

云南产青叶胆及其习用品药材中5种成分的HPLC含量测定

李耀利^{1,2}, 尚明英², 耿长安¹, 张雪梅¹, 陈纪军^{1*}, 蔡少青^{2*}

(1. 中国科学院昆明植物研究所植物化学与西部植物资源持续利用国家重点实验室, 云南昆明650204;
2. 北京大学药学院天然药物与仿生药物国家重点实验室, 北京100191)

[摘要] 目的: 建立1种用于测定青叶胆及习用品药材中獐牙菜苦苷、龙胆苦苷、獐牙菜苷、芒果苷和红白金花内酯含量的HPLC方法, 并研究5种成分在青叶胆及习用品药材中的分布。方法: Thermo BDS Hypersil C₁₈色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 流动相0.1%磷酸溶液-甲醇, 梯度洗脱, 流速0.7~1.0 mL·min⁻¹, 柱温32℃, 检测波长为250, 260, 225 nm。结果: 5种成分的分度良好, 标准曲线在检测范围内均呈良好线性, $r = 0.9997 \sim 0.9999$, 平均回收率97.03%~102.7%, RSD为1.8%~6.2%。对8种30份青叶胆测定结果显示8个青叶胆品种中5种成分的有无及含量存在差异; 弥勒獐牙菜、丽江獐牙菜等獐牙菜苦苷含量高达34.47~118.05 mg·g⁻¹; 西南獐牙菜中龙胆苦苷含量最高, 紫红獐牙菜中獐牙菜苷的含量较高; 根据獐牙菜苦苷及龙胆苦苷与獐牙菜苷含量之和的比较可以鉴别小青叶胆和大青叶胆; 根据龙胆苦苷与5成分总和的比值可以区别西南獐牙菜。结论: 本研究建立的方法操作简单、结果准确, 具有较好的重复性和稳定性, 可用于青叶胆类药材的鉴定及质量评价。

[关键词] 青叶胆; HPLC; 獐牙菜苦苷; 龙胆苦苷; 獐牙菜苷; 芒果苷; 红白金花内酯

青叶胆来源于龙胆科獐牙菜属植物弥勒獐牙菜 *Swertia mileensis* T. N. Ho et W. L. Shi 的干燥全草, 为云南特有药材, 红河州少数民族用其治疗肝炎有着较悠久的历史, 自1977年起收入《中国药典》, 具有清肝利胆、清热利湿的作用, 用于肝胆湿热、黄疸尿赤、胆胀胁痛、热淋涩痛^[1-2]。但据文献记载^[2-5]和作者实际调查, 弥勒獐牙菜仅分布于弥勒、开远和蒙自等地, 资源量少; 而獐牙菜属的多种植物在云南不同地区的民间和制药企业中用作青叶胆。本研究组多年来收集到青叶胆药材多份, 经鉴定来源于獐牙菜属植物斜茎獐牙菜 *S. patens*、紫红獐牙菜 *S. punicea*、丽江獐牙菜 *S. delavayi*、西南獐牙菜 *S. cincta*、大籽獐牙菜 *S. macrosperma* 和显脉獐

牙菜 *S. nervosa* 等。来源于紫红獐牙菜的干燥全草称为紫红青叶胆, 被2005年版《云南省中药材标准》所收载, 用途和用法与青叶胆相同^[6]。斜茎獐牙菜的全草以小儿腹痛草之名也收入2005年版《云南省中药材标准》, 主治胃痛、腹痛和牙痛等, 但在实际中常以青叶胆出售和使用。

现代药理研究表明, 獐牙菜属植物含有的环烯醚萜类(獐牙菜苦苷、龙胆苦苷、獐牙菜苷)、吡啶酮类成分和齐墩果酸等具有保肝利胆作用^[7-12]。本课题组最新研究结果显示红白金花内酯对肝炎病毒表面抗原和肝炎病毒e抗原分泌以及乙型肝炎病毒(HBV) DNA复制均显示较强的抑制活性, 具有较强的抗HBV活性^[13]。獐牙菜属植物尚做藏茵陈和当药使用^[14], 故已有不少含量测定报道。高光跃等^[15]建立了云南产11种獐牙菜属植物中獐牙菜苦苷、龙胆苦苷、獐牙菜苷及当药醇苷的高效液相色谱定量分析方法; 结果显示, 11种獐牙菜均含有獐牙菜苦苷; 西南獐牙菜、紫红獐牙菜、大籽獐牙菜中獐牙菜苦苷、龙胆苦苷、獐牙菜苷含量以龙胆苦苷最高, 獐牙菜苷最低; 显脉獐牙菜中獐牙菜苷和龙胆苦苷含量较高; 但该研究建立的方法流动相复杂, 未涉及青叶胆、斜茎獐牙菜、云南獐牙菜和丽江獐牙菜,

