

# 藏药材印度獐牙菜5种成分含量测定及药效学初步研究

杨红霞<sup>1,2</sup> 肖远灿<sup>1,2</sup> 李 岑<sup>1,2</sup> 毕宏涛<sup>1,2</sup>

张 明<sup>1,2</sup> 魏立新<sup>1,2</sup> 杜玉枝<sup>1,2\*</sup>

(1.中国科学院西北高原生物研究所,西宁 810008;  
2.青海省藏药药理学和安全性评价研究重点实验室,西宁 810008)

**摘要:**研究目的是建立印度獐牙菜含量测定方法,评价预防肝损伤药理活性。方法采用獐牙菜苦苷、龙胆苦苷、獐牙菜苷、芒果苷和异荭草苷为指标成分,建立 HPLC 含量测定外标法。选择芒果苷作为内标,利用各成分的峰面积和浓度,计算各指标成分的相对校正因子,建立一测多评法,以两种方法测量五种指标成分的含量,并进行比较。以印度獐牙菜 75%乙醇提取物预防 CCl<sub>4</sub> 致小鼠急性肝损伤,评价其药理活性。结果是 HPLC 同时测定五种指标成分含量方法学稳定,专属性强,五种指标成分的含量测定范围分别为 0.05~0.75 μg(r=0.9997), 0.07~1.08 μg(r=0.9997), 0.01~0.122 μg(r=0.9997), 0.05~0.76 μg(r=0.9998) 和 0.08~1.21 μg(r=0.9997)。一测多评法计算得到的五种指标成分含量比外标法得到的含量略低,但均在 1.0% 的范围之内。印度獐牙菜 75%醇提取物 2.0 g/kg 给药剂量能显著预防小鼠 CCl<sub>4</sub> 导致的急性肝损伤。因而印度獐牙菜具有很明显的预防急性肝损伤的药理活性。所建立的印度獐牙菜定量测定方法(外标法、一测多评法)简单准确,为印度獐牙菜指标成分含量测定提供了检测方法。

**关键词:**印度獐牙菜;指标成分;含量;一测多评;药效

## 引 言

印度獐牙菜为龙胆科獐牙菜属植物印度獐牙菜(藏语称甲蒂)[*Swertiachirayita* (Roxb. exFlemi.) Karsten] 的干燥全草,藏药蒂达的主要来源药材之一<sup>[1-3]</sup>,为一年生或多年生草本,是藏医治疗肝胆疾病的首选药物<sup>[4]</sup>。

一测多评法(quantitative analysis of multi-components by single-marker, QAMS) 是由中国中医科学院王智民等<sup>[5]</sup>于 2006 年率先提出的多指标质量控制方法, QAMS 具有检测成本低、分析效率高等优点,是利用

一种相对易得、廉价的内参物对照品,实现对多个成分的同时测定,最终达到控制中药整体质量的目的。目前已在三七<sup>[6]</sup>、补骨脂<sup>[7]</sup>、鱼腥草<sup>[8]</sup>等众多中药的质量控制中得到应用。

印度獐牙菜含量测定方法已有报道<sup>[1,9]</sup>,但并没有一测多评法应用于印度獐牙菜含量测定中,和印度獐牙菜醇提取物预防 CCl<sub>4</sub> 致小鼠急性肝损伤的相关文献。本文通过 HPLC 方法的建立,对外标法和一测多评法所测得含量进行比较,同时对印度獐牙菜醇提取物预防肝损伤的药理活性进行观察,以期建立快速测定含量的方法,并为印度獐牙菜的合理用药

销售收入 11.2 亿元,新增利税 2.6 亿元。

研究成果技术创新突出,应用程度高,具有较强的示范、带动、辐射和扩散能力,提高了藏医药行业的整体技术水平、竞争能力和系统创新能力,促进了藏药产业结构优化调整、质量标准升级及产品更新换代,对藏药行业的发展起到了极大推动作用,先后

荣获了 2014 年度青海省科技进步一等奖和 2017 年度中国民族医药学会科学技术一等奖。研究成果技术推广应用范围广泛,不仅适用于藏医药、蒙医药等我国少数民族医药,还适用于中医药以及印度 Ayurveda 医学等世界其他传统医学体系的科研、生产及临床领域。

