

藏药川西獐牙菜的质量标准研究

田成旺^{1,2*}, 张铁军², 蒋伶活^{1,3}

(1. 天津大学药物科学与技术学院, 天津 300072; 2. 天津药物研究院, 天津 300193;
3. 江南大学生物工程学院, 江苏 无锡 214122)

[摘要] **目的:**建立川西獐牙菜药材的质量标准。**方法:**采用薄层色谱法对川西獐牙菜药材进行定性鉴别,采用高效液相色谱法测定主要活性成分獐牙菜苦苷、芒果苷、当药醇苷和齐墩果酸的含量。色谱柱为 Diamonsil C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 检测獐牙菜苦苷、芒果苷和当药醇苷的流动相甲醇-0.02% 磷酸水 (45:55), 检测波长 254 nm, 检测齐墩果酸的流动相乙腈-甲醇-0.2% 冰醋酸水 (65:15:20), 检测波长 210 nm, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 30 °C。**结果:**川西獐牙菜药材的薄层色谱鉴别特征明显, 专属性强; 獐牙菜苦苷、芒果苷、当药醇苷和齐墩果酸的 HPLC 含量测定线性范围分别为 0.075 ~ 0.75 μg ($r = 0.9999$), 0.05 ~ 0.5 μg ($r = 0.9997$), 0.032 ~ 0.32 μg ($r = 0.9993$), 0.116 ~ 11.6 μg ($r = 0.9994$), 平均回收率分别为 98.91% (RSD 0.77%), 99.61% (RSD 1.38%), 100.35% (RSD 0.69%), 99.26% (RSD 0.40%), 并根据 10 批药材中相应成分的含量初步制定了其含量限度。**结论:**川西獐牙菜定性定量测定方法简单准确, 能够为川西獐牙菜药材的质量控制提供有效依据。

[关键词] 川西獐牙菜; 獐牙菜苦苷; 芒果苷; 当药醇苷; 齐墩果酸; 薄层色谱法; 高效液相色谱法

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)04-0075-04

Quality Control of Traditional Tibetan Medicine *Swertia mussotii*

TIAN Cheng-wang^{1,2*}, ZHANG Tie-jun², JIANG Ling-huo^{1,3}

(1. School of Pharmaceutical Science and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, China;
2. Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China;
3. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a method of quality control of *Swertia mussotii*. **Method:** TLC method was applied in the qualitative identification of *S. mussotii*. The content of swertiamarin, mangiferin, swertianolin and oleanolic acid were determined by HPLC equipped with Diamonsil C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) column. The mobile phase of swertiamarin, mangiferin and swertianolin consisted of methanol-0.02% phosphoric acid, and detected at the wavelength of 254 nm. The mobile phase of oleanolic acid consisted of methanol-0.2% glacial acetic acid, and detected at the wavelength of 210 nm. The analysis was done at a flow rate of 1.0 mL·min⁻¹. The column temperature was kept at 30 °C. **Result:** The linearity of swertiamarin, mangiferin, swertianolin and oleanolic acid was in the range of 0.075-0.75 μg ($r = 0.9999$), 0.05-0.5 μg ($r = 0.9997$), 0.032-0.32 μg ($r = 0.9993$) and 0.116-11.6 μg ($r = 0.9994$), respectively. The average recoveries were 98.91% (RSD 0.77%) for swertiamarin, 99.61% (RSD 1.38%) for mangiferin, 100.35% (RSD 0.69%) for swertianolin and 99.26% (RSD 0.40%) for oleanolic acid respectively. **Conclusion:** This method is simple, accurate with good reproducibility. It is suitable for quality control of *S. mussotii*.

[Key words] *Swertia mussotii*; swertiamarin; mangiferin; swertianolin; oleanolic acid; TLC; HPLC

[收稿日期] 20120516(002)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81001627);天津市科技支撑计划项目(11ZCKFSY01200)

