

HPLC 法测定苦玄参中苦玄参苷 I_A 的含量*

□陈 勇** 甄汉深 刘 婧 李耀华 叶 乐

(广西中医学院药学院 南宁 530001)

摘 要:目的:建立苦玄参药材 *Picria fel-terrae* Lour. 的含量测定方法。方法:RP-HPLC 法,采用 C₁₈ODS2 柱(5 μ m, 4.6 \times 250mm), 乙腈-0.3%磷酸(34:66)为流动相,流速为 1mL/min,检测波长为 264nm。结果:苦玄参苷 I_A 进样量在 0.42 μ g~2.10 μ g 的范围内呈良好的线性关系, $r=0.9999$, 平均回收率为 100.4%, RSD=1.64%($n=6$)。结论:该法操作简便、准确、专属性强,可作为苦玄参药材的质量控制方法。

关键词:苦玄参 苦玄参苷 I_A 含量测定 高效液相色谱法

苦玄参 *Picria fel-terrae* Lour. 为玄参科苦玄参属唯一的一种植物, 主要分布于广西、广东及云南等地。其作为广西民间用药已有 200 多年历史, 具有清热解毒, 凉血消肿之功效, 用于治疗感冒风热、咽喉肿痛、疔腮、胃热腹痛、痢疾、跌打损伤、毒蛇咬伤及痈疖等^[1], 因其味极苦, 别名又称苦草。

苦玄参是广西民间常用药, 2005 版中国药典正文中尚未记载该品种, 但有些以其为原料的中成药如妇炎净胶囊等已收载入中国药典(2000 年版及 2005 版)^[2]。对苦玄参药材及其中成药中苦玄参苷 I_A 含量的测定已有相关报道^[3-6], 但均采用薄层扫描法测定, 本文则采用 HPLC 法对不同产地、不同采收季节苦玄参中苦玄参苷 I_A 进行含量测定, 现报道如下。

一、仪器与试剂

1. 仪 器

收稿日期: 2005-10-28

修回日期: 2006-03-20

* 科学技术部西部开发科技行动资助项目(2002BA901A14-C): 广西特产中草药苦玄参质量标准研究, 负责人: 陈勇。

** 联系人: 陈勇, 教授, 广西中医学院药学院副院长, 从事中草药及其制剂的质量分析, Tel: 0771-3137585, E-mail: cy6381@163.com.

28 [World Science and Technology/Modernization of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica]

Agilent 1100 高效液相色谱仪(美国安捷伦公司); GB15B-DAD 二极管阵列检测器; G1314A-VWD 可变波长检测器; Agilent 化学工作站; Hypersil C₁₈ODS2 色谱柱(5 μ m, 4.6 \times 250mm, 大连依利特公司); BP211D 电子分析天平(德国赛多利斯公司); Millipore simplicity-185 超纯水器(美国密理博公司); SB3200T 超声波清洗器(上海必能信有限公司); LG16-W 离心机(北京医用离心机厂)。

2. 试 剂

苦玄参苷 I_A 对照品由广西桂林植物研究所植化室梁小燕老师提供, 经 HPLC 归一化法检测, 含量达到 98.0% 以上。乙腈为色谱纯(天津四友生物医学技术有限公司), 水为超纯水, 其余所用试剂均为分析纯。

本实验所用药材经广西中医学院药学院陈勇教授鉴定为玄参科植物苦玄参 *Picria fel-terrae* Lour. 的干燥全草。

二、含量测定方法与结果

1. 供试品溶液的制备

精密称取约 2g 苦玄参药材(全草)干燥粗粉,置 100mL 具塞锥形瓶中,精密加入 75%甲醇 25mL,超声处理 30min,放冷,补足重量,滤过,滤液备用。取上述样品溶液 1mL 于微型离心管中,以 10000r/min 速度离心 10min,取上清液备用,即得。

2. 对照品溶液的制备

精密称取苦玄参苷 I_A 对照品适量 (5.25mg),置 25mL 量瓶中,用适量甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,即得浓度为 0.21mg/mL 的对照品溶液。

