

液的制备方法制得供试液,测定盐酸小檗碱的含量,计算回收率,结果见表 1。

表 1 回收率试验结果

Tab 1 Determination results of recovery test

样品中含量 /mg	加入量 /mg	测定量 /mg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
1.226	0.532	1.748	98.12		
1.192	0.495	1.682	98.99		
1.232	0.511	1.740	99.41	98.38	3.79
1.180	0.489	1.662	98.56		
1.236	0.522	1.749	98.28		
1.240	0.561	1.799	99.64		

3.4.7 含量限度的制定 含量限度是在检验方法确定的基础上,积累足够的数量后总结提出的。一般应积累 10 批以上的含量数据,提出限度。本品根据以下样品测定结果规定下限,本品下限为每 1 mL 含小檗碱以盐酸小檗碱($C_{20}H_{17}NO_4 \cdot HCl$)计,不得少于 0.04 mg。取样品 10 批,进行盐酸小檗碱含量测定,结果见表 2。

4 讨论

慢性盆腔炎病程长,长期服苦寒药易伤胃,患者

表 2 样品含量测定结果

Tab 2 Results of content determination of the samples

批号	平均含量/ $g \cdot L^{-1}$	批号	平均含量/ $g \cdot L^{-1}$
040410	0.041 2	050303	0.045 1
040520	0.043 2	050512	0.040 2
040809	0.040 1	050722	0.044 3
041027	0.043 3	050809	0.045 5
041201	0.042 5	050825	0.429

难以接受。采用保留灌肠,局部用药,药物浓度高,吸收性能好,直达病灶部位。实验表明,常规量的黄桂灌肠剂具有良好的抗炎、止痛、退热、抑菌及活血化瘀等作用;大剂量黄桂灌肠剂(以临床使用量的 20 倍给小鼠灌肠)使用后未见急性毒性反应与局部刺激反应。据观察该制剂对慢性盆腔炎有效率在 95% 以上。

参考文献:

- [1] 黄兰英.黄桂灌肠剂治疗慢性盆腔炎 100 例[J]. 江苏中医, 1996, 17(9): 17-18.
- [2] 中国药典.一部[S]. 2005. 附录 31.

[收稿日期] 2005-09-09

紫红獐牙菜高效液相色谱指纹图谱的研究

张秀桥¹,田峦鸯¹,侯俊杰¹,陈家春^{1,2},刘焱文¹ (1.湖北中医学院,湖北 武汉 430061; 2.华中科技大学同济医学院药学院,湖北 武汉 430072)

[摘要] 目的:建立紫红獐牙菜药材甲醇溶解部分的高效液相色谱(HPLC)指纹图谱。方法:HPLC 色谱法,色谱柱为 Kromasil C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μL),流动相为甲醇-水(水中含 0.05% 磷酸)-乙腈,梯度洗脱,流速为 0.8 mL·min⁻¹,检测波长为 254 nm,柱温为 30 °C。结果:初步建立紫红獐牙菜药材的 HPLC 指纹图谱,标定了 13 个共有特征峰,并利用对照品对 4 个特征峰进行了鉴定。结论:该方法简便、可靠,进一步完善了紫红獐牙菜药材的质量标准。

[关键词] 紫红獐牙菜;高效液相色谱法;指纹图谱

[中图分类号] R978 [文献标识码] A [文章编号] 1001-5213(2006)08-0922-03

Study on HPLC fingerprint of *Swertia punicea*

ZHANG Xiur qiao¹, TIAN Luanyuan¹, HOU Jur jüe¹, CHEN Jia chun², LIU Yair wen¹ (1. Hubei College of Traditional Chinese Medicine, Hubei Wuhan 430061, China; 2. Tongji Medical college of Huazhong University of Science and technology, Hubei Wuhan 430030, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish an HPLC fingerprint of the methanol extract from *Swertia punicea*. **METHODS** A column of Kromasil C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μL) was used. The mobile phase consisted of methanol-water(containing 0.05% H₃PO₄)-ACN, Gradient elution mode was adopted. Flowrate was 0.8 mL·min⁻¹. Wavelength of detection 254nm. Column temperature was 30 °C. **RESULTS** The fingerprint of *Swertia punicea* was established was containing 13 common peaks 4 common peaks were identified using reference substance. **CONCLUSION** It is a simple and reliable method in controlling the quality of *Swertia punicea*.