提供实验基础。

## 1 仪器与试剂

### 1.1 仪器

Agilent1200液相色谱仪,配G1322A在线脱气机,G1311A四元泵,G1329A自动进样器,G1316A柱温箱,G1315D二极管阵列检测器。KQ5200DE型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司),METTLER TOLEDO PL203,PL602-L,XS204天平。TAUTO,RU-T-20型超纯水仪(上海同田生物技术有限公司);Mettler Toledo AL104电子天平,Sigma 3K15冷冻离心机,北京瑞科UV1801紫外—可见分光光度计,TBA-120FR全自动生化分析仪,Leica石蜡切片机 Nikon E200三目显微镜(配置数码相机)。

### 1.2 试剂与标准品

色谱甲醇(山东禹王实业有限公司化工分公司)其它试剂均为分析纯级试剂;水为Millipore超纯水

器所制超纯水。四氯化碳(CCl<sub>4</sub>)分析纯,购自天津市元力化工有限公司,批号20090916;谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)试剂盒,购自南京建成生物工程研究所;总胆红素(TBIL)、胆汁酸(TBA)试剂盒,购自上海科华公司;联苯双酯(国药准字H33021305,批号080207);其它试剂均为国产。

龙胆苦苣对照品(Gentiopicrin,中国药品生物制品检定所,供含量测定用,批号110770-200510),芒果苣(Mangiferin,中国药品生物制品检定所,供含量测定用,批号111607-200301),獐牙菜苦苣(Swertiamain,中药固体制剂制造技术国家工程研究中心,含量测定用,纯度大于98%,批号1101-080604)。异苣草苣(Isoorientin,国家食品药品鉴定研究院,含量测定用,批号111974-201401),獐牙菜苣(Swerside,北京世纪奥科生物技术有限公司,含量测定用,纯度大于98%,批号14215-86)。

### 1.3 实验材料

实验选用的印度獐牙菜样品如表1所示:

表1 印度獐牙菜样品

编号	鉴定种名	采集或购买地点
1	印度獐牙菜	西宁温室种植
2	印度獐牙菜	西宁市八一路药材市场
3	印度獐牙菜	西宁市八一路药材市场
4	印度獐牙菜	西宁市八一路药材市场
5	印度獐牙菜	尼泊尔购买
6	印度獐牙菜	拉萨圣宝堂土特产购买
7	印度獐牙菜	拉萨敏鑫商贸有限公司购买
8	印度獐牙菜	拉萨华夏工艺市场购买
9	印度獐牙菜	拉萨圣凯藏特产购买
10	印度獐牙菜	拉萨如意商店购买

## 2 方法与结果

### 2.1 HPLC 外标法或一测多评法同时测定五种指标成分

#### 2.1.1 色谱条件

色谱柱:Agilent Zorbax Eclipse XDB-C18(5μm, 4.6mm×250mm),流动相:甲醇(A)—0.2%乙酸水溶液(B),梯度洗脱,0-18min,22→32%A;18→20min,32%

A;20→25min,32→35%A;25→35min,35%A;35→42min,35→100%A。检测波长:243nm;柱温:25℃;流速:1.0mL/min。

#### 2.1.2 对照品溶液的配制

精密称取獐牙菜苦苣对照品3.50mg,龙胆苦苣对照品5.42mg,芒果苣对照品0.61mg,獐牙菜苣对照品3.80mg,异苣草苣对照品6.07mg,分别于5ml容量瓶中,加入少量甲醇溶解,超声促溶,定容至刻

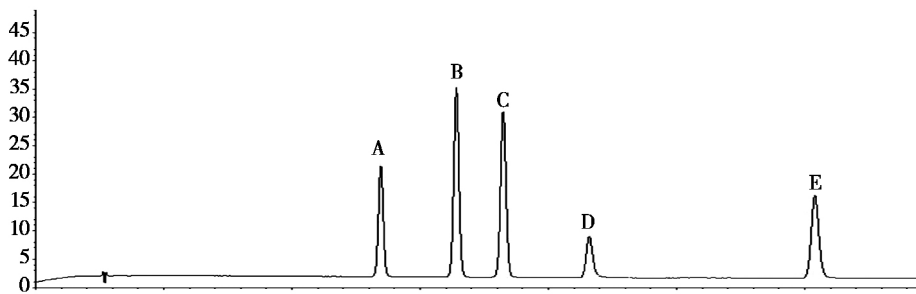
基金项目:中国科学院重点部署项目“藏药材印度獐牙菜与短管兔耳草质量标准研究”(KSZD-EW-Z-004)下属子课题藏药材印度獐牙菜质量标准研究;青海省重点实验室专项“青海省藏药药理学和安全性评价研究重点实验室”(2017-ZJ-Y08)。

