

HPLC 法测定茺龙胶囊中马钱苷酸、山栀苷甲酯、6'-O-β-D-葡萄糖基龙胆苦苷、獐牙菜苦苷、龙胆苦苷、獐牙菜苷、异荛草苷和异牡荆黄素

翟欣¹, 田云², 肖会敏³, 王四旺⁴, 常瑛^{1*}

1. 西北妇女儿童医院 药剂科, 陕西 西安 710061

2. 陕西省肿瘤医院 药剂科, 陕西 西安 710061

3. 陕西含光生物科技有限公司, 陕西 西安 710032

4. 空军军医大学 药学院 药物研究所, 陕西 西安 710032

摘要: 目的 建立 HPLC 法同时测定茺龙胶囊中马钱苷酸、山栀苷甲酯、6'-O-β-D-葡萄糖基龙胆苦苷、獐牙菜苦苷、龙胆苦苷、獐牙菜苷、异荛草苷、异牡荆黄素的方法。方法 采用 Intersil C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-0.2%磷酸溶液, 梯度洗脱; 检测波长: 254 nm; 体积流量: 0.8 mL/min; 柱温: 25 °C; 进样量: 10 μL。结果 马钱苷酸、山栀苷甲酯、6'-O-β-D-葡萄糖基龙胆苦苷、獐牙菜苦苷、龙胆苦苷、獐牙菜苷、异荛草苷、异牡荆黄素分别在 21.20~2 120.00、3.20~320.00、15.00~1 500.00、5.10~51.00、39.00~3 900.00、4.20~420.00、2.20~220.00、1.10~110.00 μg/mL 与峰面积呈良好的线性关系; 平均回收率分别为 99.37%、97.28%、96.49%、99.37%、97.28%、96.49%、99.37%、97.28%, RSD 值分别为 1.64%、1.16%、1.85%、1.64%、1.16%、1.85%、1.64%、1.16%。结论 方法简便、重复性好, 结果准确可靠, 可为进一步完善茺龙胶囊的质量评价方法提供参考依据。

关键词: 茺龙胶囊; 马钱苷酸; 山栀苷甲酯; 6'-O-β-D-葡萄糖基龙胆苦苷; 獐牙菜苦苷; 龙胆苦苷; 獐牙菜苷; 异荛草苷; 异牡荆黄素; 高效液相色谱

中图分类号: R286.02

文献标志码: A

文章编号: 1674-5515(2022)09-1987-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2022.09.013

Determination of loganic acid, shanzhiside methyl ester, 6'-O-β-D-glucosylgentiopicroside, swertiamarin, gentiopicroside, sweroside, isoorientin, and isovitexin in Jiaolong Capsules by HPLC

ZHAI Xin¹, TIAN Yun², XIAO Hui-min³, WANG Si-wang⁴, CHANG Ying¹

1. Department of Pharmacy, Northwest Women's and Children's Hospital, Xi'an, 710061, China

2. Department of Pharmacy, Shaanxi Cancer Hospital, Xi'an, 710061, China

3. Shaanxi Hanguang Biotechnology Limited Company, Xi'an, 710032, China

4. Institute of Pharmaceutical Research, School of Pharmacy, Air Force Medical University of PLA, Xi'an, 710032, China

Abstract: Objective To develop an HPLC method for simultaneous determination of loganic acid, shanzhiside methyl ester, 6'-O-β-D-glucosylgentiopicroside, swertiamarin, gentiopicroside, sweroside, isoorientin, and isovitexin in Jiaolong Capsules. **Methods** The separation was carried out on Intersil C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm). The mobile phase was acetonitrile - 0.2% phosphoric acid solution with gradient elution. The detection wavelength was set at 254 nm. The volume flow was 0.8 mL/min, the column temperature was 25 °C, and the injection volume was 10 μL. **Results** Loganic acid, shanzhiside methyl ester, 6'-O-β-D-glucosylgentiopicroside, swertiamarin, gentiopicroside, sweroside, isoorientin, and isovitexin showed good linear relationships within the ranges of 21.20 — 2 120.00, 3.20 — 320.00, 15.00 — 1 500.00, 5.10 — 51.00, 39.00 — 3 900.00, 4.20 — 420.00, 2.20 — 220.00, 1.10 — 110.00 μg/mL, and their average recoveries were 99.37%, 97.28%, 96.49%, 99.37%, 97.28%, 96.49%, 99.37%, and 97.28% with RSD values of 1.64%, 1.16%, 1.85%, 1.64%, 1.16%, 1.85%, 1.64%, and 1.16%, respectively. **Conclusion** The method is simple,