[稿件编号] 20121129008

[基金项目] 国家自然科学基金-云南省联合基金重点项目(U0832603); 国家杰出青年科学基金项目(81025023); 植物化学与西部植物资源持续利用国家重点实验室自主课题项目(P2010-ZZ08); 中国科学院西部之光“西部博士”启动项目

[通信作者] * 陈纪军, Tel/Fax: (0871) 5227197, E-mail: chenjj@mail.kib.ac.cn; * 蔡少青, Tel/Fax: (010) 82801693, E-mail: sqcai@bjmu.edu.cn

[作者简介] 李耀利, 博士, 从事生药学研究, E-mail: liyaoli123456@163.com

未测定芒果苷和红白金花内酯。纪兰菊等^[16]报道了15种獐牙菜属植物中9种成分的含量,涉及獐牙菜苦苷、龙胆苦苷和芒果苷在西南獐牙菜、显脉獐牙菜、斜茎獐牙菜及大籽獐牙菜中的含量;但该研究中样品水浴回流提取时间长达2h;未见青叶胆、云南獐牙菜、丽江獐牙菜和紫红獐牙菜中各化合物的含量,未测定獐牙菜苷和红白金花内酯。以上2个研究中每种獐牙菜样品仅只有1份,代表性不足。夏从龙等^[17]也对该属一些种的多个成分进行了测定。但是,迄今未见2010年版《中国药典》收载青叶胆的含量测定项;未见云南獐牙菜 *S. yunnanensis* 中除芒果苷之外的成分含量测定研究和红白金花内酯在该属植物中的含量报道;未见青叶胆中芒果苷和斜茎獐牙菜中獐牙菜苷的含量报道。

针对以往研究报道中的这些不足,本研究建立了同时测定青叶胆及习用品种中獐牙菜苦苷、龙胆苦苷、獐牙菜苷、芒果苷和红白金花内酯含量的HPLC方法,并对云南产青叶胆、斜茎獐牙菜、紫红獐牙菜、丽江獐牙菜、西南獐牙菜、大籽獐牙菜、显脉獐牙菜和云南獐牙菜共30份样品进行了含量测定,在比较8个青叶胆品种含量测定结果的同时,建立了鉴定大青叶胆、小青叶胆、西南獐牙菜和紫红獐牙菜的方法。研究结果将为青叶胆及其习用品种的鉴定和质量评价提供科学资料。

1 材料

Agilent 1100型高效液相色谱仪, DAD二极管阵列检测器, Agilent Chemstation化学工作站; Milli-Q超纯水仪(美国Millipore公司); XS205 dual range 1/10万电子天平(瑞士梅特勒-托利多仪器有限公司); KQ-500DE型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); WB-100型小型高速粉碎机(北京市微创机械设备有限公司)。

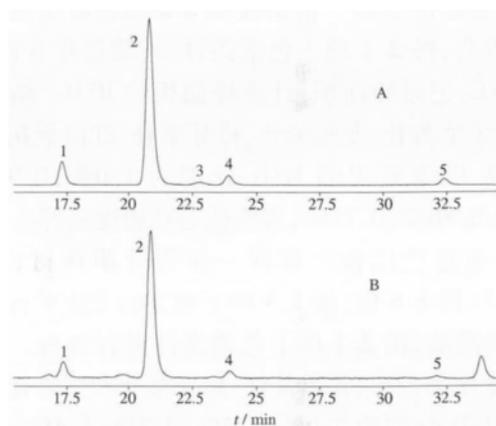
龙胆苦苷、獐牙菜苷对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为110770-201013, 111742-200501); 獐牙菜苦苷、芒果苷对照品(成都瑞芬思生物科技有限公司,批号分别为PCS1001, PCS0640, 纯度大于98%); 红白金花内酯对照品(自制, 纯度大于98%)。甲醇为色谱纯(美国Fisher公司), 磷酸为色谱纯(美国Tedia公司), 水为超纯水, 其余试剂均为分析纯。

