

## · 药物分析 ·

**HPLC-DAD 法对扶正平消胶囊中龙胆苦苷的含量研究**

姜云霞, 战 旗, 金柔男, 朱张超, 王 彬(上海东方肝胆外科医院药材科, 上海 200438)

**[摘要]** **目的** 建立用高效液相色谱法(HPLC)测定扶正平消胶囊中龙胆苦苷的含量测定方法,并将测定方法作为此制剂的质量控制指标。**方法** 采用 Agilent 1100 系列高效液相色谱仪,色谱柱 Agilent Zorbax XDB-C<sub>8</sub>(4.6 mm × 150 mm, 5 μm),流动相为甲醇-水(19:81),检测波长 275 nm,流速 1 ml/min,柱温为 25 °C。**结果** 龙胆苦苷含量在 4.88 ~ 97.60 μg/ml 的范围内线性关系良好,标准曲线方程为  $Y = 23.82X - 7.170$  ( $r = 0.9999$ );其中日内精密度  $RSD < 2\%$ ,日间精密度  $RSD < 3\%$ ,最低定量限为 0.244 μg/ml,回收率为 99.39%。**结论** 本法专属性强,灵敏度高,选择性好,可用于测定扶正平消胶囊中龙胆苦苷的含量。

**[关键词]** 高效液相色谱法;龙胆苦苷;扶正平消胶囊;质量标准

**[中图分类号]** R927.2 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2011)05-0376-03

**Determination of gentiopicrin in Fuzhengpingxiao capsule by HPLC-DAD**

JIANG Yun-xia, ZHAN Qi, JIN Rou-nan, ZHU Zhang-chao, WANG Bin(Department of Pharmacy, Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438, China)

**[Abstract]** **Objective** To develop a high performance liquid chromatograph method for determination of gentiopicrin in Fuzhengpingxiao capsule which could be used as a quality control indicator. **Methods** The separation was performed by 1100 series high performance liquid chromatograph, on an Agilent Zorbax XDB-C<sub>8</sub> column (4.6 mm × 150 mm, 5 μm), using the methanol-water (19:81) as the mobile phase, and the analysis was detected by UV spectrometry at 275 nm with flowing rate at 1 ml/min, the column temperature was 25 °C. **Results** The correlation coefficient of the calibration curve was better than 1 in the range 4.88 ~ 97.60 μg/ml and the calibration curve was  $Y = 23.82X - 7.170$ . The relative standard deviation ( $RSD$ ) of day to day precision was less than 3% and within-day precision was less than 2%. The lowest limit of quantification was 0.244 μg/ml. The sample recovery of Fuzhengpingxiao capsule was 99.39%. **Conclusions** This quantitative assay with better specificity, higher sensibility and could be used to determinate gentiopicrin in Fuzhengpingxiao capsule.

**[Key words]** HPLC; gentiopicrin; Fuzhengpingxiao capsule; quality standard

扶正平消胶囊是由黄芪、当归、全蝎、蜈蚣等二十八味中药组成的复方制剂。对于这二十八味中药大复方制剂,我院现有的质量标准中仅有黄芪、浙贝母及狼毒这三味药材的薄层鉴别,无法满足《中国药典》2010 版一部对于中药制剂的标准要求。因此为了提高医院制剂的质量标准,我们选择复方中比重最大的药材之一龙胆作为研究对象,进行含量测定方面的研究。

龙胆药材其化学成分含裂环烯醚萜苷类苦味成分(龙胆苦苷,当药苦苷,当药苷,苦龙胆酯苷,痕量苦当药酯苷),生物碱(龙胆碱)<sup>[1~3]</sup>。《中国药典》2010 版中将龙胆苦苷作为控制龙胆药材的指标,其中龙胆苦苷含量可高达 3.0%。其含量测定方法有多种,包括高效液相色谱法<sup>[4]</sup>,薄层色谱扫描法<sup>[5]</sup>,

液相色谱-串联质谱法<sup>[6]</sup>,毛细管电泳法<sup>[7]</sup>等。其中高效液相色谱法在中药制剂分析中具有较多优点,包括速度快,分辨率高,并且用一根色谱柱可分离不同的化合物并且可反复使用等等。因此,我们首先考虑使用高效液相色谱法对扶正平消中龙胆苦苷进行含量测定的研究。