收稿日期: 2022-04-28

基金项目: 陕西省科学技术研究发展计划项目 (2015SF2-08-01)

作者简介: 翟欣 (1993—), 女, 硕士, 研究方向为药物分析以及医院药学。E-mail: 810347045@qq.com

*通信作者: 常瑛 (1980—), 女, 副主任药师, 博士, 研究方向为药物分析以及医院药学。E-mail: 286834152@qq.com

reproducible, and the results are accurate and reliable, which can provide a reference for further improving the quality evaluation method of Jiaolong Capsules.

Key words: Jiaolong Capsules; loganic acid; shanzhiside methyl ester; 6'-O- β -D-glucosylgentiopicoside; swertiamarin; gentiopicoside; sweroside; isoorientin; isovitexin; HPLC

芫龙胶囊是从秦艽中提取的有效部位制成的促胃肠动力的中药制剂,由龙胆总苷组成,具有清肝泄热的功效^[1],主要用于功能性消化不良、肝损伤、胃溃疡等^[2-5]。文献报道了芫龙胶囊中的马钱苷酸、6'-O- β -D-葡萄糖基龙胆苦苷、獐芽菜苦苷和龙胆苦苷测定^[6],并且在《中国药典》2020 年版一部芫龙胶囊项下将龙胆苦苷作为唯一的质控指标^[1]。秦艽中化学成分虽已明确^[7],但制剂在制备时受到工艺的影响,因此需要对芫龙胶囊进行全面的主成分分析以保证制剂的有效性。本实验采用高效液相色谱法同时测定芫龙胶囊中 6 个环烯醚萜类、2 个黄酮类成分,为进一步完善芫龙胶囊的质量评价方法提供参考。

1 实验材料

Shimadzu LC-2010 CHT 型高效液相色谱仪(日本岛津); Sartorius CPA225D 型微量分析天平(德国 Sartorius); KQ-5200DE 数控超声波清洗器(昆山超声仪器有限公司); Milli-Q Academic 超纯水系统(德国 Merck Millipore)。

芫龙胶囊由西安正大制药有限公司提供,批号分别是 20210106、20210120、20210206、20210220、20210306、20210320、20210406、20210420、20210506、20210520。马钱苷酸(批号 111865-201403,质量分数 $\geq 94.7\%$)、山梔苷甲酯(批号 111873-201103,质量分数 $\geq 98.3\%$)、獐牙菜苦苷(批号 110785-201404,质量分数 $\geq 98.3\%$)、龙胆苦苷(批号 110770-201716,质量分数 $\geq 99.1\%$)、异荛草苷(批号 111974-201401,质量分数 $\geq 94.0\%$)对照品均购于中国食品药品检定研究院,6'-O- β -D-葡萄糖基龙胆苦苷(批号 20161102)、獐牙菜苷(批号 20161012)、异牡荆黄素(批号 20160908)对照品均购于上海盛中医药化工有限公司,质量分数 $\geq 98.0\%$ 。HPLC 级甲醇、乙腈(Honeywell); HPLC 级磷酸(天津红岩化学试剂厂)。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的制备

分别精密称取马钱苷酸、山梔苷甲酯、6'-O- β -D-葡萄糖基龙胆苦苷、獐牙菜苦苷、龙胆苦苷、獐牙菜苷、异荛草苷、异牡荆黄素对照品适量,置 10

mL 量瓶中,加甲醇溶解至刻度,摇匀,制成质量浓度分别为 2.12、0.32、1.50、0.51、3.90、0.42、0.22、0.11 mg/mL 的混合对照品溶液。

2.2 供试品溶液的制备

取 5 粒芫龙胶囊内容物,混合均匀,取 0.17 g,精密称定,置于 50 mL 量瓶中,加甲醇适量,超声处理(功率 250 kW、频率 40 kHz) 30 min,放凉后加甲醇至刻度,摇匀,静置,滤过,取续滤液过 0.45 μ m 微孔滤膜,即得。