通讯作者:杜玉枝

度,摇匀即得混合对照品溶液母液。母液浓度为:獐牙菜苦苷 0.7mg/ml,龙胆苦苷 1.084mg/ml,芒果苷 0.122mg/ml,獐牙菜苷 0.76mg/ml,异荭草苷 1.214mg/ml。

### 2.1.3 供试品溶液的制备

精密称取约 0.3g 样品粉末(过 4 号筛),加入 20ml 甲醇,超声处理 40min,功率 200w,频率 40KHZ,放冷,甲醇补足减失的重量,过滤,续滤液即得,进样前续滤液过 0.45 $\mu$ m 滤膜。



A.獐牙菜苦苷; B.龙胆苦苷; C.獐牙菜苷; D.芒果苷; E.异荭草苷

图1 标准品对应的 HPLC 色谱图

### 2.1.5 仪器精密度

对混合对照品母液连续进样 5 次,以 2.2.1 项下的色谱条件进样 5 次,以峰面积计算獐牙菜苦苷、龙胆苦苷、獐牙菜苷、芒果苷和异荭草苷的 RSD 值分别为 1.35%,1.40%,1.09%,1.47%和 1.66%,仪器精密度良好。

### 2.1.6 重复性

精密称取印度獐牙菜样品 3 份,每份约 0.25g,依照 2.2.3 项下供试品处理方法配置样品待测溶液,依照 2.2.1 项下的检测方法测试各指标成分的含量。獐牙菜苦苷、龙胆苦苷、獐牙菜苷、芒果苷和异荭草苷的含量分别为 2.22mg/g、0.40mg/g、1.48mg/g、4.80mg/g 和 0.12mg/g,五种成分 RSD 值分别为 0.36%、0.73%、0.75%、0.76%和

### 2.1.4 线性关系考察

配置不同浓度的混标溶液,以 2.2.1 项下的色谱条件检测,进样量 5 $\mu$ l,得到相应色谱峰面积,用进样量对峰面积做校正曲线,即得:獐牙菜苦苷: $Y=4337.8X+1.2667$ ;龙胆苦苷: $Y=8202.7X+0.8875$ ;獐牙菜苷: $Y=5095.7X+1.5125$ ;芒果苷: $Y=13555X-4.0292$ ;异荭草苷: $Y=4210X-2.8208$ ;五种对照品分别在 0.05~0.75 $\mu$ g,0.07~1.08 $\mu$ g,0.01~0.122 $\mu$ g,0.05~0.76 $\mu$ g 和 0.08~1.21 $\mu$ g 内呈良好的线性关系。

1.02%。实验结果显示方法重复性良好。

### 2.1.7 加样回收

对已测定獐牙菜苦苷、龙胆苦苷、獐牙菜苷、芒果苷和异荭草苷含量的上述供试品,分别精密称取约 0.100g,共 9 份,分为 3 组,分别加入约 0.5、1.0 和 2.0 倍 3 种指标成分总量的对照品溶液,按照 2.1.3 项下方法制备样品溶液,采用 2.2.1 项下色谱条件进行分析,计算五种成分 3 种加入量的回收率,结果如表 2。

从獐牙菜苦苷、龙胆苦苷、獐牙菜苷、芒果苷和异荭草苷加样回收率结果可以看出,所建立的含量测定方法有较好的准确度。

### 2.1.8 样品含量测定

#### (1) 外标法进行样品含量测定结果

表 2 五种指标成分加样回收率实验结果(%)

