

轮叶獐牙菜质量标准草案及起草说明

目录

技术资料 1 轮叶獐牙菜药材质量标准草案	1
技术资料 2 轮叶獐牙菜药材质量标准起草说明	3
一、文献调研	3
1.1. 轮叶獐牙菜药材名称	3
1.2. 本草考证	3
1.3. 植物形态	3
1.4. 用药部位及生长环境	4
1.5. 关于轮叶獐牙菜药材研究现状的说明	4
二、“轮叶獐牙菜”质量标准起草说明正文	4
2.1. 仪器、试剂与药材	4
2.1.1 仪器	4
2.1.2 试剂（药）	5
2.1.3 药材样品	5
2.2 性状鉴别	6
2.3 显微鉴别	7
2.4 薄层色谱鉴别	7
2.4.1 对照品溶液制备	8
2.4.2 供试品溶液制备	8
2.4.3 点样量及展开体系的考察	8
2.4.4 薄层色谱鉴别耐用性实验	9
2.4.5 药材薄层色谱鉴别结果讨论：	13
2.5 轮叶獐牙菜药材检查项研究	14
2.5.1 水分测定	14
2.5.2 总灰分及酸不溶性灰分测定	15
2.5.3 浸出物测定	16
2.6 轮叶獐牙菜药材含量测定研究	17
2.6.1 含量测定指标成分的选择	17
2.6.2. 色谱条件及方法的考察	18

2.6.3 色谱条件与系统适用性试验	30
2.6.4. HPLC 定量分析方法学考察	32
2.6.5 样品中獐牙菜苦苷含量测定	51
2.6.6 轮叶獐牙菜中獐牙菜苦苷限度的制定	59
三、讨论与小结	67
四、参考文献	68

技术资料 1 轮叶獐牙菜药材质量标准草案

轮叶獐牙菜

དཔལ་ཅན་མེ་ལོ་

Lunyezhangyacai

巴莪色保

SWERTIA VERTICILLIFOLIA RADIX

本品为龙胆科獐牙菜属植物轮叶獐牙菜 *Swertia verticillifolia* T.N.Hoet S.W.Liu. 的干燥根。秋季采挖，洗净阴干或晒干。

【性状】 本品根圆锥状，头部膨大，多横皱纹，顶端有茎、叶的残基或凹陷。表面棕黄色或棕褐色，具有散落的分枝，具纵皱纹。易折断，断面黄色，形成层明显。气特异，味苦。

【鉴别】 (1) 本品粉末黄色至棕黄色。纤维众多，黄棕色，单个散在或成束，多具纹孔，直径 7~25 μm 。导管以螺纹为主，直径 10~23 μm 。

(2) 取本品粉末 0.5g，加甲醇 20ml，超声处理 30 分钟，放冷，滤过，滤液作为供试品溶液。另取獐牙菜苦苷对照品，加甲醇制成每 1ml 含 1mg 的溶液，作为对照品溶液。照薄层色谱法（《中国药典》2020 年版通则 0502）试验，吸取供试品溶液，对照品溶液各 5 μl ，分别点于同一硅胶 GF₂₅₄ 薄层板上，以乙酸乙酯-甲醇-甲酸（20:4.5:1）为展开剂，展开，取出，晾干，置紫外光灯（254 nm）下检视。供试品色谱中，在与对照品色谱相应的位置上，显相同颜色的斑点。

【检查】 水分 不得过 12.0%（《中国药典》2020 年版通则 0832 第二法）。

总灰分 不得过 5.0%（《中国药典》2020 年版通则 2302）。

【浸出物】 照醇溶性浸出物测定法（《中国药典》2020 年版通则 2201）热浸法测定，用乙醇作溶剂，不得少于 42.0%。

【含量测定】 照高效液相色谱法（《中国药典》2020 年版通则 0512）测定。

色谱条件与系统适应性试验 以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂；以 0.1%磷酸溶液为流动相 A，以乙腈为流动相 B，按下表中的规定进行梯度洗脱；检测波长为 238 nm。理论塔板数按獐牙菜苦苷峰计算应不低于 8000。

表 1 梯度洗脱表

时间(分钟)	流动相 A (%)	流动相 B (%)
0~12	90→84	10→16
12~12.5	84→5	16→95

12.5~16.5	5	95
16.5~17	5→90	95→10
17~21	90	10

对照品溶液的制备 取獐牙菜苦苷对照品适量，精密称定，加甲醇制成每 1ml 含獐牙菜苦苷 0.2mg 的溶液，即得。

供试品溶液的制备 取本品粉末（过二号筛）约 0.02g，精密称定，置具塞锥形瓶中，精密加入甲醇 10ml，密塞，称定重量，超声处理（功率 180w，频率 53KHz）30 分钟，放冷，再称定重量，用甲醇补足减失的重量，摇匀，滤过，取续滤液，即得。

测定法 分别精密吸取对照品溶液与供试品溶液各 10μl，注入液相色谱仪，测定，即得。

本品按干燥品计算，含獐牙菜苦苷（C₁₆H₂₂O₁₀）不得少于 8.0 %。

【性味】 味苦，性凉；化后味苦。

【功能与主治】 清热解毒；用于治疗各类中毒症。

དུག་ཚད་སེལ་ཞིང་དུག་རིགས་འཛོམས།

【用法与用量】 配方用或遵医嘱。

【贮藏】 置阴凉干燥处。

技术资料 2 轮叶獐牙菜药材质量标准起草说明

一、文献调研

1.1. 药材名称

轮叶獐牙菜藏文名དཔལ་པོ་མེད་པོ།，音译为“巴葛色保”。

1.2. 本草考证

本品为常见藏药品种之一，生长于我国西藏南部山地海拔 3800m 以上的灌丛中。

《晶珠本草》^[1]始载：“巴葛分黄、白、贵三类，黄的为巴葛色保，生长在土质松软的地方。叶茎状如紫茉莉，花小，黄色，根中空，黄色。味苦，性凉，能解毒。”《藏药晶镜本草》^[2]记载：“巴葛色保来源认定为龙胆科獐牙菜属植物轮叶獐牙菜 *Swertia verticillifolia* T.N.Hoet S.W.Liu. 的干燥根，根似萝卜、黄色，味苦，能解毒”。据现代研究报道，轮叶獐牙菜根黄色，味苦，性凉，可治疗“黄水”病等，广泛应用于多种复方及藏药临床制剂如“仁青常觉”、“仁青芒觉”、“旺日喜噶曲典”及二十五味马宝丸等中^[3]。

1.3. 植物形态

基生叶多数，莲座状，叶片匙形，长 4-7 厘米，宽 2.5-3.5 厘米，先端圆形，边缘平滑，基部渐狭，叶脉 5-7 条，弧形，在下面明显，叶柄扁平，长 4-6 厘米；茎生叶 4-6 个轮生，无柄或具短柄，叶片椭圆形或椭圆状卵形，长至 12 厘米，宽至 3.5 厘米，愈向茎上部叶愈小，全部叶先端芒尖，边缘平滑，基部钝或渐狭，叶脉 5-7 条，细而弧形，在背面明显。塔形复聚伞花序似轮伞状，有间断，多花，花序分枝长达 23 厘米，紫红色；花梗常带紫色，不等长，长至 6 厘米，具细条棱；花 4 数，下垂，直径 3-3.5 厘米；花萼长为花冠的 1/2，裂片宽椭圆形或宽卵形，长 1-1.5 厘米，宽 0.9-1.7 厘米，果时增大，先端钝圆，边缘平滑，基部钝或近心形，互相覆盖，背面具 9-11 条弧形细脉；花冠黄绿色，有深紫色脉纹，钟状，裂片倒卵形，长 2-2.5 厘米，宽达 2 厘米，先端截形，有不明显的、不规则的细波状齿，基部有 1 个腺窝，腺窝卵状三角形，裸露；花丝线状锥形，长达 14 毫米，花药黄色，椭圆形，长 4-5 毫米；子房无柄，卵形，长 11-12 毫米，先端渐狭，花柱不明显，柱头小，2 裂。蒴果无柄，卵形，长 2.2-2.7 厘米；种子深褐色，矩圆形，长约 2 毫米，平滑，两端具狭翅。花果期 7-9 月。

1.4. 用药部位及生长环境

本品为龙胆科獐牙菜属植物轮叶獐牙菜 *Swertia verticillifolia* T.N.Hoet S.W.Liu. 的干燥根。

其基源植物生长于我国西藏南部山地海拔 3800 m 以上的灌丛中。

1.5. 关于轮叶獐牙菜药材研究现状的说明

目前，轮叶獐牙菜的现代药学研究较少，依赖于传统医药典籍，缺乏药理学基础研究。“巴葛色保”为根入药，味苦，性凉，可治疗“黄水病”，常用在多种藏药临床制剂中，如“仁青常觉”、“旺日喜噶曲典”以及二十五味马宝丸等。现代药理学研究表明，轮叶獐牙菜具有呋酮类和三萜类成分^[4]，在分子生物学研究中，获得了叶绿体全基因组序列，确定其基源植物的系统学位置，为后续的植物物种分类、建立 DNA 数据库等工作提供了一定的参考。但“巴葛色保”药材质量标准等研究尚未见到系统研究报道。

二、“轮叶獐牙菜”质量标准起草说明正文

为了建立“轮叶獐牙菜”的质量标准，本项研究中完成了如下工作：

(1) 【鉴别】项中以獐牙菜苦苷作为对照的“薄层鉴别”，同时建立“生药粉末显微鉴别”。

(2) 【检查】项中按 2020 年《中国药典》四部通则 0832 第二法，测定水分含量；按 2020 年《中国药典》四部通则 2302，测定总灰分、酸不溶性灰分含量；按 2020 年《中国药典》四部通则 2201，测定浸出物含量。

(3) 采用 HPLC 法增加了【含量测定】项中以獐牙菜苦苷为指标的含量限度规定。

2.1. 仪器、试剂与药材

2.1.1 仪器

上海科导超声仪器有限公司 SK3300HP 超声波清洗器；

DK-2000-III 型拉伸水浴锅（黄骅菲斯福实验仪器有限公司）；

DHG-9243B5 电热恒温鼓风干燥箱（上海一恒科学仪器有限公司）；

X2.5-T1.5-2001 型箱式电阻炉（余姚市长丰仪表厂）；

日本岛津 SHIMADZU LC-2050C 30 高效液相色谱仪；

Sartorius BT 25 S（十万分之一）和 BSA124S-CW（万分之一）电子天平；

PCWJ-10 超纯水机（成都品成科技有限公司）

2.1.2 试剂（药）

1. 对照品

獐牙菜苦苷：中国食品药品检定研究院，批号：110785-202205，含量：97.2%。

2. 试药：

甲醇（AR）：成都金山化学试剂有限公司，批号：20230222；

乙醇（AR）：成都金山化学试剂有限公司，批号：20230102；

甲醇（HPLC）：fisher chemical，批号：224346；

乙腈（HPLC）：fisher chemical，批号：F22M8G206；

磷酸（AR）：成都金山化学试剂有限公司，批号：20221004；

硫酸（AR）：成都市科隆化学制品有限公司，批号：2017122701；

石油醚（60~90）（AR）：成都金山化学试剂有限公司，批号：20230208；

乙酸乙酯（AR）：成都市科隆化学制品有限公司，批号：C11807956；

丙酮（AR）：成都市科隆化学制品有限公司，批号：2023041704；

甲酸（AR）：上海迈瑞尔化学技术有限公司，批号：70767118；

水：哇哈哈纯净水

高效硅胶 GF₂₅₄ 板（薄层色谱用）：青岛海洋化工有限公司，批号：20230702；

硅胶 GF₂₅₄ 板（薄层色谱用）：青岛海洋化工有限公司，批号：20201126；

高效硅胶 GF₂₅₄ 板（薄层色谱用）：北京百灵威科技有限公司，批号：L980X16；

2.1.3 药材样品

表 2-1 药材样品信息表

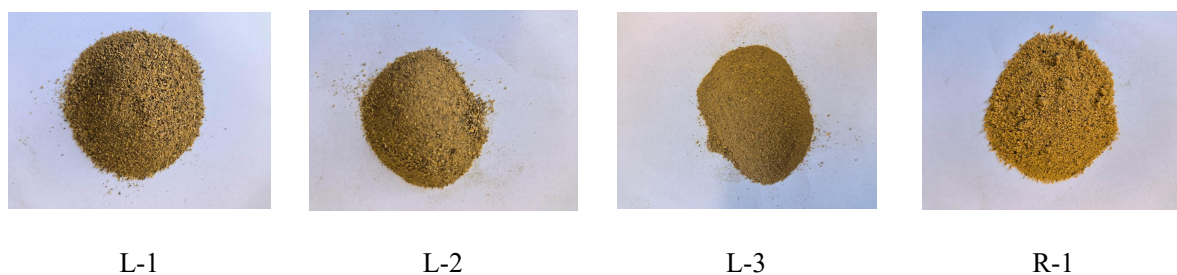
批次	产地	批次	产地
L-1	拉萨市堆龙德庆	R-5	西藏日喀则市
L-2	拉萨市堆龙德庆	R-6	西藏日喀则市
L-3	拉萨市堆龙德庆	R-7	西藏日喀则市
R-1	西藏日喀则市	R-8	西藏日喀则市
R-2	西藏日喀则市	R-9	西藏日喀则市
R-3	西藏日喀则市	R-10	西藏日喀则市
R-4	西藏日喀则市		

2.2 性状鉴别

本品根头部膨大，圆锥状，多横皱纹，顶端有茎、叶的残基或凹陷。表面棕黄色或棕褐色，具有散落的分枝，具纵皱纹。质韧，易折断，断面黄色，形成层明显。气微，味苦。



图 2-1. 轮叶獐牙菜外观性状鉴别





R-2



R-3



R-4



R-5



R-6



R-7



R-8



R-9



R-10

2.3 显微鉴别

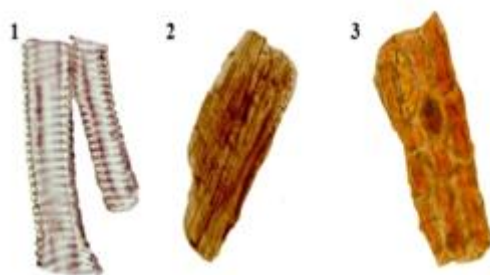


图 2-2 轮叶獐牙菜粉末显微特征图

注：1：导管；2：木纤维；3：韧皮纤维

本品粉末黄色至棕黄色。纤维众多，黄棕色，单个散在或成束，多具纹孔，直径 7~25 μm 。导管以螺纹为主，直径 10~23 μm 。

2.4 薄层色谱鉴别

獐牙菜苦苷为轮叶獐牙菜主要成分之一，故选用獐牙菜苦苷作为薄层鉴别的对照

品。

2.4.1 对照品溶液制备

取獐牙菜苦苷对照品适量，加甲醇制成每 1ml 含 1mg 的溶液，即得。

2.4.2 供试品溶液制备

取轮叶獐牙菜药材样品粉末 0.5g，置具塞锥形瓶中，加入 20ml 甲醇，常温超声 30 min，放置室温，过滤，滤液作为供试品溶液。

2.4.3 点样量及展开体系的考察

2.4.3.1 点样量考察

分别考察了四种点样量，见图 2-3：2 μ l、3 μ l、4 μ l，5 μ l，结果显示：当点样量为 5 μ l 时，斑点清晰，最终确定对照品点样量为 5 μ l。

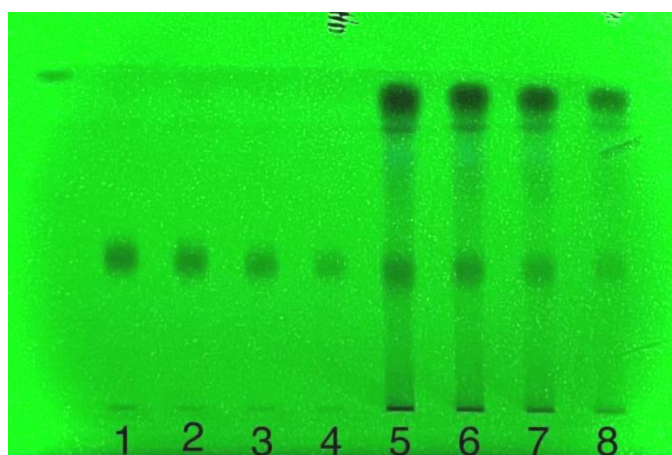


图 2-3. 薄层点样量考察 (T=20°C RH=58%)

1.獐牙菜苦苷 5 μ l 2.獐牙菜苦苷 4 μ l 3.獐牙菜苦苷 3 μ l 4.獐牙菜苦苷 2 μ l
5.批次 L-3 5 μ l 6.批次 L-3 4 μ l 7.批次 L-3 3 μ l 8.批次 L-3 2 μ l

展开剂：乙酸乙酯-甲醇-甲酸 (20:4.5:1)

高效硅胶 GF₂₅₄ 板 (薄层色谱用)：青岛海洋化工有限公司

2.4.3.2 展开体系考察

考察了以下两种展开剂体系，见图 2-4：

乙酸乙酯-甲醇-甲酸 (20:4.5:1)；

丙酮-石油醚-甲酸 (25:12.5:1)

结果显示：对比之下，展开剂为乙酸乙酯-甲醇-甲酸 (20:4.5:1) 时，斑点颜色清晰，位置适中，R_f 值约为 0.50，符合药典相关规定，展开后斑点清晰明显，无拖尾；

展开剂为丙酮-石油醚-甲酸（25:12.5:1）时，斑点颜色清晰，但位置靠下，RF 值约为 0.30，最终确定展开剂为乙酸乙酯-甲醇-甲酸（20:4.5:1）。

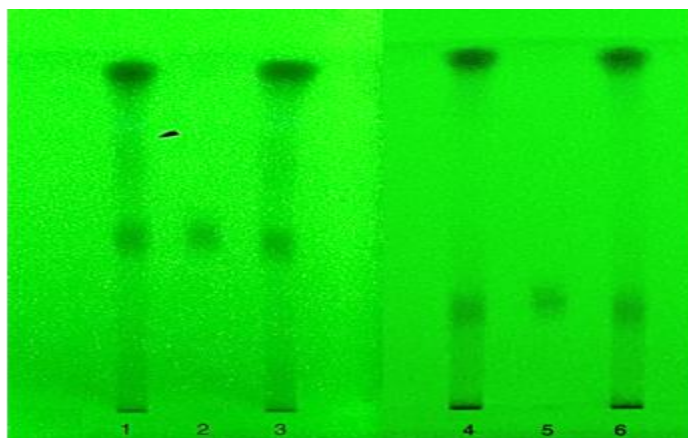


图 2-4. 薄层展开剂体系考察（T=20°C RH=58%）

乙酸乙酯-甲醇-甲酸（20:4.5:1）

1. 批次 L-3 5 μ l 2. 獐牙菜苦苷 5 μ l 3. 批次 L-3 5 μ l

丙酮-石油醚-甲酸（25:12.5:1）

4. 批次 L-3 5 μ l 5. 獐牙菜苦苷 5 μ l 6. 批次 L-3 5 μ l

高效硅胶 GF₂₅₄ 板（薄层色谱用）：青岛海洋化工有限公司

2.4.4 薄层色谱鉴别耐用性实验

对选定的展开条件进行常温下 18%和 88%相对湿度、常湿下 5°C（冰箱）和 36°C 温度，以及不同生产厂家薄层色谱板的考察，结果如下：

2.4.4.1 常温下不同湿度的比较：

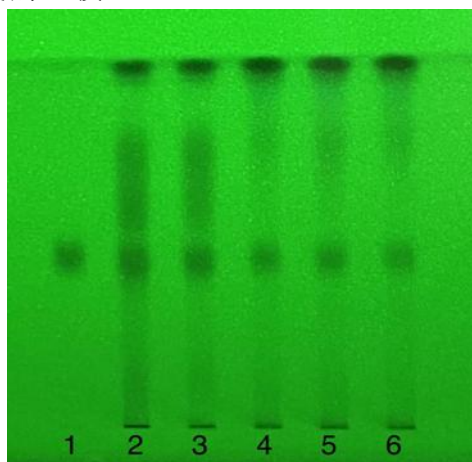


图 2-5. 高湿常温（T=20°C，RH=88%）（点样量 5 μ l）

1. 对照品 2. 批次 R-2 3. 批次 R-1 4. 批次 L-3 5. 批次 L-2 6. 批次 L-1

高效硅胶 GF₂₅₄板（薄层色谱用）：青岛海洋化工有限公司

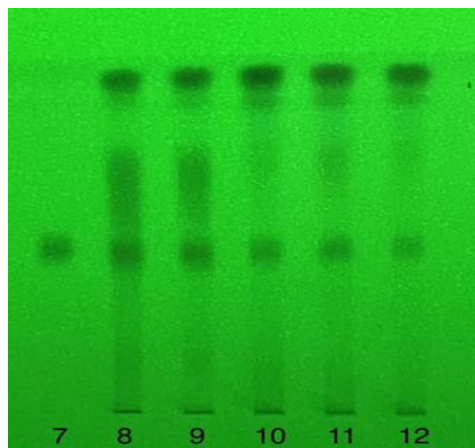


图 2-6. 低湿常温 (T=20℃, RH=18%) (点样量 5μl)

7. 对照品 8.批次 R-2 9.批次 R-1 10.批次 L-3 11. 批次 L-2 12. 批次 L-1

高效硅胶 GF₂₅₄板（薄层色谱用）：青岛海洋化工有限公司

结果表明：该方法的薄层色谱分离效果受湿度环境的影响较小。

2. 4. 4. 1 常湿下不同温度的比较：

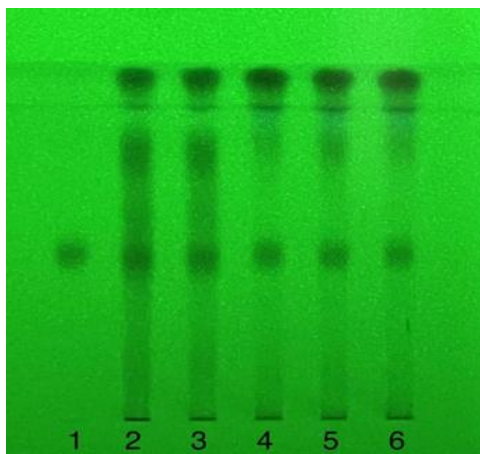


图 2-7. 低温常湿 (T=4℃, RH=58%) (点样量 5μl)

1. 对照品 2.批次 R-2 3.批次 R-1 4.批次 L-3 5. 批次 L-2 6. 批次 L-1

高效硅胶 GF₂₅₄板（薄层色谱用）：青岛海洋化工有限公司

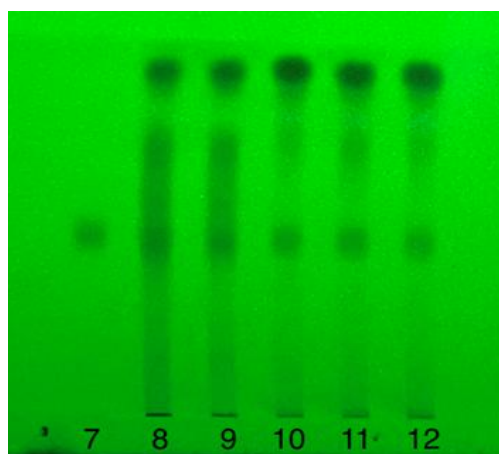


图 2-8. 高温常湿 ($T=36^{\circ}\text{C}$, $\text{RH}=58\%$) (点样量 $5\mu\text{l}$)

7. 对照品 8. 批次 R-2 9. 批次 R-1 10. 批次 L-3 11. 批次 L-2 12. 批次 L-1

高效硅胶 GF₂₅₄ 板 (薄层色谱用): 青岛海洋化工有限公司

结果表明: 该方法的薄层色谱分离效果受温度环境的影响较小。

2. 4. 4. 3 不同生产厂家薄层色谱板:

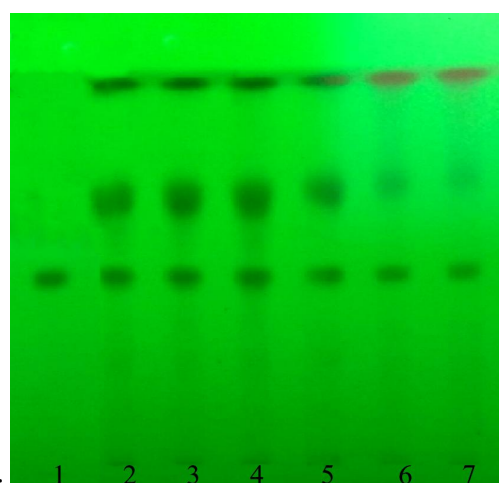


图 2-9. (点样量 $5\mu\text{l}$)

1. 对照品 2. 批次 R-3 3. 批次 R-2 4. 批次 R-1 5. 批次 L-3 6. 批次 L-2 7. 批次 L-1

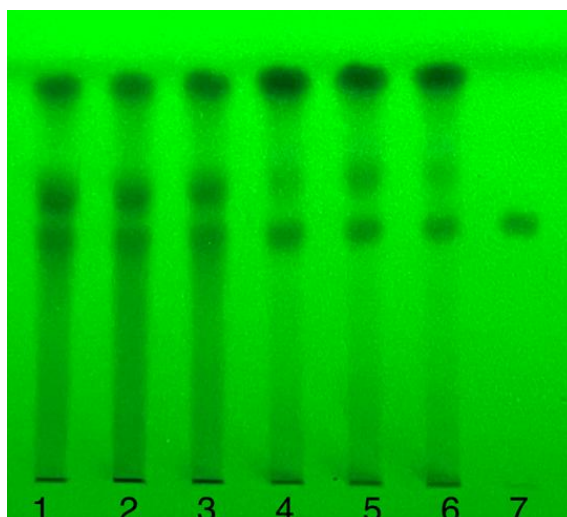


图 2-10. 青岛海洋硅胶 GF₂₅₄ 板 (T=20℃, RH=58%)

(点样量 5μl)

1.批次 R-3 2.批次 R-2 3.批次 R-1 4.批次 L-3 5.批次 L-2 6.批次 L-1 7.对照品

结果表明：不同品牌的薄层色谱板对药材分离效果影响不大

最终确定的薄层鉴别条件谱图：

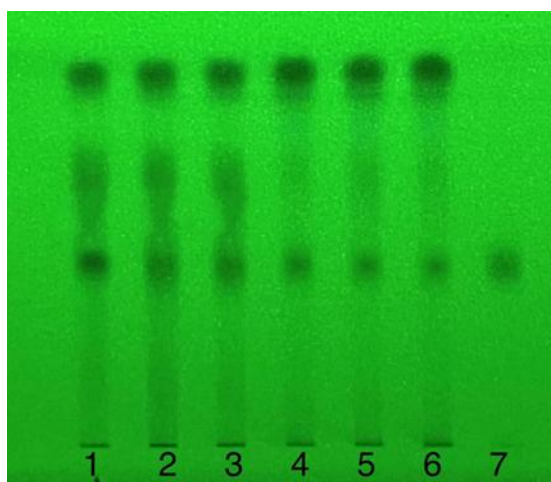


图 2-11. 青岛海洋 (GF₂₅₄ 板) (T=20℃, RH=58%)

(点样量 5μl)

1.批次 L-1 2.批次 L-2 3.批次 L-3 4.批次 R-1 5.批次 R-2 6.批次 R-3 7.对照品

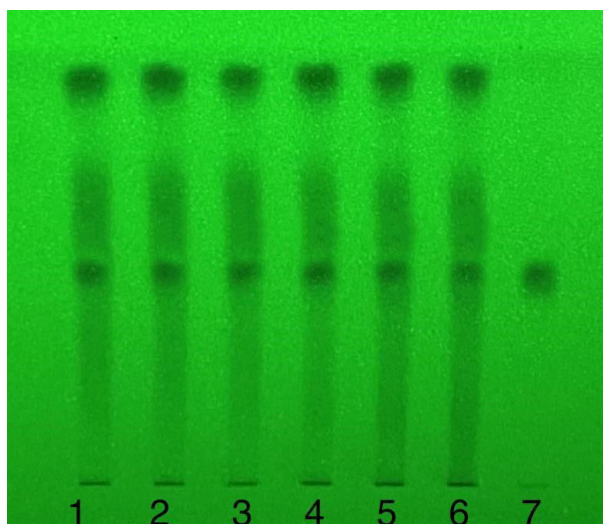


图 2-12. 青岛海洋 (GF₂₅₄ 板) (T=20°C, RH=58%)

(点样量 5μl)

1.批次 R-4 2.批次 R-5 3.批次 R-6 4.批次 R-7 5.批次 R-8 6.批次 R-9 7.对照品

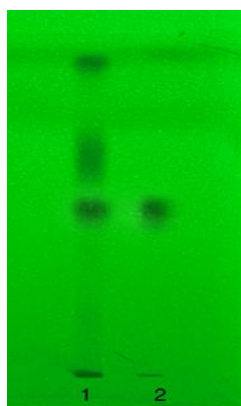


图 2-13. 青岛海洋 (GF₂₅₄ 板) (T=20°C, RH=58%)

(点样量 5μl)

1.批次 R-10 2.对照品

2.4.5 药材薄层色谱鉴别结果讨论:

通过比较一系列不同的薄层色谱方法, 最终确定轮叶獐牙菜药材的薄层色谱鉴别方法为-

取本品粉末 0.5g, 加 20ml 甲醇, 超声处理 30min, 放冷, 过滤, 滤液作为供试品溶液。另取獐牙菜苦苷对照品, 加甲醇制成每 1ml 含 1mg 的溶液, 作为对照品溶液。照薄层色谱法 (《中国药典》2020 年版通则 0502) 试验, 吸取供试品溶液对照品溶液各 5μl, 分别点于同一硅胶 GF₂₅₄ 薄层板上, 以乙酸乙酯-甲醇-甲酸 (20:4.5:1) 为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 置紫外光灯 (254 nm) 下检视。供试品色谱中, 在对照品色

谱相应的位置上，显相同颜色的荧光斑点。

该方法在不同的温、湿度条件下展开，结果分离效果受影响较小，用不同品牌的薄层色谱板按此方法进行展开，得到的薄层色谱图区别不大。故该方法分离效果、稳定性和安全性均较为理想。