2.3 色谱条件

Intersil C₁₈ 色谱柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m); 流动相:乙腈(A)-0.2%磷酸溶液(B),梯度洗脱(0~10 min, 5% $\rightarrow$ 15% A; 10~40 min, 15% $\rightarrow$ 18% A; 40~60 min, 18% $\rightarrow$ 45% A); 检测波长:254 nm; 体积流量:0.8 mL/min; 柱温:25 $^{\circ}$ C; 进样量:10 μ L。在芫龙胶囊供试品溶液的色谱中,与各对照品对应的吸收峰的理论板数均不低于 3 000。色谱图见图 1。

2.4 线性关系考察

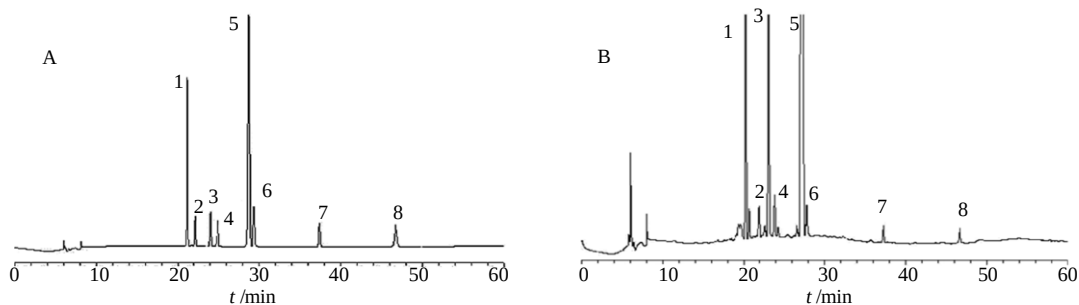
分别精密量取混合对照品溶液 0.01、0.05、0.10、0.25、0.50、1.00 mL,置于各个 1 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,用 0.22 μ m 微孔滤膜滤过,进样 10 μ L。以质量浓度为横坐标,峰面积值为纵坐标,绘制标准曲线,结果见表 1。

2.5 精密度试验

精密吸取混合对照品溶液 10 μ L,连续进样 6 次,测定峰面积,结果马钱苷酸、山梔苷甲酯、6'-O- β -D-葡萄糖基龙胆苦苷、獐牙菜苦苷、獐牙菜苷、异荛草苷、龙胆苦苷、异牡荆黄素峰面积的 RSD 值分别为 0.95%、0.93%、0.91%、0.76%、0.92%、0.75%、0.89%、0.85%。

2.6 稳定性试验

精密吸取批号 20210320 芫龙胶囊制备的供试品溶液 10 μ L,分别在 0、2、4、8、12、24 h 进样测定。结果马钱苷酸、山梔苷甲酯、6'-O- β -D-葡萄糖基龙胆苦苷、獐牙菜苦苷、龙胆苦苷、獐牙菜苷、异荛草苷和异牡荆黄素的峰面积 RSD 值分别为 0.82%、0.75%、0.77%、0.89%、0.92%、0.98%、0.84%、0.83%,表明该溶液在 24 h 内稳定性。



1-马钱苷酸 2-山栀苷甲酯 3-6'-O-β-D-葡萄糖基龙胆苦苷 4-獐牙菜苦苷 5-龙胆苦苷 6-獐牙菜苷 7-异荭草苷 8-异牡荆黄素
1-loganic acid 2-shanzhiside methyl ester 3-6'-O-β-D-glucosylgentiopicoside 4-swertiamarin 5-gentiopicoside 6-weroside 7-isoorientin 8-isovitexin

图 1 混合对照品 (A) 和 芫龙胶囊 (B) 的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of mixed reference substances (A) and Jiaolong Capsules (B)

表 1 8 个成分的线性方程、浓度范围

Table 1 Regression equation and limit of detection of quantitations of eight components

成分	线性方程	<i>r</i>	线性范围/(μg·mL ⁻¹)
马钱苷酸	$Y=7\,627\,902\,X-38\,372$	0.999 9	21.20~2 120.00
山栀苷甲酯	$Y=10\,011\,043\,X+1\,637$	0.999 8	3.20~320.00
6'-O-β-D-葡萄糖基龙胆苦苷	$Y=15\,490\,145\,X+5\,269$	0.999 7	15.00~1 500.00
獐牙菜苦苷	$Y=12\,246\,400\,X+13\,874$	0.999 9	5.10~51.00
龙胆苦苷	$Y=20\,600\,523\,X+57\,441$	0.999 9	39.00~3 900.00
獐牙菜苷	$Y=19\,578\,052\,X+12\,020$	0.999 7	4.20~420.00
异荭草苷	$Y=48\,662\,616\,X+36\,527$	0.999 9	2.20~220.00
异牡荆黄素	$Y=32\,321\,287\,X+3\,545$	0.999 7	1.10~110.00

