆苦苷的含量 [J]. 药学与临床研究, 2008, 16(5): 408.
 [4] 俞桂新, 王峥涛, 董婷霞, 等. 龙胆药材中龙胆苦苷的含量测定 [J]. 上海中医药杂志, 2005, 39(11): 53.

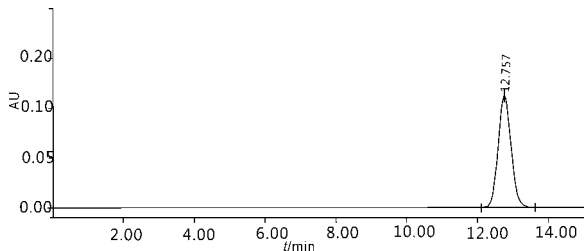


图 1 龙胆苦苷对照品

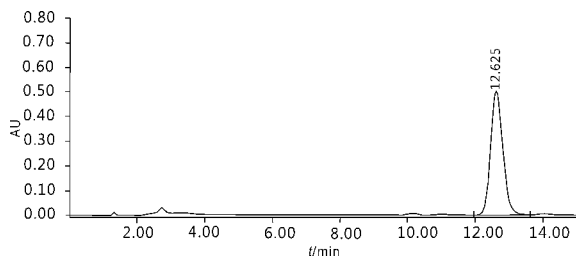


图 2 滇龙胆样品

2.5 精密度实验 精密吸取对照品溶液 10 μl 连续进样 5 次, 测定龙胆苦苷峰面积, 结果其 RSD 为 1.40%, 表明仪器的精密度良好。

2.6 重复性实验 取同一样品, 按“2.3”项下的方法平行制备 6 份供试品溶液, 进行测定, 计算龙胆苦苷质量分数, RSD 为 1.36%, 表明该条件重复性良好。

2.7 稳定性实验 将同一样品已制备好的供试品溶液在室温下放置 0, 2, 4, 6, 8, 10 h 后分别进样 10 μl 进行测定, 计算龙胆苦苷