2.5 轮叶獐牙菜药材检查项研究

2.5.1 水分测定

按《中国药典》2020年版通则 0832 第二法测定，取供试品粉末 2~5g（过 2 号筛），置干燥至恒重的称量瓶中，粉末厚度不超过 5 mm，精密称定，开启瓶盖在 100~105℃干燥 5 小时，将瓶盖盖好，移至干燥器中，放冷 30 分钟，精密称定重量，再在上述温度干燥 1 小时，放冷，称重，至连续两次称重的差异不超过 5 mg 为止。根据减失的重量，计算供试品含水量(%)。数据见下表 2-2。

测得 13 批样品水分平均值为 9.9%，以平均值上浮 20%为上限，暂定本品水分不得过 12.0%。

表 2-2 轮叶獐牙菜药材水分测定结果

序号	取样量 (g)	水分 (%)	平均 (%)
L-1-1	2.0004	8.89	8.78
L-1-2	2.0014	8.67	
L-2-1	2.0021	8.43	8.52
L-2-2	2.0024	8.60	
L-3-1	2.0007	8.30	8.27
L-3-2	2.0016	8.24	
R-1-1	2.0049	11.20	11.29
R-1-2	2.0051	11.38	
R-2-1	2.0047	9.23	9.24
R-2-2	2.0048	9.24	
R-3-1	2.0042	10.05	10.00
R-3-2	2.0047	9.95	
R-4-1	2.0036	9.49	9.43
R-4-2	2.0037	9.38	
R-5-1	2.0024	10.46	10.57
R-5-2	2.0027	10.68	
R-6-1	2.0056	11.83	11.72
R-6-2	2.0061	11.61	

R-7-1	2.0066	10.13	10.11
R-7-2	2.0065	10.09	
R-8-1	2.0047	10.27	10.37
R-8-2	2.0052	10.48	
R-9-1	2.0038	10.72	10.70
R-9-2	2.0034	10.68	
R-10-1	2.0067	9.77	9.70
R-10-2	2.0070	9.63	

2.5.2 总灰分及酸不溶性灰分测定

总灰分按《中国药典》2020年版通则 2302 测定。本品粉碎，使能通过二号筛，混合均匀后，取供试品粉末 3.5g，置炽灼至恒重的坩埚中，称定重量，缓缓炽热，注意避免燃烧，至完全炭化时，逐渐升高温度至 550℃，使完全灰化并至恒重。根据残渣重量计算总灰分的百分含量。测得 13 批样品总灰分平均值为 3.58%，以平均值上浮 20%为上限，暂定本品总灰分不得过 5.0%。

酸不溶性灰分按《中国药典》2020年版通则 2302 测定，取总灰分项下所得的灰分，在坩埚中小心加入稀盐酸约 10ml，用表面皿覆盖坩埚，置水浴上加热 10min，表面皿用热水 5ml 冲洗，洗液并入坩埚中，用无灰滤纸滤过，坩埚内的残渣用水洗于滤纸上并洗涤至洗液不显氯化物反应为止，滤渣连同滤纸移至同一坩埚中，干燥，炽灼至恒重。根据残渣重量，计算供试品中酸不溶灰分百分含量(%)。

结果见表 2-3。测得 13 批样品酸不溶性灰分平均值为 0.38%，结果偏低，建议暂不收入标准正文。

表 2-3 轮叶獐牙菜药材总灰分及酸不溶性灰分测定结果

序号	取样 (g)	总灰分 (%)	平均 (%)	酸不溶性灰分 (%)	平均 (%)
L-1-1	3.5010	4.38	4.40	1.25	1.22
L-1-2	3.5016	4.42		1.19	
L-2-1	3.5028	3.89	3.86	0.64	0.63
L-2-2	3.5024	3.83		0.62	
L-3-1	3.5026	3.79	3.77	0.46	0.46
L-3-2	3.5021	3.75		0.47	
R-1-1	3.5019	3.39	3.38	0.20	0.21
R-1-2	3.5022	3.37		0.21	
R-2-1	3.5015	3.51	3.50	0.18	0.18
R-2-2	3.5023	3.49		0.17	

R-3-1	3.5032	3.43		0.19	
R-3-2	3.5031	3.39	3.41	0.18	0.19
R-4-1	3.5030	3.58		0.29	
R-4-2	3.5028	3.66	3.62	0.30	0.30
R-5-1	3.5028	3.58		0.24	
R-5-2	3.5026	3.51	3.55	0.23	0.24
R-6-1	3.5002	3.47		0.26	
R-6-2	3.5009	3.47	3.47	0.26	0.26
R-7-1	3.5011	3.43		0.26	
R-7-2	3.5017	3.35	3.39	0.25	0.26
R-8-1	3.5012	3.35		0.29	
R-8-2	3.5013	3.32	3.33	0.30	0.30
R-9-1	3.5019	3.39		0.28	
R-9-2	3.5019	3.31	3.35	0.27	0.28
R-10-1	3.5009	3.53		0.36	
R-10-2	3.5002	3.50	3.52	0.37	0.37

2.5.3 浸出物测定

浸出物测定实验分别比较了水、稀乙醇、乙醇的冷、热浸法提取的结果，热浸法以乙醇为溶剂时提取的浸出物最多。按《中国药典》2020年版通则 2201 热浸法测定，以乙醇为溶剂，取供试品粉碎，过二号筛。取供试品约 2 g，精密称定，置 250 mL 的锥形瓶中，精密加乙醇 100 mL，密塞，称定重量，静置 1 小时后，连接回流冷凝管，加热至沸腾，并保持微沸 1 小时。放冷后，取下锥形瓶，密塞，再称定重量，用乙醇补足减失的重量，摇匀，用干燥滤器滤过，精密量取滤液 25 mL，置已干燥至恒重的蒸发皿中，在水浴上蒸干后，于 105℃干燥 3 小时，置干燥器中冷却 30 分钟，迅速精密称定重量，计算供试品中醇溶性浸出物的含量(%)。测得 13 批样品中醇溶性浸出物的平均值为 53.24%，以本品干燥品平均值的 80%为下限，暂定本品醇溶性浸出物不得少于 42.0%。

表 2-4 轮叶獐牙菜药材不同溶剂冷、热浸法浸出物测定结果比较表

序号	浸提方法	溶剂	取样量 (g)	浸出物含量 (%)	平均 (%)
1-1	热浸法	水	2.0025	21.36	21.08
1-2			2.0026	20.79	
2-1		稀乙醇	2.0004	37.76	37.14
2-2			2.0001	36.52	
3-1		乙醇	2.0012	41.27	41.69
3-2			2.0013	42.12	

4-1	水	4.0012	15.91	15.71
4-2		4.0018	15.50	
5-1	冷浸法	稀乙醇	4.0025	22.04
5-2		4.0022	22.42	
6-1	乙醇	4.0013	25.17	25.52
6-2		4.0008	25.86	

表 2-5 轮叶獐牙菜药材浸出物测定结果

序号	取样量 (g)	浸出物含量 (%)	平均 (%)
L-1-1	2.0015	39.63	39.44
L-1-2	2.0017	39.26	
L-2-1	2.0010	42.32	42.56
L-2-2	2.0007	42.79	
L-3-1	2.0012	41.27	41.69
L-3-2	2.0013	42.12	
R-1-1	2.0004	53.85	53.53
R-1-2	2.0010	53.20	
R-2-1	2.0021	57.69	57.28
R-2-2	2.0025	56.87	
R-3-1	2.0000	58.44	58.14
R-3-2	2.0003	57.83	
R-4-1	2.0030	57.55	57.27
R-4-2	2.0031	57.00	
R-5-1	2.0030	55.80	56.04
R-5-2	2.0024	56.29	
R-6-1	2.0021	53.70	53.58
R-6-2	2.0020	53.46	
R-7-1	2.0025	59.66	59.29
R-7-2	2.0030	58.92	
R-8-1	2.0011	56.89	56.41
R-8-2	2.0019	55.94	
R-9-1	2.0010	58.87	58.66
R-9-2	2.0011	58.45	
R-10-1	2.0015	58.27	58.18
R-10-2	2.0018	58.09	

2.6 轮叶獐牙菜药材含量测定研究

2.6.1 含量测定指标成分的选择

藏药“巴莪色保”为龙胆科獐牙菜属植物轮叶獐牙菜（*Swertia verticillifolia*

T.N.HoetS.W.Liu), 分布于我国西藏海拔3800以上的高山灌丛中, “巴葛色保”为根入药, 味苦, 性凉, 可治疗“黄水”病, 常用在多种藏药临床制剂中, 如“仁青常觉”、“旺日喜噶曲典”以及二十五味马宝丸等。通过本实验室前期质谱鉴定及文献考证发现^[5], 獐牙菜苦苷是轮叶獐牙菜中主要成分之一, 可作为其含量测定的指标, 以保证轮叶獐牙菜药材的质量质量可控。

2.6.2. 色谱条件及方法的考察

2.6.2.1 检测波长的考察

取对照品溶液 10 μ l, 注入 SHIMADZU LC-2050C 30 高效液相色谱仪中, 用 PDA 检测器在 190~500nm 波长范围进行全波长扫描, 结果显示獐牙菜苦苷在 238nm 有最大吸收, 故确定检测波长为 238nm, 详见图 2-14。

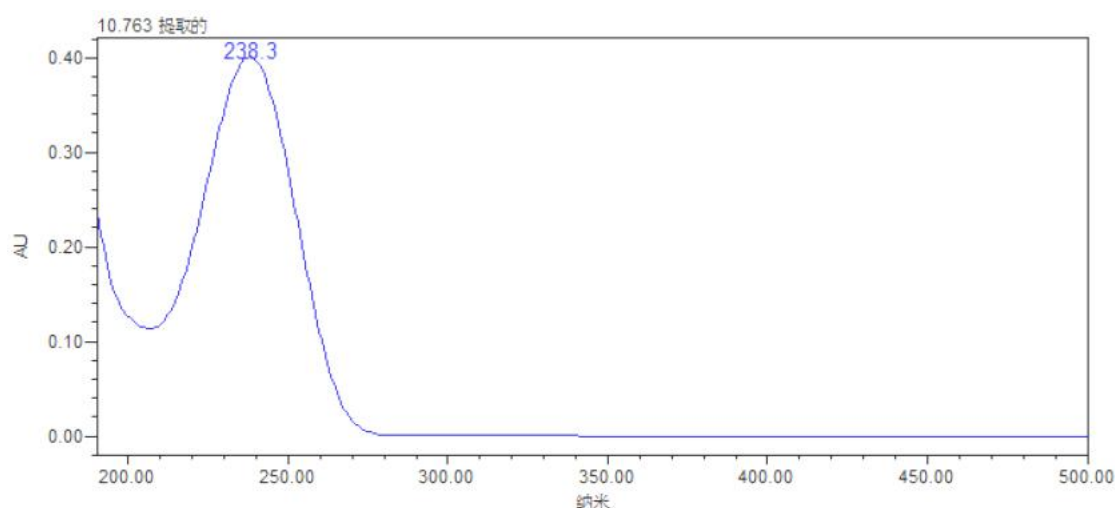


图 2-14.獐牙菜苦苷对照品紫外吸收波长图

2.6.2.2 流动相的考察

《中国药典》2020年版一部中未记载轮叶獐牙菜的含量测定方法, 参考相关文献^[6-9]獐牙菜苦苷的含量测定方法, 选择甲醇-磷酸溶液或乙腈-磷酸溶液作为流动相体系, 对流动相洗脱梯度、有机相的种类及磷酸用量进行考察。实验结果表明, 以乙腈-磷酸溶液作为流动相所得峰形比甲醇-磷酸溶液作为流动相所得峰形更好; 磷酸含量分别为 0.1%、0.3%时, 化合物的保留时间和分离度没有明显差异, 但 0.1%磷酸比 0.3%磷酸更利于色谱柱保护, 因此确定流动相体系为乙腈-0.1%磷酸溶液, 并对流动相洗脱梯度进行了优化。有机相对比及洗脱梯度优化见表 2-6~2-11, 图谱见附图 1-6。

(1) Kromasil 100-5-C18(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m), 以 0.1%磷酸溶液(A)-甲醇(B)为流动相梯度洗脱。目标峰保留时间 6.366min, 拖尾因子 1.58。

表 2-6 流动相梯度 1

时间(min)	流速(ml/min)	流动相 A (%)	流动相 B (%)
0~12	1	70→50	30→50
12~12.5	1	50→5	50→95
12.5~16.5	1	5	95
16.5~17	1	5→70	95→30
17~21	1	70	30

(2) Kromasil 100-5-C18(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 以 0.1%磷酸溶液(A)-乙腈(B)为流动相梯度洗脱。与 (1) 相比, 将有机相换为乙腈, 并调整流动相梯度, 保证目标峰的出现。目标峰保留时间 7.592min, 拖尾因子 1.10。

表 2-7 流动相梯度 2

时间(min)	流速(ml/min)	流动相 A (%)	流动相 B (%)
0~12	1	90→70	10→30
12~12.5	1	50→5	50→95
12.5~16.5	1	5	95
16.5~17	1	5→90	95→10
17~21	1	90	10

(3) Kromasil 100-5-C18(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 以 0.1%磷酸溶液(A)-乙腈(B)为流动相梯度洗脱。与 (2) 相比, 在前 12 分钟降低了梯度陡度, 起始流动相比比例不变, 最终流动相比比例改为 0.1%磷酸溶液-乙腈 (80 : 20)。目标峰保留时间 9.175min, 拖尾因子 1.11。

表 2-8 流动相梯度 3

时间(min)	流速(ml/min)	流动相 A (%)	流动相 B (%)
0~12	1	90→80	10→20
12~12.5	1	80→5	20→95
12.5~16.5	1	5	95
16.5~17	1	5→90	95→10
17~21	1	90	10

(4) Kromasil 100-5-C18(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 以 0.1%磷酸水(A)-乙腈(B)为流动相梯度洗脱。与 (2) 相比, 前 12 分钟再次降低了梯度陡度, 起始流动相比比例不变, 最终将流动相比比例改为 0.1%磷酸溶液-乙腈 (84:16)。目标峰保留时间 10.345min, 拖尾因子 1.10。

表 2-9 流动相梯度 4

时间(min)	流速(ml/min)	流动相 A (%)	流动相 B (%)
0~12	1	90→84	10→16
12~12.5	1	84→5	16→95

12.5~16.5	1	5	95
16.5~17	1	5→90	95→10
17~21	1	90	10

在上述条件中，有机相为乙腈时，目标峰峰形更好，而（2）（3）（4）中（4）条件下分离度更好为 3.34，因此在（4）的流动相梯度上，水相中酸的比例进行考察。

（5）Kromasil 100-5-C18(250 mm × 4.6 mm, 5μm)，以水(A)-乙腈(B)为流动相梯度洗脱。

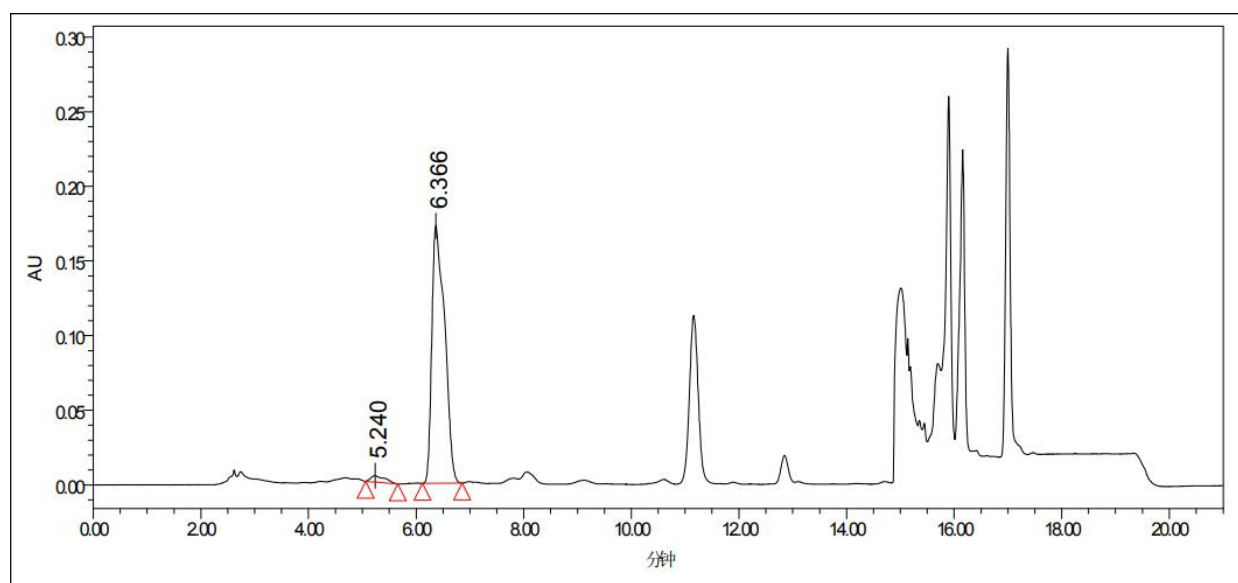
表 2-10 流动相梯度 5

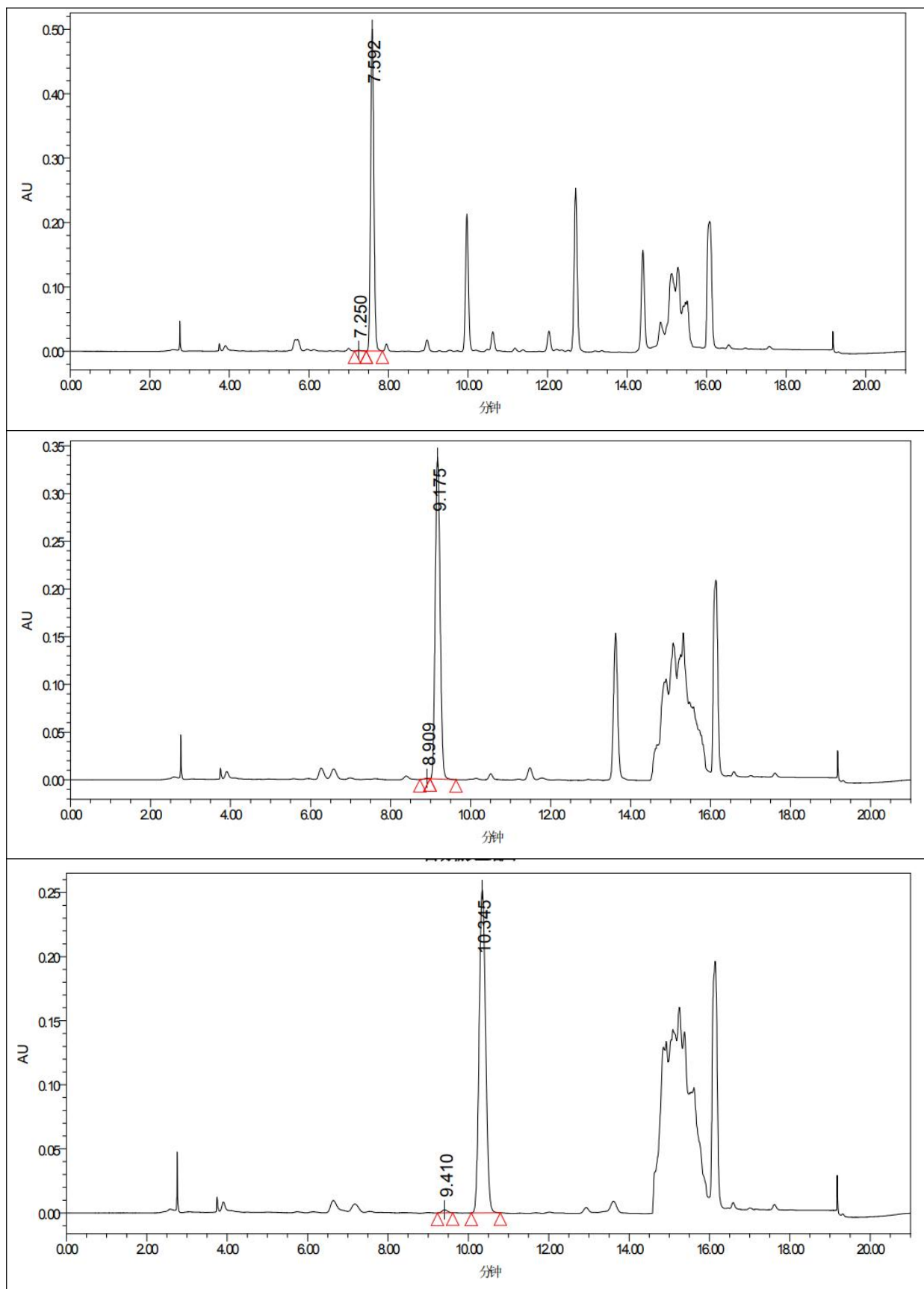
时间(min)	流速(ml/min)	流动相 A (%)	流动相 B (%)
0~12	1	90→84	10→16
12~12.5	1	84→5	16→95
12.5~16.5	1	5	95
16.5~17	1	5→90	95→10
17~21	1	90	10

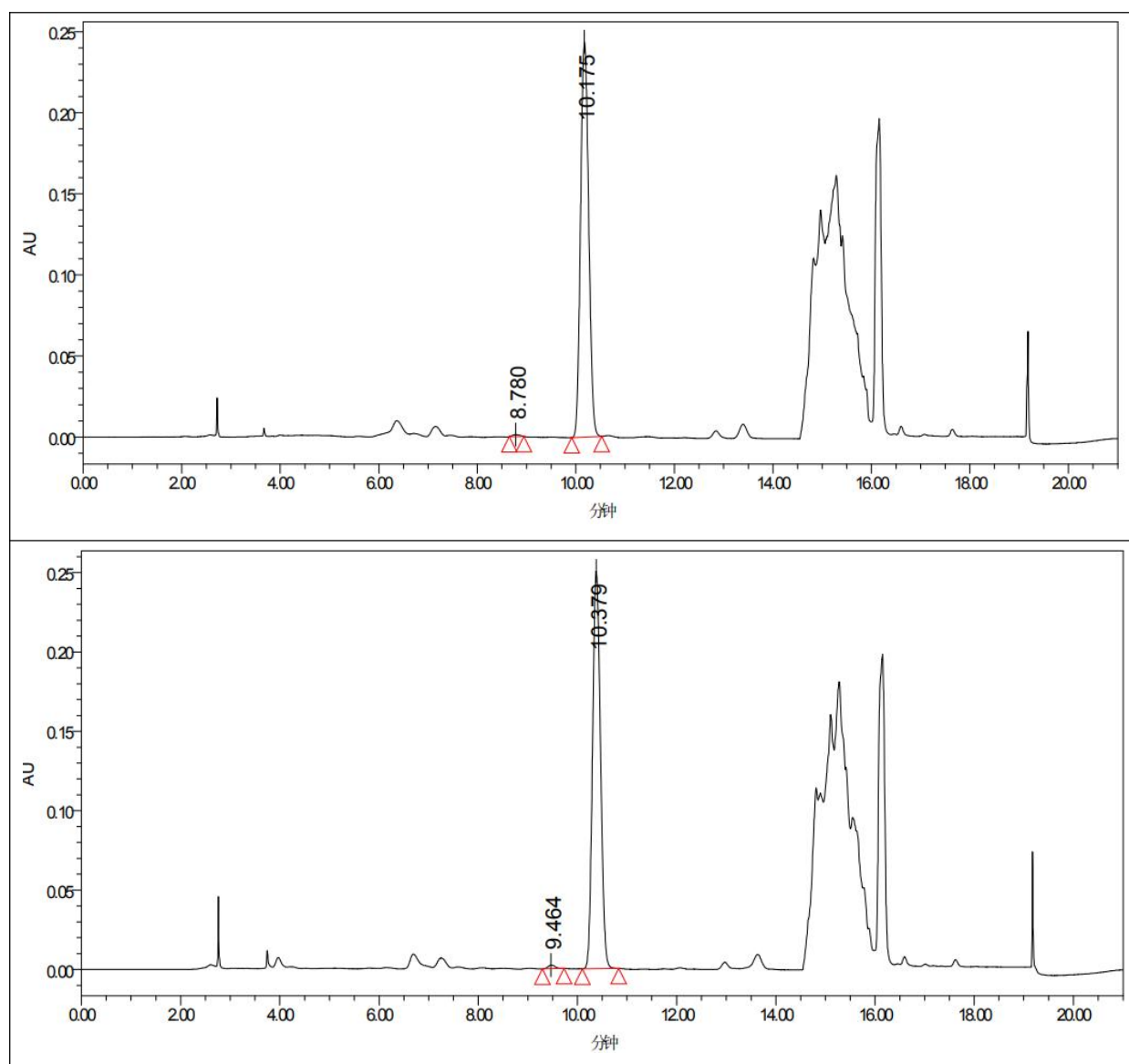
（6）Kromasil 100-5-C18(250 mm × 4.6 mm, 5μm)，以 0.3%磷酸溶液(A)-乙腈(B)为流动相梯度洗脱。

表 2-11 流动相梯度 6

时间(min)	流速(ml/min)	流动相 A (%)	流动相 B (%)
0~12	1	90→84	10→16
12~12.5	1	84→5	16→95
12.5~16.5	1	5	95
16.5~17	1	5→90	95→10
17~21	1	90	10







根据图谱，是否加酸，所得图谱效果差别不大，但考虑到水相少量加酸，重复性更好。因此獐牙菜苦苷含量测定液相条件确定为：用十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂；以 0.1%磷酸水为流动相 A，以乙腈为流动相 B，流速为每分钟 1ml，按下表 2-12 进行梯度洗脱；柱温 30℃，进样量 10ul，检测波长 238 nm；理论板数均不低于 8000。

表 2-12 流动相洗脱梯度

时间(min)	流速(ml/min)	流动相 A (%)	流动相 B (%)
0~12	1	90→84	10→16
12~12.5	1	84→5	16→95
12.5~16.5	1	5	95
16.5~17	1	5→90	95→10
17~21	1	90	10

2.6.2.3 样品制备方法考察

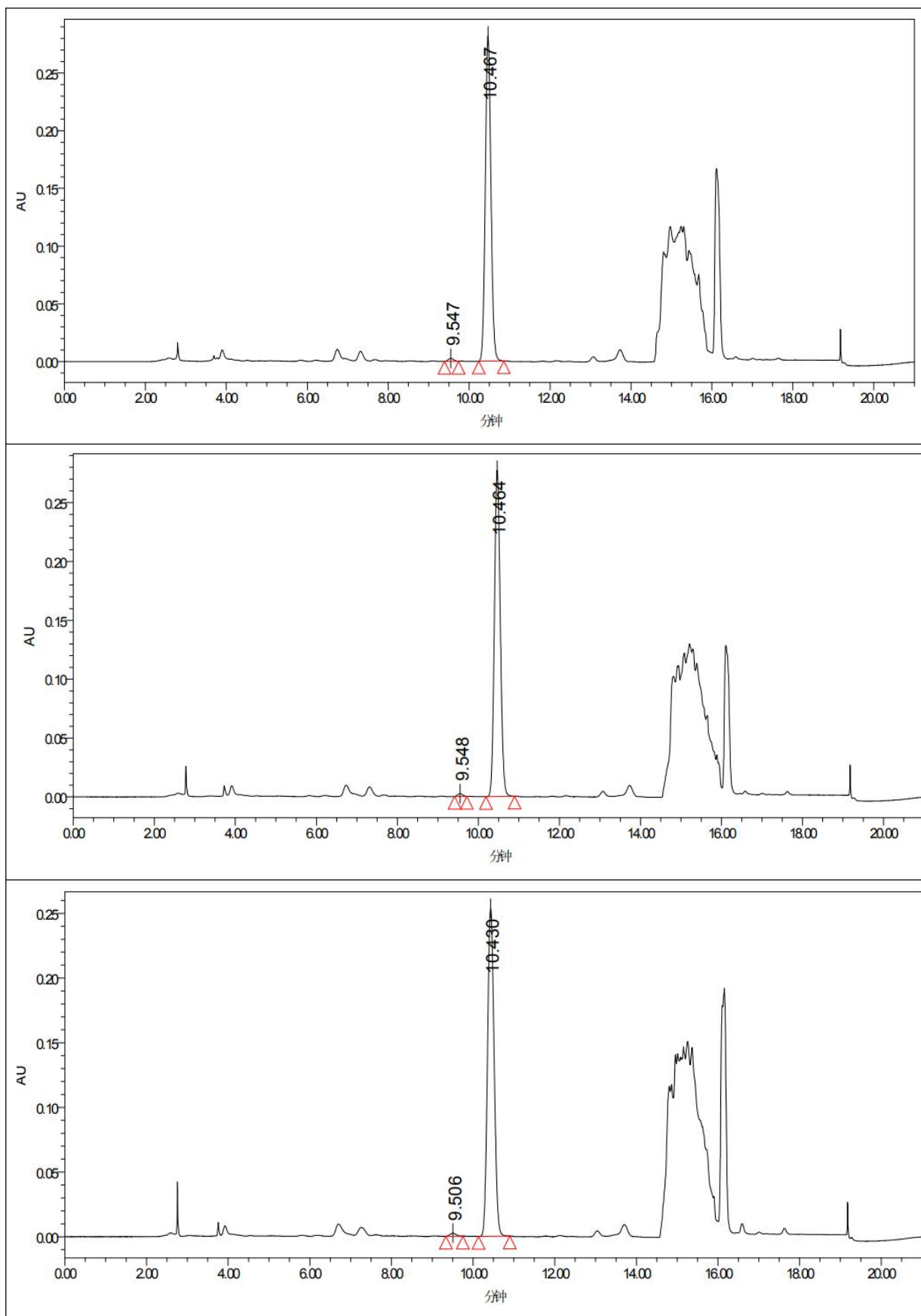
在样品制备方法考察中，考察了提取溶剂种类、提取方法及提取时间、提取溶剂用量，最终样品制备方法为：取本品粉末（过二号筛）0.02g，精密称定，置锥形瓶中，精密加入甲醇 10ml，密塞，称定重量，超声处理（功率 180w，频率 53KHz）30 分钟，放冷，再称定重量，用甲醇补足减失的重量，滤过，取续滤液，即得。