2.7 重复性试验

精密称取批号 20210320 芫龙胶囊样品 6 份, 分别制备供试品溶液, 进样测定。结果马钱苷酸、山栀苷甲酯、6'-O-β-D-葡萄糖基龙胆苦苷、獐牙菜苦苷、龙胆苦苷、獐牙菜苷、异荭草苷、异牡荆黄素平均质量分数分别为 104.280、7.118、49.399、8.346、483.801、5.131、0.892、0.603 mg/g, RSD 值分别为 1.22%、1.14%、1.00%、1.32%、1.21%、0.97%、0.98%、1.25%。

2.8 回收率试验

分别精密量取批号 20210320 芫龙胶囊样品 0.17 g, 各 6 份, 精密加入 1.8 mg/mL 马钱苷酸、0.12 mg/mL 山栀苷甲酯、0.085 mg/mL 6'-O-β-D-葡萄糖基龙胆苦苷、0.14 mg/mL 獐牙菜苦苷、8.3 mg/mL 龙胆苦苷、0.088 mg/mL 獐牙菜苷、0.015 mg/mL 异荭草苷、0.01 mg/mL 异牡荆黄素对照品溶液 0.8、1.0、1.2 mL 于各 2 组中, 制备供试品溶液,

进样 10 μL 进行测定。结果马钱苷酸、山栀苷甲酯、6'-O-β-D-葡萄糖基龙胆苦苷、獐牙菜苦苷、龙胆苦苷、獐牙菜苷、异荭草苷、异牡荆黄素平均回收率分别为 99.37%、97.28%、96.49%、99.37%、97.28%、96.49%、99.37%、97.28%, RSD 值分别为 1.64%、1.16%、1.85%、1.64%、1.16%、1.85%、1.64%、1.16% ($n=6$)。

2.9 样品测定

精密量取 10 批芫龙胶囊样品, 分别制备供试品溶液, 进样测定, 采用标准曲线法计算各批样品中马钱苷酸、山栀苷甲酯、6'-O-β-D-葡萄糖基龙胆苦苷、獐牙菜苦苷、龙胆苦苷、獐牙菜苷、异荭草苷、异牡荆黄素的质量分数, 结果见表 2。

3 讨论

3.1 检测波长的选择

采用 PDA 检测器对芫龙胶囊样品进行全波长测定, 依据三维色谱图及对应波长下峰面积的信息

表 2 芩龙胶囊中马钱苷酸、山柰苷甲酯、6'-O-β-D-葡萄糖基龙胆苦苷、獐牙菜苦苷、龙胆苦苷、獐牙菜苷、异荭草苷、异牡荆黄素的测定结果 (n=3)

Table 2 Content of loganic acid, shanzhiside methyl ester, 6'-O-β-D-glucosylgentiopicroside, swertiamarin, gentiopicroside, sweroside, isoorientin, and isovitexin in Jiaolong Capsules (n=3)

批次	质量分数/(mg·g ⁻¹)							
	马钱苷酸	山柰苷甲酯	6'-O-β-D-葡萄糖基龙胆苦苷	獐牙菜苦苷	龙胆苦苷	獐牙菜苷	异荭草苷	异牡荆黄素
20210106	104.280	7.118	49.399	8.346	483.801	5.131	0.892	0.603
20210120	103.924	7.231	50.002	8.213	490.652	5.042	0.872	0.612
20210206	104.736	7.178	49.124	8.392	483.451	5.012	0.901	0.591
20210220	103.265	7.159	49.322	8.283	483.913	5.153	0.872	0.612
20210306	105.247	7.128	49.435	8.312	477.113	5.214	0.902	0.614
20210320	102.335	7.313	48.665	8.264	482.012	5.210	0.864	0.625
20210406	104.119	7.131	49.424	8.375	491.877	5.196	0.885	0.597
20210420	105.101	7.132	49.456	8.123	475.865	5.123	0.873	0.613
20210506	105.576	7.135	48.635	8.403	482.118	5.069	0.896	0.621
20210520	104.788	7.175	49.449	8.325	486.802	5.092	0.888	0.595