**1 仪器和试剂**

**1.1 仪器** Agilent 1100 Series(安捷伦)高效液相色谱仪(G1379A 脱气阀,G1311A 泵,G1367A 进样器,G1316A 柱温箱,G1314A 紫外检测器),AE240 电子天平(德国梅特勒),SK2200H 型超声波清洗器(上海科导超声仪器有限公司)。

**1.2 试剂** 扶正平消胶囊由第二军医大学附属东方肝胆外科医院制剂室生产(批号:080901,081101,090101,090301,090801,091201),龙胆苦苷对照品购自中国药品生物制品检定所(110770-200712),无

**[作者简介]** 姜云霞(1980-),女,药师。

**[通讯作者]** 王 彬. E-mail:wbpanda223@163.com.

水乙醇、磷酸、甲醇等均为分析纯,流动相甲醇为色谱纯,水为娃哈哈纯净水。

## 2 方法和结果

**2.1 对照品溶液的制备** 精密称取龙胆苦苷对照品 6.1 mg,加 19% 甲醇溶解定容置 25 ml 量瓶中,配成浓度为 244  $\mu\text{g/ml}$  龙胆苦苷对照品母液。精密吸取上述对照品母液 10 ml,用 19% 甲醇稀释定容置 25 ml 量瓶中,得对照品母液浓度为 97.60  $\mu\text{g/ml}$ ,再分别精密吸取上述对照品母液 0.5、1、2、4、6、8 ml,用 19% 甲醇分别稀释定容置 10 ml 量瓶中,得对照品标准系列溶液,浓度依次为 4.88、9.76、19.52、39.04、58.56、78.08  $\mu\text{g/ml}$ 。

**2.2 供试品溶液的制备** 取扶正平消胶囊 10 粒的内容物,混匀,精密称定,加 40% 甲醇溶解定容置 50 ml 量瓶中,静置 12 h,超声 1 h,放冷,稀释至刻度,混匀,用微孔滤膜(0.22  $\mu\text{m}$ )滤过,取续滤液即得。

**2.3 色谱条件** 色谱柱 Agilent Zorbax XDB-C<sub>8</sub> (4.6 mm  $\times$  150 mm, 5  $\mu\text{m}$ ),流动相为甲醇-水(19 : 81),检测波长 275 nm,流速 1 ml/min,柱温为 25  $^{\circ}\text{C}$ ,进样量 20  $\mu\text{l}$ 。

**2.4 阴性供试品的制备及考察** 取处方量药材(全蝎、蜈蚣由厂家提取)加水回流提取 2 次,每次 2 h,水量分别为 10、8 倍量,过滤,得滤液;滤液浓缩至相对密度 1.1,加乙醇至乙醇终浓度为 60%,放置 24 h,过滤得滤液。合并全蝎、蜈蚣滤液,回收乙醇,浓缩,干燥,粉碎,过 120 目筛,即得阴性样品。按照供试品溶液的制备方法项下制备阴性样品溶液,20  $\mu\text{l}$  进样测定。样品图中目标峰后还有一小峰,通过计算得出其分离度  $R = 1.76$ ,符合色谱图分离要求。色谱图见图 1。

**2.5 线性关系的考察** 分别将不同浓度的对照品溶液依次连续进样,重复 5 次,以对照品溶液的浓度( $X$ ,  $\mu\text{g/ml}$ )对对照品的峰面积( $Y$ )进行线性回归。得到龙胆苦苷的回归方程为  $Y = 23.82X - 7.170$  ( $r = 0.9999$ ),在 4.88 ~ 97.60  $\mu\text{g/ml}$  之间的线性关系良好。以信噪比 10 : 1 确定最低定量限为 0.244  $\mu\text{g/ml}$ 。

### 2.6 精密度试验

**2.6.1 日内精密度** 取上述对照品溶液中的 4.88、39.04、97.60  $\mu\text{g/ml}$  3 个浓度各 20  $\mu\text{l}$  进样,早、中、晚各一次,记录各色谱峰的峰面积,计算得  $RSD$  值依次为 1.06%、1.47%、1.68%,日内精密度均小于 2%,符合检测要求。

