

[参考文献]

- [1] 张璐. 千金方衍义 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 1995: 220
- [2] 张政. 苦参汤新用举隅 [J]. 陕西中医, 1998, 19(4): 175.
- [3] 王雅娟, 董西林, 范引侠. 苦参汤治疗霉菌性阴道炎 120 例 [J]. 陕西中医, 1999, 20(1): 28.
- [4] 李立. 苦参汤加味治疗慢性溃疡性结肠炎 28 例临床观察 [J]. 甘肃中医, 1998, 11(2): 27.
- [5] 王新宏, 安睿, 邹云, 等. 数字化色谱指纹谱技术在双黄连制剂质量及药材鉴定中的应用 [J]. 中草药, 2002, 33(2): 115.
- [6] 胡柳, 栾连军, 程翼宇. 复方有效部位与组方药材指纹图谱色谱峰相关性研究 [J]. 中国药学杂志, 2004, 39(12): 895.
- [7] 李春成, 杨星昊, 崔敬浩, 等. 大孔吸附树脂分离纯化四逆散活性部位的研究 [J]. 中成药, 2005, 27(1): 84.

HPLC fingerprint of flavonoids of Kushen Tang and its correlation to *Scutellaria baicalensis* and *Sophora flavescens*

LU Bin, SHI Ren-bing, ZHU Li-jun

(School of Chinese Pharmacology, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China)

[Abstract] **Objective:** To establish the HPLC fingerprint of the flavonoids of Kushen Tang, and to study its correlation to *Scutellaria baicalensis* and *Sophora flavescens*. **Method:** The fingerprints of the flavonoids of Kushen Tang were established by HPLC under two detective wavelengths 280 nm and 365 nm. The correlation existed in the common peaks of HPLC fingerprint of Kushen Tang and the Chinese materia medicines which composed the prescription was explored by analyzing the HPLC fingerprints of different compatibilities. The chemical constituents which the common peaks stood for were analyzed by adding controls to the samples respectively. **Result:** Under the detective wavelength 280 nm, 19 common peaks were found, which came from *S. baicalensis* except that two peaks came from *S. flavescens*, and eight peaks were baicalin/trifolirhizin, wogonoside, luteolin, baicalein, oroxylin A, 5, 8-dihydroxy-6, 7-dimethoxyflavone, wogonin and fomononetin/chrysin respectively. Under the detective wavelength 365 nm, 22 common peaks were found, which thirteen peaks came from *S. baicalensis* and six peaks came from *S. flavescens*. Among them, eleven peaks were baicalin, wogonoside, baicalein, oroxylin A, 5, 8-dihydroxy-6, 7-dimethoxyflavone, wogonin, chrysin/7-methoxyflavone, 2, 4-dihydroxy-4, 6-dimethoxychalcone, 4, 4'-dimethoxychalcone, xanthohumol and kuraridin respectively. **Conclusion:** The common peaks of HPLC fingerprint of the flavonoids of Kushen Tang, which were obtained under the two detective wavelengths 280 nm and 365 nm, came from *S. baicalensis* and *S. flavescens*. It was more scientific and comprehensive that establishing the HPLC fingerprint of the flavonoids of Kushen Tang under the detective wavelength 365 nm.

[Key words] Kushen Tang; flavonoids; fingerprint; *Scutellaria baicalensis*; *Sophora flavescens* [责任编辑 鲍雷]

HPLC测定胆南星中猪去氧胆酸的含量

赫炎¹, 张永欣², 赵惠东², 张启伟^{2*}

(1. 中国中医科学院 中医临床基础研究所, 北京 100700;

2. 中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700)

[摘要] 目的: 建立胆南星中猪去氧胆酸含量测定方法, 为其质量控制提供方法。方法: 用 HPLC 蒸发光散射检测测定样品的猪去氧胆酸含量。色谱和检测条件: Diamonsil C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 柱温 35 °C; 流

[收稿日期] 2006-07-19

[通讯作者] *张启伟, Tel: (010) 64014411-2848, E-mail: zhangqw1955@163.com

动相甲醇-水-冰醋酸(75:25:0.01),流速 $1\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$;漂移管温度 85°C ,空气流速 $3.0\text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ 。结果:猪去氧胆酸进样量在 $2.4\sim 24\ \mu\text{g}$,进样量和峰面积的对数呈线性($r=0.9998$)。平均加样回收率为 97.1% ,RSD 3.0% ($n=5$)。结论:方法简便,测定准确,且重复性好,可用于胆南星的质量控制。