3. 色谱条件

色谱柱为 C₁₈ODS2 柱(5μm, 4.6×250mm, 大连依利特公司),流动相为乙腈-0.3%磷酸(34:66),流速为 1mL/min,检测波长为 264nm,柱温为 25℃,理论塔板数按苦玄参苷 I_A 计算应不低于 3000。在上述色谱条件下,供试品中苦玄参苷 I_A 色谱峰能与其它成分分离,色谱图见图 3,图 4。

4. 线性关系考察

分别精密吸取上述苦玄参苷 I_A 对照品溶液 (0.21mg/mL) 2μL、4μL、6μL、8μL 和 10μL,注入液相色谱仪,按上述色谱条件测定峰面积值。以峰面积为纵坐标,对照品进样量(μg)为横坐标,绘制标准曲线,并求出回归方程为 $y=773.0x+1.85$, $r=0.9999$ 。结果表明苦玄参苷 I_A 进样量在 0.42~2.10μg 间呈良好线性关系,结果见表 1,色谱图见图 1,标准曲线见图 2。

5. 精密度试验

精密吸取苦玄参苷 I_A 对照品溶液 (0.21mg/mL) 5μL,注入液相色谱仪,重复进样 5 次,测定苦玄参苷 I_A 峰面积值,计算 RSD=0.21%,结果见表 2。

6. 稳定性试验

取供试品溶液 (宁明),每隔 4 小时分别进样 10μL,测定苦玄参苷 I_A 峰面积值,计算 RSD=0.10%,表明供试品溶液在 24 小时内保持稳定,结果见表 3。

7. 重复性试验

精密称取同一产地供试品(平乐)各 5 份,按样品测定项下方法进行测定,结果见表 4。

8. 加样回收率试验

精密称取 0.2g 已测知苦玄参苷 I_A 含量的供试品(龙州)干燥粗粉,分别精密加入一定量的苦玄参苷 I_A 对照品溶液 (0.21mg/mL) 2mL,按供试品溶液制备方法制备待测溶液,按上述色谱条件测定,计算加样回收率,结果见表 5。

9. 样品测定

分别精密吸取供试品溶液与对照品溶液 (0.21mg/

表 1 苦玄参苷 I_A 线性关系考察结果

序号	进样量(μg)	峰面积(A)
1	0.42	330.0
2	0.84	655.0
3	1.26	994.8
4	1.68	1331.3
5	2.10	1630.0

表 2 精密度试验结果

进样次数	峰面积(A)	平均峰面积(\bar{A})	RSD(%)
1	868.9		
2	872.6		
3	872.6	870.7	0.21
4	870.0		
5	869.3		

表 3 稳定性试验结果

时间(小时)	峰面积(A)	平均峰面积(\bar{A})	RSD(%)
0	1985.1		
4	1980.9		
8	1980.0	1982.2	0.10
12	1982.8		
16	1980.9		
20	1982.5		
24	1983.0		

表 4 重复性试验结果

序号	含量(mg/g)	平均含量(mg/g)	RSD(%)
1	2.53		
2	2.50		
3	2.49	2.50	0.76
4	2.48		
5	2.49		

mL)各 10 μ L,注入液相色谱仪,测定峰面积值,结果见表 6,色谱图图例见图 3(梧州)和图 4(龙州)。

三、讨论

1. 分别以甲醇、乙醇、氯仿、乙酸乙酯为溶剂对苦玄参进行超声提取,提取液进行 HPLC 测定。结果表明,甲醇、乙醇提取液测得色谱峰的峰面积最大,但乙醇比甲醇的黏度大,不利于滤过净化处理,于是选用甲醇为提取溶剂。比较以不同浓度甲醇为溶剂所测的峰面积,结果 75%甲醇测得的峰面积最大,故本实验选用 75%甲醇进行提取。

2. 分别采用回流提取法和超声提取法进行提取,所得提取液采用 HPLC 法测定苦玄参苷 I_A 色谱峰的峰面积。结果表明,超声提取法测得苦玄参苷 I_A 含量较高,且时间较短,无其他组分峰干扰,操作步骤简单,故本实验采用超声提取法进行提取。