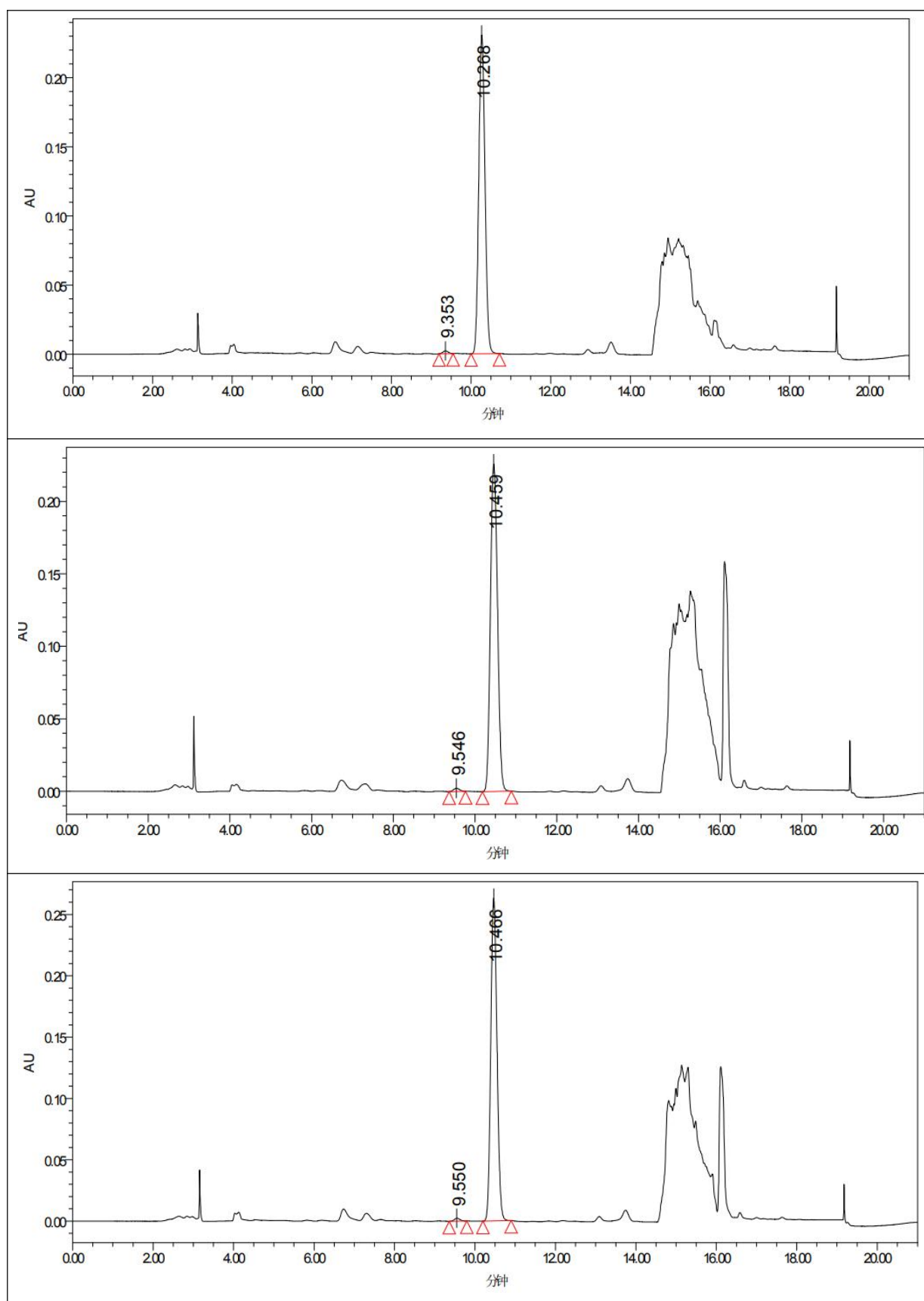
（1）提取溶剂种类考察

取本品（R-1 批）粉末约 0.02g，精密称定 6 份，每份分别精密加入 20ml 不同浓度的甲醇、乙醇，密塞，称定重量，超声处理（功率 180W，频率 53kHz）30 分钟，放冷，再称定重量，加相应溶剂补足减失的重量，摇匀，滤过，作为供试品溶液。分别精密吸取上述 6 种供试品液各 10 μ l，注入液相色谱仪，测定。计算獐牙菜苦苷的含量，结果表明以甲醇为溶剂提取的獐牙菜苦苷含量较高，因此选择用甲醇作为提取溶剂。结果见表 2-13，图谱见附图 7-12。

表 2-13 提取溶剂种类的选择

编号	提取溶剂	取样量（g）	峰面积（A）	峰面积/取样量	獐牙菜苦苷 （g/g）
1	50%甲醇	0.02014	2732122	135656504	0.10239
2	70%甲醇	0.02008	2812486	140064044	0.10570
3	100%甲醇	0.02020	2853076	141241386	0.10658
4	50%乙醇	0.02028	2471256	121856805	0.09202
5	70%乙醇	0.02012	2729772	135674553	0.10241
6	100%乙醇	0.02007	2832938	141152865	0.10652



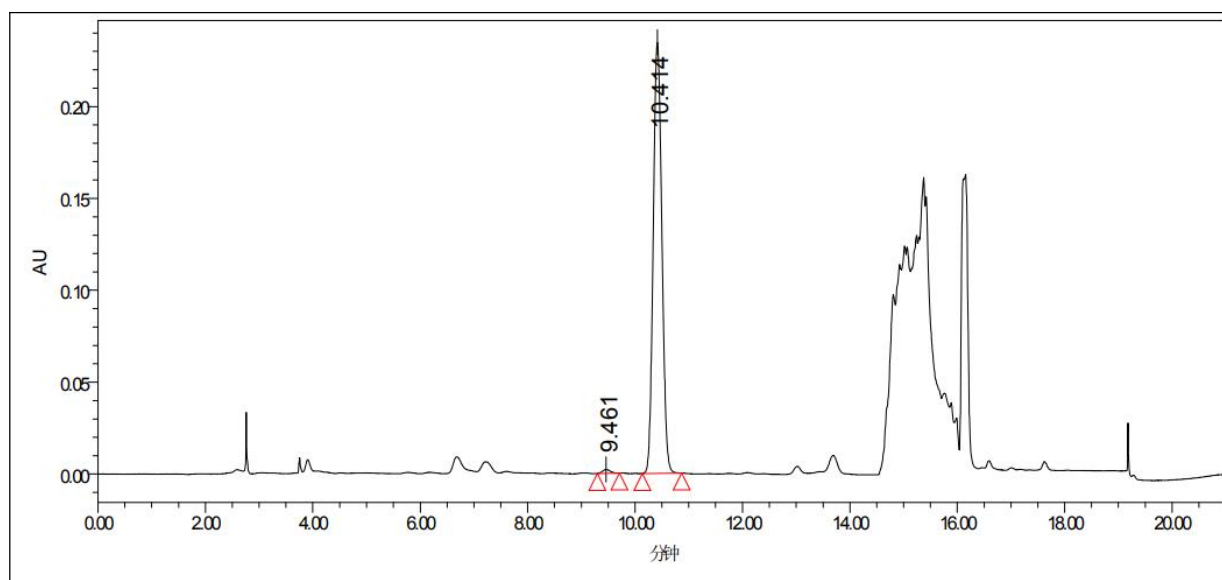


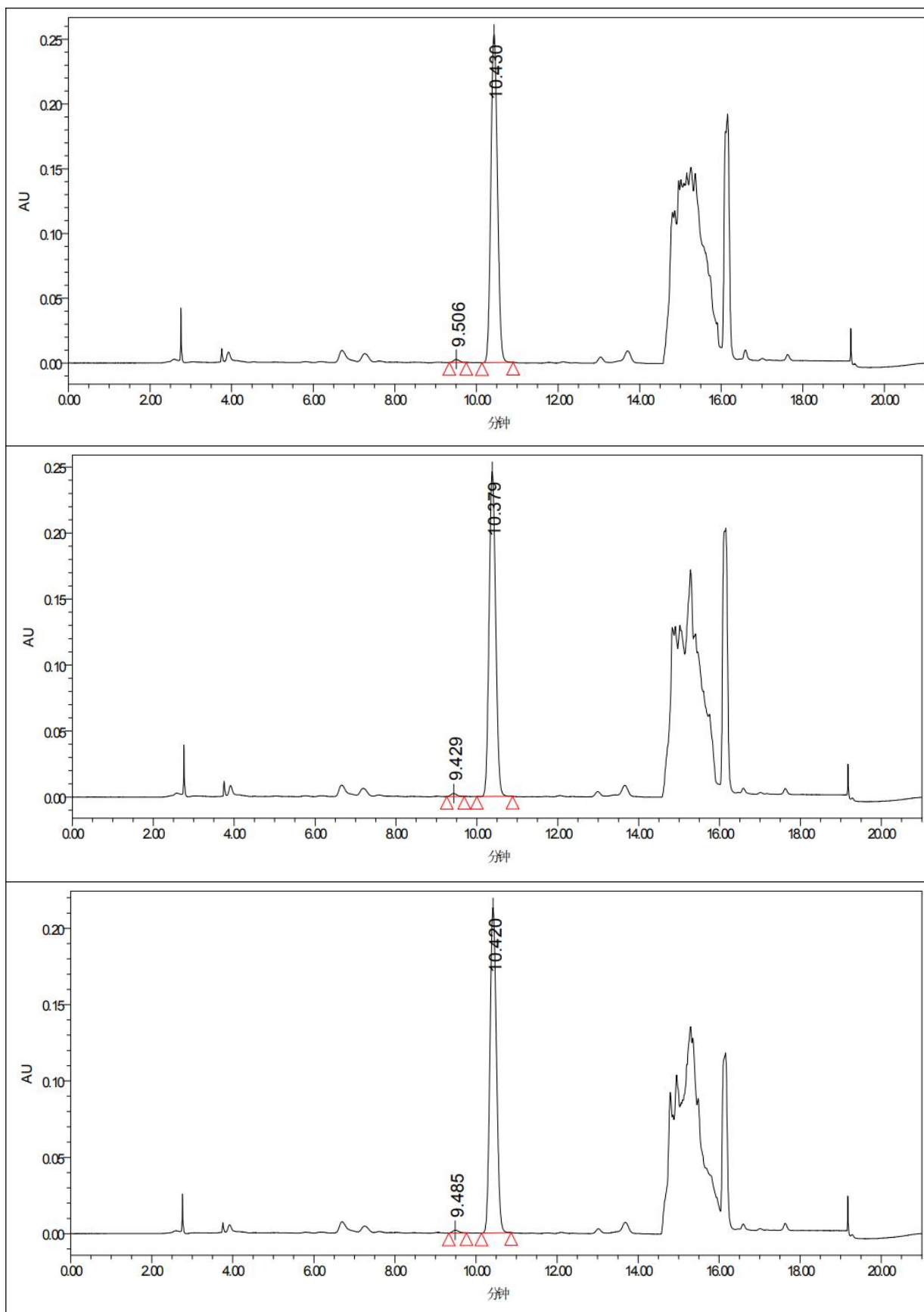
(2) 提取方法及提取时间考察

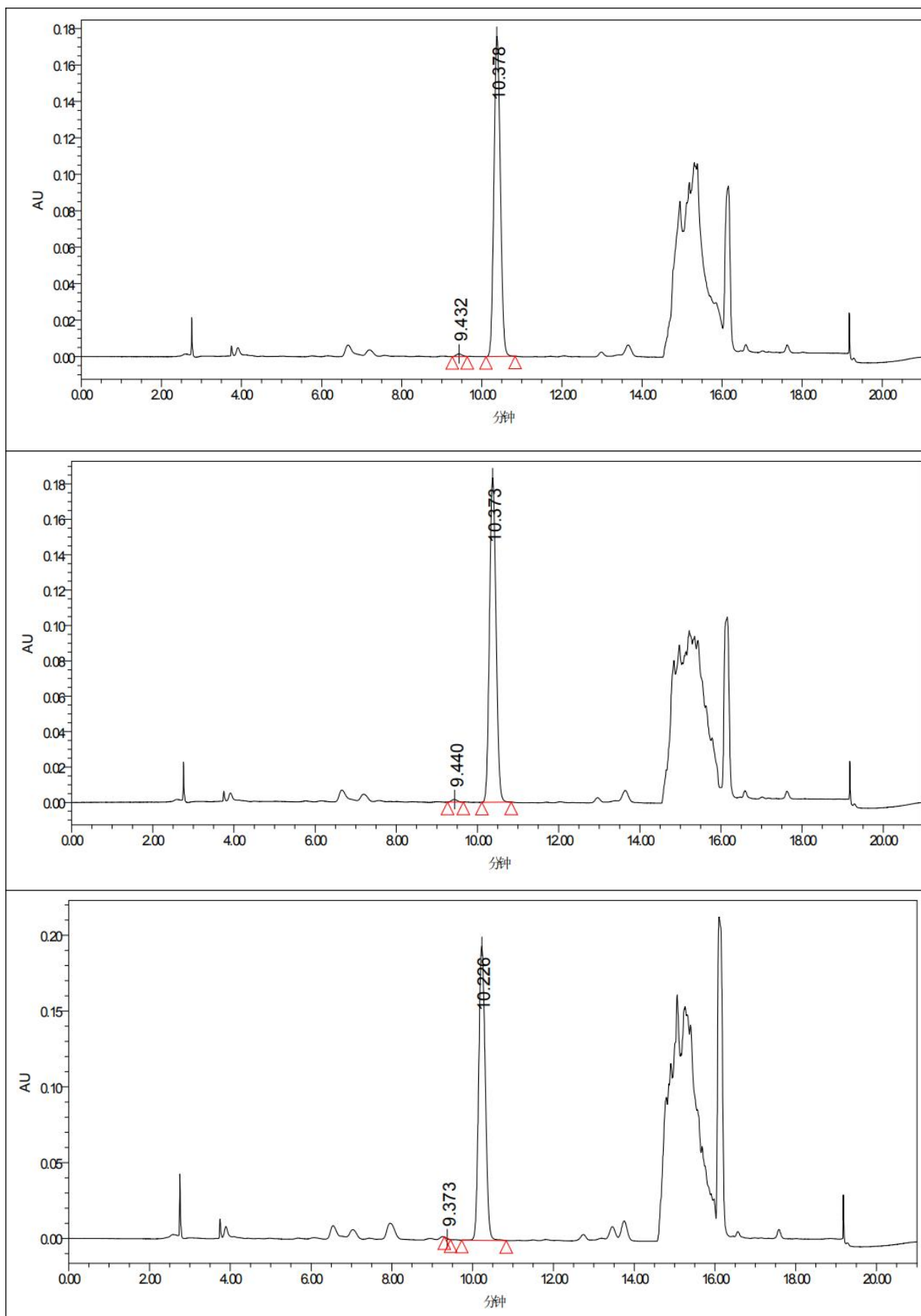
取本品（R-1 批）粉末约 0.02g，精密称定 8 份，每份分别精密加入 20ml 甲醇，密塞，称定重量，按下表中提取方式进行提取，放冷，再称定重量，用甲醇补足减失的重量，摇匀，滤过，作为供试品溶液。分别精密吸取上述 8 种供试液各 10 μ l，注入液相色谱仪，测定。计算獐牙菜苦苷的含量，由下表可以看出，选择用超声 30 分钟提取獐牙菜苦苷含量较高。结果见表 2-14，图谱见附图 13-20。

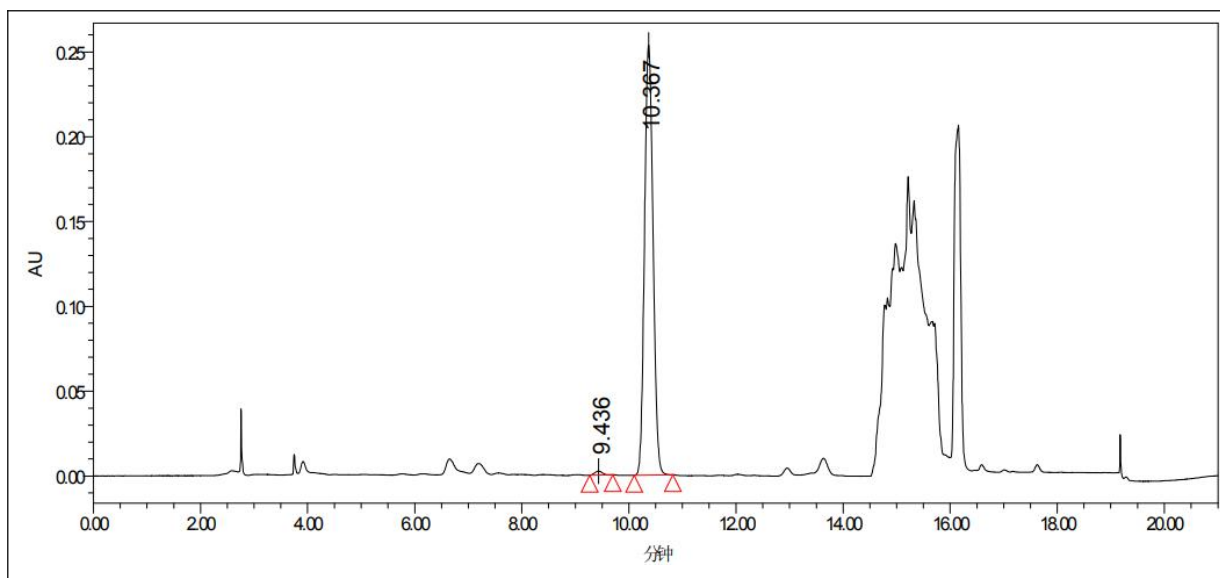
表 2-14 提取方法的选择结果

编号	提取方法	取样量（g）	提取时间（h）	峰面积（A）	峰面积/取样量	獐牙菜苦苷 （g/g）
1	超声	0.02008	0.25	2633737	131162201	0.09902
2	超声	0.02020	0.5	2853076	141241386	0.10658
3	超声	0.02006	0.75	2771685	138169741	0.10428
4	冷浸	0.02012	1	2389029	118739016	0.08969
5	冷浸	0.02020	2	1955958	96829604	0.07324
6	冷浸	0.02021	3	2049658	101418011	0.07669
7	回流	0.02009	0.5	2181808	108601692	0.08208
8	回流	0.02018	0.75	2811470	139319623	0.10514







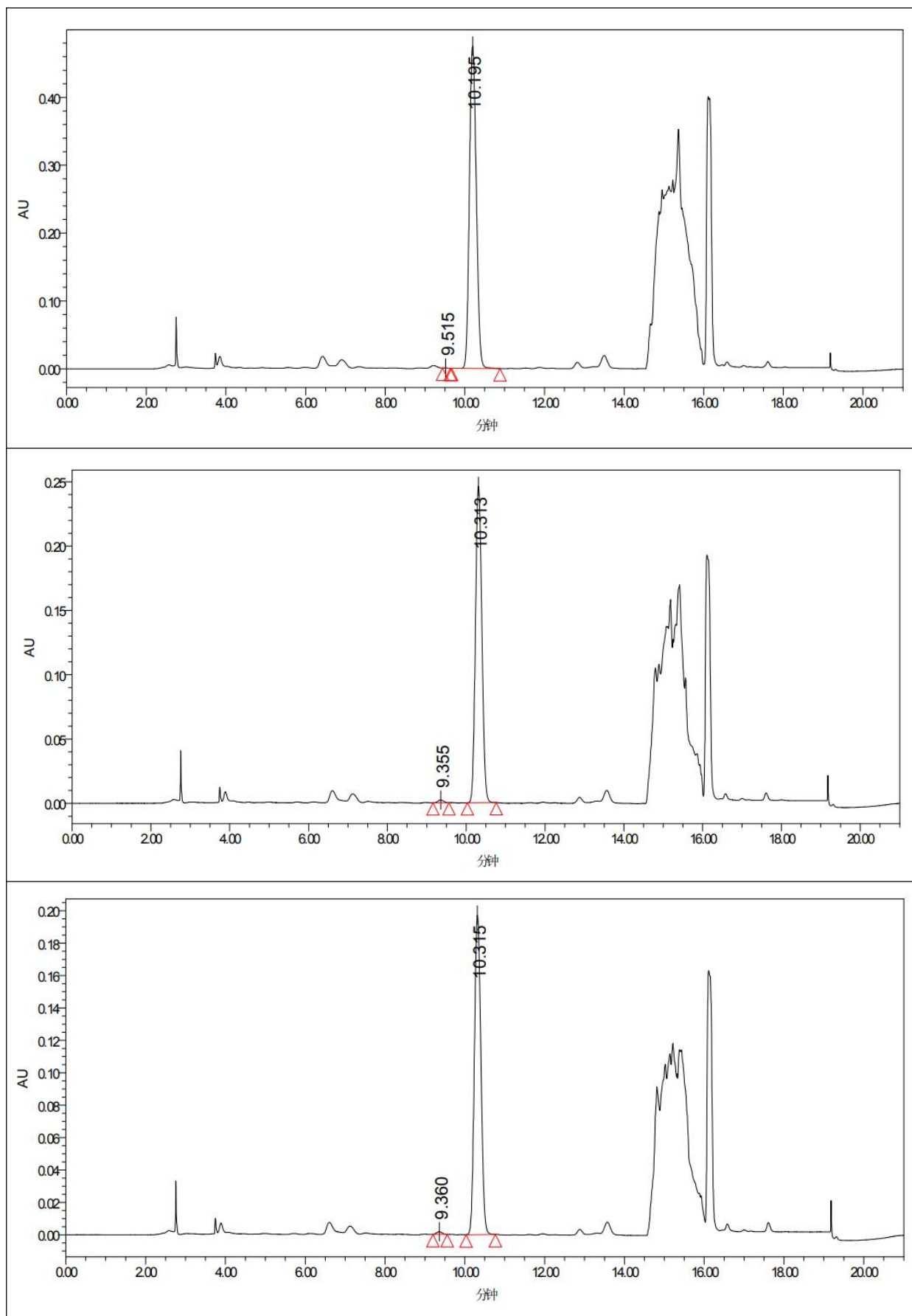


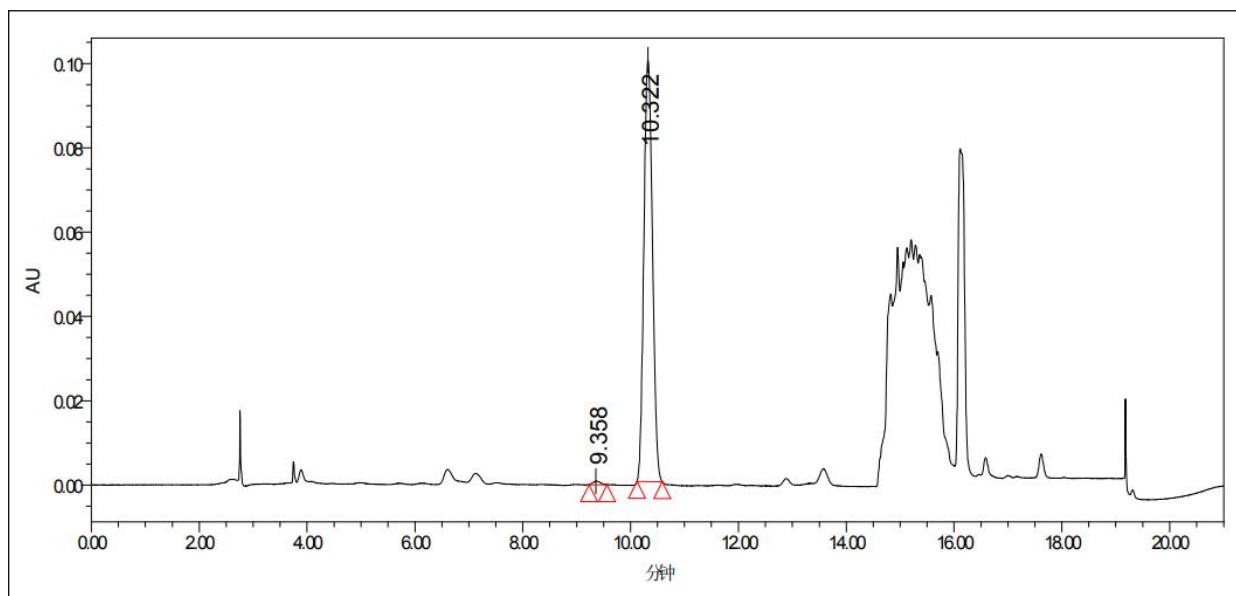
(3) 提取溶剂用量考察

取本品（R-1 批）粉末约 0.02g，精密称定 4 份，每份分别精密加入 10ml、20ml、25ml、40ml 甲醇，密塞，称定重量，超声处理（功率 180 W，频率 53 kHz）30 分钟，放冷，再称定重量，用甲醇补足减失的重量，摇匀，滤过，作为供试品溶液。分别精密吸取上述 4 种供试液各 10 μ l，注入液相色谱仪，测定。计算獐牙菜苦苷的含量，由下表可以看出，因此选择用 10 ml 作为提取溶剂用量提取的獐牙菜苦苷含量较高。结果见表 2-15，图谱见附图 21-24。

表 2-15 提取溶剂用量的选择结果

编号	溶剂体积 (ml)	取样量 (g)	峰面积 (A)	峰面积/取样量*溶剂 体积	獐牙菜苦苷 (g/g)
1	10ml	0.02020	5670926	2807389109	0.10565
2	20ml	0.02004	2763149	2757633733	0.10407
3	25ml	0.02013	2219535	2756501490	0.10416
4	50ml	0.02024	1102648	2723932806	0.10362





2.6.3 色谱条件与系统适用性试验

以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂，以 0.1%磷酸溶液(A)-乙腈(B)为流动相梯度洗脱；按下表进行 梯度洗脱，检测波长为 238 nm，进样量 10 μ l。理论塔板数按獐牙菜苦苷计算应不低于 8000。

表 2-16 梯度洗脱表

时间(min)	流动相 A (%)	流动相 B (%)
0~12	90→84	10→16
12~12.5	84→5	16→95
12.5~16.5	5	95
16.5~17	5→90	95→10
17~21	90	10

对照品溶液的制备 取獐牙菜苦苷对照品 20.44mg（含量 97.2%），精密称定，置 20 ml 容量瓶中，加甲醇溶解并定容至刻度，摇匀，即得对照品储备液（0.99338mg/ml）。精密量取上述獐牙菜苦苷对照品储备溶液 2ml，置 10ml 容量瓶中，用甲醇稀释至刻度，摇匀，即得对照品溶液（198.67680 μ g/ml）。

供试品溶液的制备 取本品粉末（过二号筛）0.02g，精密称定，置具塞锥形瓶中，精密加入甲醇 10ml，密塞，称定重量，超声处理（功率 180W，频率 53KHz）30 分钟，放冷，再称定重量，用甲醇补足减失的重量，取续滤液，即得。

测定法 分别精密吸取对照品溶液与供试品溶液各 10 μ L，注入液相色谱仪，测定，即得。本品按干燥品计算，含獐牙菜苦苷（C₁₆H₂₂O₁₀）不得少于 11.0 %。

2.6.4. HPLC 定量分析方法学考察

2.6.4.1 专属性

色谱柱：Kromasil 100-5-C18(250mm × 4.6mm，5μm)；柱温：30℃；流速：1.0ml·min⁻¹。按上述色谱条件，分别精密吸取对照品溶液、供试品溶液、空白溶液（甲醇）各 10μl，分别注入液相色谱仪。结果，待测成分色谱峰与相邻色谱峰的分度度>1.5，理论板数按獐牙菜苦苷峰计算不低于 8000，供试品溶液色谱中，在与对照品獐牙菜苦苷相应的位置上，有相同的色谱峰，空白溶液在此无干扰。见图 2-15~2-17，图谱见附图 25-27。