KEY WORDS: *Swertia punicea*; HPLC; fingerprint

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(编号:30271590) [作者简介] 张秀桥,女,博士,副教授,电话:027-65783493, E-mail: qiaoxzh2000@yahoo.com.cn [通讯作者] 陈家春,男,博士,教授,电话:027-83692482, E-mail: homespringchen@sohu.com

紫红獐牙菜又名山黄连、布什都补此(彝族)等,来源于龙胆科獐牙菜属植物 *Swertia punicea*, 主要分布于湖北、四川、贵州和云南等省区。具清热除湿、利胆的功效^[1], 在我国民间长期用于治疗肝炎, 对胆囊炎也有较显著疗效^[2]。研究表明紫红獐牙菜主要含苦苣类、口山酮及其苣类、齐墩果酸等成分, 其中抗炎有效成分为齐墩果酸、芒果苣等^[3], 为了进一步评价其药材质量和疗效, 我们利用 HPLC 色谱法对其药材指纹图谱进行了研究。

1 材料

1.1 药材 采集湖北西部地区不同产地的样品 10 批, 经华中科技大学同济医学院陈家春教授鉴定为紫红獐牙菜 *Swertia punicea*, 见表 1。

表 1 紫红獐牙菜样品

Tab 1 Ten samples of *Swertia punicea*

样品	产地	采集日期	样品	产地	采集日期
1	鹤峰奇峰关	2003-10-5	6	五峰长乐坪	2003-10-15
2	鹤峰太平镇	2003-10-8	7	五峰采花	2003-10-20
3	鹤峰五里坪	2003-10-12	8	五峰弯潭	2003-10-22
4	鹤峰走马坪	2003-10-16	9	恩施天桥	2003-10-20
5	鹤峰江口	2003-10-22	10	恩施白杨坪	2003-10-25

1.2 仪器与试剂 DIONEX 高效液相色谱仪(德国鼎泰科技有限公司); 对照品獐牙菜苦苣(*Swertiamarin*, 批号 0785-200203, 1)、龙胆苦苣(*gentiopicoside*, 批号 110770-200409, 2)均购自中国药品生物制品检定所; 芒果苣(*mangiferin*, 3)、8- σ - β -D-吡喃葡萄糖基-1,5-二羟基-3-甲氧基口山酮(*swertianolin*, 4)经 95% 乙醇渗漉提取, 反复硅胶柱分离、葡聚糖凝胶柱纯化得到, 经 UV、IR、¹HNMR、¹³CNMR、MS 鉴定结构, HPLC 法测定纯度大于 98%; 甲醇、乙腈均为色谱纯; 水为注射用水; 磷酸为化学纯, 经 0.45 μ m 滤膜滤过。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Kromasil C₁₈ (250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m) 色谱柱; 流动相: 甲醇-水(水中含 0.05% 磷酸)-乙腈; 梯度洗脱程序 0~30 min, 甲醇体积分数(下同)由 15% 增至 55%, 30~45 min, 55%, 45~60 min, 由 55% 增至 65%, 60~90 min, 由 65% 增至 70%, 乙腈体积分数为 5%; 流速: 0.8 mL \cdot min⁻¹; 检测波长: 254 nm; 柱温: 30 $^{\circ}$ C; 进样量: 10 μ L。

2.2 供试品和对照品溶液的制备 取紫红獐牙菜全草 0.5 kg 粉碎, 过 5 号筛, 混合均匀后精密称定 0.258 g, 用甲醇浸泡过夜, 超声提取 2 次, 每次 20 min, 滤过, 用甲醇定容于 10 mL 量瓶, 过 0.45 μ m 滤膜备用。精密称定对照品于量瓶中, 用甲醇定容, 制成獐牙菜苦苣 1.93 g \cdot L⁻¹、龙胆苦苣 1.57 g \cdot L⁻¹、

芒果苣 0.31 g \cdot L⁻¹、8- σ - β -D-吡喃葡萄糖基-1,5-二羟基-3-甲氧基口山酮 0.31 g \cdot L⁻¹ 对照品溶液, 过 0.45 μ m 滤膜备用。