表 5 加样回收率试验结果

序号	原有量 (mg)	加入量 (mg)	测得量 (mg)	回收率 (%)	\bar{X} (%)	RSD (%)
1	0.5104	0.42	0.9223	98.10		
2	0.5105	0.42	0.9310	100.1		
3	0.5112	0.42	0.9412	102.4	100.4	1.64
4	0.5110	0.42	0.9309	100.0		
5	0.5093	0.42	0.9268	99.40		
6	0.5144	0.42	0.9436	102.2		

表 6 样品含量测定结果(n=2)

批号(或产地)	峰面积(A)	平均含量(mg/g)
031013	2464.8	2.75
031217	2661.8	2.97
040218	2164.7	2.42
040830	1521.2	1.72
041012	2015.0	2.23
平乐	1951.1	2.21
宁明	1982.8	2.25
梧州	3100.9	3.51
越南	3016.0	3.42
龙州	2254.0	2.56
龙州(叶子)	2464.7	2.80

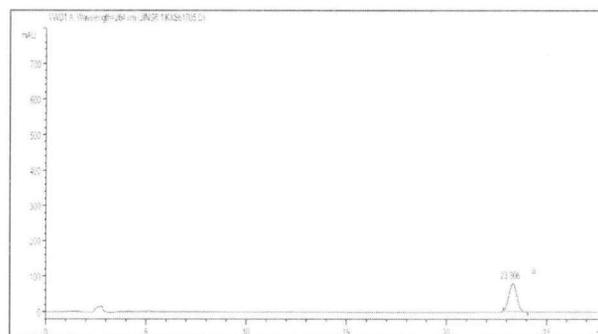


图 1 苦玄参苷 I_A 对照品 HPLC 色谱图 a 为苦玄参苷 I_A

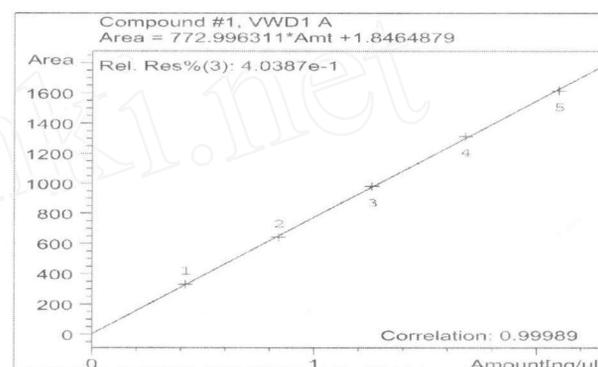


图 2 苦玄参苷 I_A 标准曲线图

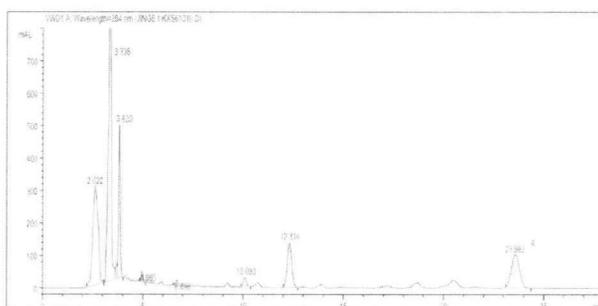


图 3 苦玄参(梧州)HPLC 色谱图

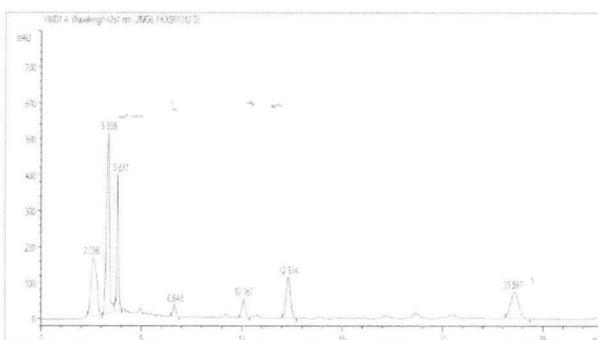


图 4 苦玄参(龙州)HPLC 色谱图

3. 利用 DAD 检测器可同时获得色谱-光谱三维图谱, 从该图谱中可得出苦玄参苷 I_A 的最大吸收波长, 进样后测得苦玄参苷 I_A 的最大吸收波长为 264nm。