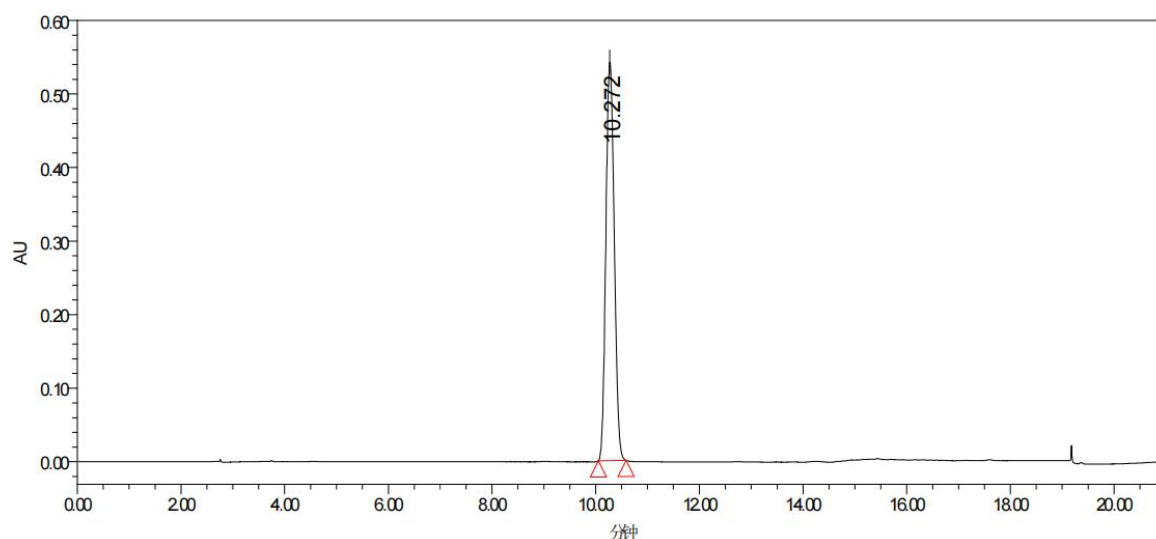


图 2-15 对照品溶液 HPLC 图

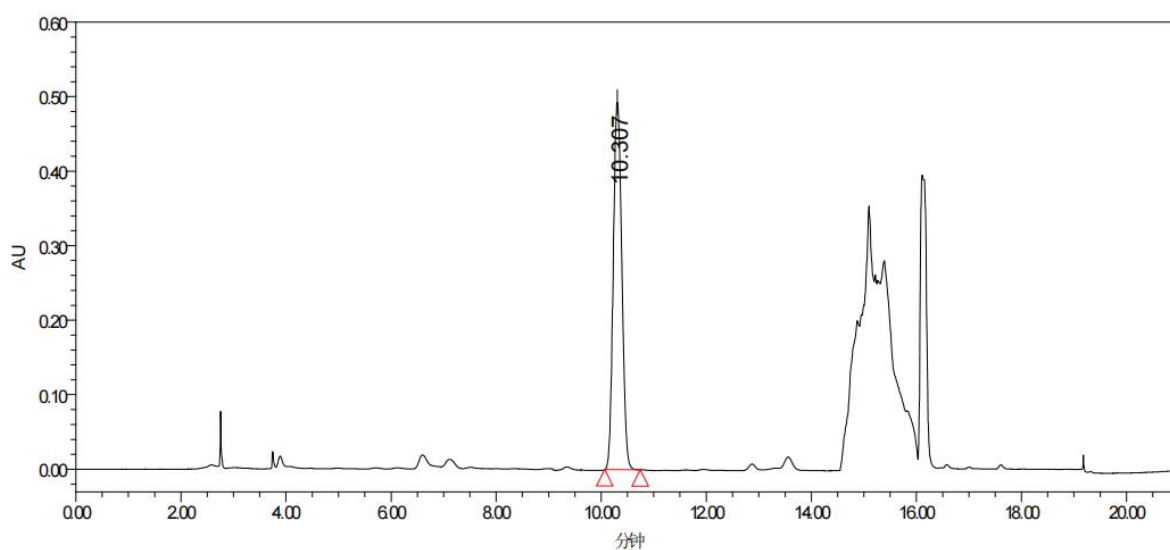


图 2-16 供试品溶液 HPLC 图

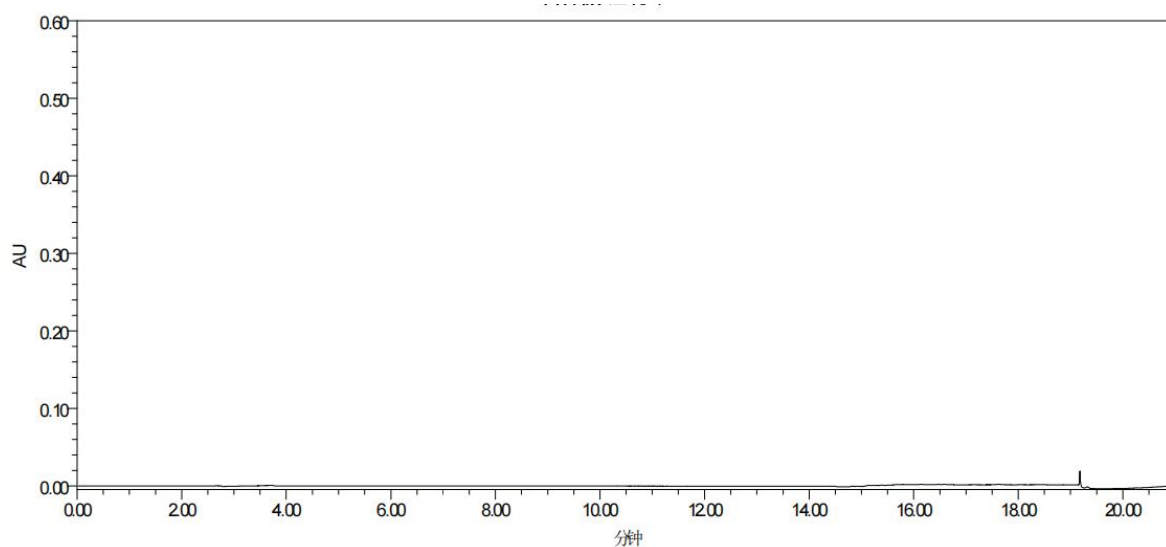


图 2-17 空白溶液 HPLC 图

2.6.4.2 标准曲线的制备对

精密吸取獐牙菜苦苷对照品储备液（含獐牙菜苦苷 0.99338mg/ml，）至量瓶中，分别用甲醇稀释制备系列浓度：0.24835 μ g/ml、0.49669 μ g/ml、0.99338 μ g/ml、9.9338 μ g/ml、24.83460 μ g/ml、49.66920 μ g/ml、149.00760 μ g/ml、198.67680 μ g/ml、298.01520 μ g/ml 的獐牙菜苦苷线性溶液。分别精密吸取线性溶液各 10 μ l，注入液相色谱仪，测定。以獐牙菜苦苷质量浓度(μ g·mL⁻¹)为 x 轴，以峰面积为 y 轴，进行线性回归，得回归方程 $Y = 30032X - 14869$ ，相关系数 $r^2 = 0.9993$ ，结果表明该成分在 0.24835~298.01520 μ g·mL⁻¹ 范围内线性关系良好，见表 2-17。图谱见附图 28-36。

表 2-17 獐牙菜苦苷对照品标准曲线

编号	对照品浓度 (μ g/ml)	进样体积 (μ l)	进样量 (μ g)	对照品峰面积
1	0.24835	10	0.00248	5636
2	0.49669	10	0.00497	10678
3	0.99338	10	0.00993	24313
4	9.93384	10	0.09934	266568
5	24.83460	10	0.24835	708052
6	49.66920	10	0.49669	1353289
7	149.00760	10	1.49008	4632707
8	198.67680	10	1.98677	6014961
9	298.01520	10	2.98015	8829851

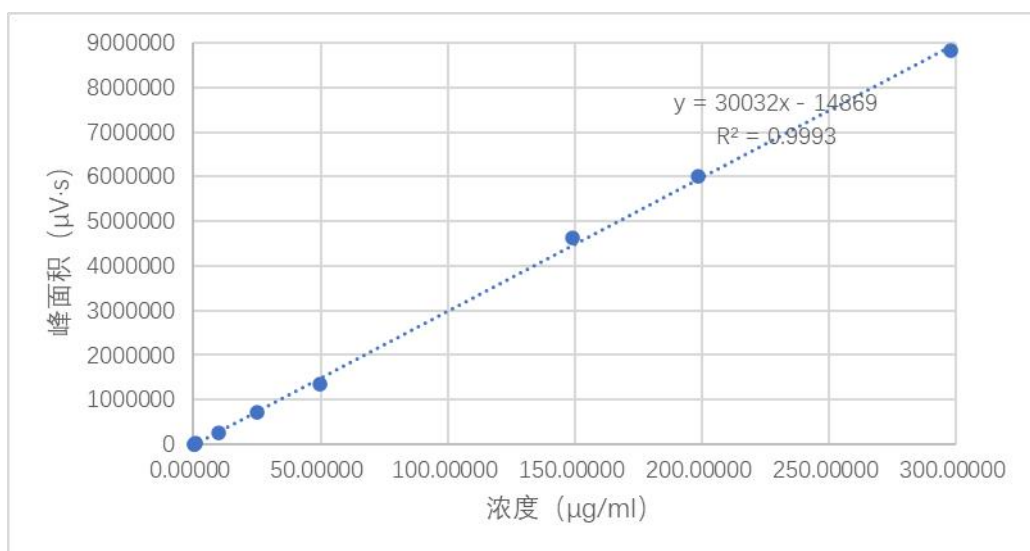
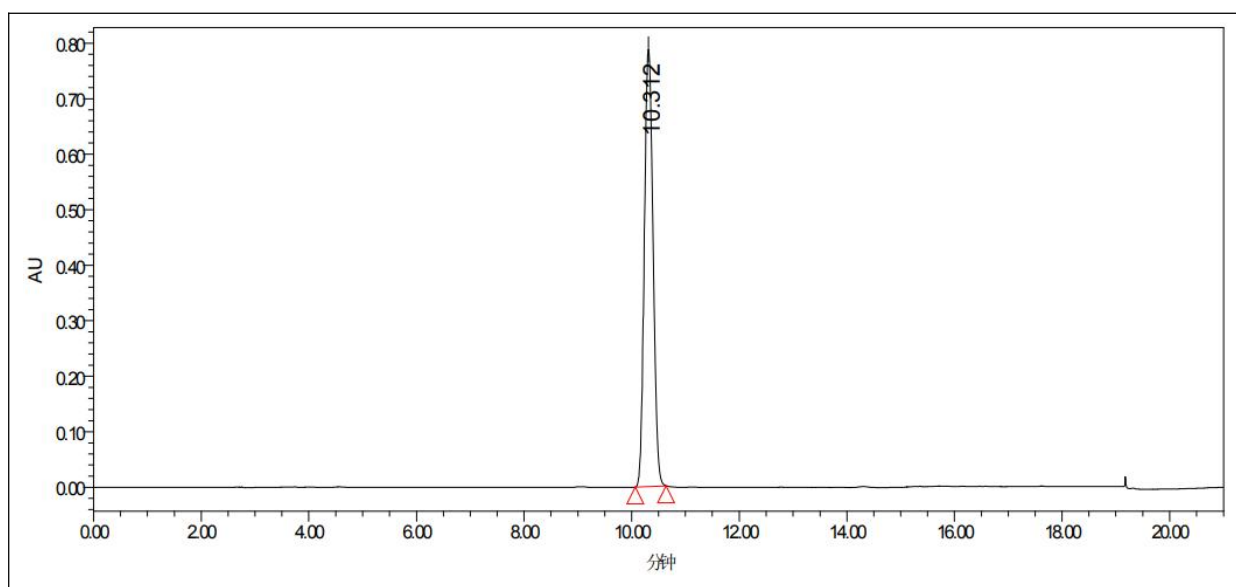
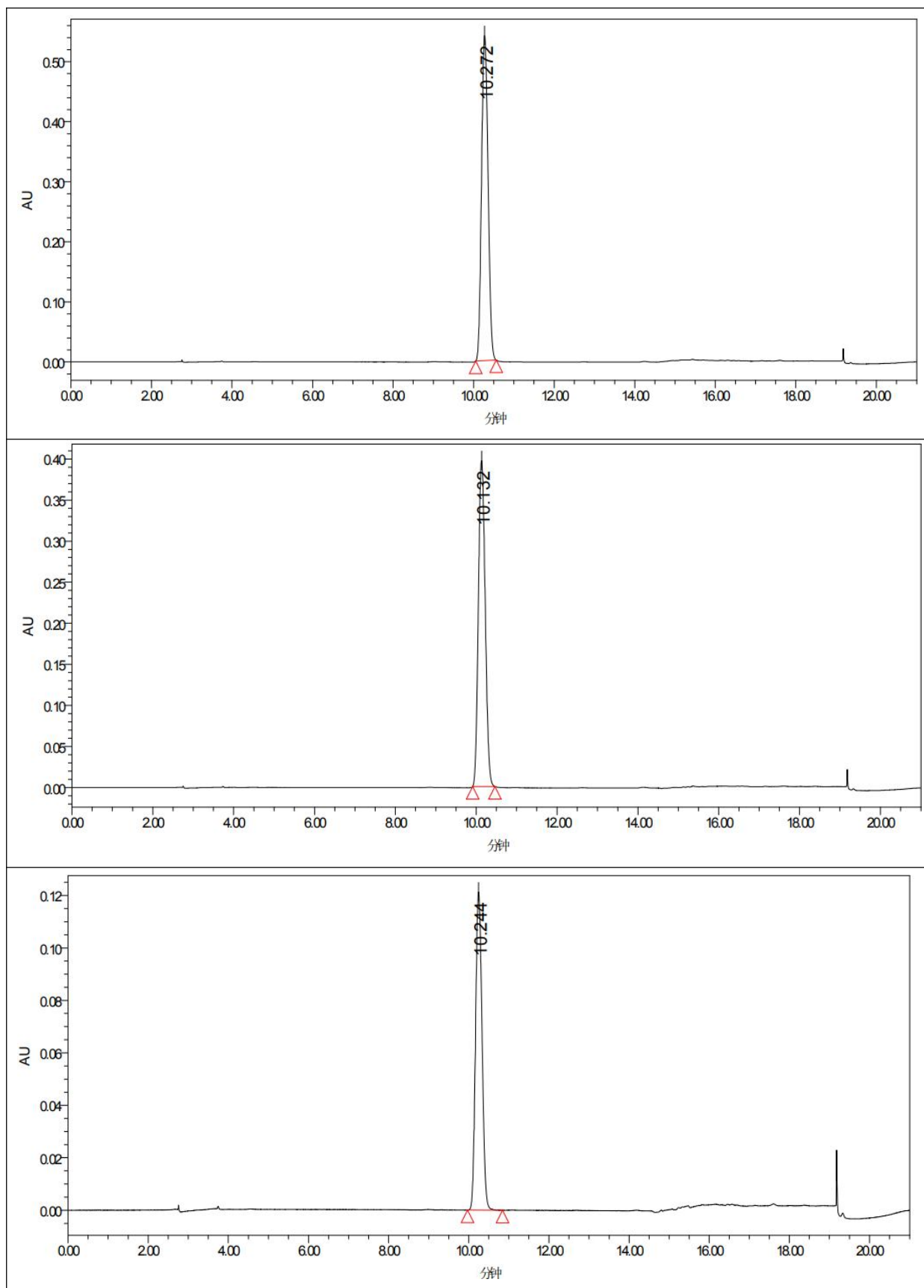
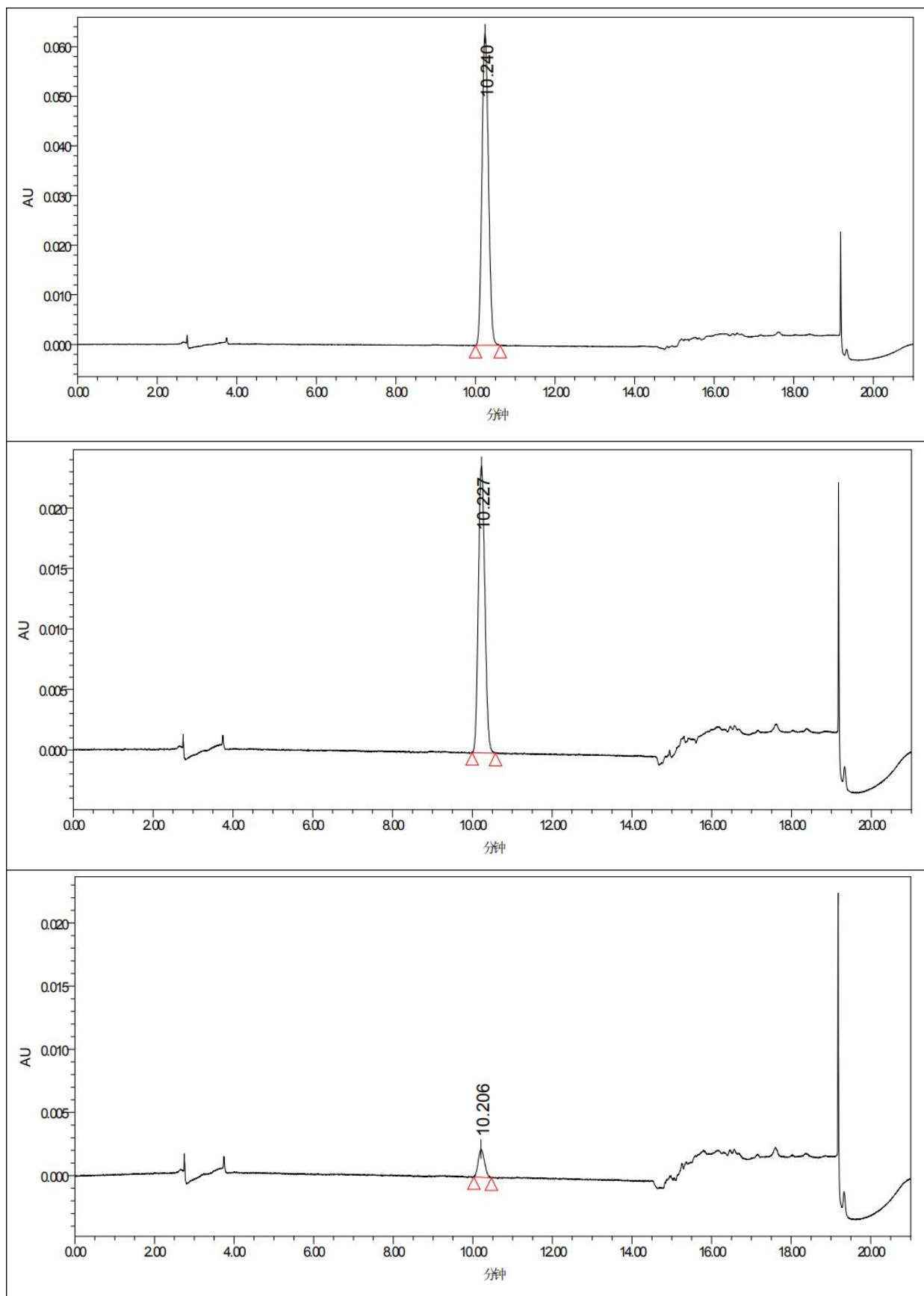
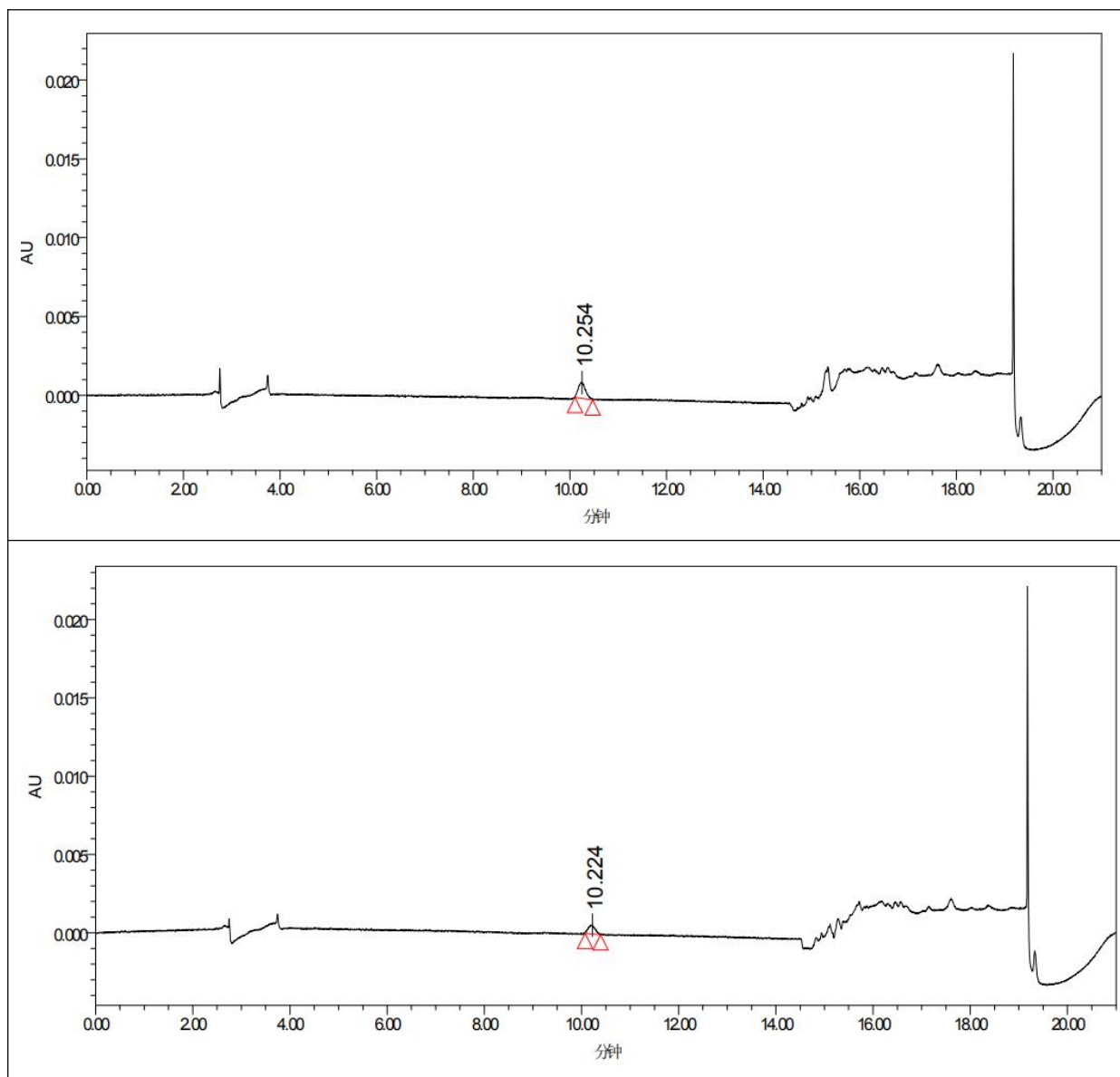


图 2-18 獐牙菜苦苷对照品标准曲线





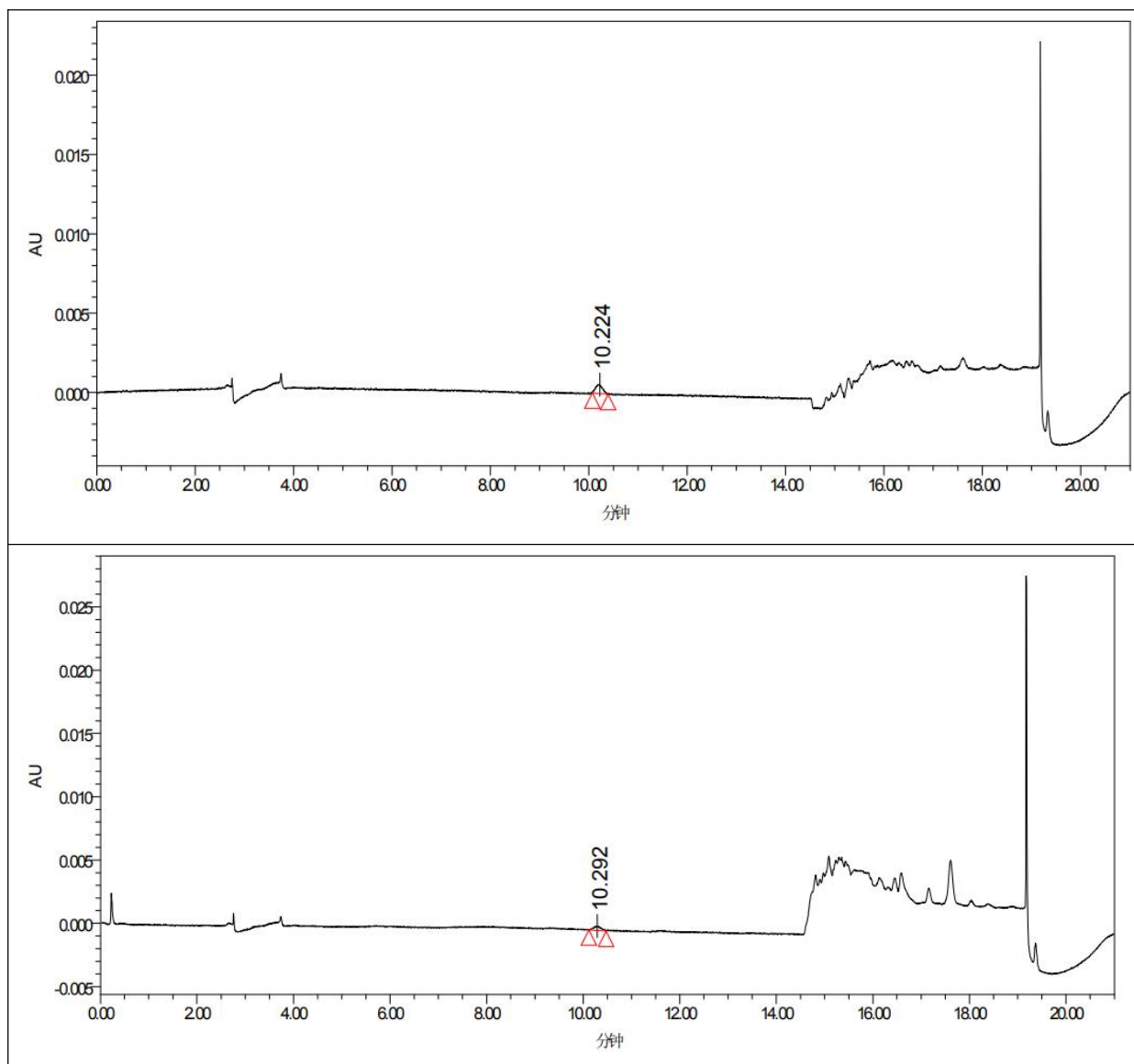




取线性溶液，用甲醇逐级稀释后进样测定，以色谱图中信噪比 3：1 为检测限，信噪比 10：1 为定量限。结果表明，獐牙菜苦苷的定量限为 2.5ng；检测限为 1.2ng。

表 2-18 獐牙菜苦苷定量限与检测限结果

名称	检测限 (μg/mL)	定量限 (μg/mL)
S/N	4.11	10.01
浓度	0.12418	0.24835

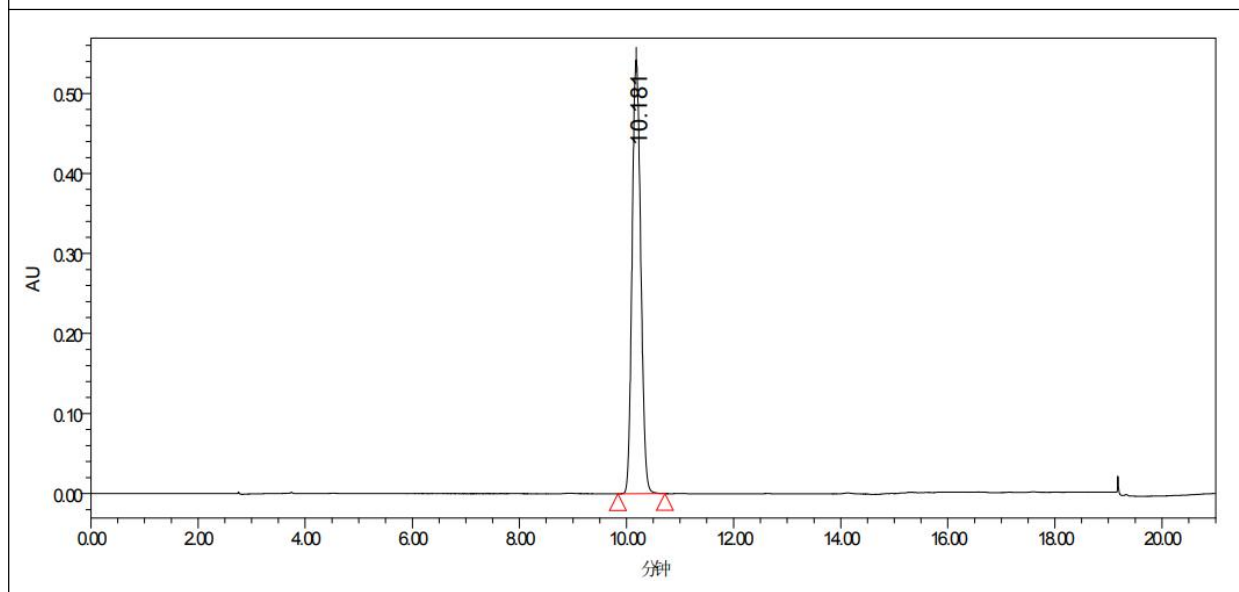
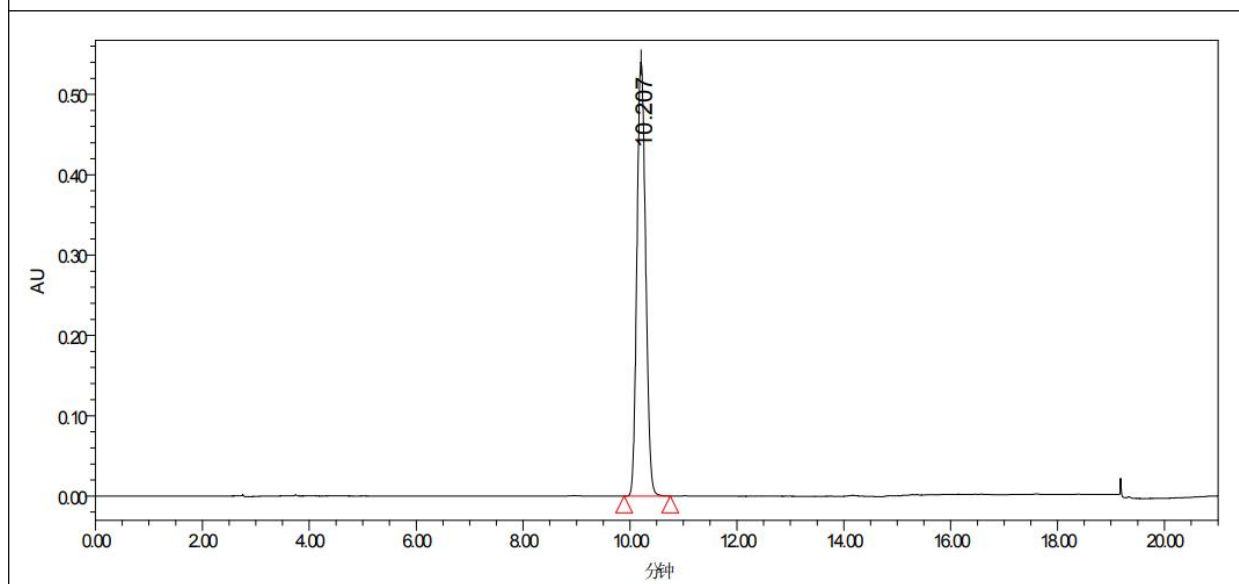
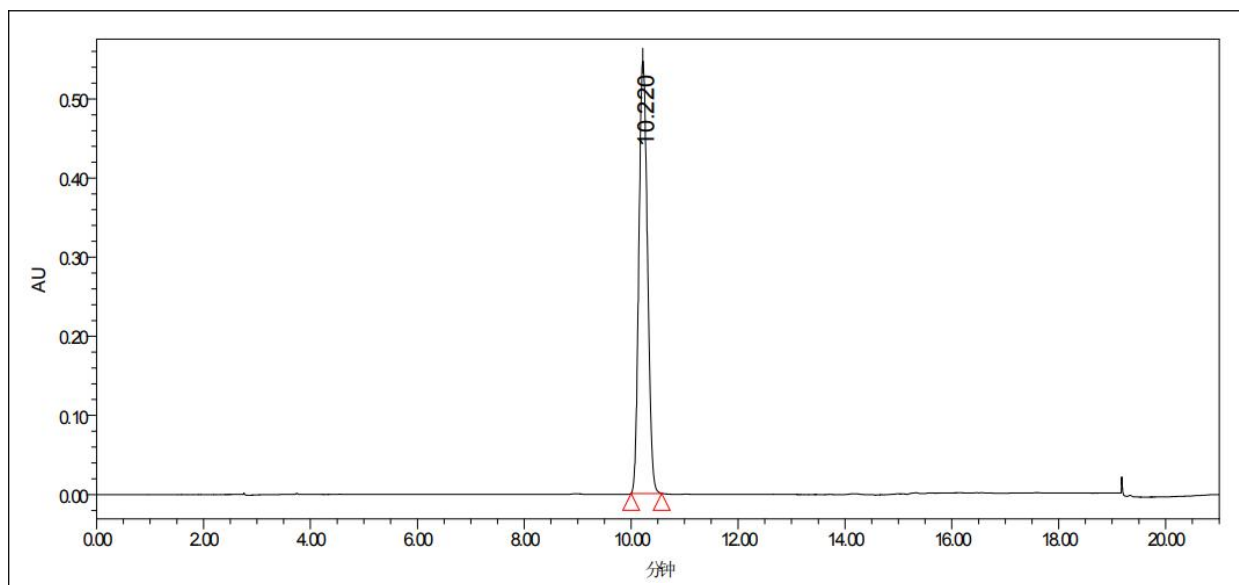