[通讯作者] * 田成旺, 副研究员, 从事中药新药的基础及开发研究, Tel: 022-23006843, E-mail: tiancw@tjipr.com

川西獐牙菜药材来源于龙胆科植物川西獐牙菜的干燥全草,为我国传统藏药藏茵陈的主要源药材之一,具有清肝利胆、退诸热的功效,用于治疗黄疸型肝炎,疗效显著^[1]。川西獐牙菜收载于卫生部《药品标准·藏药》(WS3-BC-0006-95),其中包括性状鉴别和性味、功能等项,但没有薄层鉴别和含量测定项,难以有效控制川西獐牙菜的质量。现代研究表明,川西獐牙菜中含有环烯醚萜、咕吨酮、三萜等多种类别的化学成分^[2-4],其中环烯醚萜类成分包括獐牙菜苦苷、獐芽菜苷、龙胆苦苷等,并具有抗炎、促进肝损伤细胞修复等药理活性^[5-6];咕吨酮类成分包括芒果苷、当药醇苷、1-三羟基-2,5,8-三甲氧基咕吨酮等,并具有抑制转氨酶升高、抗乙肝病毒等药理活性^[7-8];三萜类成分包括齐墩果酸、熊果酸等,并具有抗炎、保肝等药理作用^[9-10]。本文在参阅相关文献的基础上^[11-14],建立了川西獐牙菜药材的薄层鉴别和主要活性代表成分獐牙菜苦苷、芒果苷、当药醇苷和齐墩果酸的含量测定方法,以达到科学控制藏茵陈药材质量的目的。

1 材料

Dionex 液相系统,包括四元梯度泵、在线脱气机、柱温箱、DAD 检测器和 Chromeleon 色谱工作站, Chemstation B2.0 色谱工作站; Sartorius (1/10 万天平); METTLER TOLEDO (1/万天平)。AUTOSCIENCE (AS3120) 型超声仪。HFFLC GF254, G 薄层板(烟台化学工业研究所,规格 100 mm × 100 mm,批号 081020)。

獐牙菜苦苷(0785-200203),芒果苷(111607-200301),齐墩果酸(110709-200505)均购自中国药品生物制品检定所;当药醇苷(swertianolin),自制,经检测纯度在 98% 以上;甲醇、乙腈为色谱纯,流动相用水为双蒸水(自制),其余试剂均为分析纯。川西獐牙菜药材共 10 批,分别采自青海、云南、四川、西藏等地,经天津药物研究院张铁军研究员鉴定为川西獐牙菜 *Swertia mussotii* Franch. 的干燥全草。

2 定性鉴别

2.1 獐芽菜苦苷的薄层鉴别 取药材粉末(过 60 目筛)0.5 g,加甲醇 25 mL,回流提取 60 min,滤过,滤液浓缩至约 2 mL,作为供试品溶液。取獐牙菜苦苷对照品,加甲醇制成每 1 mL 含 1.0 mg 的溶液,作为对照品溶液。照薄层色谱法(《中国药典》2010 年版一部附录 VI B)试验,吸取上述溶液各 5 μ L,分别点于同一高效硅胶 GF₂₅₄ 薄层板上,以乙酸乙酯-甲醇-冰醋酸(5:1:0.2)为展开剂,展开,取出,晾干,于

紫外 254 nm 下检视。供试品色谱中,在与对照品色谱相应的位置上,显相同颜色的荧光淬灭斑点。

2.2 当药醇苷的薄层鉴别 取 2.1 项下供试品溶液。取当药醇苷对照品适量,加甲醇制成每 1 mL 含 1.0 mg 的溶液,作为对照品溶液。照薄层色谱法(《中国药典》2010 年版一部附录 VI B)试验,吸取上述溶液各 5 μ L,分别点于同一高效硅胶 G 薄层板上,以乙酸乙酯-甲醇(10:1)为展开剂,展开,取出,晾干,喷三氯化铝试液,加热至斑点清晰,于紫外 366 nm 下检视。在供试品色谱中,在与对照品色谱相应的位置上,显相同黄颜色的荧光斑点。

2.3 齐墩果酸的薄层鉴别 取 2.1 项下供试品溶液。取齐墩果酸对照品,加甲醇制成每 1 mL 含 1.0 mg 的溶液,作为对照品溶液。照薄层色谱法(《中国药典》2010 年版二部附录 VI B)试验,吸取上述溶液各 5 μ L,分别点于同一高效硅胶 G 薄层板上,以己烷-丙酮-乙酸乙酯-甲酸(5:1:1:0.1)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以 10% 硫酸乙醇溶液,加热至斑点清晰。供试品色谱中,在与对照品色谱相应的位置上,显相同紫颜色的斑点。