**2.6.2 日间精密度** 取上述对照品溶液中的 4.88、39.04、97.6  $\mu\text{g/ml}$  3 个浓度各 20  $\mu\text{l}$  进样,连续

测定 5 d,记录各色谱峰的峰面积,计算得  $RSD$  值依次为 1.35%、1.55%、2.75%,日间精密度均小于 3%,符合检测要求。

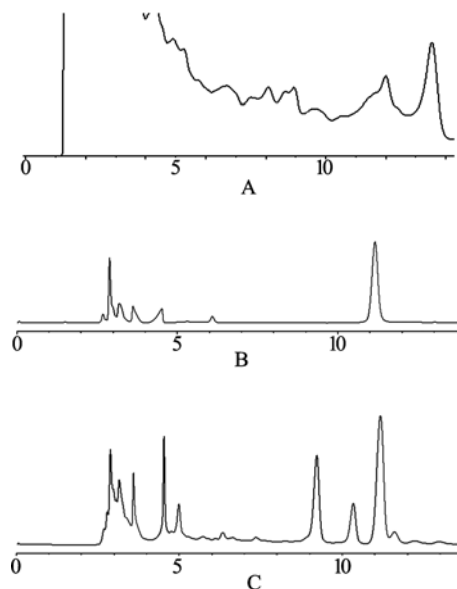


图 1 HPLC 色谱图

A-阴性供试品, B-对照品, C-样品; 1-龙胆苦苷

**2.7 回收率试验** 取 090301 批号扶正平消胶囊 10 粒,精密称定 2.528 40 g,加 40% 甲醇 49 ml 及 39.04  $\mu\text{g/ml}$  龙胆苦苷标准液 1 ml,静置 12 h,超声 1 h,静置,过滤即得。取 20  $\mu\text{l}$  进样,测定 4 次。结果显示样品加样回收率为 99.39%,在 95% ~ 105% 之间,符合检测要求。

**2.8 稳定性试验** 取对照品溶液 4.88、39.04、97.6  $\mu\text{g/ml}$  3 个浓度,分别于 0、12、24、48、72、96 h 进样 20  $\mu\text{l}$ ,测得峰面积,计算得  $RSD$  值依次为 1.47%、4.26%、3.87%。在符合要求的情况下,取相对回收率试验时配制的样品,于 0、12、24、48、72、96 h 进样 20  $\mu\text{l}$ ,结果得  $RSD$  值为 3.83%。结果显示,龙胆苦苷对照品及龙胆苦苷在扶正平消胶囊中含量在 96 h 内稳定。

## 3 讨论

**3.1 检测波长的选择** 文献检索发现潘利明等<sup>[4]</sup>将 270 nm 作为龙胆苦苷的最大吸收波长,而高言明等<sup>[7]</sup>使用 275 nm 作为最大吸收波长。本实验中,我们通过对对照品龙胆苦苷进行 DAD 测定,发现 275 nm 为最大吸收波长,光谱图见图 2。

**3.2 色谱柱的选择** 我们选择了几种不同的色谱柱进行考察,发现应用 XDB-C<sub>8</sub> (4.6 mm  $\times$  150 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) 有更好的效果,峰形有分离的趋势,且保留时

间良好。因此在此基础上进行进一步优化。

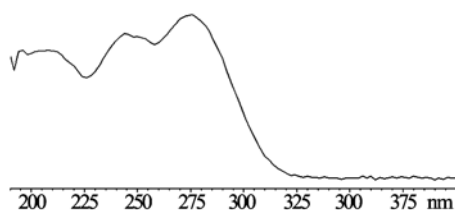


图 2 龙胆苦苷光谱图

**3.3 溶剂的选择** 我们选择了 100%、50%、19% 甲醇以及 100% 乙醇与纯水为溶剂溶解样品进行考察,分别进样,其中 50% 甲醇溶解较好。后又进样发现,50% 甲醇溶解时,有峰倾斜的现象,不利于定量分析,所以又尝试其他浓度甲醇溶解,最后发现 40% 甲醇溶解时,峰面积最高。具体结果见图 3。