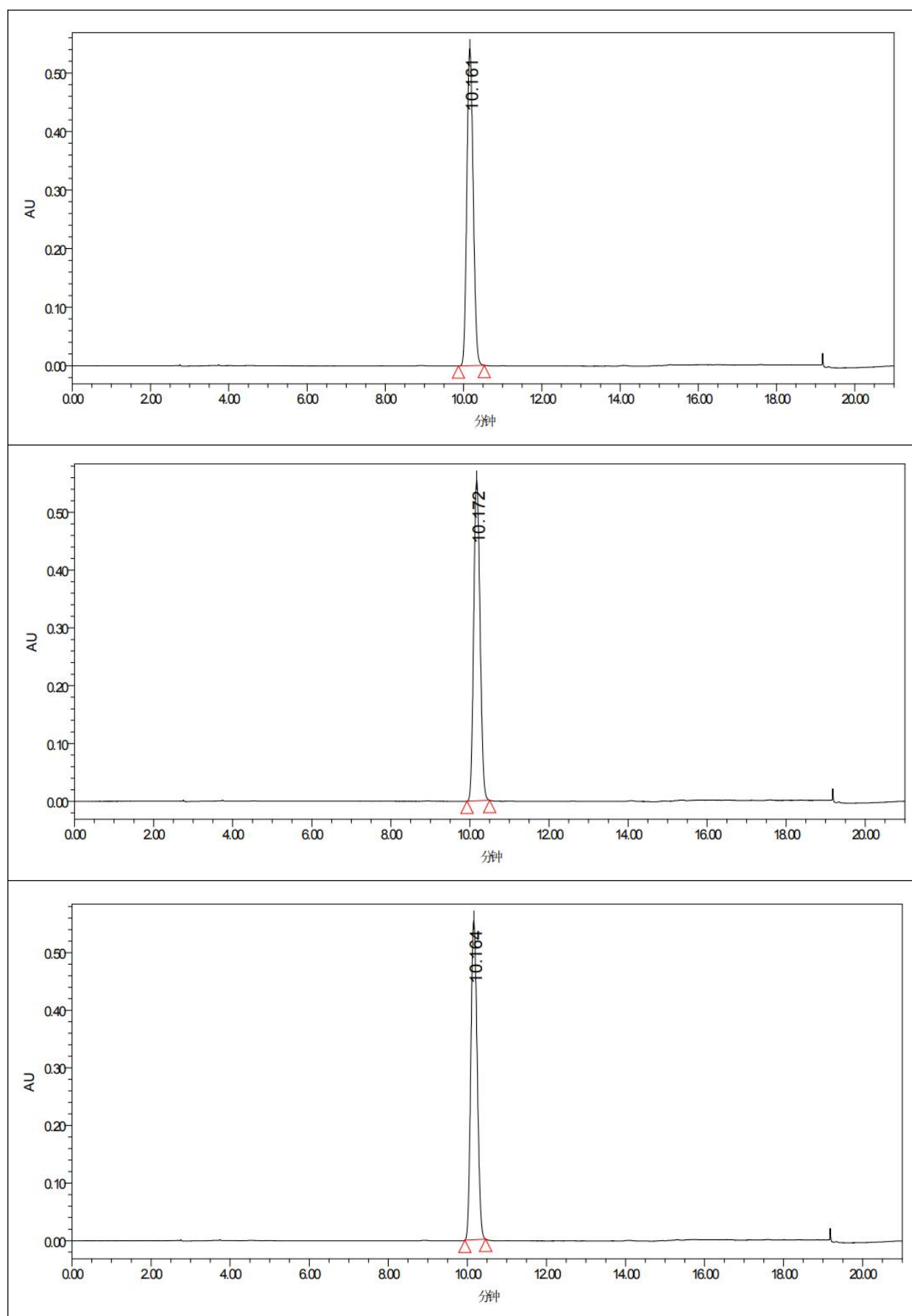
2.6.4.3 精密度实验

取“2.6.3”项下獐牙菜苦苷对照品溶液 10 μ l，连续进样 6 次，记录峰面积。结果獐牙菜苦苷的峰面积 RSD 为 0.63600% (n=6)，表明仪器精密度良好。结果见表 2-19，图谱见附图 38-43。

表 2-19 精密度实验结果 (n=6)

次数	1	2	3	4	5	6	平均	RSD,%
獐牙菜苦苷	6066747	6046162	6076233	6130073	6085055	6146959	6091871.5	0.63600



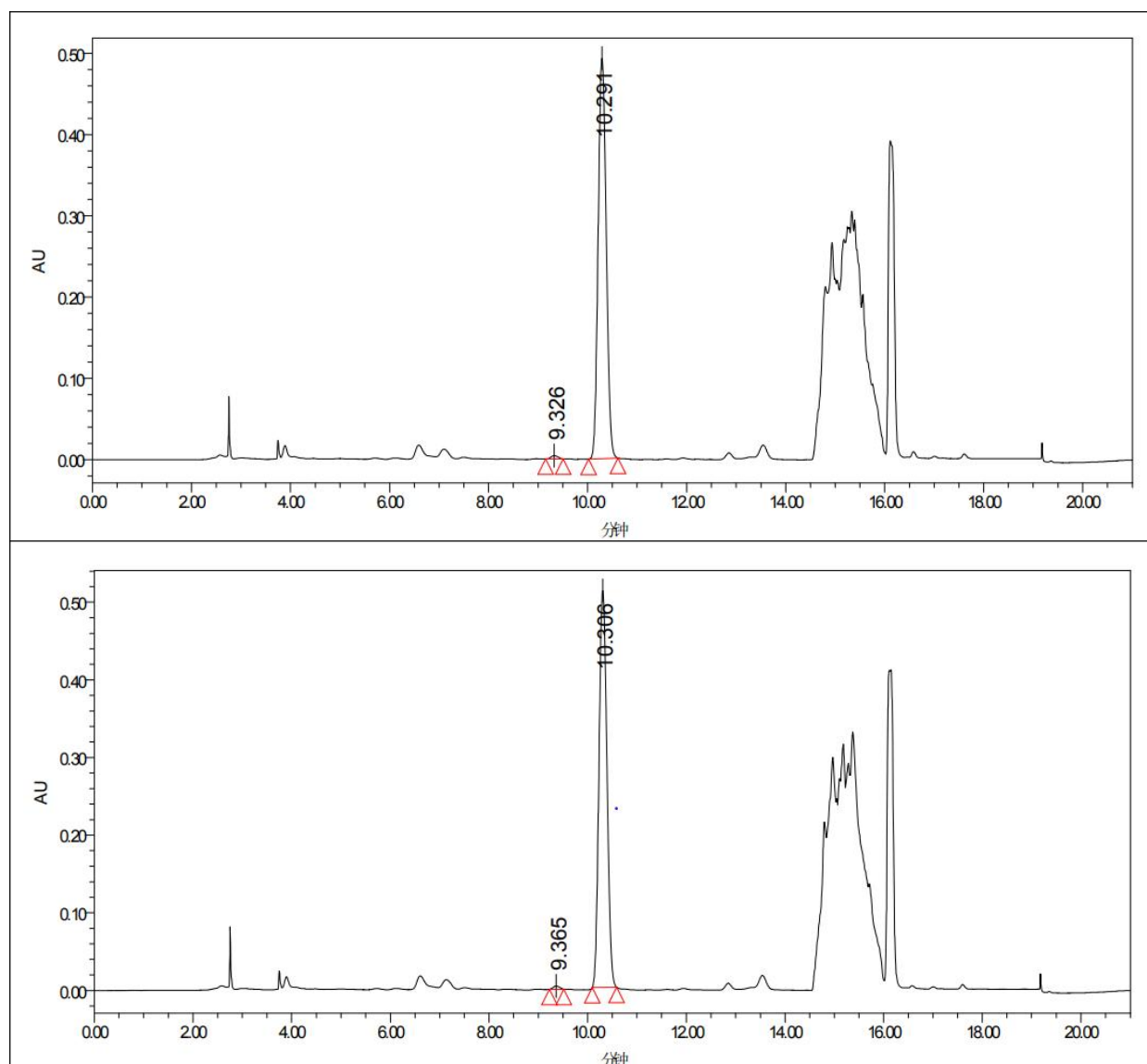


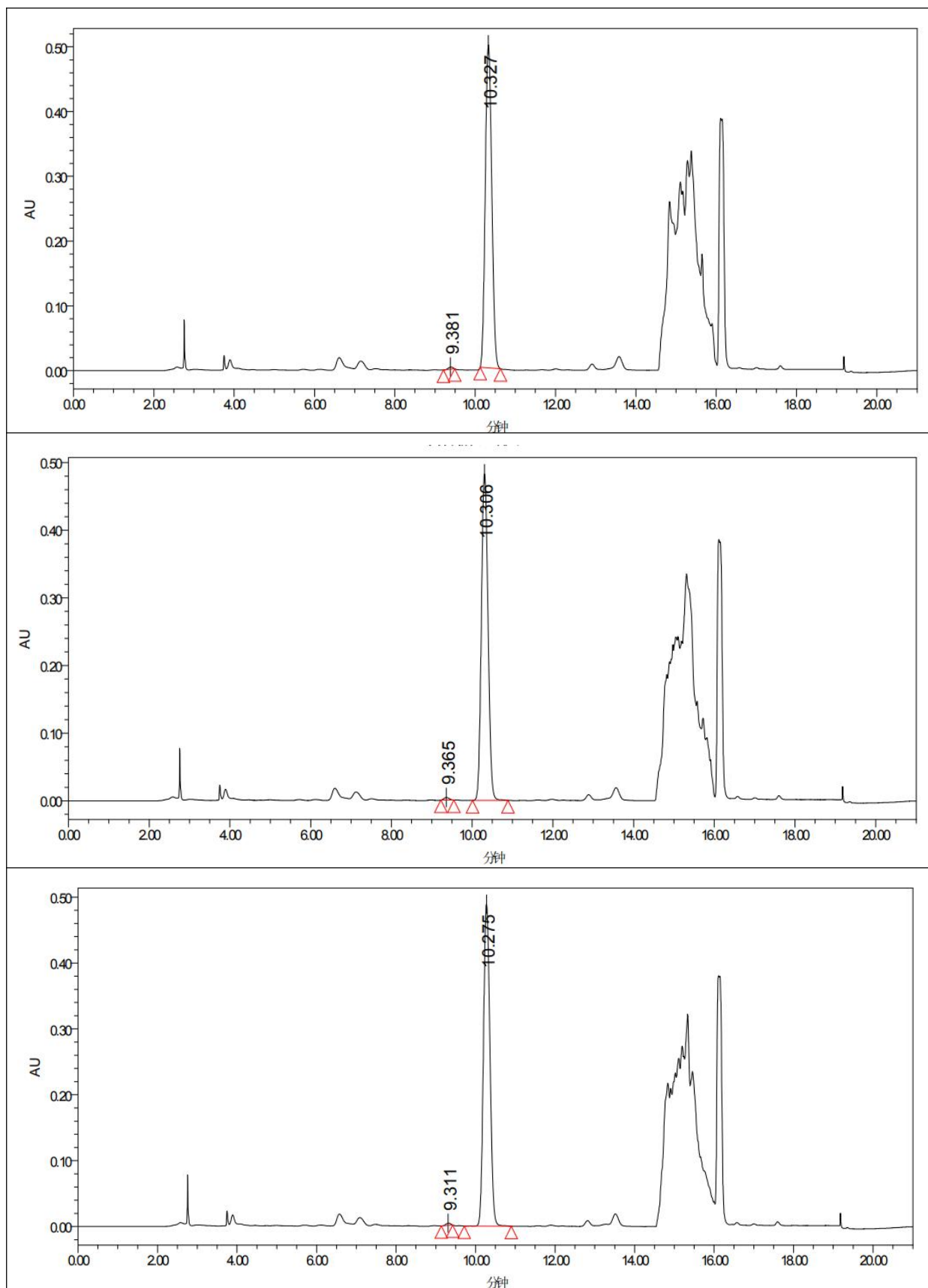
2.6.4.4 重复性实验

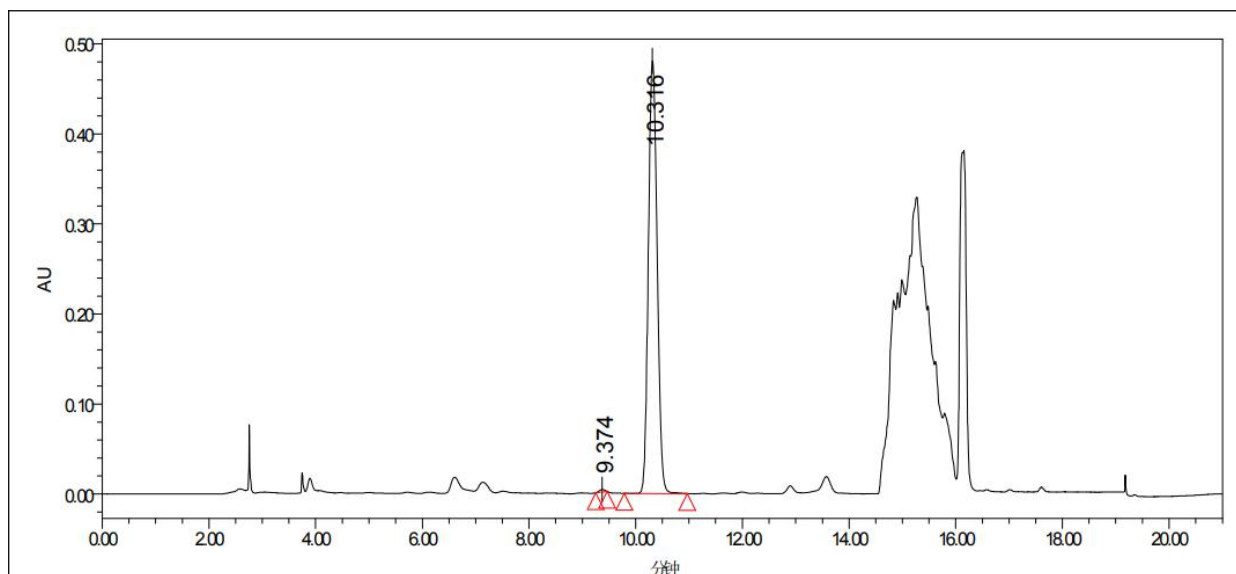
按“2.6.3”项下方法平行制备 6 份供试品溶液（R-1 批次），进样 10 μ l，分别进样并记录峰面积，计算含量，结果各份供试品溶液的獐牙菜苦苷的测定结果 RSD (n=6)为 0.75611%，结果表明重复性良好，结果见表 2-20，图谱见附图 44-49。

表 2-20 重复性实验结果 (n=6)

编号	取样量 (g)	峰面积 (A)	含量 (g/g)	平均含量 (mg/g)	RSD (%)
1	0.01998	5532908	0.10422	0.10466	0.75611
2	0.02010	5671641	0.10619		
3	0.02001	5571363	0.10479		
4	0.01982	5480624	0.10407		
5	0.01980	5493022	0.10442		
6	0.01975	5470056	0.10424		







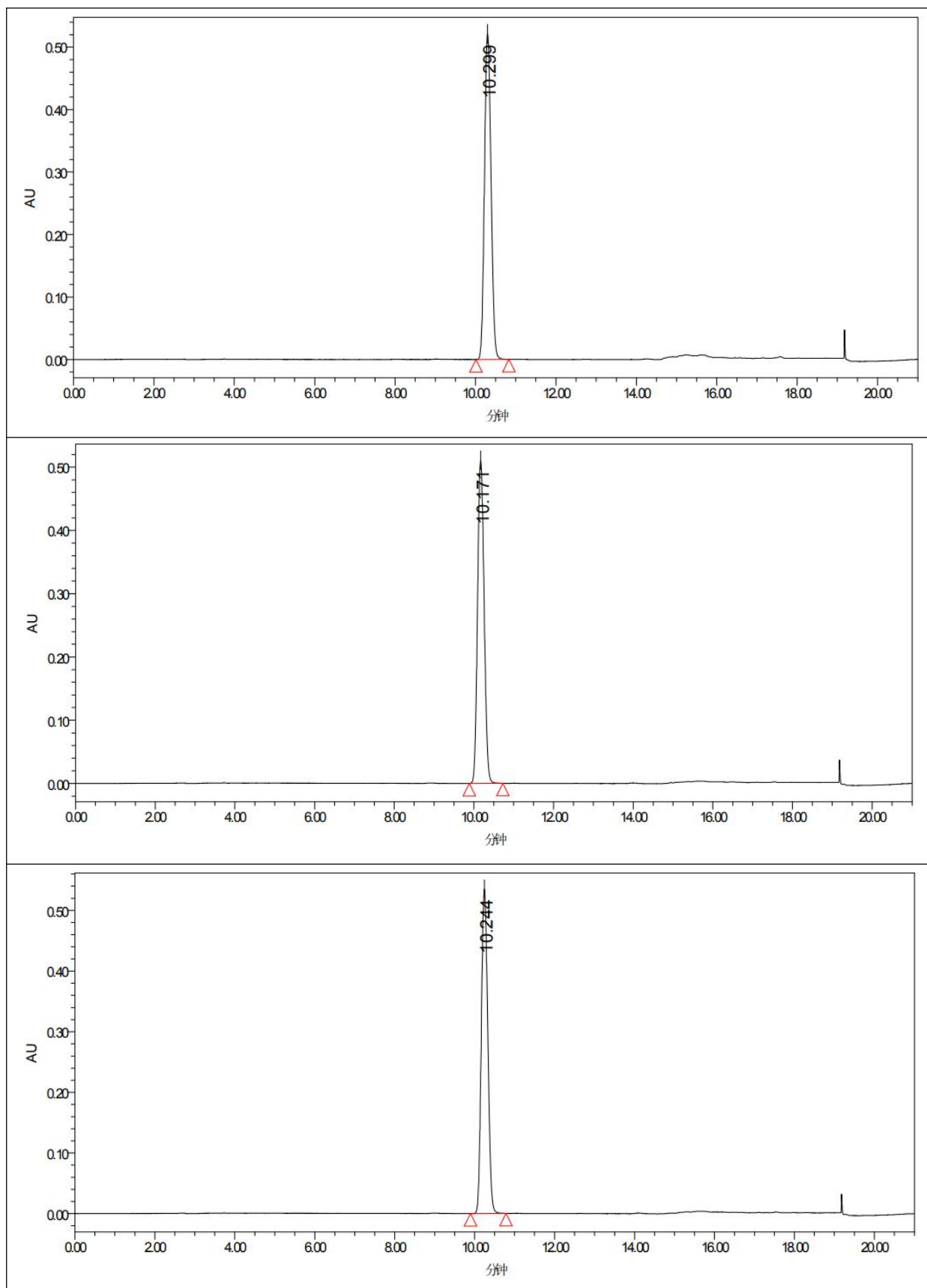
2.6.4.5 溶液稳定性实验

取“2.6.3”项下獐牙菜苦苷对照品溶液，分别于 0、2、4、6、8、12h 进样 10 μ l 测定。结果獐牙菜苦苷的峰面积的 RSD (n=6)分别为 1.75267%，结果表明对照品溶液在室温 12h 内稳定，见表 2-21，附图 50-55。

按“2.6.3”项下方法制备供试品溶液（R-1 批），于 0、2、4、6、8、12h 进样 10 μ l 并记录峰面积，结果獐牙菜苦苷的峰面积的 RSD (n=6)分别为 0.29845%，结果表明供试品溶液在室温 12h 内稳定，结果见表 2-222，图谱见附图 56-61。

表 2-21 对照品溶液稳定性实验结果(n=6)

时间	0h	2h	4h	6h	8h	12h	平均	RSD,%
峰面积	5880740	5792140	5956672	5690895	5880619	5956618	5859614	1.75267



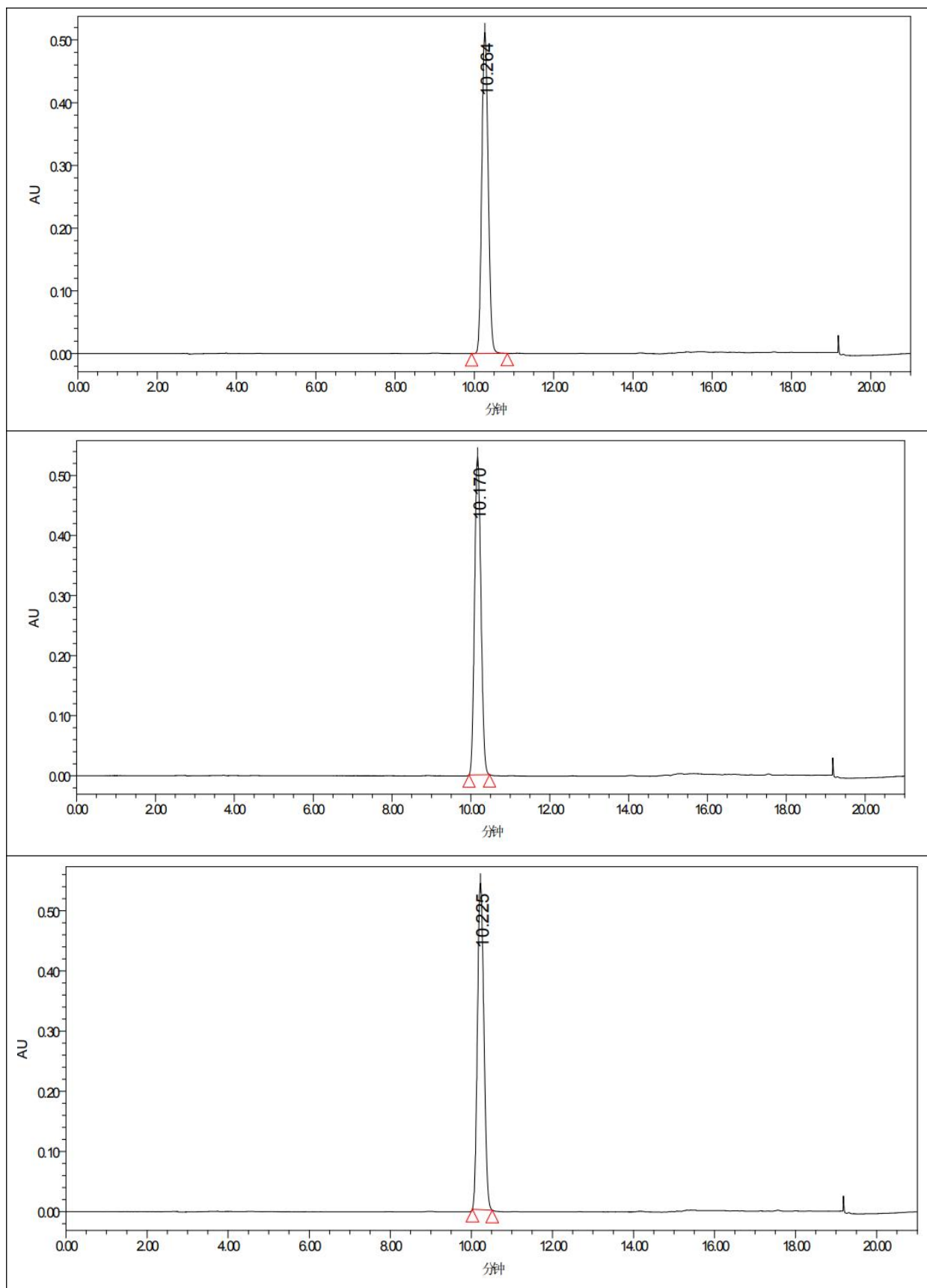
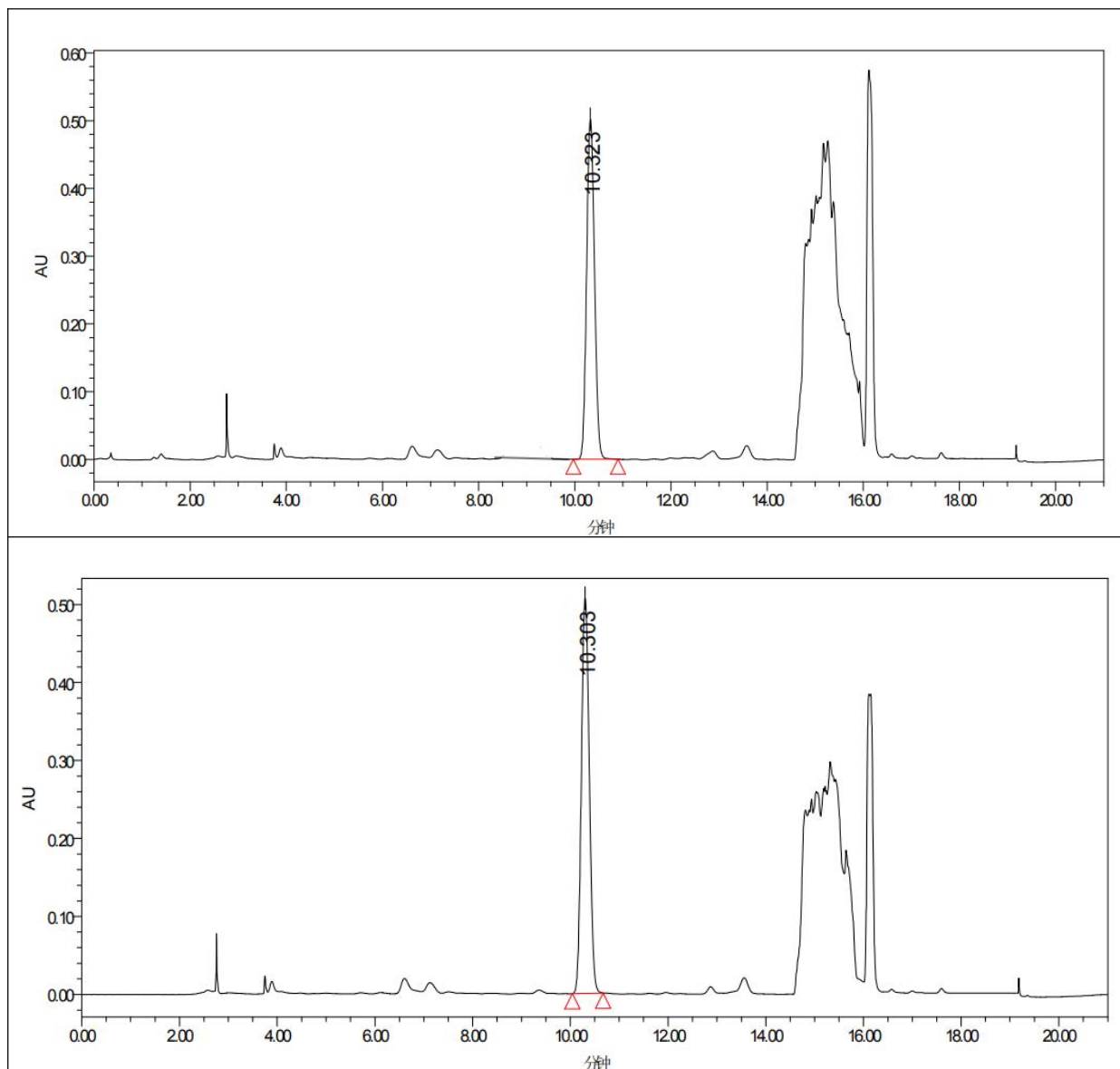
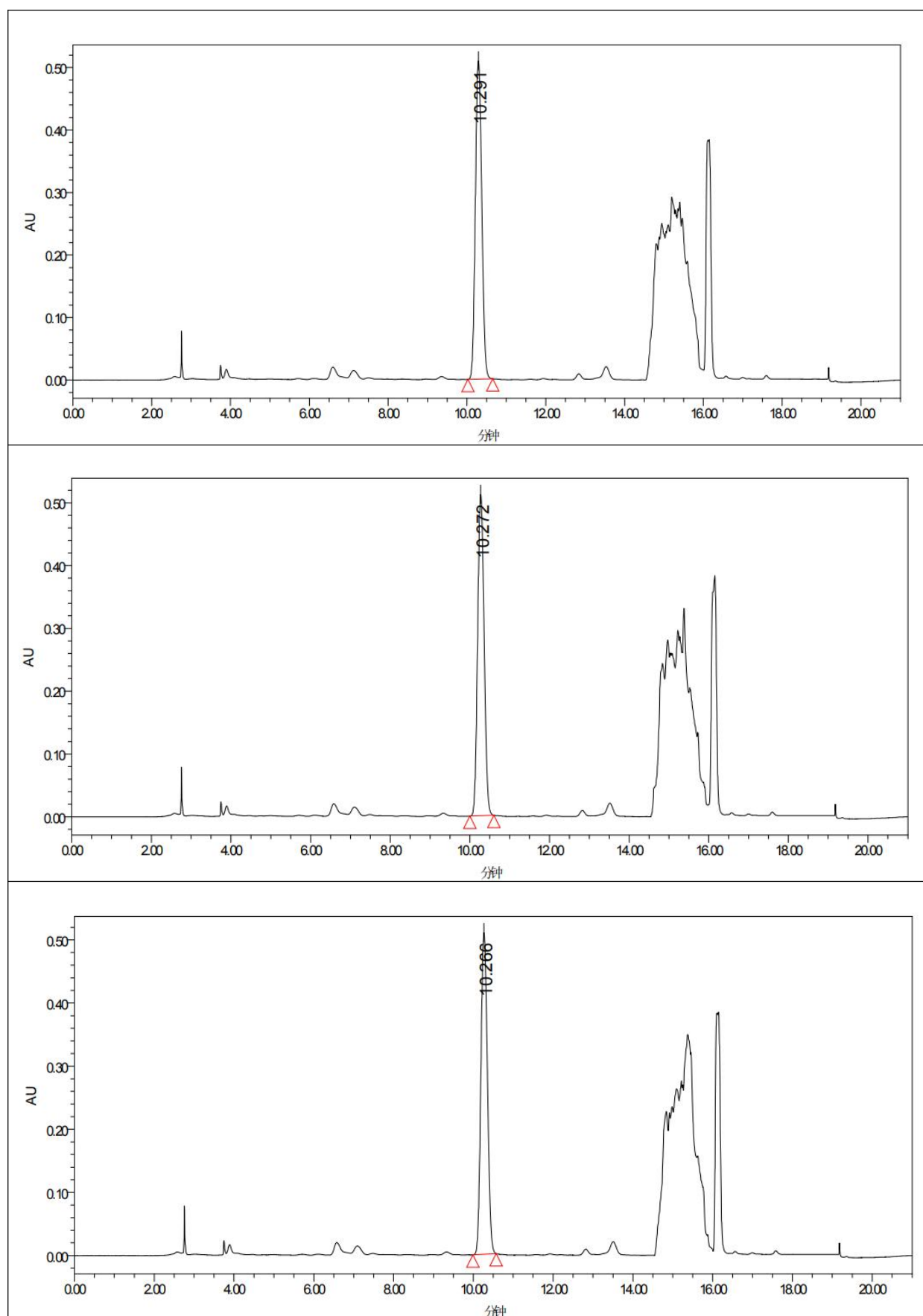
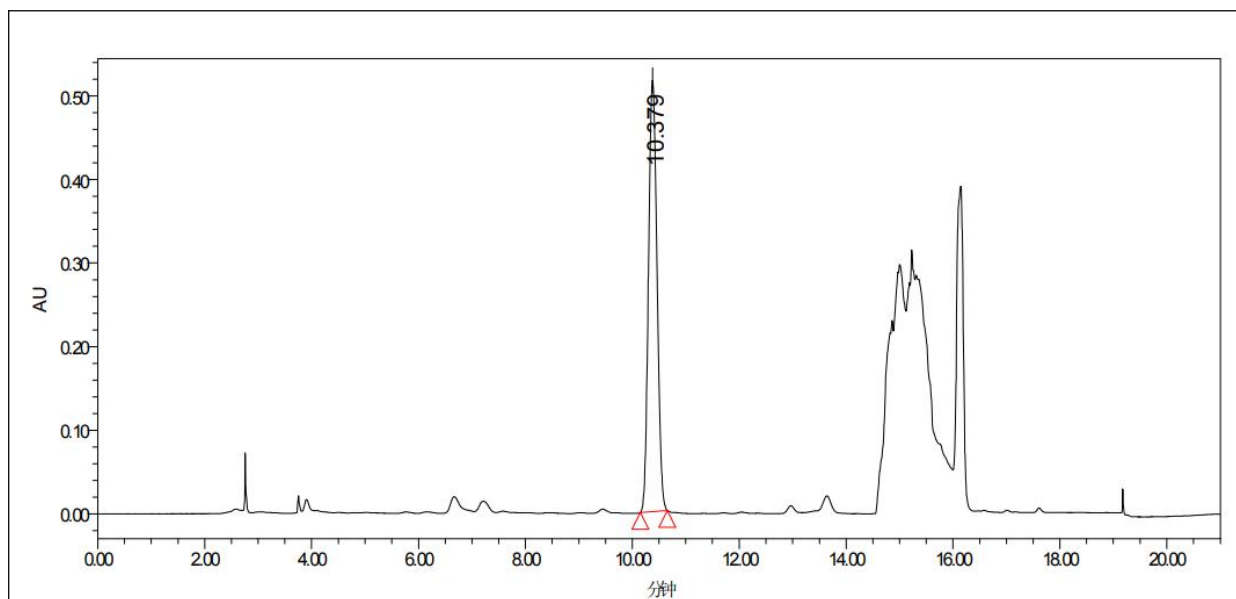