3 含量测定

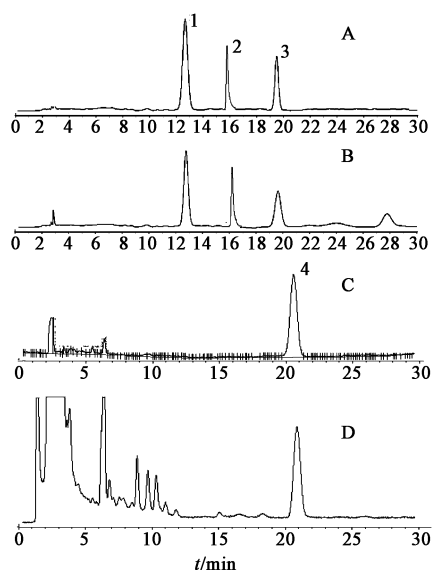
3.1 色谱条件 Diamonsil C₁₈(4.6 mm × 250 mm, 5 μ m),检测獐芽菜苦苷、芒果苷和当药醇苷的流动相甲醇-0.02% 磷酸水(45:55),检测波长 254 nm;检测齐墩果酸的流动相乙腈-甲醇-0.2% 冰醋酸水(65:15:20),检测波长 210 nm,流速 1.0 mL·min⁻¹,柱温 30 $^{\circ}$ C。见图 1。

3.2 溶液制备

3.2.1 对照品溶液 取獐芽菜苦苷、芒果苷和当药醇苷对照品适量,精密称定,置 25 mL 棕色量瓶中,加甲醇制成 1 mL 含獐芽菜苦苷 75 μ g、芒果苷 50 μ g 和当药醇苷 32 μ g 的对照品溶液;另取齐墩果酸适量,精密称定,置 25 mL 棕色量瓶中,加甲醇制成 1 mL 含齐墩果酸 116 μ g 的混合对照品溶液

3.2.2 供试品溶液 精密称取约 0.5 g 药材(CX-1)粉末(过 60 目筛),加入 25 mL 甲醇,加热回流 120 min,放冷,甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,续滤液过 0.45 μ m 滤膜,即得。

3.3 线性关系考察 精密吸取 3.2.1 项下办法制备的对照品储备液 1.0, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0 mL,分别置 10 mL 量瓶中,以甲醇定容,摇匀,即得系列浓度的混合对照品溶液。分别吸取上述系列对照品溶液各 10 μ L,注入色谱仪,记录色谱图。以峰面积对对照品的质量(μ g)进行线性回归,得回归方程。取对



A, C. 对照品; B, D. 样品;

1. 獐牙菜苦苷; 2. 芒果苷; 3. 当药醇苷; 4. 齐墩果酸

图1 川西獐牙菜 HPLC

照品储备液不断稀释后进样分析,以3倍信噪比确定检出限,结果见表1。

表1 各成分的线性回归方程及检测限

成分	回归方程	线性范围	<i>r</i>	检出限
		/μg		/μg
獐芽菜苦苷	$Y = 2796X - 2.66$	0.075 ~ 0.75	0.999 9	2.5×10^{-3}
芒果苷	$Y = 7290X + 12.75$	0.05 ~ 0.50	0.999 7	1.8×10^{-3}
当药醇苷	$Y = 1092X + 97.01$	0.032 ~ 0.32	0.999 3	1.2×10^{-3}
齐墩果酸	$Y = 133.4X + 24.85$	0.116 ~ 1.16	0.999 4	8.6×10^{-3}

3.4 精密度试验 精密吸取3.2.1项中间浓度梯度点的对照品溶液10 μL,连续进样6次,按色谱条件测定峰面积值。求得日内RSD,连续分析4 d,每天进样1次,求得日间RSD,结果见表2。

表2 各成分的日内及日间精密度 %

成分	RSD(日内)		RSD(日间)	
	峰面积	出峰时间	峰面积	出峰时间
獐芽菜苦苷	1.13	0.57	1.46	0.75
芒果苷	1.23	0.46	1.17	0.66
当药醇苷	1.21	0.75	1.65	0.86
齐墩果酸	1.62	0.69	1.01	0.49