2.3 精密度试验 取同一供试品溶液, 连续进样 5 次, 以芒果苣为标准, 测得各共有特征峰相对保留时间(R_{RT})的 RSD 均小于 3%, 各共有特征峰相对峰面积(R_A)的 RSD 均小于 5%, 结果表明精密度良好。

2.4 重复性试验 取同一批样品 5 份, 精密称定, 按 2.2 项下制备供试品溶液, 分别进样, 以芒果苣为标准, 测得各共有特征峰相对保留时间(R_{RT})的 RSD 均小于 3%, 各共有特征峰相对峰面积(R_A)的 RSD 均小于 5%, 结果表明重复性良好。

2.5 稳定性试验 取同一供试品溶液, 分别在 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 进样, 以芒果苣为标准, 测得各共有特征峰相对保留时间(R_{RT})的 RSD 均小于 3%, 各共有特征峰相对峰面积(R_A)的 RSD 均小于 5%, 结果表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.6 指纹图谱及技术参数、主要色谱峰的鉴定 按照中药指纹图谱研究技术^[4]要求, 测定 10 批紫红獐牙菜供试品。根据 10 批供试品溶液的 HPLC 图谱所给出的相关参数, 紫红獐牙菜药材甲醇溶解部分的所有色谱峰在 90 min 内全部出现, 共有特征峰 13 个, 见图 1。根据色谱归一化分析, 其 HPLC 指纹图谱的共有特征峰的峰面积总和大于 90%。

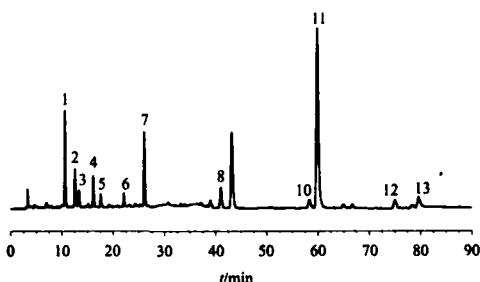


图 1 紫红獐牙菜药材的 HPLC 指纹图谱
Fig 1 HPLC FPS of *Swertia punicea* Hems

测定对照品溶液可知, 其中 1 号峰为獐牙菜苦苣, 2 号峰为龙胆苦苣, 7 号峰为芒果苣, 11 号峰为 8- σ - β -D-吡喃葡萄糖基-1,5-二羟基-3-甲氧基口山酮。以 7 号峰芒果苣作为参照物, 以其保留时间、峰面积为 1, 分别计算其他各共有特征峰的相对保留时间、相对峰面积, 见表 2, 3。其中 11 号峰峰面积占总峰面积的 41.29%, 大于 20%, 故其差值需小于 20%; 9 号峰峰面积占总峰面积 16.23%, 其值大于 10%, 且小于 20%, 故其差值需小于 25%; 其他峰峰面积占总峰面积均小于 10%, 故其峰面积比值不作要求, 仅需标定相对保留时间。

表 2 紫红獐牙菜药材的 HPLC 特征峰 R_{RT} Tab 2 HPLC characteristic peak R_{RT} of *Swertia punicea*(relative time)

样品号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1	0.41	0.48	0.51	0.62	0.67	0.85	1.00	1.57	1.65	2.22	2.29	2.87	3.05
2	0.41	0.48	0.52	0.62	0.67	0.85	1.00	1.57	1.65	2.23	2.30	2.87	3.00
3	0.43	0.51	0.52	0.63	0.69	0.85	1.00	1.58	1.67	2.23	2.28	2.87	3.04
4	0.42	0.49	0.53	0.62	0.68	0.85	1.00	1.58	1.68	2.24	2.29	2.89	3.06
5	0.41	0.48	0.51	0.62	0.67	0.85	1.00	1.57	1.65	2.23	2.29	2.87	3.05
6	0.41	0.49	0.51	0.62	0.69	0.85	1.00	1.57	1.65	2.23	2.30	2.87	3.06
7	0.42	0.49	0.53	0.62	0.68	0.85	1.00	1.58	1.68	2.24	2.30	2.88	3.06
8	0.42	0.49	0.53	0.62	0.68	0.85	1.00	1.59	1.67	2.23	2.29	2.87	3.05
9	0.42	0.49	0.52	0.62	0.68	0.85	1.00	1.57	1.66	2.22	2.28	2.86	3.04
10	0.43	0.48	0.51	0.63	0.69	0.85	1.00	1.58	1.67	2.23	2.28	2.88	3.05
\bar{x}	0.42	0.49	0.52	0.62	0.68	0.85	1.00	1.58	1.66	2.23	2.29	2.87	3.05
RSD/ %	1.88	1.63	1.68	0.68	1.20	0	0	0.44	0.75	0.32	0.34	0.31	0.57