量^[8], 结果 254 nm 时信息量较多, 且各成分的峰面积最大, 同时马钱苷酸、山柰苷甲酯、6'-O-β-D-葡萄糖基龙胆苦苷、獐牙菜苦苷、龙胆苦苷、獐牙菜苷、异荭草苷和异牡荆黄素 8 个成分与相邻各峰有良好的分离度, 故选择 254 nm 作为 8 个成分的检测波长。

3.2 提取方式的选择

本制剂主要为 80%乙醇提取物, 所以使用甲醇作为溶剂, 提取方法参考相关文献报道^[9-10], 采用不同时间 (10、15、20、30、40、50、60 min) 浸泡、超声处理或加热回流, 结果甲醇超声 30 min 提取效率最高。

3.3 色谱柱的选择^[11]

比较了不同色谱柱 Intersil C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm)、Kromasil C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm)、Diamondsil C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm)、Waters C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm)、Agilent (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 通过比较, 结果 Intersil C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 的色谱柱柱效和各目标峰分离度良好。

3.4 流动相的优化

由于中药复方中成分复杂, 等度洗脱难以充分洗脱, 所以采用梯度洗脱的方法^[12]。对不同流动相系统乙腈-磷酸水溶液、甲醇-水、乙腈-醋酸水溶液、乙腈-水进行比较, 结果乙腈-0.2%磷酸水

溶液流动相的色谱峰峰形和分离效果最佳。

本研究建立了 HPLC 法同时测定芩龙胶囊中马钱苷酸、山柰苷甲酯、6'-O-β-D-葡萄糖基龙胆苦苷、獐牙菜苦苷、龙胆苦苷、獐牙菜苷、异荭草苷和异牡荆黄素 8 个成分的方法, 方法简便、重复性好, 结果准确可靠, 可为进一步完善芩龙胶囊的质量评价方法提供参考依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国药典 [S].一部. 2020: 798.
- [2] 张振山, 宗伟. 乳酸菌素片联合芩龙胶囊治疗功能性消化不良的疗效观察 [J]. 现代药物与临床, 2019, 34(11): 3323-3328.
- [3] 张苏, 杨锡燕. 芩龙胶囊治疗功能性消化不良的 Meta 分析 [J]. 湖南中医杂志, 2021, 37(3): 137-140.
- [4] 肖会敏, 何悦, 常瑛, 等. 芩龙胶囊对伴刀豆蛋白致小鼠急性肝损伤的保护与机制研究 [J]. 西北药学杂志, 2020, 35(2): 220-223.
- [5] 陈贵娥, 唐天乐, 唐源, 等. 芩龙胶囊对大鼠急性胃溃疡的保护作用及机制研究 [J]. 贵州医药, 2021, 45(7): 1030-1033.
- [6] 肖会敏, 何悦, 雷美娜, 等. 芩龙胶囊制备中 4 种主化学成分转移率研究 [J]. 西北药学杂志, 2019, 34(1): 1-5.
- [7] 杨飞霞, 王玉, 夏鹏飞, 等. 秦艽化学成分和药理作用研究进展及质量标志物(Q-marker)的预测分析 [J]. 中草药, 2020, 51(10): 2718-2731.

- [8] Carvalho M G, Arago C F S, Raffin F N, *et al.* Development and validation of a simultaneous RP-HPLC/UV/ DAD method for determination of polyphenols in gels containing *S. terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae) [J]. *Pharmacogn Mag*, 2017, 13(50): 309-315.
- [9] 张枫. 中药提取工艺对药品质量的影响分析 [J]. 临床医药文献电子杂志, 2020, 7(35): 196.
- [10] 丁艳霞, 王晓琴, 杨倩. HPLC-DAD 双波长法同时测定小秦艽花中 5 个成分的含量 [J]. 药物分析杂志, 2020, 40(2): 227-231.
- [11] Ding W, Wang H, Zhou Q, *et al.* Establishment and application of a new HPLC qualitative and quantitative assay for *Gentiana Macrophyllae Radix* based on characteristic constituents of anofinic acid and its derivatives [J]. *Biomed Chromatogr*, 2018, 43(2): 41-43.
- [12] Li S, Xie X, Li D, *et al.* Simultaneous determination and tissue distribution studies of four phenolic acids in rat tissue by UF LC-MS/MS after intravenous administration of salvianolic acid for injection [J]. *Biomed Chromatogr*, 2018, 32(3): 56-63.

[责任编辑 解学星]