8个青叶胆品种药材由作者分别采集或购买于云南省昆明、楚雄、景东、大理和丽江等地, 共30份,

由北京大学药学院蔡少青教授鉴定。

2 方法和结果

2.1 色谱条件 Thermo BDS Hypersil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相 0.1% 磷酸溶液(A)-甲醇(B) 梯度洗脱 0~10 min, 18%~20% B; 10~30 min, 20%~35% B; 30~35 min, 35%~60% B; 流速前30 min为0.7 mL·min⁻¹, 后5 min由0.7 mL·min⁻¹逐渐升到1.0 mL·min⁻¹; 柱温32℃; 獐牙菜苦苷、龙胆苦苷和獐牙菜苷检测波长为250 nm, 芒果苷检测波长为260 nm, 红白金花内酯检测波长为225 nm。按照上述色谱条件进行测定, 各成分分离度良好, 对照品及样品的色谱图见图1。



A. 对照品; B. 样品; 1. 獐牙菜苦苷; 2. 龙胆苦苷; 3. 红白金花内酯; 4. 獐牙菜苷; 5. 芒果苷。

图1 对照品和样品 HPLC 图(250 nm)

Fig. 1 HPLC chromatograms of the references and a sample at 250 nm

2.2 对照品溶液的制备 取獐牙菜苦苷、龙胆苦苷、獐牙菜苷、红白金花内酯和芒果苷各对照品适量, 精密称定, 分别加75%甲醇制成每1 mL含1.03, 1.506, 1.01, 0.524, 0.506 mg的溶液, 即得各对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备 取药材(全草)粉末(过40目筛)约0.5 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入75%甲醇25 mL, 密封, 称重, 超声提取30 min(超声过程温度范围为20~32℃)。待冷却至室温后称重, 用75%甲醇补足失重, 摇匀, 经0.45 μm微孔滤膜滤过, 取续滤液即得。样品在提取完0.5~10 h内测定。所有样品在2012年6月—2012年

7 月内测定完毕。

2.4 线性关系的考察 将 2.2 项下各对照品溶液, 稀释 10, 20, 50, 100 倍, 分别精密吸取不同倍数的溶液进样 1, 3, 5, 10 μL , 以峰面积为纵坐标, 对照品的

进样量为横坐标, 绘制标准曲线, 得到回归方程和相关系数; 吸收信号为噪音信号 10 倍时的进样量确定为定量限, 吸收信号为噪音信号 3 倍时的进样量确定为检测限, 见表 1。

表 1 对照品的线性关系和范围

Table 1 Linearities and ranges of five references

化合物	回归方程	r	线性范围/ μg	检测限/ng	定量限/ng
獐牙菜苦苷	$y = 1\,357.4x + 46.76$	0.999 9	0.072 ~ 13.39	17.56	66.72
龙胆苦苷	$y = 1\,415.1x + 3.813$	0.999 9	0.120 ~ 4.518	12.68	78.21
獐牙菜苷	$y = 1\,917.6x + 43.24$	0.999 7	0.060 ~ 5.050	10.69	49.93
红白金花内酯	$y = 9\,427.7x + 24.57$	0.999 7	0.031 ~ 0.210	5.691	22.24
芒果苷	$y = 4\,489.4x - 0.578$	0.999 7	0.025 ~ 1.518	4.121	13.93

2.5 精密度试验 精密吸取 2.2 项各对照品溶液适量混合, 按 2.1 项下色谱条件, 连续进样 6 次, 每次 5 μL , 记录峰面积, 计算峰面积的 RSD。结果显示, 獐牙菜苦苷、龙胆苦苷、獐牙菜苷、红白金花内酯和芒果苷峰面积的 RSD 分别为 1.0%, 0.93%, 1.0%, 0.86%, 0.71%, 表明仪器精密度良好。

2.6 重复性试验 取同一份青叶胆药材 (YLLi 101007) 粉末 6 份, 按 2.3 项下确定的方法平行制备供试品溶液, 按 2.1 项下色谱条件进行分析。结果显示, 獐牙菜苦苷、龙胆苦苷、獐牙菜苷和芒果苷峰面积的 RSD 分别为 2.0%, 1.7%, 2.3%, 1.4%, 均小于 3.0%, 表明该试验方法重复性良好。

2.7 稳定性试验 取一份青叶胆药材 (YLLi 101007) 粉末, 按 2.3 项下确定的方法制备供试品溶液, 分别于 0, 2, 4, 8, 12, 20, 24, 30, 36 h 时进样 5 μL , 按 2.1 项下色谱条件测定, 记录峰面积, 并计算獐牙菜苦苷、龙胆苦苷、獐牙菜苷和芒果苷峰面积的 RSD。结果显示, 供试品溶液中獐牙菜苦苷、龙胆苦苷、獐牙菜苷和芒果苷峰面积的 RSD 分别为 2.4%, 1.7%, 3.9%, 2.7%, 表明供试品溶液在 36 h 内稳定。