表 2-22 供试品溶液稳定性实验结果(n=6)

时间	0h	2h	4h	6h	8h	12h	平均	RSD,%
峰面积	5693835	5691024	5708164	5728584	5731893	5713306	5711134	0.29845







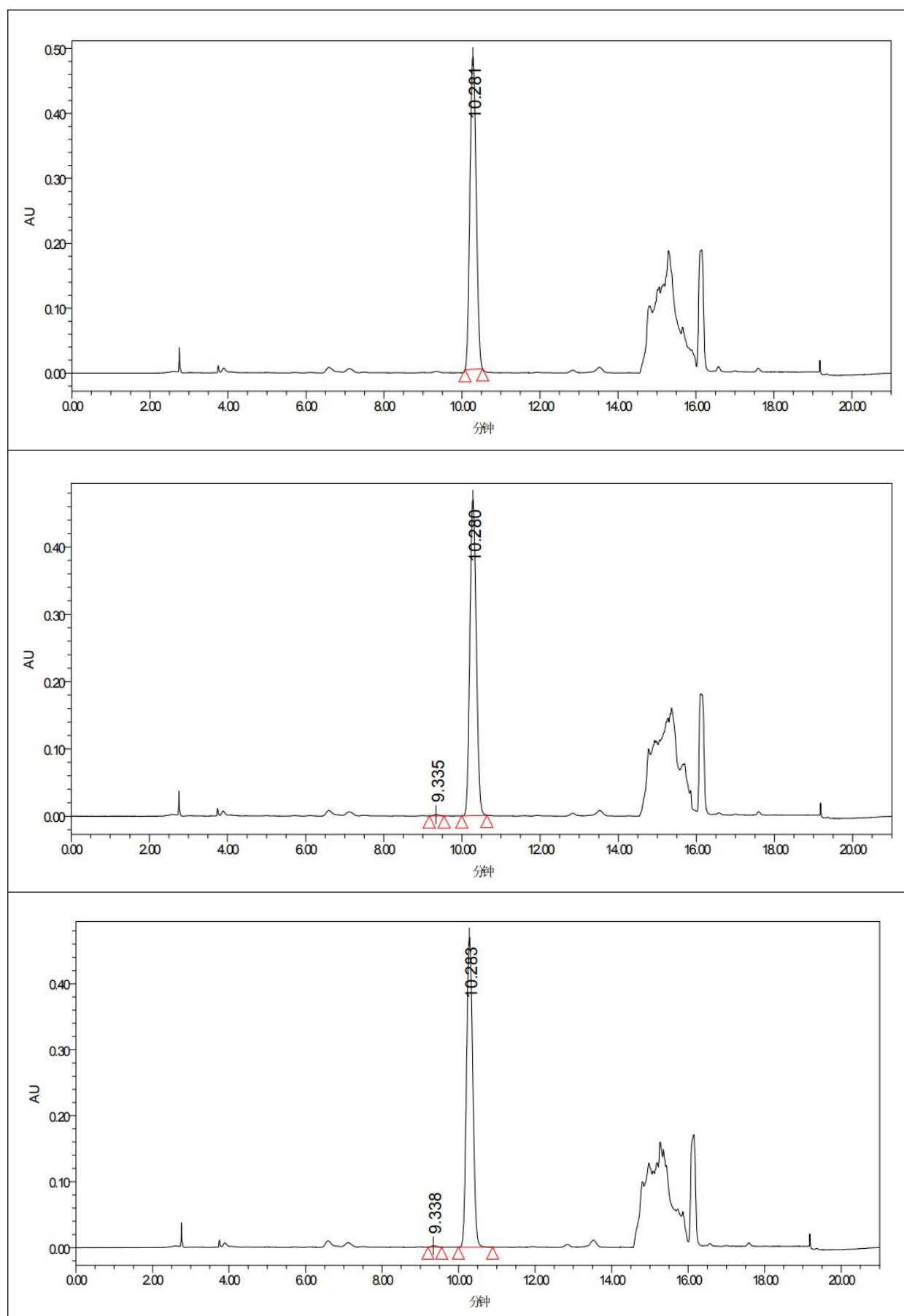
2.6.4.6 加样回收率实验

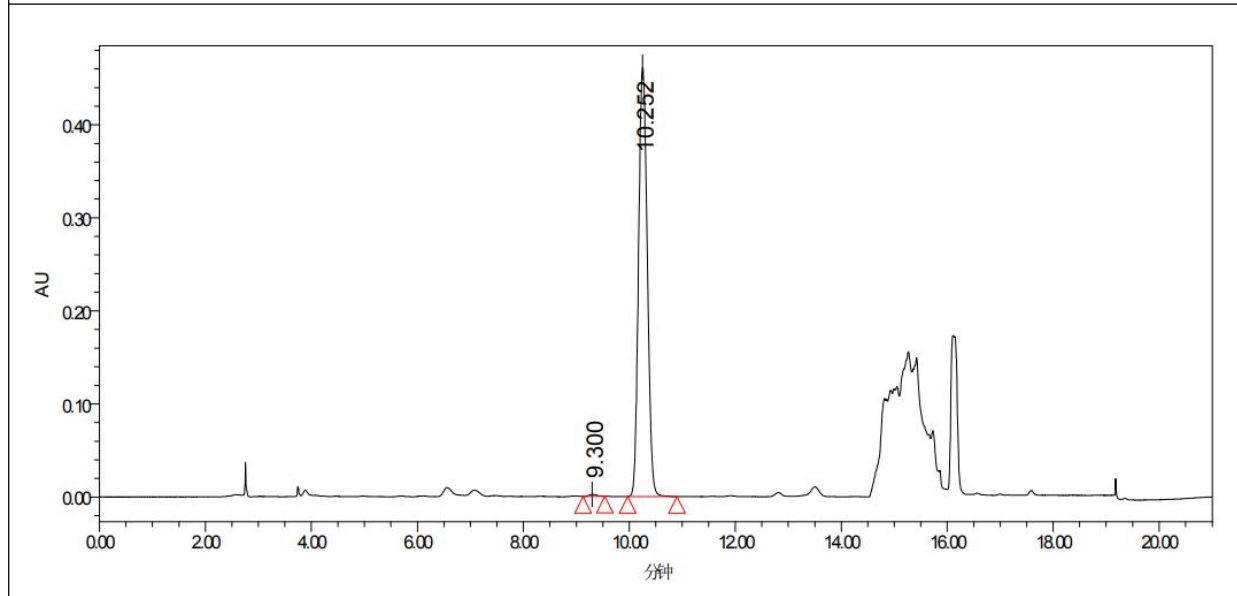
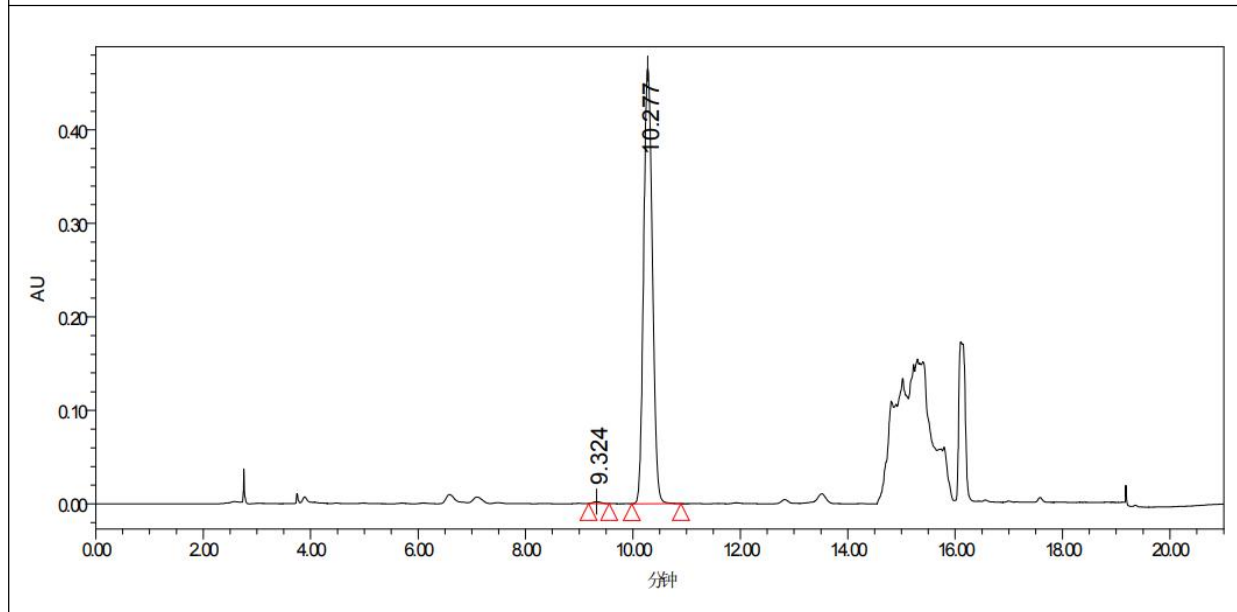
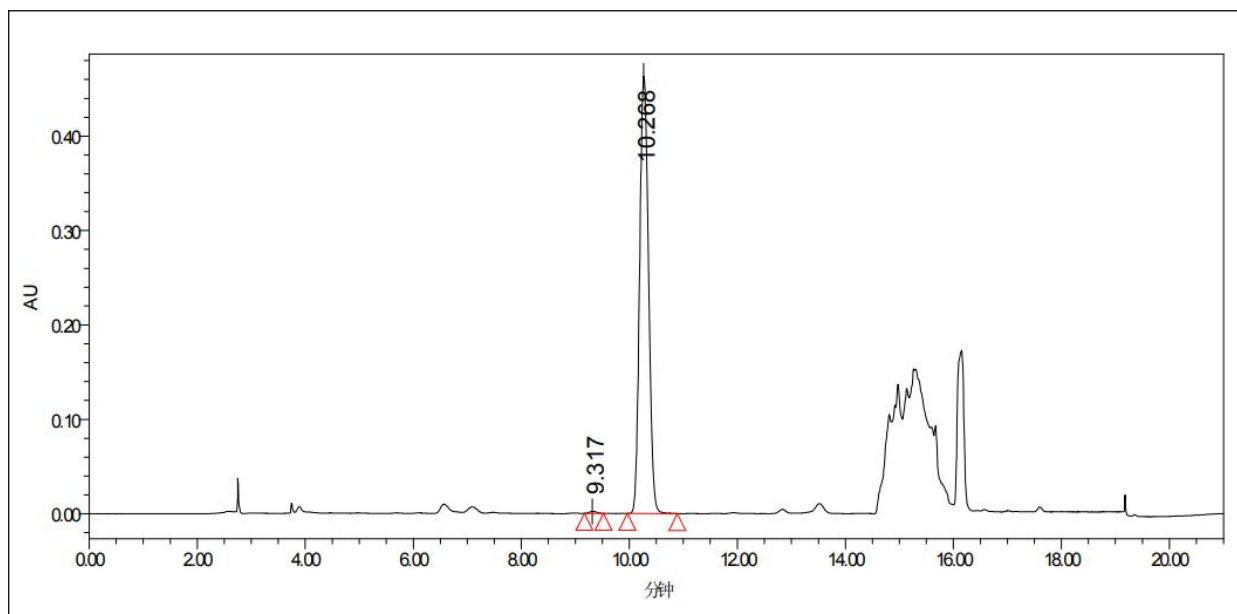
取已知獐牙菜苦苷含量的轮叶獐牙菜样品（R-1 批）粉末 6 份，每份各约 0.01g，精密称定，置 6 个具塞锥形瓶中，加入獐牙菜苦苷对照品溶液 1ml（0.99338mg/ml）再精密加入甲醇 10ml，密塞，称定重量，超声处理（功率 180W，频率 53KHz）30 分钟，放冷，再称定重量，用甲醇补足减失的重量，取续滤液，即得 分别制备獐牙菜苦苷加样回收供试品溶液，按“2.6.3”项下色谱条件测定，计算回收率，结果见表 2-23，图谱见附图 62-67；平均回收率为 100.23940%，RSD 值为 1.27420%，表明本方法具有较好的准确性。

$$\text{回收率}(\%) = \frac{\text{测出含量}(\text{mg}) - \text{供试品中含量}(\text{mg})}{\text{加入对照品量}(\text{mg})} \times 100\%$$

表 2-23 加样回收率试验结果(n=6)

编号	称样量/g	样品中的 量/mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率/%	平均回收 率/%	RSD/%
1	0.01030	0.95626	0.99338	1.96197	101.24102	100.23940	1.27420
2	0.01017	0.94419	0.99338	1.94748	100.99794		
3	0.01015	0.94233	0.99338	1.94487	100.92171		
4	0.01003	0.93119	0.99338	1.93490	101.04012		
5	0.01020	0.94697	0.99338	1.92986	98.94359		
6	0.01021	0.94790	0.99338	1.92432	98.29201		



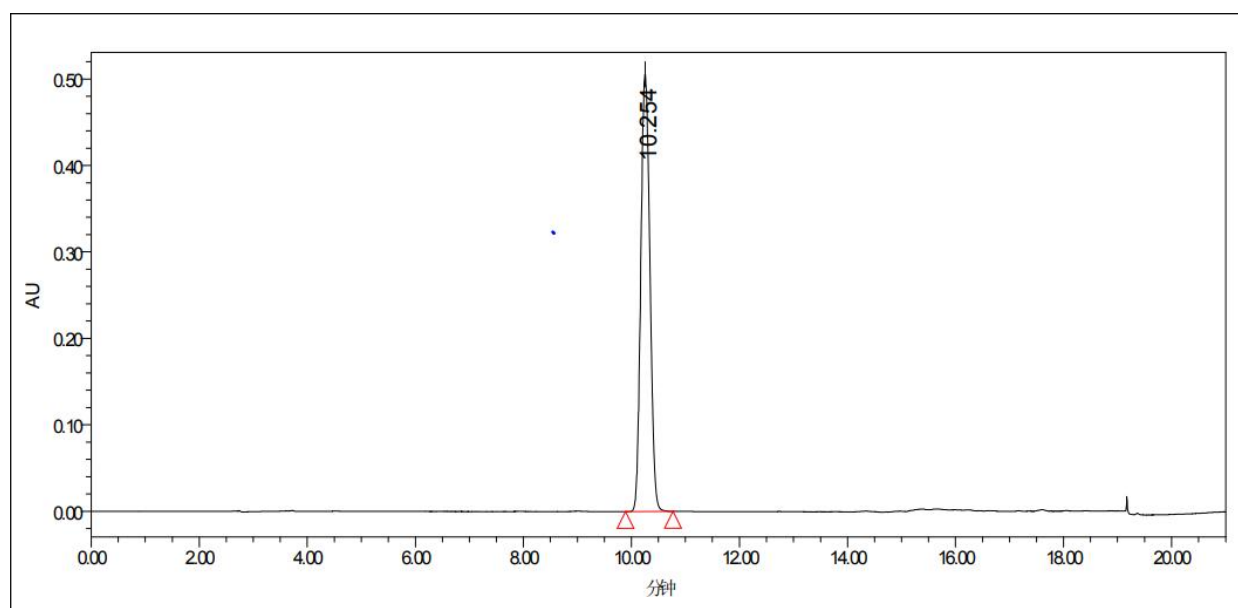


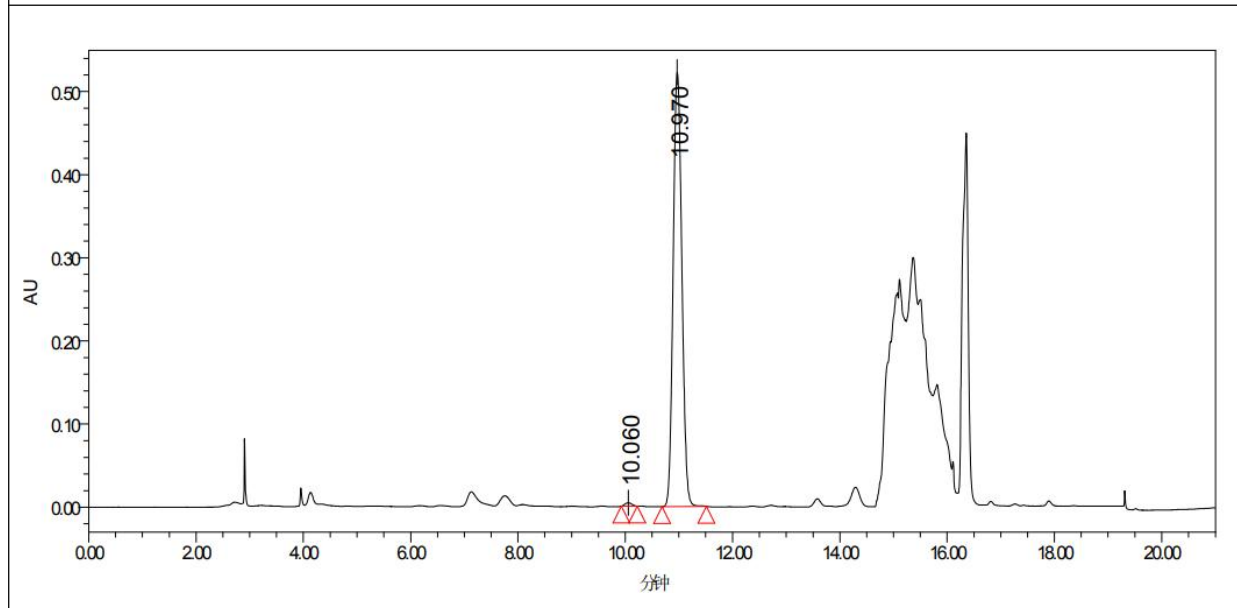
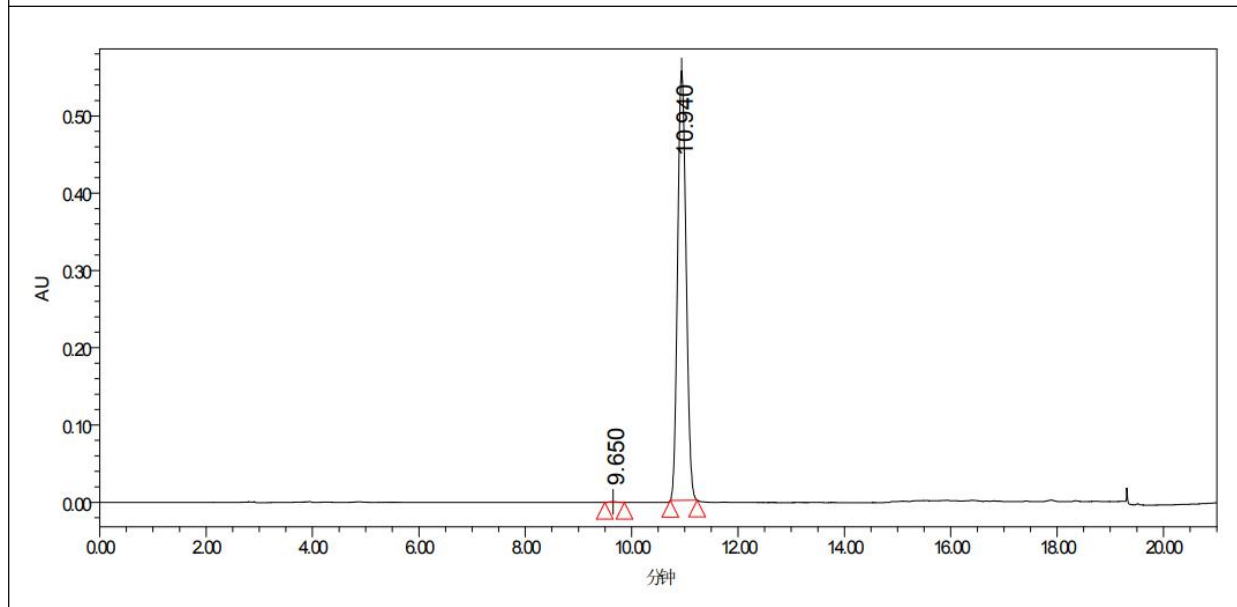
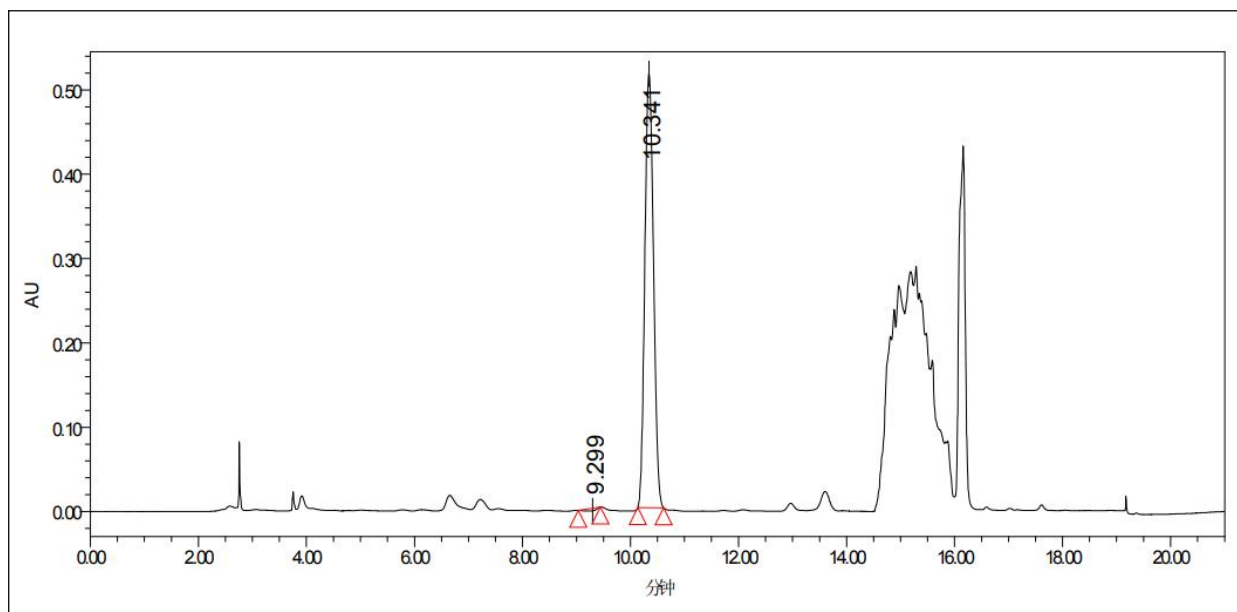
2.6.4.7 耐用性考察