3.5 稳定性试验 取同一份供试品溶液,分别于0,2,4,6,8,12 h,按上述色谱条件测定峰面积。结果供试品溶液在12 h内色谱峰面积无明显变化,獐牙菜苦苷、芒果苷、当药醇苷、齐墩果酸的RSD($n = 6$)分别为1.23%,1.15%,1.45%,1.16%,说明供试品溶液在制备后至少12 h内稳定。

3.6 重复性试验 取药材(CX-1)样品6份,按3.2.2项下方法制备供试品溶液,依法测定各物质含量。结果CX-1药材中獐牙菜苦苷、芒果苷、当药醇苷、齐墩果酸含量平均值($n = 6$)分别为15.13, 6.21, 8.82, 0.85 mg·g⁻¹; RSD分别为1.05%, 1.21%, 1.45%, 1.49%。

3.7 加样回收率试验 对已测定獐牙菜苦苷、芒果苷、当药醇苷和齐墩果酸含量的上述供试品,分别精密称取约0.25 g,共6份,分别加入约0.8,1.0,1.2倍4种指标成分总量的对照品溶液各两份,按照3.2.2项下方法制备样品溶液,采用3.1项下色谱条件进行分析,计算4种成分加入量的回收率,结果见表3。

表3 川西獐牙菜中4种成分加样回收率试验

成分	样品量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均回 收率/%	RSD /%
獐芽菜苦苷	3.78	3.02	6.79	99.67	98.91	0.77
	3.75	3.78	7.46	98.15		
	3.86	4.54	8.35	98.90		
芒果苷	1.55	1.25	2.78	98.4	99.61	1.38
	1.49	1.50	2.98	99.3		
	1.58	1.75	3.35	101.1		
当药醇苷	2.21	1.76	3.96	99.58	100.35	0.69
	2.20	2.20	4.42	100.94		
	2.25	2.64	4.90	100.52		
齐墩果酸	0.21	0.17	0.38	98.82	99.26	0.40
	0.22	0.21	0.43	99.36		
	0.20	0.25	0.45	99.60		

3.8 样品含量测定 精密称取收集的川西獐牙菜样品,按照3.2.2制备供试品溶液,进样检测,记录指标成分色谱峰面积,根据标准曲线计算含量,10批样品的测定结果见表4。

3.9 含量限度的制定 由表4中数据可以看出,不同产地以及不同批次的川西獐牙菜中獐芽菜苦苷、芒果苷、当药醇苷和齐墩果酸含量存在较大的差异,而青海玉树州的川西獐牙菜质量相对稳定,参照以上产地及批次川西獐牙菜中主要活性成分的含量,初步制定川西獐牙菜的含量限度为:本品按干燥品计算,含獐芽菜苦苷、芒果苷、当药醇苷和齐墩果酸的总和不得低于0.5%。

4 讨论

4.1 薄层色谱展开剂的选择 在展开剂的选择过程中,根据环烯醚萜、咕吨酮和三萜的理化性质,分别考察了其展开剂的组成及配比,显色剂等因素的

表 4 10 批川西獐牙菜的含量测定 (n=3) mg·g⁻¹

No.	产地	獐芽菜苦苷	芒果苷	当药醇苷	齐墩果酸	总和
CX-1	青海玉树	15.15	6.21	8.86	0.83	31.05
CX-2	青海玉树	18.39	7.37	7.95	1.02	34.73
CX-3	青海海东	12.23	5.01	5.65	0.75	23.64
CX-4	青海海东	10.78	4.42	6.98	1.12	23.3
CX-5	青海海南	24.65	9.89	3.21	0.17	37.92
CX-6	青海海南	26.38	10.31	2.16	0.09	38.94
CX-7	四川阿坝	5.75	2.41	15.12	0.27	23.55
CX-8	四川甘孜	3.97	1.55	17.21	0.21	22.94
CX-9	云南宜宾	7.23	2.78	2.23	0.78	13.02
CX-10	西藏昌都	3.45	1.41	1.01	1.35	7.22

影响,最终确定了最佳的薄层色谱条件。

4.2 检测波长和流动相的确定 取配置好的对照品溶液和样品溶液,以流动相为空白,在 190~400 nm 内进行 DAD 全波长扫描,根据扫描结果选择 254 nm 作为检测獐芽菜苦苷、芒果苷和当药醇苷的波长,210 nm 作为检测齐墩果酸的波长。对比了甲醇-水,甲醇-水-冰醋酸,甲醇-乙腈-磷酸水等系统,通过多次优化,选出了 3.1 项下的流动相条件。

4.3 供试品溶液制备方法的优化 考察了水,95% 乙醇,50% 甲醇,甲醇为溶剂进行提取,结果表明甲醇对三类成分的提取效果最佳,考察了回流、超声、渗漉等提取方式,对比发现甲醇回流的方式操作简便,提取率高,故最终确定了甲醇回流提取的制备方法。

[参考文献]

[1] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草·藏药卷[M]. 上海:上海科学技术出版社,2002:68.