2.8 加样回收率试验 称取已知含量的药材 (YL-Li 101005) 粉末 6 份, 每份约 0.25 g, 精密称定, 置于具塞锥形瓶中, 加入各对照品溶液 (除红白金花内酯外, 其余对照品约相当于药材中含量的 60% ~ 120%) 适量, 按 2.3 项下方法制备供试品溶液, 按 2.1 项下色谱条件测定, 计算各对照品的回收率和 RSD, 结果见表 2。结果显示, 獐牙菜苦苷、龙胆苦苷、獐牙菜苷、芒果苷和红白金花内酯平均加样回收

率为 97.03% ~ 102.7%, RSD 为 1.8% ~ 6.2%。

2.9 样品的含量测定 取各药材粉末, 按 2.3 项下的方法操作制备供试品溶液, 每个样品平行 2 份, 并按 2.1 项下的色谱条件进行测定, 每份测定 2 次。同时, 按 2010 年版《中国药典》附录 IX H 烘干法测定各样品中的含水量。计算各样品扣除水分后的獐牙菜苦苷、龙胆苦苷、獐牙菜苷、红白金花内酯和芒果苷的净含量, 结果见表 3。

3 结论与讨论

本研究建立了测定青叶胆及其习用品种 (全草) 中 5 种成分含量的高效液相色谱方法, 该方法操作简单、结果准确, 具有较好的重复性和稳定性。并采用该方法对 8 个青叶胆品种多个产地共 30 份药材样品进行了测定。具体数据见表 3。

3.1 检测波长的确定 采用二极管阵列检测器, 分别对 5 种被测成分在 190 ~ 400 nm 进行了全波长扫描。结果显示, 獐牙菜苦苷、龙胆苦苷、獐牙菜苷、芒果苷和红白金花内酯分别在 240 nm; 250, 275 nm; 250 nm; 260, 320 nm; 225 nm 有最大吸收。为了兼顾 5 个成分的最大吸收, 最终检测波长确定为獐牙菜苦苷、龙胆苦苷和獐牙菜苷为 250 nm, 芒果苷为 260 nm, 红白金花内酯为 225 nm。

3.2 供试品提取方法的考察 分别考察了不同浓度甲醇和不同浓度乙醇对青叶胆药材中 5 个成分的提取效果, 结果以 75% 甲醇为最佳。继而又对提取方式 (超声、回流和冷浸)、超声时间、溶剂用量进行了考察, 最终确定采用 75% 甲醇 25 mL 超声提取 30 min 作为供试品溶液的制备方法。

表2 5种有效成分的加样回收率($n=6$)

Table 2 The recoveries of the five effective constituents($n=6$)

化合物	样品中量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	回收率平均值/%	RSD/%
獐牙菜苦苷	0.559	0.530	1.096	101.3	102.7	2.7
	0.558	0.530	1.098	101.9		
	0.558	0.424	0.987	101.2		
	0.559	0.424	1.018	108.3		
	0.558	0.635	1.198	100.8		
	0.559	0.635	1.213	103.0		
龙胆苦苷	5.038	4.821	9.799	98.76	97.03	2.5
	5.046	4.821	9.634	95.17		
	5.061	3.857	8.921	100.1		
	5.045	3.857	8.848	98.60		
	5.059	5.785	10.539	94.73		
	4.993	5.785	10.479	94.83		
獐牙菜苷	0.238	0.203	0.429	94.09	98.43	6.2
	0.237	0.203	0.447	103.5		
	0.238	0.162	0.409	105.6		
	0.236	0.162	0.383	90.74		
	0.235	0.244	0.485	102.5		
	0.235	0.244	0.465	94.26		
红白金花内酯	0	0.237	0.235	99.16	101.7	2.2
	0	0.237	0.246	103.8		
	0	0.189	0.192	101.6		
	0	0.189	0.196	103.7		
	0	0.284	0.281	98.94		
	0	0.284	0.293	103.2		
芒果苷	0.068	0.061	0.131	103.3	100.4	1.8
	0.069	0.061	0.130	100.0		
	0.069	0.049	0.118	100.0		
	0.069	0.049	0.117	97.96		
	0.069	0.073	0.142	100.0		
	0.068	0.073	0.142	101.4		