指标成分	高	中	低	平均
獐牙菜苦苷	99.31	98.86	100.24	99.47
龙胆苦苷	99.89	101.46	101.62	100.99
獐牙菜苷	100.29	100.22	99.44	99.98
芒果苷	99.52	100.02	100.40	99.98
异荭草苷	104.38	104.21	105.26	104.62

依照 2.2.3 项下供试品处理方法配置样品待测 含量。各目标成分的含量如表 3。  
 溶液,依照 2.2.1 项下的检测方法测试各指标成分的 (2)一测多评法测定样品

表 3 印度獐牙菜样品中五种指标成分的含量

样品编号	獐牙菜苦苣(mg/g)	龙胆苦苣(mg/g)	獐牙菜苣(mg/g)	芒果苣(mg/g)	异苳草苣(mg/g)	总量(mg/g)
1	0.760	未检出	0.573	3.730	未检出	5.063
2	1.586	1.236	0.905	2.275	未检出	6.002
3	1.664	1.268	0.957	1.860	未检出	5.749
4	0.631	0.082	1.044	4.896	0.190	6.843
5	2.283	0.408	1.467	4.851	0.125	9.134
6	3.550	0.573	2.015	3.960	0.105	10.203
7	4.695	1.657	1.480	7.575	0.147	15.554
8	1.583	0.335	1.412	3.919	0.130	7.379
9	11.166	10.247	1.399	23.692	0.124	46.628
10	8.166	0.494	3.025	6.688	未检出	18.373

选用混标溶液进样,以芒果苣作为内标,利用各 校正因子计算结果如表 4,各指标成分含量如表 5。  
 成分峰面积和浓度计算各指标成分的相对校正因子。 (3)两种检测方法含量比较

表 4 不同组分相对校正因子

浓度	fm/ 獐牙菜苦苣	fm/ 龙胆苦苣	fm/ 獐牙菜苣	fm/ 异苳草苣
X	0.322	0.608	0.378	0.311
X/2	0.327	0.618	0.385	0.314
X/4	0.332	0.628	0.389	0.314
X/8	0.339	0.636	0.403	0.312
X/16	0.352	0.652	0.413	0.316
平均	0.334	0.628	0.394	0.313

注:m—芒果苣;X—混标溶液。

表 5 五种指标成分含量

样品编号	獐牙菜苦苣(mg/g)	龙胆苦苣(mg/g)	獐牙菜苣(mg/g)	异苳草苣(mg/g)	芒果苣(mg/g)	总量(mg/g)
1	0.773	未检出	0.582	未检出	3.730	5.085
2	1.606	1.256	0.915	未检出	2.275	6.052
3	1.685	1.289	0.968	未检出	1.860	5.802
4	0.643	0.085	1.055	0.185	4.896	6.864
5	2.310	0.416	1.480	0.116	4.851	9.173
6	3.589	0.583	2.031	0.095	3.960	10.258
7	4.743	1.683	1.494	0.096	7.575	15.591
8	1.603	0.342	1.425	0.122	3.919	7.411
9	11.273	10.394	1.412	0.116	23.692	46.887
10	8.246	0.503	3.046	未检出	6.688	18.483

内标法和一测多评法计算结果比较如表 6:

由表 6 可知,外标法和一测多评法计算的各目

表 6 内标法和一测多评法计算结果的比较

样品编号	内标法检测结果(mg/g)	一测多评法计算结果(mg/g)	相差百分比(%)
1	5.063	5.085	0.435
2	6.002	6.052	0.833
3	5.749	5.802	0.922
4	6.843	6.864	0.307
5	9.134	9.173	0.427
6	10.203	10.258	0.539
7	15.554	15.591	0.238
8	7.379	7.411	0.434
9	46.628	46.887	0.555
10	18.373	18.483	0.599

标成分之和之间有一定的偏差,且一测多评法计算出的各指标成分的含量均比外标法直接得到的各指标成分的含量偏高。但以外标法得到的各指标成分含量为基础,一测多评法计算出的各成分含量与其相差均在 1.00% 以内。

## 2.2 保肝活性观察

### 2.2.1 浸膏提取流程

取 1.5kg 印度獐牙菜,切段,加入 10 倍体积 75% 的酒精,浸泡过夜,水浴提取,回流发生开始计时,第一次提取 2h 后,将提取液移出;再加入酒精至原体积量提取 1h,相同方法提取第三次,提取时间 1h,合并三次提取液,利用负压回收酒精,获得浸膏,所得浸膏冷冻干燥后粉碎待用。

