

在预试验中小鼠在灌服衣滞康散药液 7 d 内,除第 1 天灌胃后动物有短暂不适、活动减少外,未见动物发生中毒症状和死亡,每组随机取小鼠 2 只,断头处死后病理剖检,未发现眼观病理变化。正式试验中采用简化寇氏法给药,给药体积超出小鼠正常生理代偿能力时,小鼠未出现中毒症状和死亡,所以不能精确测定衣滞康散的 LD_{50} ,综合预试验和正式试验,说明其 $LD_{50} > 60$ g/kg 体重,而无法准确测定 LD_{50} ,故进行最大给药量测定试验,经计算该药的最大耐受倍数为奶牛治疗量 (2 g/kg) 的 100 倍,10 d 内只有前 3 d 小鼠精神萎靡、皮毛不整,食欲减退,第 3 天小鼠恢复正常,试验结束时无一死亡。

2.2 蓄积性毒性试验结果

衣滞康散对小鼠蓄积性毒性试验结果见表 4。试验组小鼠在连续给药 20 d 内无一死亡,眼观和病理剖检未发现任何异常变化,经计算该药的蓄积系数 $k > 5.28$,按蓄积评价标准该药属弱蓄积性或基本无蓄积性。与对照组比较试验组小鼠正常生长,在 20 d 内,试验组小鼠体重由 (18.47 ± 1.55) g 增至 (31.98 ± 1.64) g,对照组小鼠体重由 (18.50 ± 1.75) g 增至 (32.24 ± 1.58) g,差异不显著。

表 4 衣滞康散蓄积性毒性试验结果

给药时间 / d	累计剂量 / g · kg ⁻¹	死亡动物数 / 只		小鼠体重 / g	
		对照组	用药组	对照组	用药组
0	0	0	0	18.50 ± 1.75	18.47 ± 1.55
1 - 4	24	0	0	22.02 ± 2.00	21.89 ± 2.12
5 - 8	36	0	0	25.43 ± 1.85	25.27 ± 1.94
9 - 12	52.8	0	0	27.96 ± 1.74	27.80 ± 1.79
13 - 16	81.6	0	0	29.41 ± 1.87	29.28 ± 1.69
17 - 20	120	0	0	32.24 ± 1.58	31.98 ± 1.64

参考文献:

- [1] 刘树民,李玉洁. 中药毒性研究及思路探 [J]. 世界科学技术·中医药现代化, 2003, 5(2): 21 - 23
- [2] 李寿祺. 毒理学基本原理和方法 [M]. 成都: 四川大学出版社, 2003: 77 - 90
- [3] 谢秀琼. 中药新制剂开发与应用 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2000: 155

HPLC 法测定山西道地中药连翘中连翘苷的含量

武果桃¹, 刘红霞², 任杰¹, 孟冬霞¹, 赵娟¹, 孙建钢¹

(1. 山西省农业科学院畜牧兽医研究所, 山西太原 030032; 2. 山西农业大学)

中图分类号: S859.7

文献标识码: A

文章编号: 1000 - 6354(2009)03 - 0049 - 02

连翘 *Forsythia suspensa* (Thunb.) Vahl 为木犀科连翘属植物连翘的干燥果实,气微香味苦,按采收时期不同,分青翘、老翘^[1]两种。连翘主产于山西、河南、陕西、山东等地,以山西、河南产量最大^[3]。为常用的清热解毒中药,具有清热解毒、消肿散结的功效。现代药理研究证明,连翘有抗菌、抗炎、解热、抗肝损伤、镇吐、利尿、解压等作用。其主要成分为连翘苷、连翘苷元、连翘酯苷、连翘酚、芦丁等,《中国药典》以连翘苷作为指标成分控制连翘的质量^[2]。其测定方法虽有一些报道^[4,5],但无法确定检验方法。中药指纹图谱是一种综合、可量化的鉴别手段,是利用现代交叉学科去阐述中医中药精髓,是当前符合中药特色的评价中药真实性、稳定性和一致性的质量控制模式之一。本试验以连翘苷作为指标成分,对连翘苷建立了反相高效液相色谱分析方法,经过大量试验,优化了提取分离方法及色谱测定条件,并以此为基础,对 11 批山西道地连翘药材中的连翘苷进行了含量测定,方法学考察表明,该法简便易行,重现性好,为控制连翘质量

提供了科学依据。

1 仪器与试剂

1.1 高效液相色谱仪 (上海伍丰科学仪器有限公司),紫外检测器 (上海伍丰科学仪器有限公司),DST20500 超声清洗器 (天津 DOC - CHROM 技术有限公司)。

1.2 连翘苷对照品,批号 110821 - 200609,购自中国药品生物制品检定所,供含量测定用。11 批连翘供试品,购自产地市场,均经品种鉴定。色谱用试剂甲醇和乙腈为色谱纯 (天津市四友精细化学品有限公司),提取用甲醇为分析纯 (天津市四友精细化学品有限公司),水为重蒸馏水 (实验室自备)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

PT - 230A column heater Apollo C₁₈ 柱 (150 mm × 4.6 mm, 5 μm), LC - UV 100 紫外检测器, LC - P100 高压恒流泵,上海伍丰工作站,流动相乙腈 - 水为 25 : 75,流速 0.8 mL/min,柱温 40℃,检测波长 280 nm,进样量 20 μL,分析时间 60 min。

2.2 供试品溶液的制备

收稿日期: 2008 - 12 - 09

基金项目: 山西省农业科学院高新技术研究资助项目

作者简介: 武果桃 (1967 -),女,助理研究员,主要从事中兽药研究。

将供试品连翘研成粉末,精密称取 1 g 粉末各 2 份,分别加入无水甲醇 15 mL,冷浸过夜,超声提取 30 min,过滤至容量瓶中,定容至 50 mL,过 0.45 μ m 膜,作为供试品溶液。