3.3 大青叶胆和小青叶胆以及西南獐牙菜和紫红獐牙菜的鉴别 丽江獐牙菜和斜茎獐牙菜因植株矮、茎秆细(多数植株高度小于30 cm,多数茎直径小于2 mm)的特点在药材市场上被称作小青叶胆。按此特点,弥勒獐牙菜和云南獐牙菜也应属于小青叶胆。西南獐牙菜、显脉獐牙菜、大籽獐牙菜和紫红獐牙菜因植株较高大以及茎秆粗(多数植株为20~50 cm,多数茎直径大于2 mm)在药材市场被称为大青叶胆。本研究结果显示4种小青叶胆品种中均含有大量的獐牙菜苦苷(均大于 $30 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$),其含量远远高于獐牙菜苷和龙胆苦苷及两者之和,尤其是丽江獐牙菜中獐牙菜苦苷的含量可达 $118.05 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。西南獐牙菜、大籽獐牙菜和显脉獐牙菜中龙胆苦苷含量高于獐牙菜苦苷,紫红獐牙菜中龙胆苦苷和獐牙菜苷的含量之和大于獐牙菜苦苷的含量。

由此作者发现根据獐牙菜苦苷含量与龙胆苦苷和獐牙菜苷含量之和的比较可以鉴别大青叶胆和小青叶胆的规律,即如果獐牙菜苦苷含量高于龙胆苦苷和獐牙菜苷含量之和,为小青叶胆;如果獐牙菜苦苷含量小于龙胆苦苷和獐牙菜苷含量之和,为大青叶胆。作者对文献中已报道的同时测定西南獐牙菜、大籽獐牙菜、显脉獐牙菜和紫红獐牙菜中这3种成分含量的3篇文献的含量数据进行了分析,分析结果支持本研究中作者发现的规律^[15, 18-19]。

大青叶胆西南獐牙菜中龙胆苦苷和紫红獐牙菜中獐牙菜苷的含量较高,可用于鉴别这两种植物来源的青叶胆。西南獐牙菜5种成分中龙胆苦苷含量高于其他4种成分,且龙胆苦苷与5成分总和的比值大于0.76,其余7种青叶胆样品中龙胆苦苷与5成分总和的比值小于0.70(表3,图2)。依据此比

表 3 8 个青叶胆品种(全草) 中 5 种有效成分的含量测定

Table 3 The contents of five effective constituents in eight different Qingyedans (whole herbs)

种名 ¹⁾	编号 ²⁾	产地/ 购买地	收集 时间	质量分数/mg·g ⁻¹					5 成分 总和	龙胆苦苷/ 5 成分总和
				獐牙菜 苦苷	龙胆 苦苷	獐牙 菜苷	红白金 花内酯	芒果 苷		
弥勒獐牙菜	200811	弥勒	2008-11	56.97	2.08	0.64	- ⁴⁾	-	59.69	0.03
	200911	弥勒	2009-11	53.42	1.80	0.92	-	-	56.14	0.03
	200812	蒙自	2008-12	34.47	-	0.79	-	-	35.25	0.00
丽江獐牙菜	6943	昆明	2011-11	118.05	2.55	1.46	-	-	122.05	0.02
	6949	楚雄	2011-11	100.11	1.25	2.09	trace	trace	103.44	0.01
	091111	元谋	2009-11	69.27	trace ³⁾	1.24	trace	-	70.50	0.00
斜茎獐牙菜	11046	禄劝	2011-11	98.97	1.10	1.08	trace	0.28	101.43	0.01
	6911	昆明	2011-11	83.30	-	0.51	trace	0.18	83.99	0.00
	6903	昆明	2011-10	60.32	1.93	2.59	trace	0.30	65.13	0.03
云南獐牙菜	091122	大理	2009-11	62.80	1.42	3.57	trace	-	67.79	0.02
西南獐牙菜	100912	丽江	2010-09	2.04	25.91	0.64	-	0.26	28.85	0.90
	6947	马街	2011-11	1.87	22.04	0.64	-	0.15	24.70	0.89
	100915	丽江	2010-09	1.69	21.71	trace	-	trace	23.40	0.93
	100908	大理	2010-09	2.38	21.21	1.03	-	0.29	24.90	0.85
	101005	嵩明	2010-10	2.21	19.95	0.93	-	0.27	23.36	0.85
	101007	嵩明	2010-10	1.68	19.16	0.57	-	0.16	21.58	0.89
	6645	丽江	2009-11	0.92	11.07	-	-	-	11.99	0.92
	11018	景东	2011-11	1.00	7.69	-	-	-	8.69	0.88
	091127	大理	2009-11	0.80	5.77	-	-	-	6.57	0.88
	6944	马街	2011-11	0.98	3.50	trace	-	-	4.47	0.78
紫红獐牙菜	091114	丽江	2009-11	-	3.42	-	-	-	3.42	1.00
	6931	禄劝	2011-11	0.69	2.29	-	-	-	2.98	0.77
	6927	富明	2011-11	15.80	7.45	20.96	-	7.79	51.99	0.14
	6937	武定	2011-11	7.85	2.23	6.49	-	2.73	19.30	0.12
	100910	大理	2010-09	4.84	7.02	40.33	-	3.68	55.86	0.13
大籽獐牙菜	101006	嵩明	2010-10	trace	4.35	4.21	-	4.21	12.77	0.34
	6642	昆明	2010-10	-	trace	0.72	-	0.51	1.23	0.00
显脉獐牙菜	11020	楚雄	2011-11	trace	1.83	1.45	-	-	3.28	0.56
	100909	大理	2010-09	trace	1.70	0.79	-	-	2.50	0.68
	6929	富明	2011-11	0.84	1.60	1.93	-	-	4.37	0.37