[2] 周永福,黄飞燕,文荣荣,等. 川西獐牙菜的化学成分研究(II) [J]. 云南民族大学学报:自然科学版, 2011,2(1):14.

[3] 张建胜,王雪梅,董秀华,等. 川西獐牙菜化学成分研究[J]. 中药材, 2009,32(4):511.

[4] 张慧萍,字敏. 药用植物獐牙菜属活性成分研究[J]. 云南化工, 2000,27(4):29.

[5] 陈千良,孙文基. 裂环烯醚萜类化合物研究进展[J]. 国外医药:植物药分册, 2003,18(2):58.

[6] 刘学伟,曾敏,刘树民. 龙胆碱的解热作用及机制研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(24):128.

[7] 郭宏伟,邓家刚,运晨霞,等. 芒果苷抑制哮喘小鼠气道炎症的机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(9):187.

[8] 韦健全,郑子敏,潘勇,等. 芒果苷对乙醇引起肝损伤的保护作用[J]. 广西医科大学学报, 2008, 25(5):732.

[9] 昌盛,李龙. 齐墩果酸药理作用研究进展[J]. 广州化工, 2011,39(14):30.

[10] 张明发,沈雅琴. 齐墩果酸和熊果酸的抗炎及其抗变态反应[J]. 抗感染药学, 2011,8(4):235.

[11] 吉文鹤,卢雪峰,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(13):977.

[12] 宋娅莉,胡凤祖,林鹏程,等. 川西獐牙菜与抱茎獐牙菜中吡啶酮的高效液相色谱分析[J]. 色谱, 2004, 22(1):53.

[13] 马玉花,陈桂琛,吉文鹤,等. 川西獐牙菜中不同部位 3 种药用成分的反相高效液相色谱测定[J]. 药物分析杂志, 2005, 25(9):1079.

[14] 温金莲,周清,宋粉云. RP-HPLC 测定栀子金花丸中芒果苷的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(17):65.

[责任编辑 顾雪竹]

欢迎订阅 2013 年《中国中医药信息杂志》

《中国中医药信息杂志》是由国家中医药管理局主管、中国中医科学院中医药信息研究所主办的中医药学术期刊。本刊立足于行业报道的前沿,关注相关的政策动态,跟踪报道中医药重大课题,及时分析报道中医药的新政策、新技术、新发明、新成果、新疗法,努力使信息的选择与表达方式能够充分体现中医药发展水平,为广大读者提供一流的信息服务。

《中国中医药信息杂志》1994 年创刊,2002 年,被中国科学技术信息研究所的“中国科技论文统计源期刊”收录,成为中国科技核心期刊。随着期刊影响力的不断提升,已被波兰《哥白尼索引》、美国《化学文摘》、美国《乌利希期刊指南》、《世界卫生组织西太平洋地区医学索引》及英国《农业与生物科学研究中心文摘》、英国《全球健康》等国际检索系统收录。

《中国中医药信息杂志》是中医药行业一本独具特色的学术期刊,其内容较全面地反映了我国中医药发展水平。主要栏目有:中医动态、中医药发展论坛、专题论坛、改革与管理、中医药信息学、研究与进展、论著、实验研究、流行病学调查、质量标准研究、制剂与工艺、中药研究与开发、临床报道、专家经验、临证心得、思路与方法、中医教育、医院药学等。

《中国中医药信息杂志》为月刊,大 16 开国际开本,112 页,国内外公开发行,每册定价 10 元,全年 120 元。国内邮发代号:82-670;国外代号:M4564。也可直接汇款至本刊编辑部订阅。地址:北京市东直门内南小街 16 号《中国中医药信息杂志》编辑部 邮编:100700 电话:010-64014411-3278 E-mail:Lxx@mail.cintcm.ac.cn