[关键词] 胆南星;猪去氧胆酸;含量测定;HPLC-ELSD

[中图分类号] R 284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1001-5302(2007)16-1634-03

胆南星为天南星炮制品之一,系由制或生天南星细粉与牛、羊或猪胆汁经加工炮制而成。胆汁制南星,既可减低生南星毒副作用,又使其药性由温转凉,变温化寒痰药为清化热痰、息风定惊之品。本草认为治惊风有奇效。胆南星的原药材为天南星,其药用物质基础研究很少,特别是与传统药效相对应的化学成分尚不清楚。目前,胆南星疗效成分也不完全清楚,尚无完整而准确地表述和控制胆南星药用质量的统一化学成分指标。因此,需要从化学成分的层面提供对胆南星进行质量控制方法和实验研究的支持。

作为胆南星主要加工辅料胆汁,古代和现代文献均对其药效作用给予重要评价,现代实验药理学研究也报道胆汁具有一定镇静、安神,调节心血管系统作用。作者在胆南星工艺比较研究中,也见到了胆汁在镇静方面有一定的作用,因此胆汁含量的变化无疑可以部分反映炮制品药用质量及炮制工艺的稳定性。现市售胆南星多为用猪胆汁做辅料加工而成。作者按《中国药典》胆南星项下的发酵及混合蒸制法的炮制工艺,用猪胆汁分别实验研制胆南星炮制品,对其猪去氧胆酸含量检测方法进行了研究,在此基础上进行了含量测定,以期对炮制品控制提供方法。

1 仪器与试剂

HP1100型单元泵和 3395型积分仪;Alltech500型蒸发光散射检测器;空气发生器(北京汇龙公司);沙得利司 2004MP型电子半微量天平。甲醇(色谱级),超纯水(本所制备),其他试剂均为分析纯。猪去氧胆酸(含量 98% ,Sigma公司)。

药材为掌叶半夏 *Pinellia pedatisecta* Schott的块茎,制南星按《中国药典》制南星项下的炮制法制备。胆南星按《中国药典》胆南星项下的发酵法及混合蒸制法炮制。猪胆汁由北京房山畜牧屠宰厂提供猪胆囊中直接取出后得到。制南星细粉与猪胆汁混合加入量比为 $1:6$ 。

2 方法与结果

2.1 测定方法 色谱条件:Diamondsil C_{18} 色谱柱

($4.6\text{ mm}\times 250\text{ mm},5\ \mu\text{m}$),柱温 35°C ;流动相甲醇-水-冰醋酸(75:25:0.01),流速 $1\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$;蒸发光散射检测器漂移管温度 85°C ,空气流速 $3.0\text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ 。在此条件下,猪去氧胆酸与其他组分均能达到较好分离,见图 1。

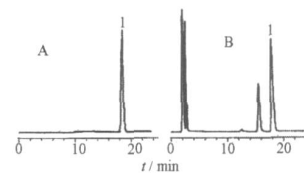


图 1 猪去氧胆酸和胆南星分离色谱图

A. 猪去氧胆酸; B. 胆南星; 1. 猪去氧胆酸

2.2 溶液的制备 对照品溶液:精密称取猪去氧胆酸对照品 12 mg ,置 10 mL 量瓶中,加甲醇溶解,稀释至刻度,摇匀,即得(每 1 mL 中含猪去氧胆酸 1.2 mg)。

供试品溶液:取胆南星粉末约 0.5 g ,精密称定,置 50 mL 三角瓶中,准确加入甲醇 20 mL ,称重,水浴回流 45 min ,放至室温,补至原重,摇匀滤过,取续滤液(必要时适当浓缩,过滤)供色谱分析用。

2.3 方法评价 精密度试验:取供试品溶液连续进样 5 次,进样量 $10\ \mu\text{L}$,测定峰面积。猪去氧胆酸峰面积的 RSD 为 1.2% 。

线性关系考察:精密称取猪去氧胆酸对照品 12.78 mg ,用甲醇溶解,定容于 10 mL 量瓶中。分别进样 $2, 5, 10, 15, 20\ \mu\text{L}$,测定峰面积。以猪去氧胆酸进样量的对数为横坐标,以峰面积的对数为纵坐标,得回归方程: $\lg A = 1.4608 \lg m + 5.4502$, $r = 0.9998$ 。对照品进样量在 $2.4\sim 24\ \mu\text{g}$,进样量的对数与峰面积的对数呈线性。由于截距较大,采用外标两点法定量。