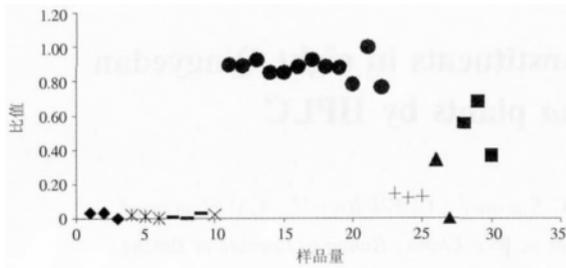
注: ¹⁾ 弥勒獐牙菜 *Swertia mileensis* T. N. Ho et W. L. Shi; 丽江獐牙菜 *S. delavayi* Franch.; 斜茎獐牙菜 *S. patens* Burk.; 云南獐牙菜 *S. yunnanensis* Burk.; 西南獐牙菜 *S. cincta* Burk.; 紫红獐牙菜 *S. punicea* Hemsl.; 大籽獐牙菜 *S. macrosperma* C. B. Clarke; 显脉獐牙菜 *S. nervosa* (G. Don) Wall. ex C. B. Clarke; ²⁾ 4 位数编号的为商品, 其余为采集品; 6 位数编号的样品中, 弥勒獐牙菜由实验室提供, 其余采集品均由第一作者采集和编号; ³⁾ trace. 定量限以下; ⁴⁾ -. 未检测到。

值, 可以将西南獐牙菜从另外 7 种青叶胆中区分出来。紫红獐牙菜中獐牙菜苷 6.49 ~ 40.33 mg·g⁻¹, 大于其余 7 个青叶胆品种。根据以上分析结果可以鉴定出大青叶胆中的西南獐牙菜和紫红獐牙菜。

西南獐牙菜在《中国植物志》^[20] 中归置于宽丝组(Sect. *Platynema*), 而本研究中的其余 7 个青叶胆品种植物均被归于多枝组(Sect. *Ophelia*), 表明它们与西南獐牙菜植物系统关系较远。本次含量测定研究结果显示, 西南獐牙菜 5 种成分中龙胆苦苷

含量高于其他 4 种成分, 龙胆苦苷与 5 成分总和的比值大于 0.76, 不同于其余 7 个青叶胆品种(龙胆苦苷与 5 成分总和的比值小于 0.70) (表 3, 图 2)。含量测定结果支持西南獐牙菜特殊的植物系统关系。

3.4 研究结果为寻找青叶胆的替代品提供了实验依据。药典规定的青叶胆基源植物弥勒獐牙菜分布狭窄, 只分布于云南红河州的弥勒、开远和蒙自, 资源量少。作者在资源调查中发现, 该种只在其产地



◆. 弥勒獐牙菜; * . 丽江獐牙菜; - . 斜茎獐牙菜; ×. 云南獐牙菜;
●. 西南獐牙菜; +. 紫红獐牙菜; ▲. 大籽獐牙菜; ■. 显脉獐牙菜。

图2 8种青叶胆品种中龙胆苦苷与5成分总和的比值
Fig. 2 The ratio gentiopicoside/total content in 8 Qingyedans