### 2.2.2 药效实验设计

SPF 级 KM 小鼠,雌雄各半,20~24g;禁食不禁水

过夜后,随机分为 9 组以空白对照组、模型对照组、阳性对照组(联苯双酯,100mg/kg·BW)和给药组进行划分。空白对照组和模型对照组给水(20mL/kg·BW),给药组分别以 0.125、0.250、0.500、1.000 和 2.000g/kg·BW 剂量灌胃相应药物,每天 1 次,连续 8d。末次给药 2h 后,除正常组外,其余各组腹腔注射 0.1% CCl<sub>4</sub> (v/v,溶于橄榄油)10mL/kg·BW,禁食不禁水 22h 后,称重,断颈取血,血液于 37℃ 水浴 30min 后,置于冷冻离心机,在 3000r/min,4℃ 条件下离心,分离血清用于生化测定;分离肝脏、脾脏称重,计算脏器系数。

### 2.2.3 脏器系数

按照实验方案,实验结束时进行样品采集,将肝脏和脾脏摘取后分别称重,按照脏器系数计算公式,计算肝脏系数和脾脏系数,结果如表 7。

由表 7 可知,相对于空白组,模型组的肝脏系数

表 7 给药剂量筛选实验肝脏系数(n = 10)

实验分组	肝脏系数(%)	脾脏系数(%)
空白组	4.11± 0.42 <sup>a</sup>	0.21± 0.07 <sup>a</sup>
模型组	5.89± 0.40 <sup>b</sup>	0.37± 0.12 <sup>b</sup>
阳性组	4.42± 0.44 <sup>a</sup>	0.27± 0.09 <sup>a</sup>
0.125g/kg 组	4.57± 0.55 <sup>a</sup>	0.26± 0.04 <sup>a</sup>
0.25g/kg 组	4.70± 0.37 <sup>a</sup>	0.24± 0.04 <sup>a</sup>
0.5g/kg 组	4.73± 0.21 <sup>a</sup>	0.24± 0.04 <sup>a</sup>
1.0g/kg 组	4.89± 0.25 <sup>a</sup>	0.27± 0.06 <sup>a</sup>
2.0g/kg 组	4.79± 0.46 <sup>a</sup>	0.27± 0.06 <sup>a</sup>

注:a,b,c 不同字母之间,代表有统计差异,P<0.05。



和脾脏系数均显著升高( $P<0.05$ ),阳性组和各给药组的肝脏系数、脾脏系数相对于空白组均有所增加,但没有统计差异,说明各给药组实验动物的肝、脾脏的损伤程度较模型组都有减轻。

#### 2.2.4 血清生化指标

按照实验方案,实验结束时进行采集血样,离心血清后,以试剂盒进行血清生化指标的检测,检测结果如表8。

表8 给药剂量筛选实验血清生化指标检测结果( $n=10$ )