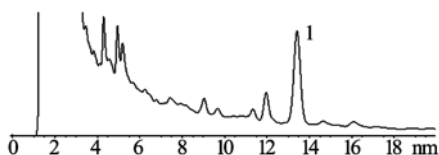


图 3 光谱图(40%甲醇为溶剂)  
1-龙胆苦苷

**3.4 流动相的选择** 通过实验研究,我们考察的范围为甲醇-水(25 : 75, 23 : 77, 21 : 79, 19 : 81),我们发现,随着甲醇比例的减少,分离度越来越高。当甲醇-水比例为 19 : 81 时,龙胆苦苷峰能与前一干扰峰完全分离,并且出峰时间在 15 min 内,符合分离度的要求。具体结果见表 1。

表 1 龙胆苦苷峰流动相甲醇-水比例与分离度的关系

甲醇-水	25 : 75	23 : 77	21 : 79	19 : 81
分离度	1.1	1.38	1.95	2.02

#### 4 样品测定

取不同批号的扶正平消胶囊按照供试品溶液配制方法制备供试品溶液,各取 20 μl 进样,每个样品重复 2 次。结果见表 2。

2010 版药典一部规定,龙胆药材中龙胆苦苷的含量应不低于 3.0%,同时根据龙胆药材占处方中比例计,龙胆苦苷理论含量应不低于 0.16 mg/粒;而测定结果显示只有 090101、090301 两批号符合此要求。同时批号 080901、081101 含量低于 0.16 mg/粒,我们怀疑是由于此制剂放置时间超

过 1 年半,有可能龙胆苦苷分解导致含量降低。批号 091201 中龙胆苦苷含量低于 0.16 mg/粒,我们怀疑有可能是更换了生产厂家,供应的药材与前一厂家不同,造成含量偏低。而批号 090101、090301 测定的含量大于 0.16 mg/粒,虽然其放置时间超过一年保质期。

表 2 样品中龙胆苦苷含量测定结果

样品批号	峰面积			浓度 C (μg/ml)	龙胆苦苷含量 (mg/粒)
	1	2	平均值		
080901	553.30	544.40	548.85	24.54	0.12
081101	671.90	671.30	671.60	24.14	0.14
090101	783.00	775.50	779.25	20.13	0.16
090301	1 327.90	1 346.20	1 337.05	56.46	0.28
091201	425.10	423.80	424.45	43.96	0.09

#### 5 结论

本法专属性强,灵敏度高,选择性好,可用于测定扶正平消胶囊中龙胆苦苷的含量。

#### 【参考文献】

- [1] Anonymous. Reports on phytotherapy findings from L. Y. Chen and co-researchers provide new insights[J]. Drug Week, 2010, 26(2):1658.
- [2] Anonymous. University of Liege details research in natural products[J]. Science Letter, 2009, 3(2):1830.
- [3] Anonymous. Study results from Northwest University, College of Life Science provide new insights into analgesics[J]. Pain & Central Nervous System Week, 2008, 11(8):314.
- [4] 潘利明. 金胆胶囊中龙胆苦苷的定性定量研究[J]. 广东药学院学报, 2008, 24(3):226.
- [5] 钟强,谢娇,潘洪. 双波长薄层扫描法测定泻胆丸中龙胆苦苷的含量[J]. 时珍国医国药, 2004, 15(7):393.
- [6] 冯怡,邓远辉,曾星,等. 液相色谱-串联质谱法测定人血浆中的龙胆苦苷浓度[J]. 药物分析杂志, 2007, 27(02):157.
- [7] 高言明,宋勤,陈惠玲,等. 高效毛细管电泳测定龙胆中龙胆苦苷的含量[J]. 药物分析杂志, 2007, 27(02):1572.
- [8] 中国药典 2010 版. 一部[S]. 2010:89.
- [9] 刘涛,韩立伟,黄学石,等. 紫外分光光度法测定龙胆软胶囊中总裂环烯醚萜苷的含量[J]. 中国医科大学学报, 2006, 35(4):388.
- [10] 白小红,杨雪,陈璇,等. 不同产地龙胆中龙胆苦苷的含量测定[J]. 沈阳药科大学学报, 2004, 21(2):114.
- [11] 陈国锋,高东雁,张文鑫,等. 龙胆苦苷的体外稳定性[J]. 复旦学报(医学版), 2008, 41(7):220.
- [12] 李莲芳,梁晓原,王扣. 龙胆中龙胆总苷的含量测定[J]. 云南中医学院学报, 2006, 29(5):9.

[收稿日期]2011-02-23

[修回日期]2011-06-21