

## HPLC 法测定龙胆泻肝丸中龙胆苦苷、黄芩苷和栀子苷

郝 福<sup>1</sup>, 蒋 晔<sup>1\*</sup>, 李艳荣<sup>1</sup>, 丁翔宇<sup>1</sup>, 胡丽英<sup>2</sup>

(1. 河北医科大学药学院, 河北 石家庄 050017; 2. 河北大安制药有限公司, 河北 石家庄 050081)

龙胆泻肝丸由龙胆泻肝汤进行剂型改进而来, 主要由龙胆草、黄芩、栀子等药味组成, 具有泻肝胆实火, 清下焦湿热的功效。《中国药典》2005 年版只对龙胆泻肝丸君药龙胆草的主要成分龙胆苦苷进行了定量测定, 臣药黄芩、栀子主要成分的测定方法已有文献报道<sup>[1~4]</sup>。复方中药多指标的同时测定不但可以节约分析成本, 减少分析误差, 而且更重要的是它可以直接反映药品的质量。本实验建立了 RP-HPLC 法同时测定龙胆泻肝丸中龙胆苦苷、黄芩苷、栀子苷 3 种指标成分, 该方法专属性好、灵敏度高、结果准确, 可更好地表征该丸内在质量。

### 1 仪器与试剂

液相色谱仪系统包括: Hitachi L-6200A 泵(日本), Applied Biosystems 785A 检测器(美国), HW 色谱工作站(南京千谱软件有限公司)。

龙胆苦苷对照品(中国药品生物制品检定所, 批号 110770-200308); 黄芩苷对照品(中国药品生物制品检定所, 批号 110715-200212); 栀子苷对照品(中国药品生物制品检定所, 批号 110749-200309); 龙胆泻肝丸(石家庄市海天药业有限公司); 乙腈为色谱纯; 冰醋酸为分析纯; 水为双蒸水。

### 2 方法与结果

2.1 色谱条件: 色谱柱 Hypersil C<sub>18</sub> (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈(A)-1%冰醋酸水溶液(B), 梯度洗脱: 0~7 min, 16%A; 7~16 min, 16%~45%A; 16~19 min, 45%A; 体积流量: 1.0 mL/min; 检测波长: 254 nm; 柱温: 室温; 进样量: 20 μL。

2.2 线性关系考察: 精密称取栀子苷对照品、龙胆苦苷对照品和黄芩苷对照品适量, 以甲醇为溶剂, 配制混合对照品溶液, 其中含栀子苷 147 μg/mL、龙胆苦苷 290 μg/mL、黄芩苷 268 μg/mL。用倍比稀释法配制成系列质量浓度的溶液。进样 20 μL, 测定各组分峰面积。以各组分质量浓度(C)为横坐标, 相应峰面积(A)为纵坐标, 绘制标准曲线, 得回归方程。栀子苷:  $A = 1.22 \times 10^4 C + 1.13 \times 10^3$ ,  $r = 0.999 9$ , 线

性范围: 4.60~147 μg/mL; 龙胆苦苷:  $A = 1.08 \times 10^4 C + 4.45 \times 10^3$ ,  $r = 0.999 9$ , 线性范围: 9.05~290 μg/mL; 黄芩苷:  $A = 1.65 \times 10^4 C + 1.29 \times 10^3$ ,  $r = 0.999 9$ , 线性范围: 8.40~268 μg/mL。

2.3 供试品溶液的制备: 取本品, 研细, 取细粉约 0.5 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 25 mL, 密塞, 称定质量, 超声处理 40 min, 放冷, 再称定质量, 用甲醇补足减失质量, 摇匀, 然后用 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液作为供试品溶液。

2.4 阴性对照溶液的制备: 取粉碎过筛且混合均匀的各药材粉末适量, 按照龙胆泻肝丸的配伍比例, 分别制备缺栀子、龙胆草、黄芩的龙胆泻肝丸阴性对照, 按照供试品溶液的制备方法制备阴性对照溶液。

2.5 系统适用性试验: 分别取混合对照品溶液、供试品溶液、阴性对照溶液注入色谱仪, 色谱图见图 1。在该色谱条件下, 栀子苷峰和龙胆苦苷峰分离度大于 1.8, 黄芩苷峰与相邻组分峰分离度均大于 2.0。理论板数以龙胆苦苷峰计不低于 4 600, 阴性样品在与对照品色谱峰相应的位置上无吸收峰, 表明处方中的其他成分对测定结果无影响。

2.6 精密度试验: 精密吸取同一供试品溶液 20 μL, 按上述色谱条件进样, 测定栀子苷、龙胆苦苷和黄芩苷的峰面积, 连续进样 6 次, 其 RSD 分别为 0.78%、0.56%、0.62%。