实验分组	ALT(U/L)	AST(U/L)	TBIL( $\mu$ mol/L)	TBA( $\mu$ mol/L)
空白组	31.50 $\pm$ 7.62 <sup>a</sup>	160.60 $\pm$ 53.89 <sup>a</sup>	3.27 $\pm$ 2.03 <sup>a</sup>	4.43 $\pm$ 1.42 <sup>a</sup>
模型组	2278.88 $\pm$ 351.87 <sup>c</sup>	2348.63 $\pm$ 191.53 <sup>c</sup>	4.61 $\pm$ 1.44 <sup>b</sup>	7.57 $\pm$ 2.26 <sup>b</sup>
阳性组	1515.00 $\pm$ 323.15 <sup>b</sup>	1712.50 $\pm$ 281.64 <sup>b</sup>	3.74 $\pm$ 1.69 <sup>a</sup>	5.17 $\pm$ 1.14 <sup>a</sup>
0.125g/kg组	2328.80 $\pm$ 284.78 <sup>c</sup>	2612.10 $\pm$ 119.67 <sup>d</sup>	6.32 $\pm$ 2.02 <sup>d</sup>	10.83 $\pm$ 2.66 <sup>c</sup>
0.25g/kg组	2214.57 $\pm$ 103.18 <sup>c</sup>	2173.14 $\pm$ 230.69 <sup>c</sup>	4.94 $\pm$ 1.10 <sup>b</sup>	8.15 $\pm$ 1.84 <sup>b</sup>
0.5g/kg组	2197.11 $\pm$ 212.05 <sup>c</sup>	2106.89 $\pm$ 276.78 <sup>c</sup>	4.72 $\pm$ 2.06 <sup>a</sup>	8.31 $\pm$ 3.70 <sup>b</sup>
1.0g/kg组	2056.63 $\pm$ 144.34 <sup>c</sup>	1901.75 $\pm$ 150.81 <sup>c</sup>	6.58 $\pm$ 1.79 <sup>d</sup>	9.76 $\pm$ 6.35 <sup>b</sup>
2.0g/kg组	1427.29 $\pm$ 171.68 <sup>b</sup>	1533.80 $\pm$ 185.62 <sup>b</sup>	5.16 $\pm$ 3.10 <sup>b</sup>	8.51 $\pm$ 6.65 <sup>b</sup>

注:a,b,c,d不同字母之间,代表有统计差异, $P<0.05$ 。

由表8的检测结果显示,与空白组比较,模型组各检测指标均显著升高( $P<0.05$ );与模型组相比,阳性组的各检测指标均有好转( $P<0.05$ ),给药最高剂量组的谷丙转氨酶和谷草转氨酶显著降低( $P<0.05$ ),单和阳性给药组检测值之间没有统计差异。

### 3 结论

本文以藏药蒂达主要来源药材之一的印度獐牙菜作为研究对象,选用獐牙菜苦苣、龙胆苦苣、獐牙菜苦苣、芒果苣和异荛苣作为指标成分,对印度獐牙菜中五种指标成分的含量测定方法进行了外标法和一测多评法的建立和比较。通过外标法和一测多评法得到的指标成分含量之间的差异,证明通过一测多评法计算得到各指标成分含量的方法,在标准品短缺的藏药植物药研究中的适用性。此外,以75%醇提物给药CCl<sub>4</sub>致急性肝损伤的模型小鼠,血清生化指标显示,印度獐牙菜75%醇提物2.0g/kg剂量(本实验中最大剂量)预防急性肝损伤的效果显著。指标成分快速检测方法的建立和药理活性的初步研究,为印度獐牙菜质量控制和合理用药提供了数据支持。

#### 参考文献:

[1] 肖远灿,魏立新,杨红霞,等.藏药材印度獐牙菜质量标准

研究[J].中国药学杂志,2010,45(4):255-258.

[2] 西北高原生物研究所.藏药志[M].西宁:青海人民出版社,1991:104-117.

[3] 俄仓巴·卓玛东珠,刘海青.藏药“蒂达”品种整理[J].中药材,1996,19(10):494-496.

[4] 中华人民共和国卫生部药品标准.藏药第一册[S].1995:28.

[5] 王智民,高慧敏,付雪涛,等.“一测多评”法中药质量评价模式方法学研究[J].中国中药杂志,2006,31(23):1925-1928.

[6] Wang C Q, Jia X H, Zhu S, et al. A systematic study on the influencing parameters and improvement of quantitative analysis of multi-component with single marker method using notoginseng as research subject [J]. Talanta, 2015, 134(1): 587-595.

[7] Yan C P, Wu Y, Weng Z B, et al. Development of an HPLC method for absolute quantification and QAMS of flavonoids components in Psoraleacorylifolia L. [J]. J Anal Methods Chem, 2015, 23(10): 1-7.

[8] Dai W, Hu L, Ji L, et al. A comprehensive method for quality evaluation of HoultuyinaeHerba by a single standard to determine multi-components, fingerprint and HPTLC method [J]. Anal Sci, 2015, 31(6): 535-541.

[9] 阳勇,罗维早,刘翔,等.藏药“甲蒂(印度獐牙菜)”中龙胆苦苣和獐牙菜苦苣等10种成分的含量测定与质量评价[J].中国中药杂志,2012,37(20):3141-3146.