4. 本实验采用乙腈-0.3%磷酸为流动相, 改变流动相配比进行最佳流动相的选择, 结果表明, 苦玄参苷 I_A 在流动相为乙腈-0.3%磷酸(34:66)时与相邻组分峰分离度 R>1.5, 达到分离要求, 能完全满足色谱峰定量要求。

5. 对同一产地(龙州)苦玄参中不同部位(全草和叶子)的苦玄参苷 I_A 含量进行考察, 发现叶子所含苦玄参苷 I_A 较全草高, 但相差不大, 说明苦玄参苷 I_A 主要存在于叶子。

6. 不同产地药材含量测定结果表明, 梧州所产苦玄参苦玄参苷 I_A 含量最高, 而平乐所产含量最低。由于 5 个不同产地苦玄参的采收季节不同, 无法对

不同产地的苦玄参苷 I_A 含量高低下定论。比较同一产地、不同采收季节的苦玄参中苦玄参苷 I_A 含量, 采收季节不同, 苦玄参苷 I_A 含量各不相同, 苦玄参采收季节不同是影响其含量的一个因素。

参考文献

- 1 广西壮族自治区卫生厅. 广西中药材标准(1990年版). 南宁: 广西科学技术出版社, 1992, 225.
- 2 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 2000 年版(一部). 北京: 化学工业出版社, 2000, 464.
- 3 蒋明康. 苦玄参中苦玄参苷 IA 的含量测定. 桂林医学院学报, 1997, 10(6): 698.
- 4 陈勇. 几种苦玄参的中成药定性定量研究. 中国现代应用药学, 2000, 17(2): 106~108.
- 5 陈勇, 黄翠娥. 炎肺化毒片的薄层鉴别及苦玄参苷 IA 的含量测定. 中成药, 1997, 19(5): 14~15.
- 6 陈勇, 黄衢. 炎见宁片的定性鉴别及其苦玄参苷 IA 的含量测定. 中成药, 1997, 19(12): 12~14.

Measurement of PiefeltarraeninI_A in *Picria fel-terrae* Lour. by HPLC

Chen Yong Zhen Hanshen Liu Jing Li Yaohua Ye Le

(Faculty of Pharmacy, Guangxi University of TCM, Guangxi Nanning 530001)

This article is to establish a method for measuring PiefeltarraeninI_A in *Picria fel-terrae* Lour. Method: RP-HPLC. The PiefeltarraeninI_A was separated on a C18ODS2 column(5μm, 4.6×250mm) and detected at 264nm and 1ml/min, using acetonitrile-0.3%phosphoric acid (34:66) as the mobile phase. Result: PiefeltarraeninI_A in *Picria fel-terrae* Lour. was baseline separated and determined. The linearity ranges was 0.48μg~2.10μg, correlation coefficient was 0.9999. The average recovery rate was 100.4% (RSD=1.64%, n=6). Conclusion: The method is simple, accurate and of strong specificity which can be used for quantify the main constituent PiefeltarraeninI_A in *Picria fel-terrae* Lour.

Key Words: *Picria fel-terrae* Lour, PiefeltarraeninI_A, content measurement, high performance liquid chromatography

(责任编辑:周立东, 责任编审:果德安, 责任译审:秦光道)

(Continued from page 34)

when the application of protocachic acid ranges within 0.06~0.18ug and in this case the average recovery of this acid can reach 99.8% with 1.2% of RSD. Conclusion This method is simple and convenient to application and therefore it can be used to determine the content of protocachic acid in Yanlixiao capsules.

Key Word: Yanlixiao capsule, protocachic acid, HPLC

(责任编辑:刘维杰, 责任编审:果德安, 责任译审:秦光道)