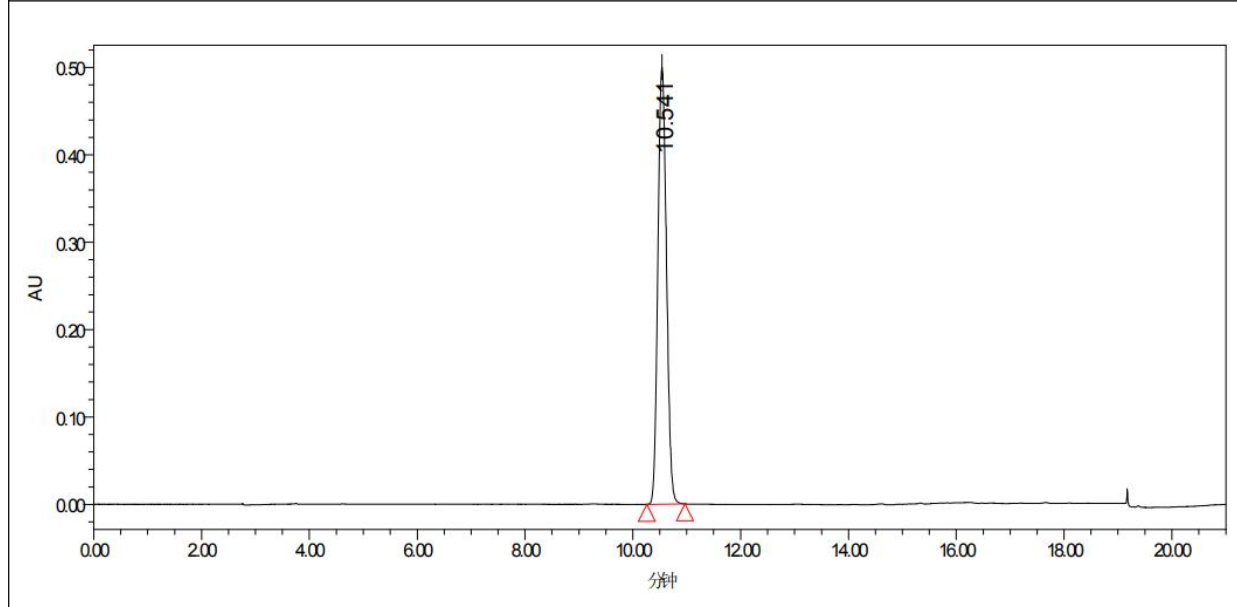
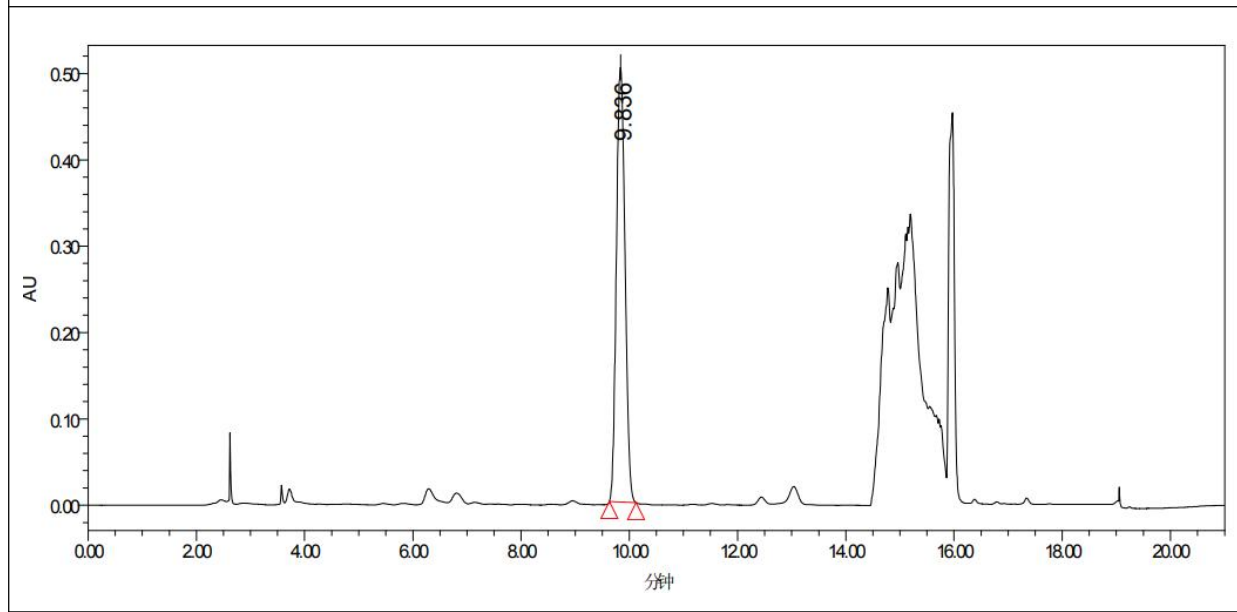
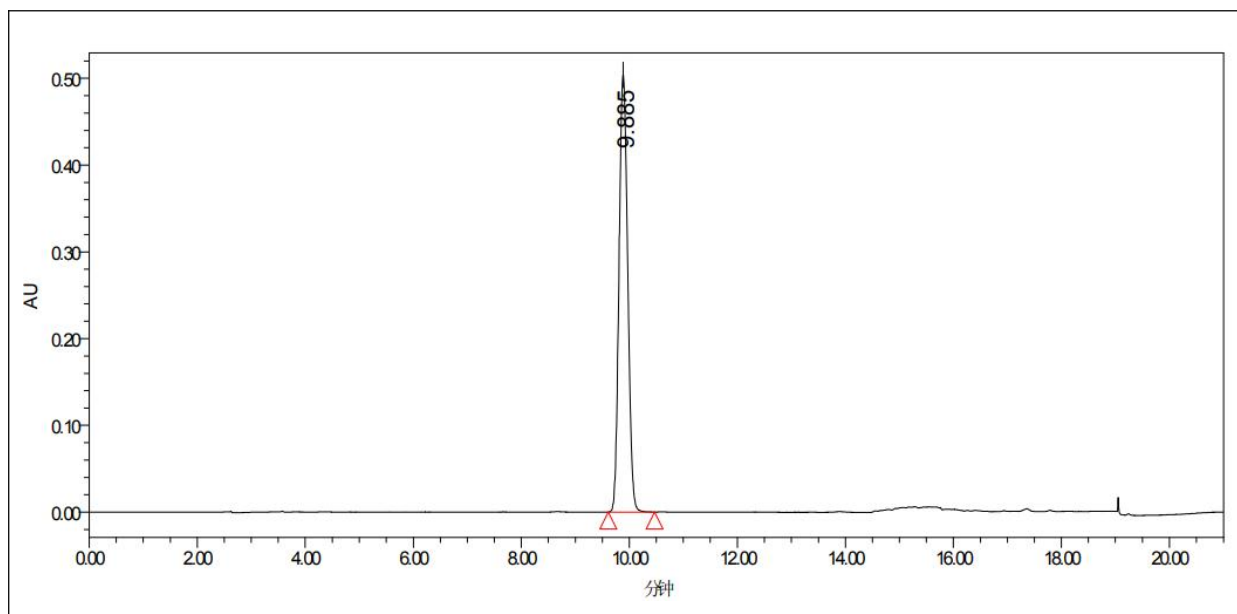
取同一供试品溶液（R-1 批）进行测定不同品牌的色谱柱（Welch Ultimate C18，4.6*250mm，5 μ m、NaNoChrom KromCore 120 C18，4.6*250mm，5 μ m），不同流速（0.95ml·min⁻¹、1.05ml·min⁻¹），不同柱温（27℃、33℃）的耐用性考察，实验结果表明，各条件下所测量结果的 RSD<2.0%，分离效果理想，图谱见附图 68-80。因此，轮叶獐牙菜中獐牙菜苦苷的测定方法具有较好的耐用性。

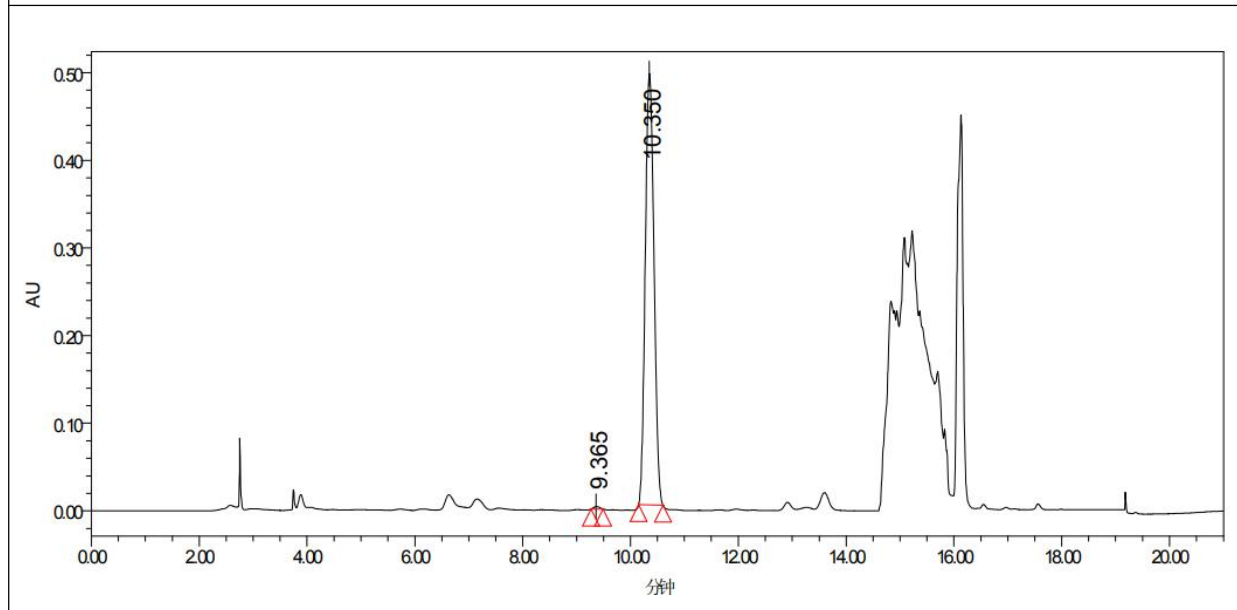
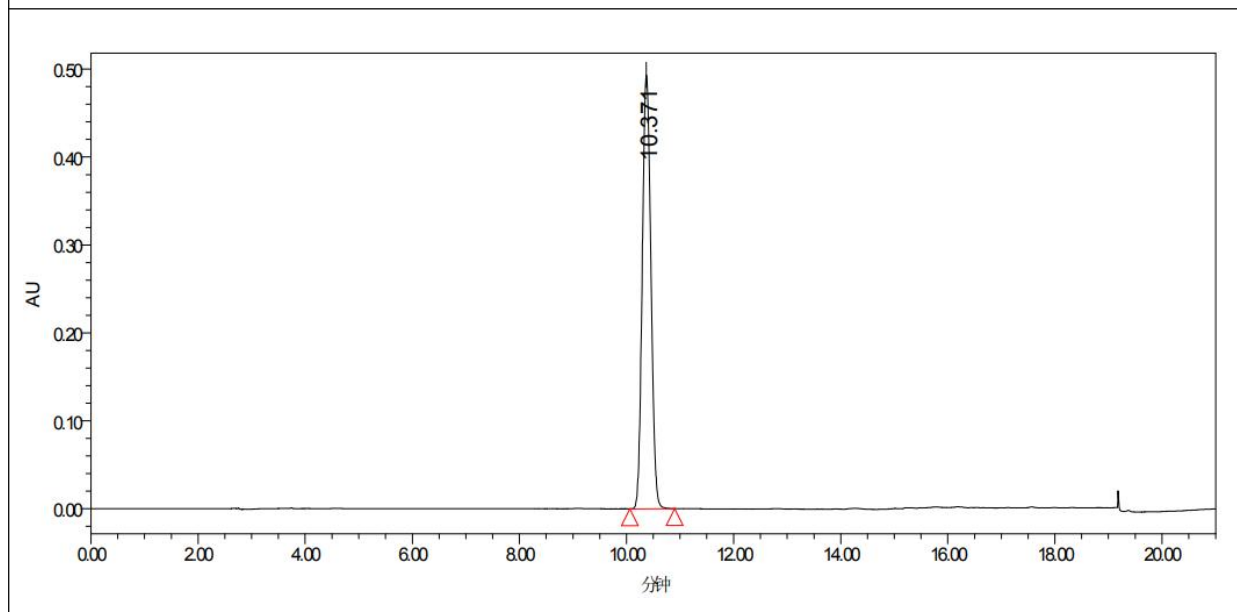
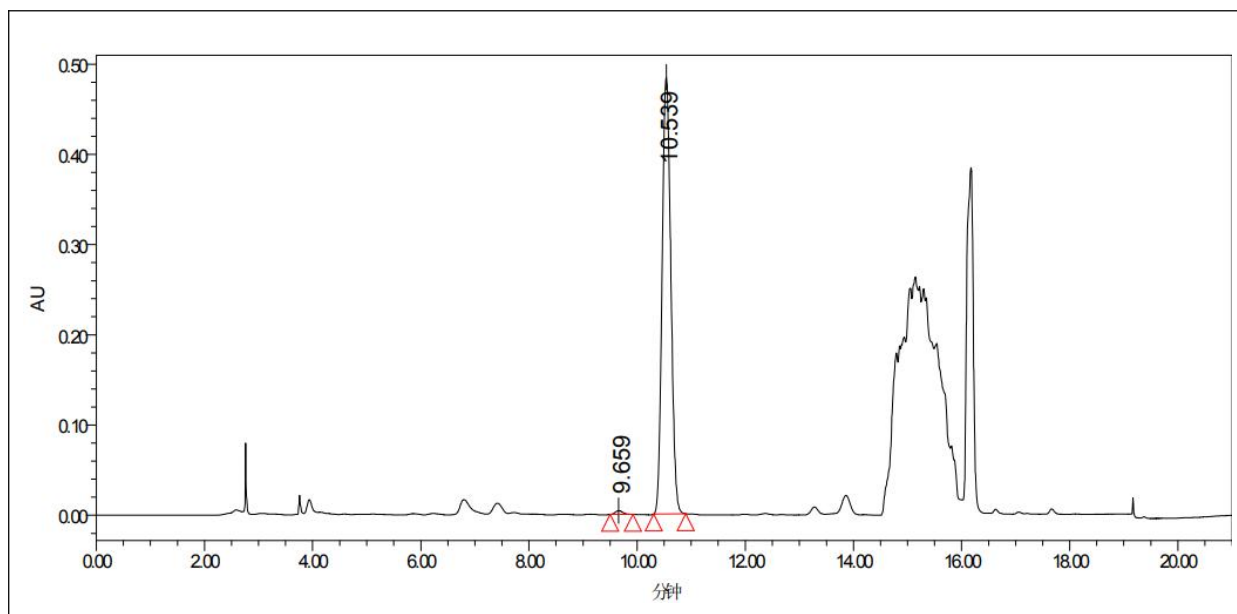
表 2-24 耐用性试验结果(n=7)

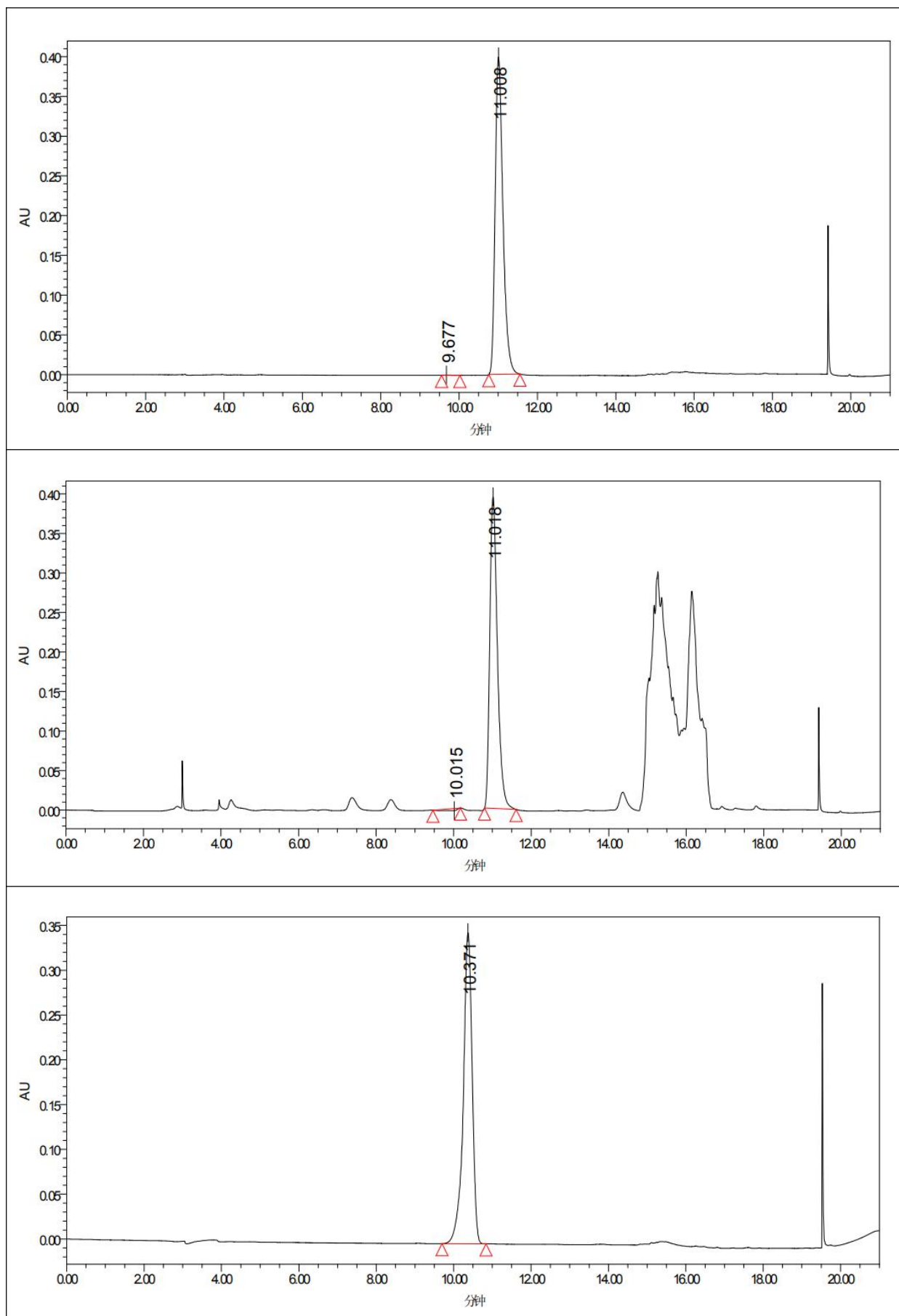
序号	流速 (mL/min)	色谱柱	柱温(℃)	含量 (g/g)	平均含量 (mg/g)	RSD (%)
1	1	Kromasil 100-5-C18	30	0.10648	0.10664	1.28829
2	0.95	Kromasil 100-5-C18	30	0.10419		
3	1.05	Kromasil 100-5-C18	30	0.10777		
4	1	Kromasil 100-5-C18	27	0.10638		
5	1	Kromasil 100-5-C18	33	0.10859		
6	1	Welch Ultimate ^R XB-C18	30	0.10678		
7	1	ChromCore TM 120 C18	30	0.10629		

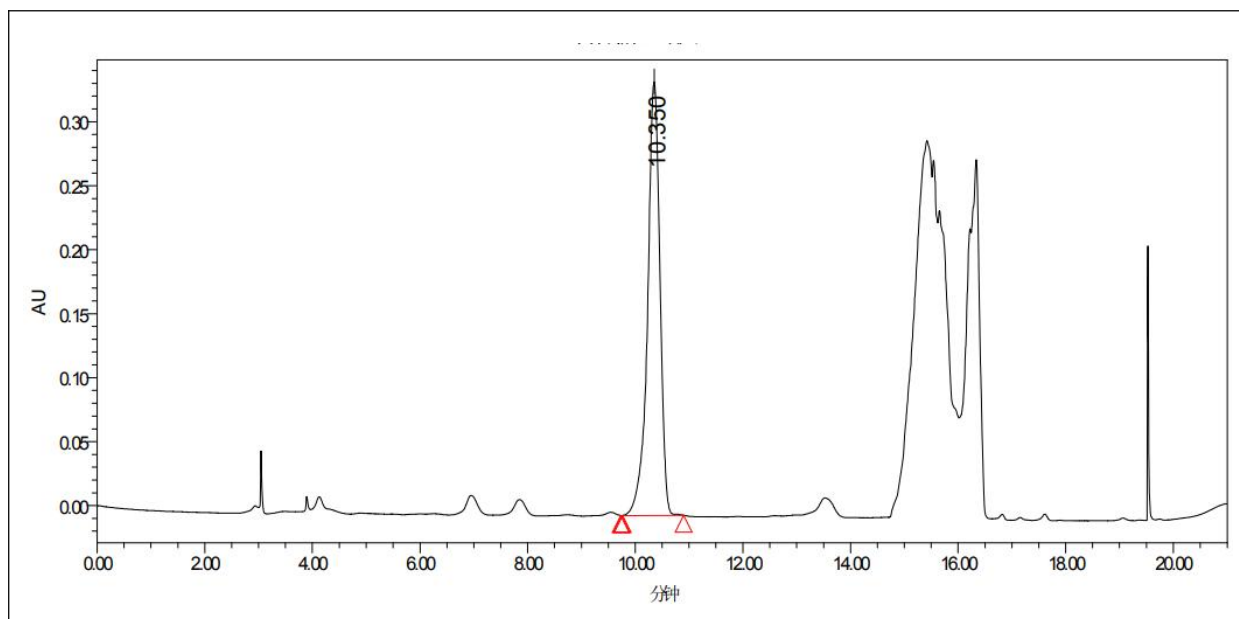












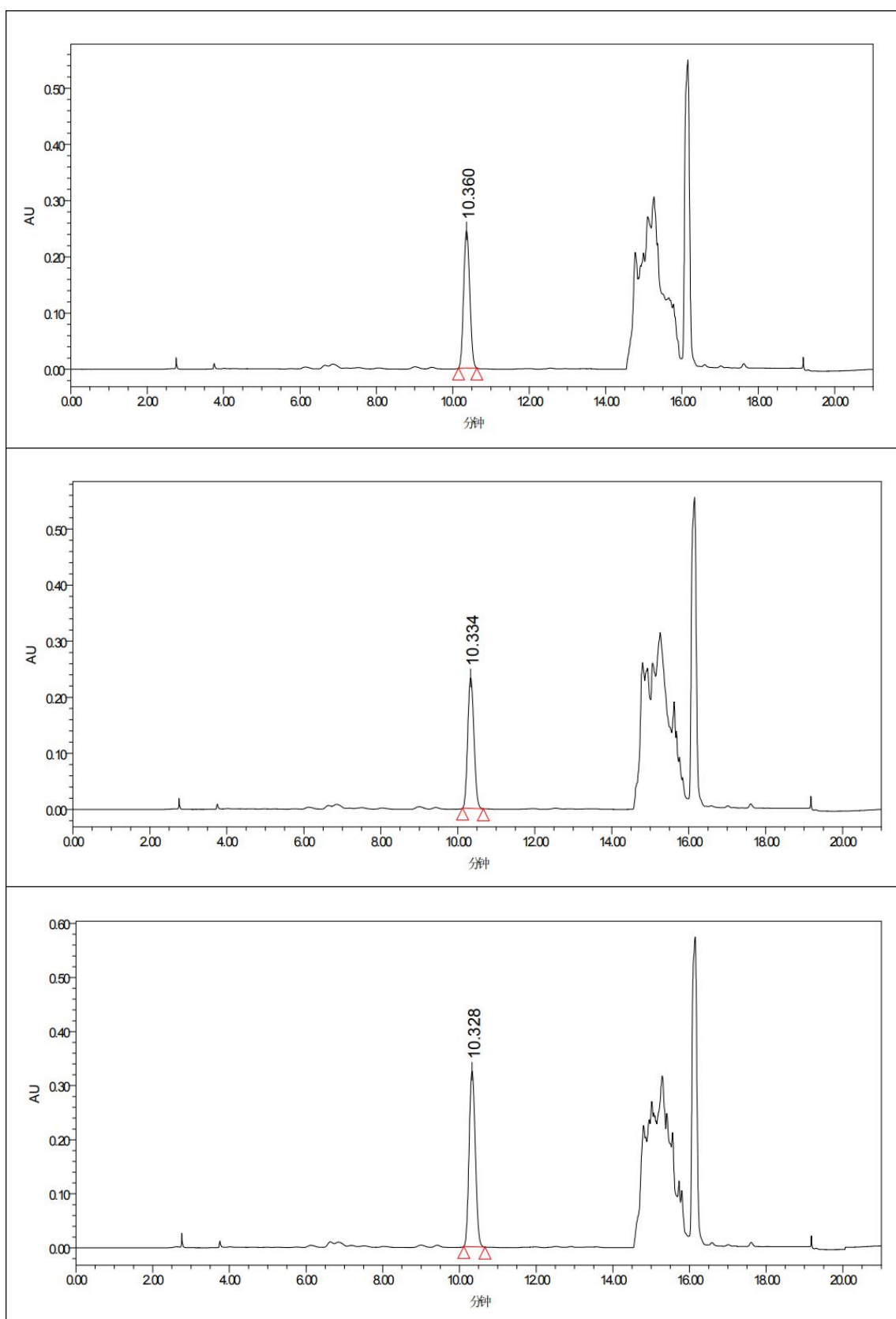
2.6.5 样品中獐牙菜苦苷含量测定

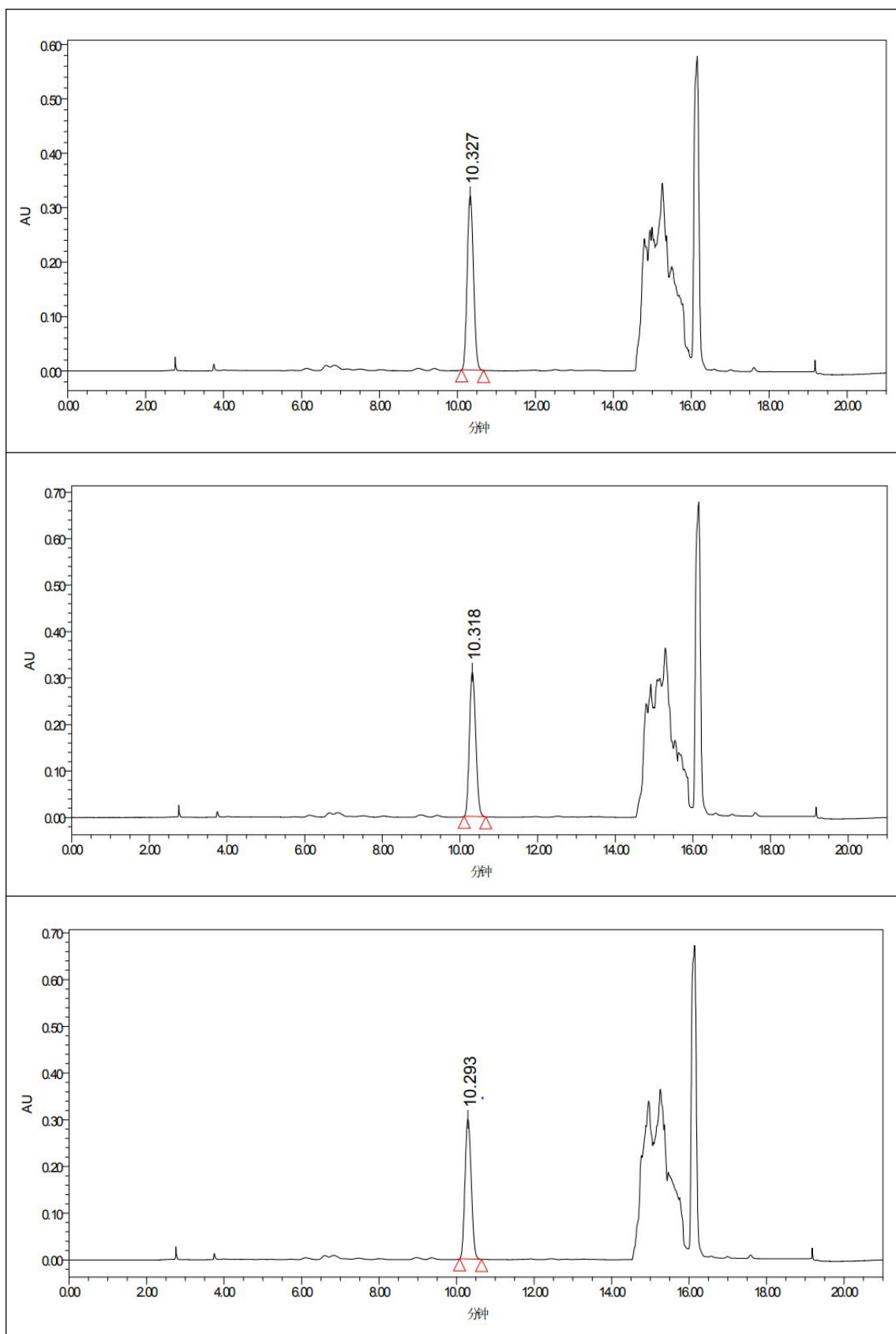
取轮叶獐牙菜 13 批，每批样品取 2 份，精密称定，每份 0.02g，分别按“2.6.3”项下方法制备供试品溶液，按“2.6.3”项色谱方法进样测定分别进样 10 μ l 进样测定，记录峰面积并计算样品含量，结果见表 2-25，图谱见附图 81-106。

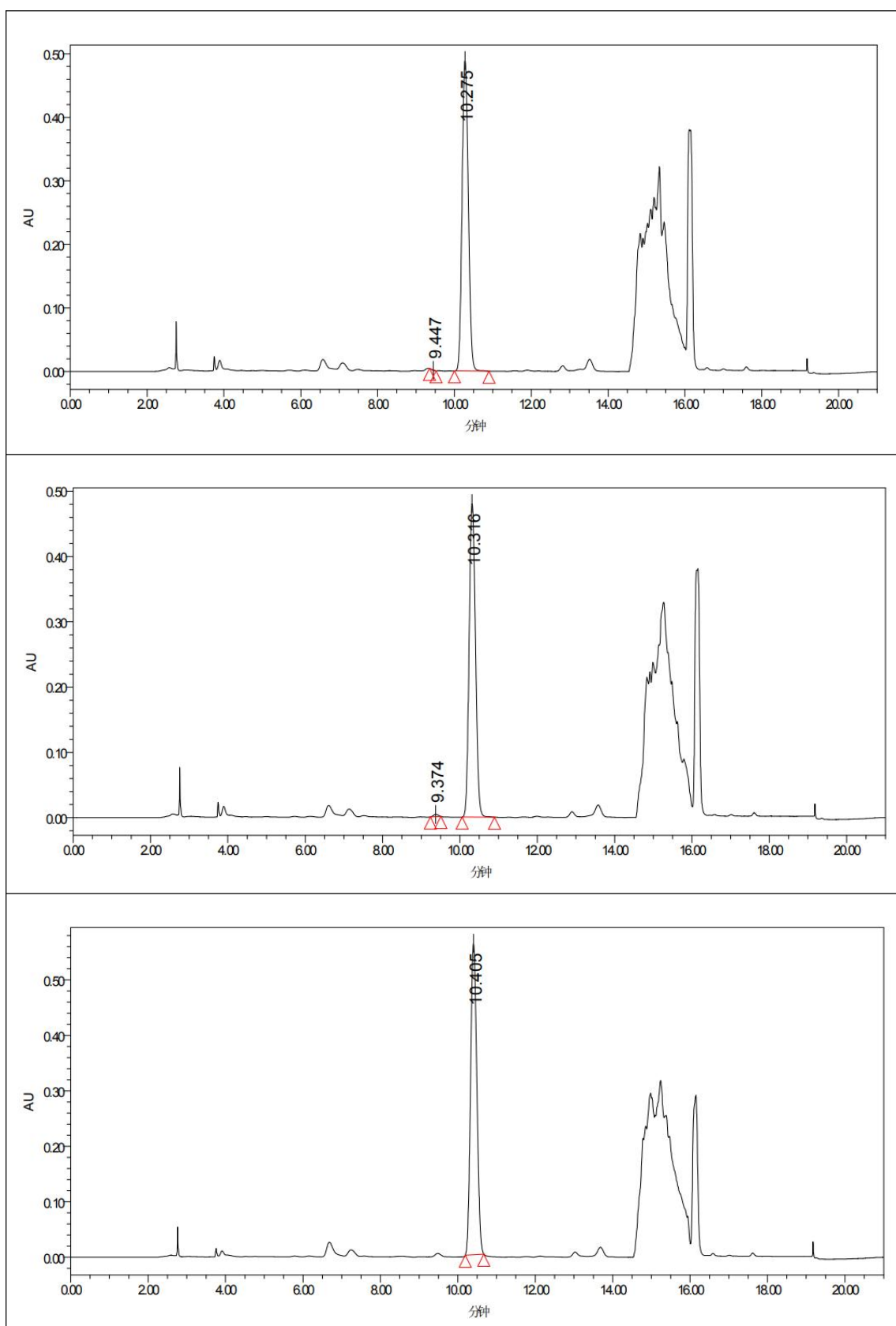
表 2-25 13 批轮叶獐牙菜獐牙菜苦苷含量测定结果 (n=26)