2.3 对照品溶液的制备

精密称定连翘苷标准品 6.5 μ g,用色谱纯甲醇定容至 50 mL,梯度稀释为 0.13、0.065、0.0325、0.01625 mg/mL,分别过 0.45 μ m 膜,作为标准品溶液。

2.4 色谱测定

取待测溶液适量,注入液相色谱仪,按选定的测试条件测定色谱图,并进行实验方法学考察。从紫外图谱(图 1)中可以看出,连翘苷在 280 nm 处有最大吸收,因此选择 280 nm 作为检测波长。

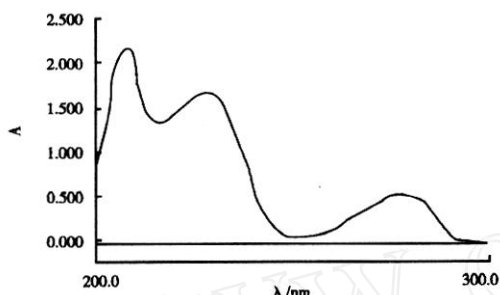


图 1 紫外检测波长的选择

2.5 标准品纯度检测

吸取连翘苷溶液 15 μ L,注入高效液相色谱仪,按上述色谱条件测定,得连翘苷对照品纯度为 99.98%。

2.6 线性范围考察

精密吸取 0.13、0.065、0.0325、0.01625 mg/mL 的连翘苷对照品溶液各 20 μ L,注入液相色谱测定,以进样量为横坐标,峰面积积分值为纵坐标,计算回归方程为:

$$Y = 1.65009e - 0.07x, R^2 = 0.998546$$

相对标准偏差 (RSD) 为 1.81%,连翘苷在 0.0165 - 0.13 mg/mL 范围内峰面积与其浓度呈良好线性关系(见图 2)。

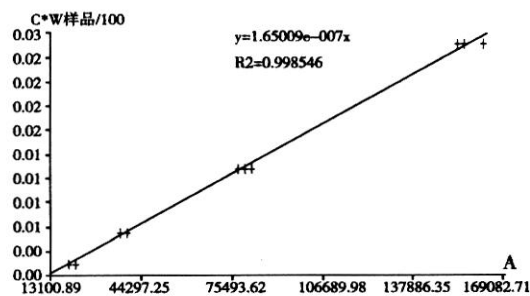


图 2 连翘苷校准曲线

2.7 精密度试验

精密吸取 0.13 mg/mL 对照品溶液 20 μ L,重复进样 5 次,平均峰面积分值为 79 424.8, RSD 为 1.81% (n=5),精密度良好。

2.8 重复性试验

取同一样品 5 份,按供试品溶液制备方法,在现实色谱

条件下,测得含量平均值为 (RSD 为 0.96%),表明方法重复性良好。

2.9 供试品的测定

同一上述实验条件下,进行 11 批连翘供试品 HPLC 色谱测定。根据 11 批供试品测定结果所给出的峰数、峰值(积分值)和峰位(相对保留时间)等相关参数,进行分析、比较,制定优化指纹图谱,运用相似度评价法和主成分分析法对各样品指纹图谱进行化学模式识别研究,对照品连翘苷及连翘的 HPLC 图谱见图 3、4。

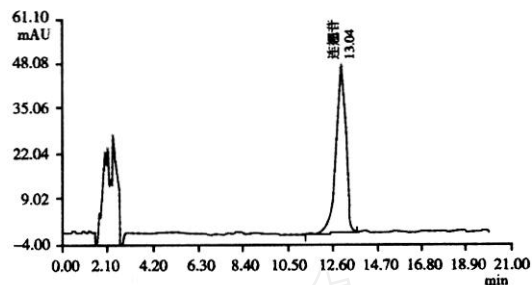


图 3 对照品连翘苷的 HPLC 图谱

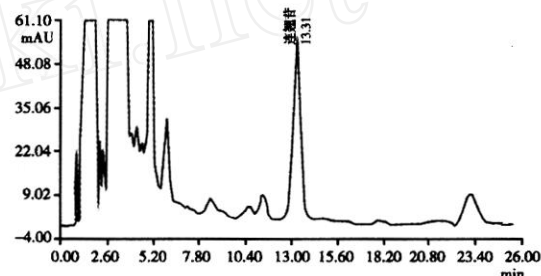


图 4 供试品连翘的 HPLC 图谱

3 讨论

3.1 连翘所含成分比较复杂,药理实验表明,连翘苷具有较强的抑菌、抗病毒活性,为其有效成分之一,且含量较高,化学性质稳定,因此可选择其作为指标成分对连翘药材质量进行控制。

3.2 本试验选取了超声提取和索氏提取两种提取方法并进行对比,尽可能将分析样本中有效成分进行有效分离,以保证试验数据的可靠性。结果以超声提取方法更为适宜。

3.3 试验中采用不同的流动相,即甲醇-水(25:75),乙腈-水-冰醋酸(25:75:0.5),选用甲醇-水(35:65),加入少量四氢呋喃作流动相,结果峰形不甚理想,采用乙腈-水后可有效地改善峰形,而且乙腈浓度的变化可明显影响连翘苷的保留时间。结果表明采用流动相乙腈-水(25:75)的色谱图基线较稳。

3.4 样品测定结果表明,不同采收期的连翘的连翘苷含量相差较大,青翘中的连翘苷含量相对较高。通过对 11 批样品中连翘苷的测定,结果表明最高含量为 13.11 mg/g,最低为 0.23 mg/g,平均含量为 4.99 mg/g。

3.5 本方法结果准确,方法简便,灵敏度和准确度高,重现性好,可作为中药连翘的质量控制方法。