表 3 紫红獐牙菜药材的 HPLC 特征峰 R_A Tab 3 HPLC characteristic Peak R_A of different samples(relative areas)

样品号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1	0.98	0.36	0.17	0.18	0.27	0.11	1.00	0.23	1.82	0.15	4.70	0.18	0.25
2	0.93	0.35	0.15	0.18	0.27	0.12	1.00	0.23	1.78	0.16	4.68	0.18	0.05
3	0.93	0.33	0.15	0.18	0.27	0.15	1.00	0.25	1.87	0.18	4.79	0.19	0.07
4	0.90	0.32	0.16	0.17	0.28	0.11	1.00	0.22	1.88	0.15	4.92	0.19	0.12
5	1.11	0.53	0.18	0.20	0.28	0.17	1.00	0.30	1.97	0.20	5.03	0.04	0.41
6	1.11	0.45	0.15	0.42	0.19	0.40	1.00	0.45	1.93	0.24	5.01	0.31	0.35
7	1.09	0.49	0.15	0.39	0.19	0.42	1.00	0.47	1.94	0.28	5.26	0.30	0.22
8	1.11	0.47	0.15	0.42	0.20	0.39	1.00	0.46	1.92	0.29	5.17	0.32	0.16
9	1.14	0.48	0.16	0.43	0.19	0.42	1.00	0.50	1.91	0.37	5.06	0.29	0.25
10	1.03	0.42	0.15	0.42	0.50	0.43	1.00	0.51	1.76	0.36	5.13	0.27	0.33
\bar{x}	1.03	0.42	0.16	0.30	0.29	0.27	1.00	0.36	1.88	0.24	4.98	0.23	0.22
RSD/ %	8.82	17.85	6.62	41.32	37.46	55.21	0	34.81	3.75	34.91	3.09	38.02	55.03

3 讨论

本实验考察了甲醇回流提取和超声提取等条件下的提取率,结果回流提取时苦苣类部分成分被破坏,故采用超声提取。超声提取时考察了药材粉碎度以及浸泡过夜的提取率,结果提示过 5 号筛后甲醇浸泡过夜,再超声提取 2 次,每次 20 min,提取率较高。

本实验考察色谱系统后以甲醇-水(水中含 0.05% 磷酸)-乙腈为最佳。

紫红獐牙菜甲醇提取物主要成分为苦苣类、吡酮及其苣类,苦苣类 UV 吸收波长范围为 220~260 nm,吡酮类化合物的最大吸收波长为 250 nm^[4,5],比较了 254, 260 nm 波长下的 HPLC 图谱,在 254 nm 时色谱图基线较平稳,出峰数多,峰形对称,故选择检测波长为 254 nm。

在研究中发现,獐牙菜苦苣主要存在于花、叶中,

龙胆苦苣主要存在于根中,故我们对 10 批不同产地、但同为花果期的药材甲醇溶解部分的 HPLC 图谱进行了技术参数分析,建立了其 HPLC 指纹图谱,为全面控制紫红獐牙菜药材的质量提供了一定的依据。

参考文献

- [1] 钱金木伏,刘光明,贺敏,等.民族药紫红獐牙菜中吡酮成分的分离与鉴定[J].大理医学院学报,1998,7(4):5-6.
- [2] 万定荣,陈家春,余汉华.湖北药材志[M].湖北:湖北科技出版社,2002:533-537.
- [3] 董光平,杨景鹏,余放争,等.彝族药布什都补此的有效成分的研究[J].中国民族医药杂志,1998,4(3):44-46.
- [4] 周玉新.中药指纹图谱研究技术[M].北京:化学工业出版社,2002:108-109.
- [5] 吉文鹤,卢学峰,陈桂琛,等.四川西北地区川西獐牙菜指纹图谱研究(I)[J].中国中药杂志,2005,30(7):977-1000.

[收稿日期] 2005-12-12

欢迎订阅 2007 年《中国医院药学杂志》