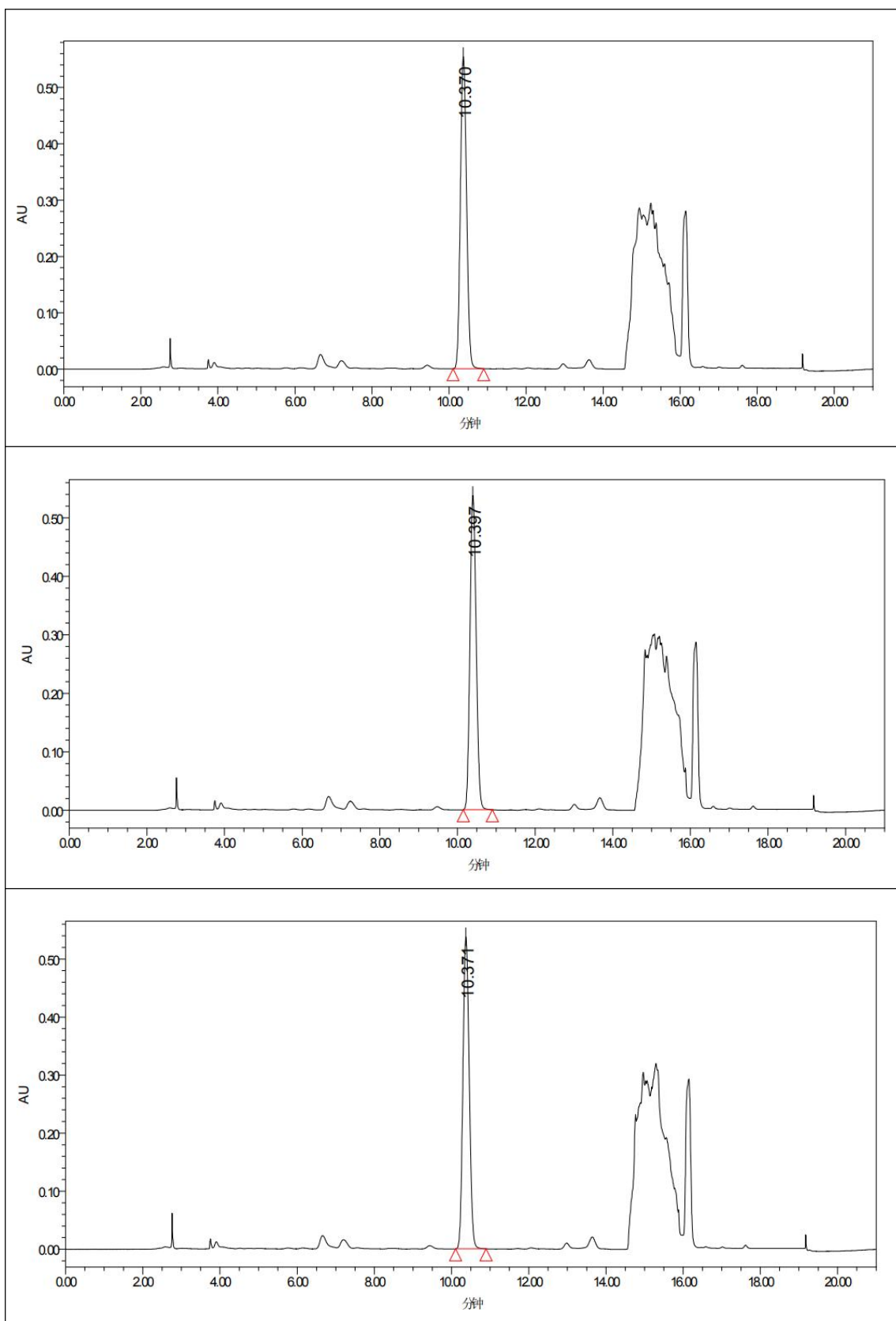
批次	产地	取样量 (g)	獐牙菜苦苷含量 (mg/g)	平均獐牙菜苦苷含量 (mg/g)	獐牙菜苦苷百分含量 (%)	平均獐牙菜苦苷百分含量 (%)
L-1-1	拉萨市堆龙德庆	0.02021	0.04901	0.04860	48.60148	4.86015
L-1-2	拉萨市堆龙德庆	0.02002	0.04820		65.83349	
L-2-1	拉萨市堆龙德庆	0.02013	0.06619	0.06583	62.05056	6.58335
L-2-2	拉萨市堆龙德庆	0.02006	0.06548		104.65182	
L-3-1	拉萨市堆龙德庆	0.02035	0.06267	0.06205	113.61205	6.20506
L-3-2	拉萨市堆龙德庆	0.02001	0.06144		110.79208	
R-1-1	西藏日喀则市	0.01971	0.10478	0.10465	10.47805	10.46518
R-1-2	西藏日喀则市	0.01965	0.10452		10.45232	
R-2-1	西藏日喀则市	0.02040	0.11393	0.11361	11.39318	11.36120
R-2-2	西藏日喀则市	0.02001	0.11329		11.32923	
R-3-1	西藏日喀则市	0.02019	0.10993	0.11079	10.99343	11.07921
R-3-2	西藏日喀则市	0.02025	0.11165		11.16499	
R-4-1	西藏日喀则市	0.02001	0.11698	0.11639	11.69754	11.63882
R-4-2	西藏日喀则市	0.01991	0.11580		11.58010	
R-5-1	西藏日喀则市	0.02035	0.11297	0.11285	11.29690	11.22400
R-5-2	西藏日喀则市	0.02001	0.11151		11.15110	
R-6-1	西藏日喀则市	0.02015	0.10887	0.10827	10.88695	10.82703
R-6-2	西藏日喀则市	0.02003	0.10767		10.76710	
R-7-1	西藏日喀则市	0.02026	0.11352	0.11285	11.35188	11.28528

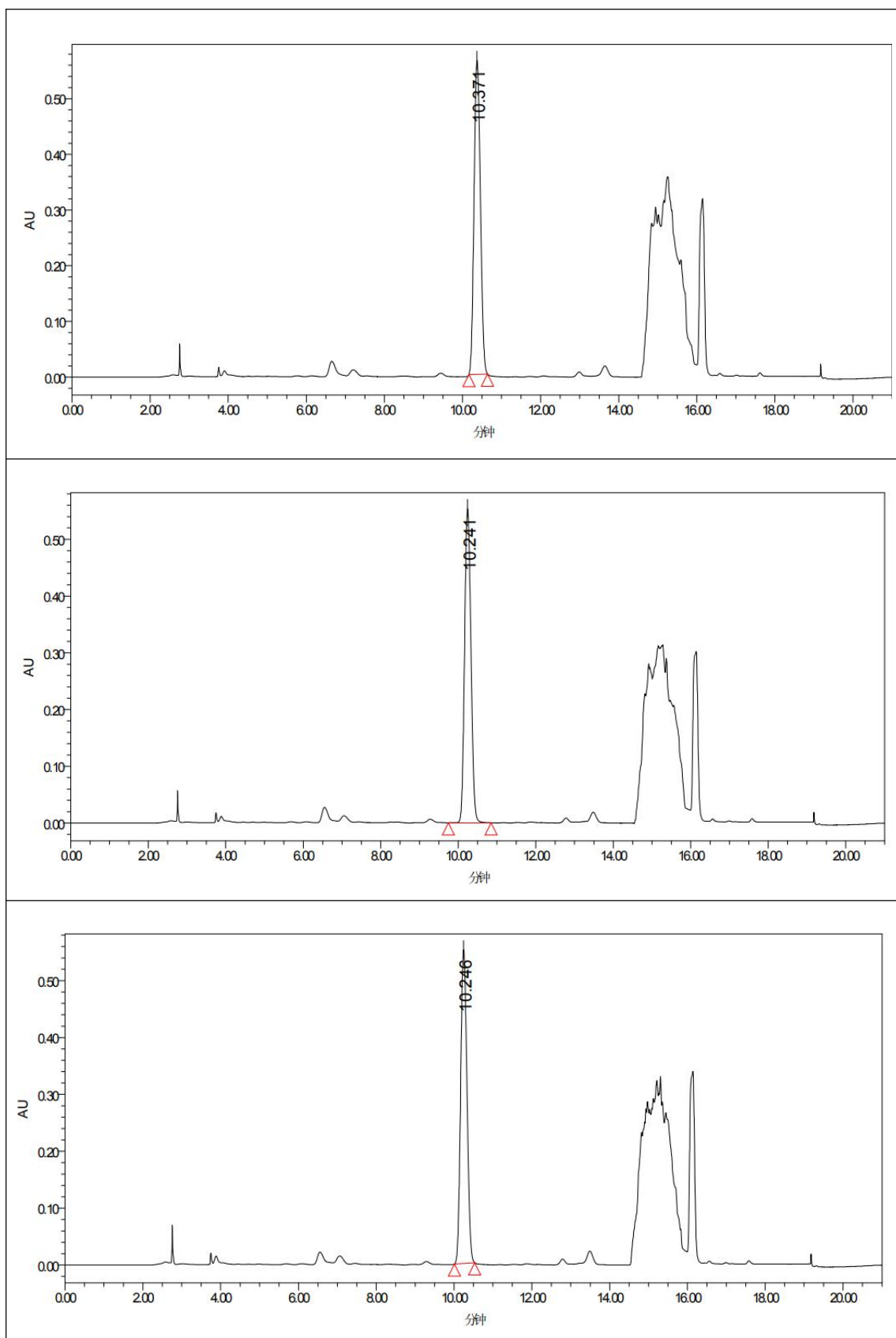
R-7-2	西藏日喀则市	0.02001	0.11219		11.21868	
R-8-1	西藏日喀则市	0.02032	0.10369		10.36891	
R-8-2	西藏日喀则市	0.02007	0.10240	0.10305	10.24031	10.30461
R-9-1	西藏日喀则市	0.02016	0.10801		10.80060	
R-9-2	西藏日喀则市	0.01999	0.10811	0.10806	10.81061	10.80560
R-10-1	西藏日喀则市	0.02022	0.11844		11.84421	
R-10-2	西藏日喀则市	0.02015	0.11744	0.11794	11.74383	11.79402

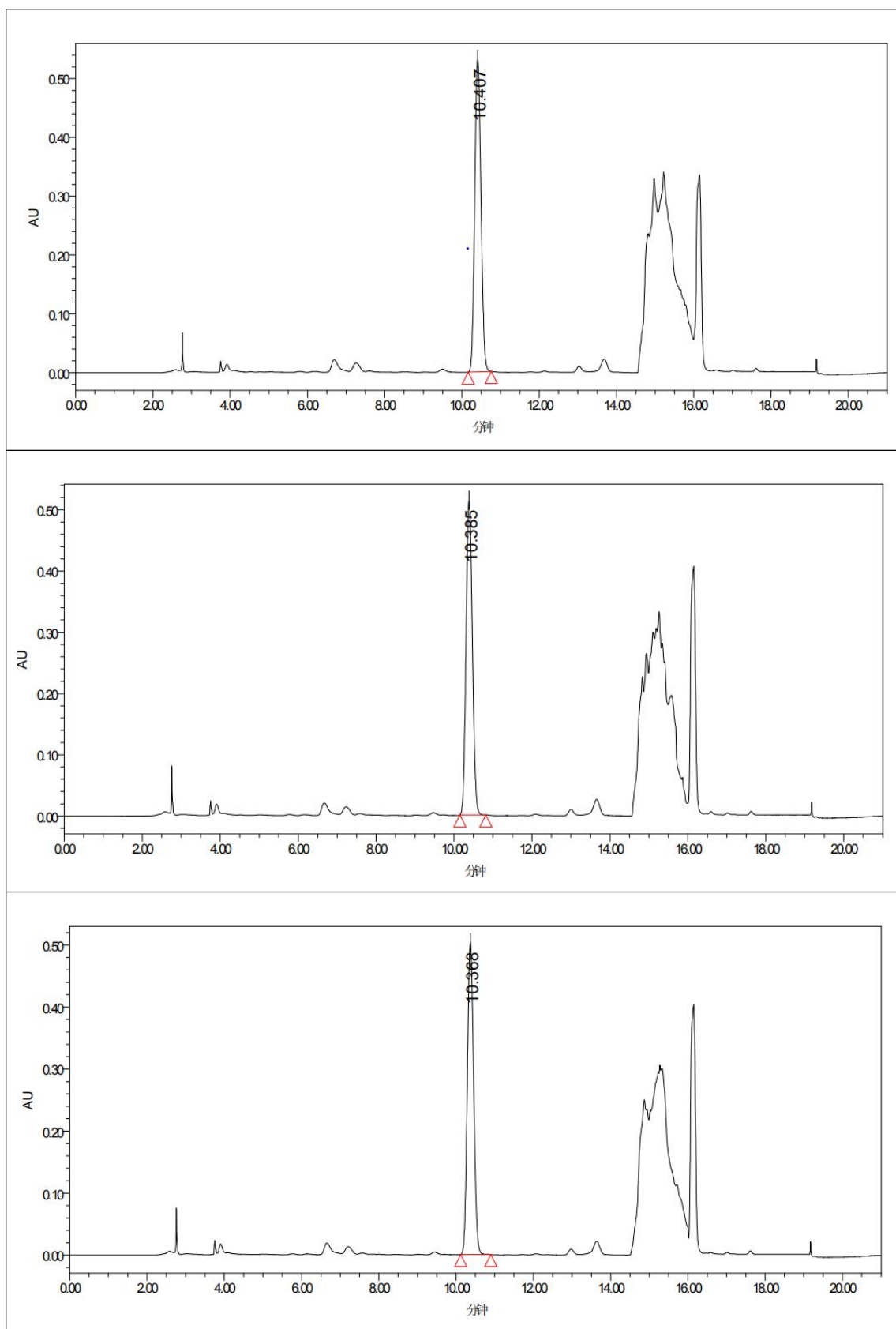


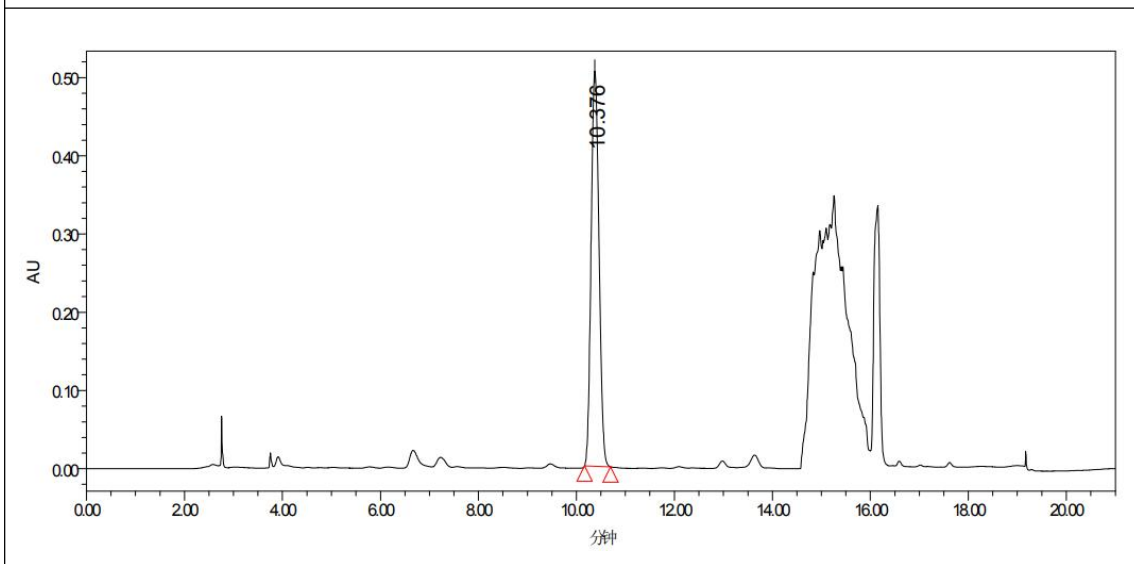
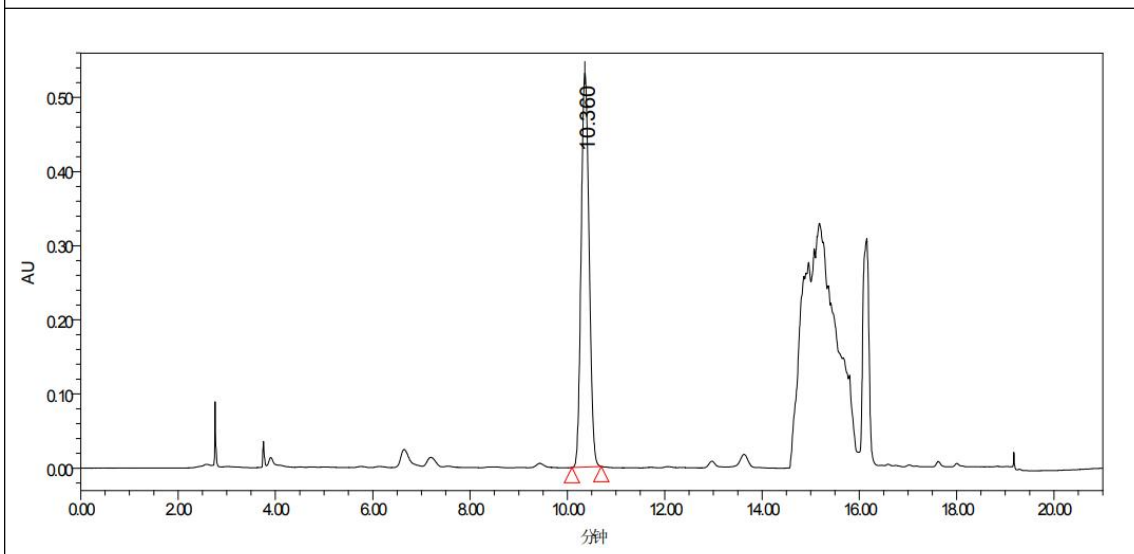
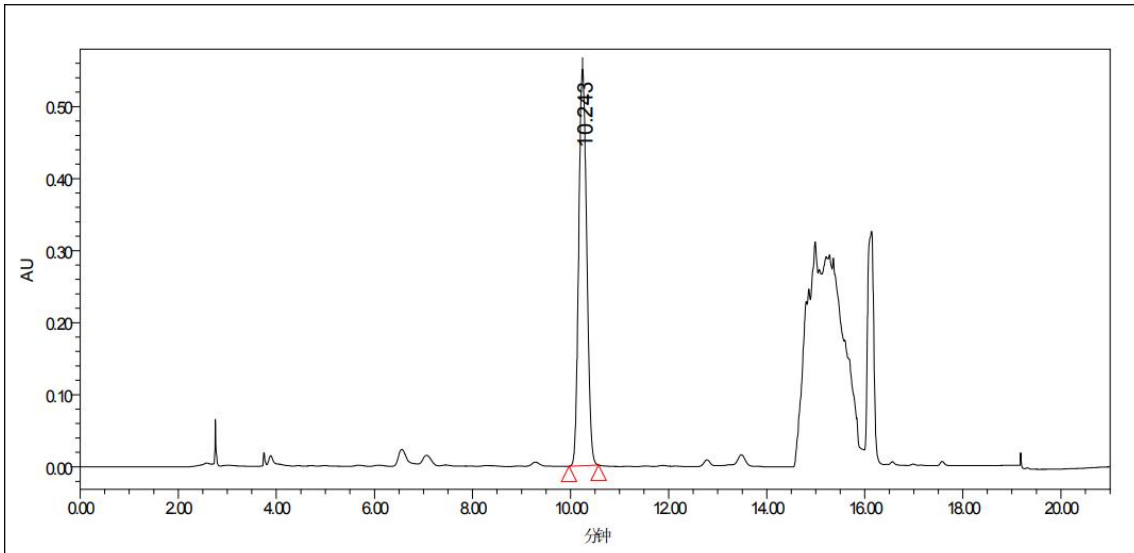


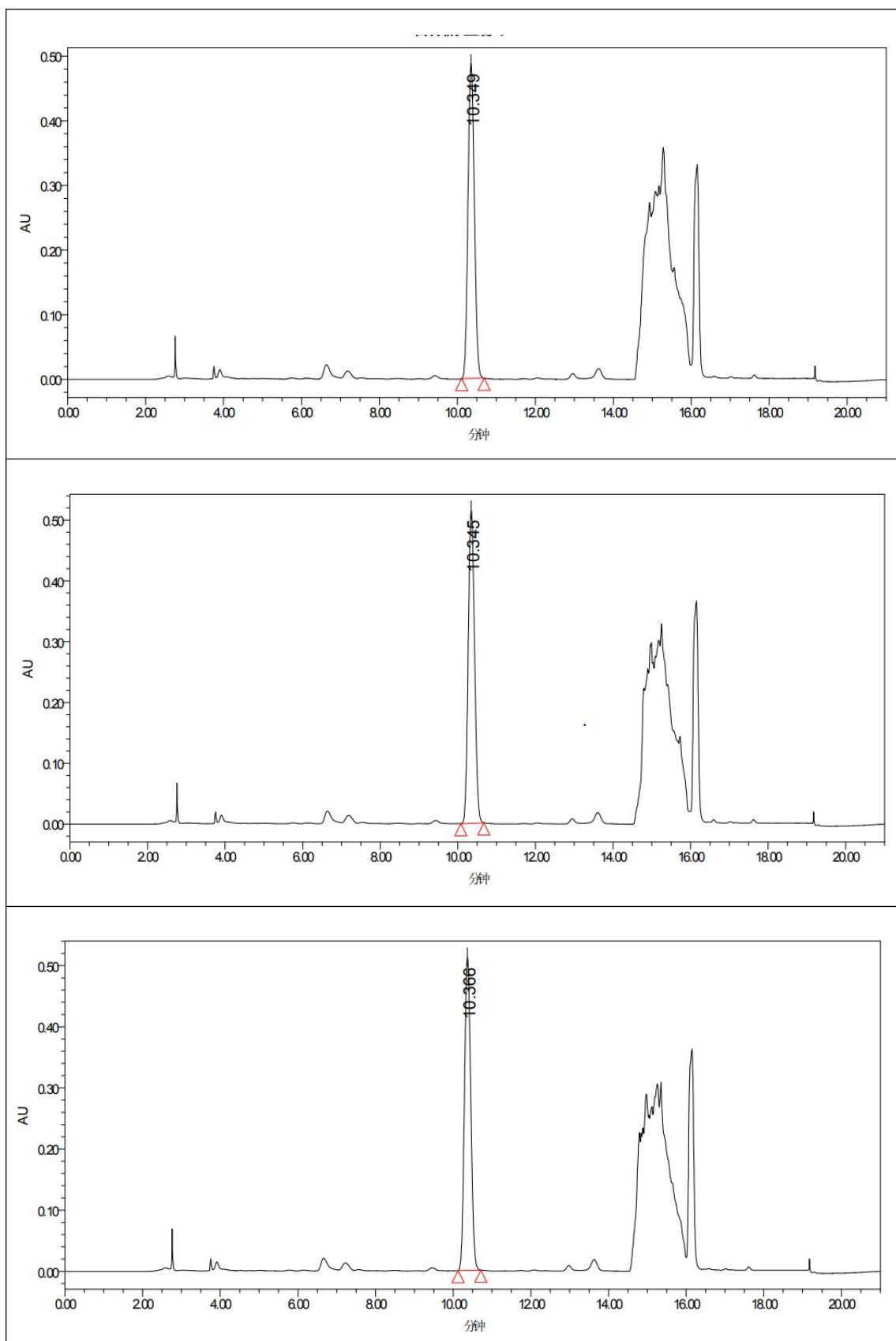


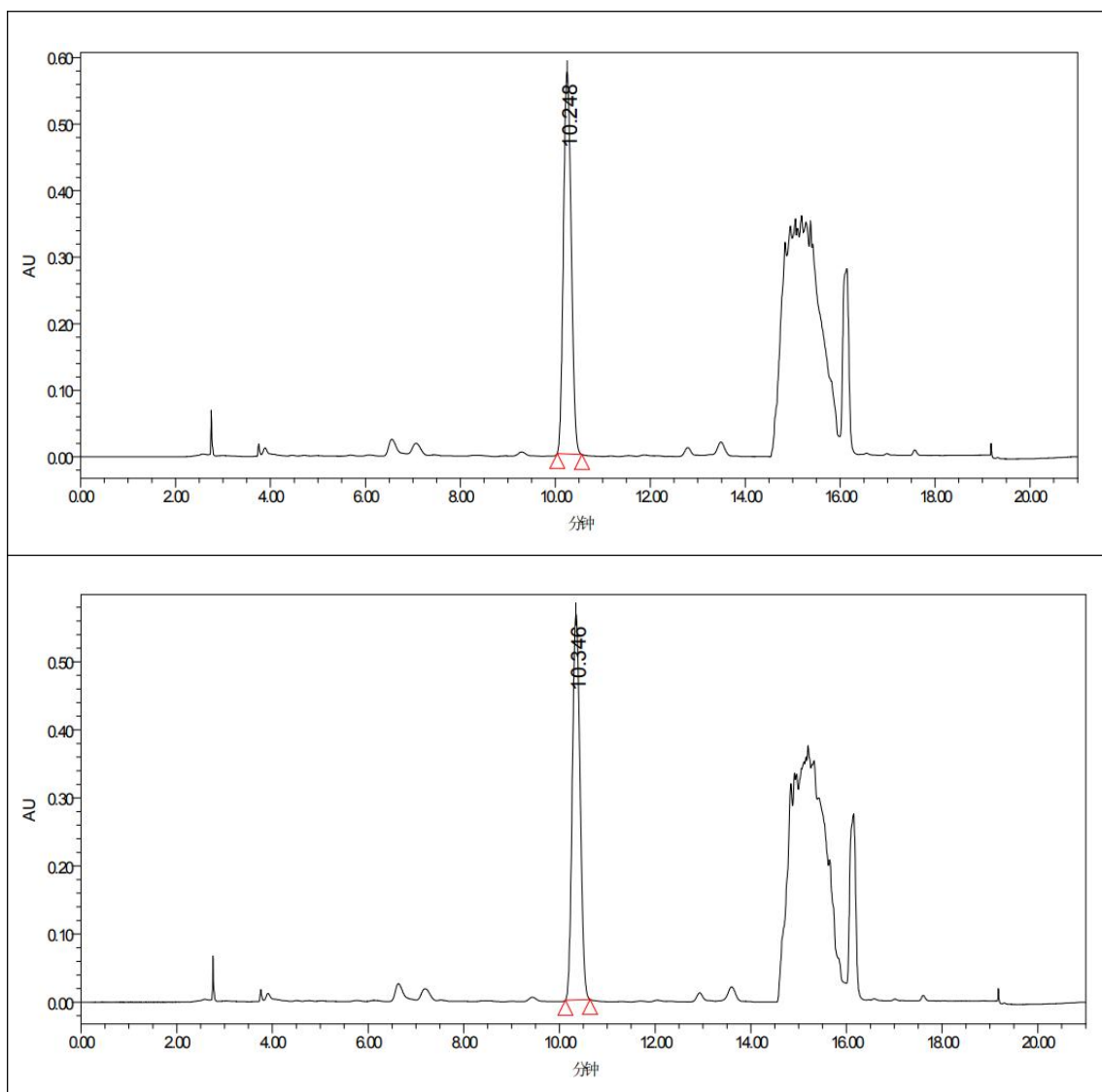












2.6.6 轮叶獐牙菜中獐牙菜苦苷限度的制定

13批轮叶獐牙菜獐牙菜苦苷进行测定，结果在4.86015%~11.79402%之间，平均含量为9.8795%，均值下浮20%，为7.9036%。由于轮

叶獐牙菜的产地不同，獐牙菜苦苷含量差异较大，其中拉萨市堆龙德庆3批样品中獐牙菜苦苷含量明显比西藏日喀则的10批样品低很多，导致拉萨市堆龙德庆3批样品的含量结果全部低于平均值。-根据上述结果暂定限度为：本品按干燥品计，每1g轮叶獐牙菜中含獐牙菜苦苷（ $C_{16}H_{22}O_{10}$ ）不得少于0.08g（8.0%）。

三、讨论与小结

本部分按《中国药典》2020版通则规定的方法，测定了西藏产地的13批

轮叶獐牙菜药材，积累了水分、灰分、酸不溶性灰分、浸出物等相关指标的数据，为制定上述项目合理的限量，有效控制药材外源异物提供依据。采用高效液相色谱法，测定轮叶獐牙菜中獐牙菜苦苷的含量，比较了不同品牌色谱柱对样品分离度的影响，实验结果表明，通过比较不同溶剂和不同提取方法，确定了样品以甲醇为提取溶剂，超声提取的效果较好。

【性味】根据藏医药理论和参考《晶珠本草》《藏药晶镜本草》等相关文献拟定。

【功能与主治】根据《四部医典大详解》《晶珠本草》《藏药晶镜本草》拟定。

【用法与用量】该药材主要用于仁青芒觉处方中，配方用或遵医嘱。

【贮藏】根据药物特性进行制定。

四、参考文献

- [1]帝玛尔·丹增彭措.晶珠本草[M].北京：民族出版社.1986-01： 289
- [2]嘎务. 藏药晶镜本草[M]. 北京: 民族出版社,2018： 209.
- [3]魏似婕, 赵志礼, 倪梁红, 吴靳荣, 高娜娜, 嘎务. 藏药“巴莪色保”基原鉴定及其叶绿体全基因组序列分析[J]. 药学学报, 2018, 53(6): 1009-1015.
- [4]廖志新, 胡伯林, 纪兰菊, 樊淑芬, 丁经业, 孙洪发. 轮叶獐牙菜的化学成分研究[J]. Journal of Integrative Plant Biology, 1991(12): 968-970.
- [5]王鑫, 陈雪晴, 尤蓉蓉, 鞠建明, 徐金娣, 范君婷, 周洪雷. 青叶胆化学成分的分析[J]. UPLC-ESI-Q-TOF-MS 分析[J]. 中草药, 2017, 48(3): 453-459.
- [6]许秀丽, 苏菊艳, 沈广志, 邹桂华. HPLC 测定青叶胆中獐牙菜苦苷含量[J]. 广州化工, 2019, 47(11): 96-97.
- [7]冯波, 朱鹤云, 关皎, 郝乘仪, 郭小存, 顾景凯. HPLC 同时测定龙胆中 4 种活性成分含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(13): 82-85.
- [8]朱鹤云, 关皎, 郭小存, 冯波. RP-HPLC 法同时测定龙胆中 3 种活性成分的含量[J]. 药物分析杂志, 2011, 31(12): 2298-2304.
- [9]关皎, 朱鹤云, 郝乘仪, 郭淑英, 冯波. UFLC 法同时测定龙胆中 3 种环烯醚萜苷的含量[J]. 中药新药与临床药理, 2017, 28(1): 81-84.