市场偶见出售,在昆明、楚雄、大理、丽江等地均未见出售和使用。

目前药材市场上青叶胆商品主要来源于斜茎獐牙菜(13份样品)、紫红獐牙菜(8份样品)和大籽獐牙菜(8份样品)等。斜茎獐牙菜全草称小儿腹痛草,2005年版《云南省中药材标准》记载其用于治疗胃痛、腹痛、胁痛、风火牙痛和咽喉肿痛等。实际上该种植物在昆明多个药店以青叶胆出售,包括一心堂、东骏大药房等,并在实际中常常当做青叶胆使用。本研究显示斜茎獐牙菜与药典青叶胆类似,含有大量的獐牙菜苦苷($60.32 \sim 98.97 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$),为在民间代用青叶胆提供了依据。本研究显示紫红獐牙菜中含有较高含量的獐牙菜苦苷、龙胆苦苷、獐牙菜苷和芒果苷,其中獐牙菜苷含量为8种中最高,獐牙菜苦苷含量是4种大青叶胆中含量最高的。紫红獐牙菜分布于云南、四川、湖北、贵州和西藏,在云南主要分布于昆明、楚雄、大理、丽江、中甸、德钦、贡山、维西、宁蒗、洱源、邓川、富民、永仁、景东、砚山等地,资源量大。以上含量测定数据和资源分布情况显示紫红獐牙菜在民间使用和收入2005年版《云南省中药材标准》是有依据的。本研究结果显示大籽獐牙菜中獐牙菜苦苷含量在定量限以下,远小于紫红獐牙菜和斜茎獐牙菜中獐牙菜苦苷的含量,这为市场上认为大籽獐牙菜质量不及紫红獐牙菜和斜茎獐牙菜提供了科学依据。

本研究显示《中国药典》规定的青叶胆含有大量的獐牙菜苦苷,而小青叶胆斜茎獐牙菜、丽江獐牙菜和云南獐牙菜均含有大量的獐牙菜苦苷,紫红獐牙菜中也含有较高的獐牙菜苦苷。综合考虑含量测定结果、资源情况和目前市场情况,有必要在本研究的基础上深入比较研究斜茎獐牙菜、丽江獐牙菜和

紫红獐牙菜的活性成分含量和药理作用等,确定最适合的青叶胆替代品。

[参考文献]

[1] 中国药典. 一部[S]. 2010:182.
[2] 高丽. 青叶胆及民间习用品的鉴定[J]. 云南中医中药杂志, 2006, 27(4):65.
[3] 陈家春, 万定荣, 难波恒雄. 獐牙菜属民族民间药物的整理[J]. 中国民族民间医药杂志, 1999(2):98.
[4] 江苏省植物研究所, 中国医学科学院, 中国科学院昆明植物研究所. 新华本草纲要. 第2册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1991:397.
[5] 宋万志. 龙胆科的植物资源——“青叶胆”和“藏茵陈”[J]. 中国民族民间医药, 1991(6):15.
[6] 云南省食品药品监督管理局. 云南省中药材标准. 第1册[S]. 昆明: 云南省食品药品监督管理局, 2005:10, 46.
[7] 赵利剑, 邹洪波, 刘俊, 等. 川东獐牙菜主要成分齐墩果酸的提取及其对肿瘤细胞的影响[J]. 湖南中医杂志, 2006(4):86.
[8] 赵利剑, 左泽乘, 邹洪波, 等. 川东獐牙菜苦甙类成分的提取及其体外抗肿瘤作用研究[J]. 中医药导报, 2006(5):62.
[9] 胡若琪, 烧娴宜. 獐牙菜甙对D-氨基半乳糖所致急性肝损伤的保护作用[J]. 中药药理与临床, 1988(3):41.
[10] 胡若琪, 烧娴宜. 獐牙菜甙对D-氨基半乳糖性肝损伤大鼠脾脏体积的影响[J]. 云南中医学院学报, 1989(2):8.
[11] 张秀桥, 黄凤娇, 陈家春, 等. 獐牙菜中吡啶类提取物抗HBV体外实验研究[J]. 中药材, 2006(7):697.
[12] Reen R K, Karan M, Singh K, et al. Screening of various *Swer-tia* species extracts in primary monolayer cultures of rat hepatocytes against carbon tetrachloride- and paracetamol-induced toxicity[J]. J Ethnopharmacol, 2001, 75(2/3):239.
[13] 耿长安. 抗肝炎中药青叶胆的抗乙型肝炎病毒活性成分研究[D]. 昆明: 中国科学院昆明植物研究所, 2011.
[14] 胡芳弟, 淮虎银, 郭继明. 国产獐牙菜属药用植物资源[J]. 甘肃科学学报, 1995, 7(4):29.
[15] 高光跃, 李鸣, 冯毓秀, 等. 11种獐牙菜及近缘植物中有效成分的高效液相色谱测定[J]. 药学学报, 1994, 29(12):910.
[16] 纪兰菊, 保怡, 陈桂琛, 等. 15种獐牙菜属植物中主要药用成分的高效液相色谱测定[J]. 西北植物学报, 2004, 24(7):1298.
[17] 夏从龙, 张浩, 刘光明, 等. 獐牙菜属及近缘植物中4种有效成分的HPLC定量分析[J]. 药物分析杂志, 2007, 27(8):1161.
[18] 徐敏, 张振秋. 青叶胆高效液相色谱特征图谱研究及指标性成分的含量测定[J]. 中国医院药学杂志, 2008, 28(20):1751.
[19] 黄飞燕, 杨海英, 杜刚, 等. HPLC法同时测定大籽獐牙菜中10种化学成分[J]. 云南中医中药杂志, 2011(4):64.
[20] 何廷农, 刘尚武, 吴庆如. 中国植物志. 第62卷[M]. 北京: 科学出版社, 1988:344.