样品溶液的稳定性:取新鲜制备的供试品溶液,室温放置,于 $0, 1, 2, 3, 4, 5, 24\text{ h}$ 测定,含量的 RSD 为 1.6% 。

重复性试验:对同一批样品平行取样 5 份,进行测定,计算含量的 RSD 为 0.53% 。

回收率试验:取已知含量样品约 0.25 g ,精密称

定,共 5 份。分别加入猪去氧胆酸对照品甲醇溶液 5 mL ($2.3912 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$),再精密加入甲醇 15 mL,依供试品溶液制备方法操作。测定猪去氧胆酸,计算回收率,结果见表 1。

表 1 猪去氧胆酸加样回收率

| 称样量 /mg | 样品中含量 /mg | 测得量 /mg | 回收率 /% | 平均值 /% | RSD /% |
|---------|-----------|---------|--------|--------|--------|
| 252.10 | 12.03 | 24.22 | 101.9 | 97.1 | 2.9 |
| 251.03 | 11.98 | 23.63 | 97.4 | | |
| 251.37 | 12.00 | 23.35 | 94.9 | | |
| 253.85 | 12.11 | 23.54 | 95.6 | | |
| 250.59 | 11.96 | 23.39 | 95.6 | | |

注:加入量均为 11.96 mg

2.4 样品测定

精密取对照品溶液 5, 10 μL 与供试品溶液 10 ~ 25 μL 进样,测定发酵法和混合蒸制法制品的 3 批样品,结果见表 2。

表 2 3 批样品测定

| 样品名称 | 猪去氧胆酸 /% |
|-------|----------|
| 药典发酵法 | 4.38 |
| 蒸法 1 | 1.79 |
| 蒸法 2 | 0.54 |
| 猪胆汁 | 0.72 |

3 讨论

猪胆汁中的胆汁酸多以结合的形式存在,即主要以甘氨酸猪去氧胆酸存在,但市场上很难得到对照

品。另外考虑到结合胆汁酸水解需在 20% 氢氧化钠、120 条件下完成,这步操作在实际的质量控制工作中不易实现,因此测定了胆南星中游离的猪去氧胆酸。

本测定方法是在参考文献 [1, 2] 的基础上,经在所选色谱条件下注入胆酸、去氧胆酸、鹅去氧胆酸对照品,证明在本系统中可以把猪去氧胆酸与上述常见到胆汁酸分离,并且取制南星和生南星按供试品溶液和样品测定项下提取分析,在猪去氧胆酸出峰的位置无干扰,因此所建立的方法具有较强的专属性。

若实际检测样品的猪去氧胆酸含量较低,如按混合蒸制所得样品,可将甲醇提取液浓缩 5 倍后进样。

本实验结果中,2 种不同制法所得样品含量差异较大,提示样品的发酵过程可能促进游离猪去氧胆酸的形成。其中发酵法所得样品虽然游离的猪去氧胆酸含量较高,但 2 种方法所得制品的药用质量比较,还有待于进一步的药效和毒理学实验检测。

[参考文献]

- [1] 肖学风,陈新培. HPLC 猪胆汁膏中猪去氧胆酸含量 [J]. 天津中医, 2002, 19(6): 42
- [2] 冯芳,马永建,陈明,等. 反相高效液相色谱-蒸发光散射检测法同时测定人工牛黄中多组分含量 [J]. 药学学报, 2000, 35(3): 216

Determination of hyodeoxycholic acid in Bile Arisaema by HPLC-ELSD

HE Yan, ZHANG Yong-xin, ZHAO Hui-dong, ZHANG Qiwei

(Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] Objective: To develop an HPLC method for the determination of hyodeoxycholic acid in Bile Arisaema. **Method:** The methanol extracts were separated on a Diamonsil ODS column eluted at 35 with a mixture of methanol-water-glacial acetic acid (75:25:0.01) at flow-rate $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. The drift-tube temperature of ELSD was 85, and the flow rate of air was $3.0 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$. **Result:** Hyodeoxycholic acid in methanol extract was well separated, the relationship of logarithms of injection amount and peak area was linear ($r=0.9998$) over the range of 2.4-24 μg . The average recovery was 97.1% (RSD 2.9%, $n=5$). **Conclusion:** The method could be used for quality control of Bile Arisaema.

[Key words] Bile Arisaema; hyodeoxycholic acid; assay; HPLC-ELSD

[责任编辑 鲍雷]