Simultaneous determination of five constituents in eight Qingyedans species derived from *Swertia* plants by HPLC

LI Yao-li^{1,2}, SHANG Ming-ying², GENG Chang-an¹, ZHANG Xue-mei¹, CHEN Ji-jun^{1*}, CAI Shao-qing^{2*}

(1. State Key Laboratory of Phytochemistry and Plant Resources in West China, Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650204, China;

2. State Key Laboratory of Natural and Biomimetic Drugs, School of Pharmaceutical Sciences, Peking University, Beijing 100191, China)

[Abstract] **Objective:** To develop an HPLC method for simultaneous determination of swertiamarin, gentiopicroside, sweroside, mangiferin, erythrocentaurin, and to detect these five constituents in eight Qingyedans derived from *Swertia mileensis*, *S. cincta*, *S. patens*, *S. punicea*, *S. delavayi*, *S. nervosa*, *S. macrosperma* and *S. yunnanensis*. **Method:** The separation was carried out on a Thermo BDS Hypersil C₁₈ (4.6 mm × 250 mm 5 μm) column eluted with mobile phase of water containing 0.1% phosphoric acid and methanol (B) in gradient program (0-10 min, 18%-20% B; 10-30 min, 20%-35% B; 30-35 min, 35%-60% B). The column temperature was 32 °C, and the detection wavelength was set at 250, 260, 225 nm. The flow rate was 0.7 mL · min⁻¹ from 0 to 30 min, and be increased to 1.0 mL · min⁻¹ in 35 min. **Result:** The five compounds were well separated. The linear response ranges of swertiamarin, gentiopicroside, sweroside, mangiferin, erythrocentaurin were 0.072-13.39 μg, 0.120-4.518 μg, 0.060-5.050 μg, 0.025-1.518 μg, and 0.031-0.210 μg, respectively. The mean recoveries of five compounds were 97.03%-102.7% (RSD 1.8%-6.2%). There are swertiamarin, gentiopicroside and sweroside in most samples, and mangiferin in half samples. But erythrocentaurin was only detected in a few samples. The contents of five compounds were different in different samples. The contents of swertiamarin in *S. mileensis*, *S. patens*, *S. yunnanensis* and *S. delavayi* are up to 34.47-118.05 mg · g⁻¹, the contents of gentiopicroside are up to 25.91 mg · g⁻¹ in *S. cincta*. In *S. punicea* all contents of swertiamarin, gentiopicroside, sweroside and mangiferin are higher, especially the content of sweroside. There are Xiao-Qingyedans and Da-Qingyedans called in markets, and they can be identified by the contents of swertiamarin, gentiopicroside and sweroside. *S. punicea* can be identified by the content of sweroside, and the ratio gentiopicroside/total content can be used for identification of *S. cincta* from other seven Qingyedans species. **Conclusion:** The method was certified to be accurate and reliable and can be used for identification and quality evaluation of traditional Chinese medicine Qingyedans derived from *Swertia* species.

[Key words] Qingyedans; *Swertia*; HPLC; swertiamarin; gentiopicroside; sweroside; mangiferin; erythrocentaurin

doi: 10.4268/cjmm20130927

[责任编辑 孔晶晶]