2.7 重现性试验: 取同一批样品 0.5 g, 共 6 份, 精密称定, 分别制备供试品溶液, 各进样 20 μL, 测定栀子苷、龙胆苦苷和黄芩苷的质量分数, 其 RSD 分别为 1.1%、0.80%、0.76%。

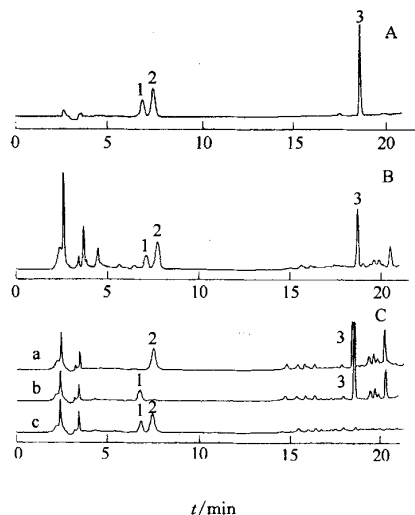
2.8 稳定性试验: 取同一供试品溶液, 分别在 0、2、4、6、8、12 h 进样 20 μL, 记录色谱峰面积, 计算栀子苷、龙胆苦苷和黄芩苷色谱峰面积的 RSD 分别为 0.80%、0.75%、0.90%。

2.9 加样回收率试验: 取已测定栀子苷、龙胆苦苷和黄芩苷的龙胆泻肝丸(批号 20050701)样品 6 份, 每份 0.25 g, 精密称定, 每份分别精密加入 501

收稿日期: 2006-02-12

作者简介: 郝 福(1979—), 男, 山西大同人, 硕士研究生, 研究方向为中药质量研究及控制。

\* 通讯作者 蒋 晔 Tel: (0311)86266069 E-mail: jiangye@hebm. edu. cn



1- 栀子苷 2- 龙胆苦苷 3- 黄芩苷  
1- geniposide 2- gentiopicrin 3- baicalin

图 1 混合对照品(A)、龙胆泻肝丸(B)和阴性对照(C; a 为缺栀子, b 为缺龙胆草, c 为缺黄芩)的 HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC Chromatograms of mixed reference substances (A), Longdan Xiegan Pills (B), and negative samples (C: a, b, c were negative sample without *Fructus Gardeniae*, *Radix Gentianae*, and *Radix Scutellariae*)

μg/mL 栀子苷对照品溶液 1.0 mL、745 μg/mL 龙胆苦苷对照品溶液 2.0 mL 和 767 μg/mL 黄芩苷对照品溶液 1.0 mL, 制备供试品溶液, 进样测定, 计算加样回收率。结果见表 1。

表 1 各组份回收率测定结果 (n=6)

Table 1 Determination of recovery yield tests of every components (n=6)

组 分	样品量 /mg	加入对照品 量/mg	测得量 /mg	回收率 /%	RSD/%
栀子苷	0.480	0.501	0.976	99.0	0.8
龙胆苦苷	1.470	1.490	2.939	98.6	1.0
黄芩苷	0.750	0.767	1.507	98.7	0.5

2.10 样品测定: 取不同批号龙胆泻肝丸, 按供试品溶液的制备方法处理, 进行 HPLC 分析, 以外标一点法计算栀子苷、龙胆苦苷和黄芩苷的质量分数。结果见表 2。

### 3 讨论

3.1 检测波长的选择: HPLC 法单独测定龙胆泻肝丸中龙胆苦苷、黄芩苷、栀子苷, 检测波长分别为 270 nm、274~279 nm 和 240 nm<sup>[1-4]</sup>。本实验选择在 254 nm 同时测定 3 个组分, 结果在选定的色谱条

表 2 龙胆泻肝丸中有效成分的测定结果 (n=3)

Table 2 Determination of active components in Longdan Xiegan Pills (n=3)

批 号	栀子苷/ (mg · g <sup>-1</sup> )	龙胆苦苷/ (mg · g <sup>-1</sup> )	黄芩苷/ (mg · g <sup>-1</sup> )	组分比例
20050401	2.20	6.36	3.36	1 : 2.9 : 1.5
20050601	2.01	6.12	3.30	1 : 3.0 : 1.6
20050701	1.92	5.88	3.00	1 : 3.1 : 1.6

件下 3 组分均有较高的紫外吸收值, 其最低检测限以信噪比 3 计分别为 9、15、13 ng, 各组分分离度良好, 故选择检测波长 254 nm。

3.2 流动相的选择: 龙胆苦苷和栀子苷的极性相对黄芩苷较强, 本实验考察了二者在乙腈-1% 冰醋酸 (15 : 85) 等度洗脱的情况下的保留情况, 结果龙胆苦苷和栀子苷保留时间为 6.7、7.5 min, 而黄芩苷则保留到色谱柱上, 故为了保证 3 组分的同时分离, 采用梯度洗脱程序, 结果表明, 该洗脱程序可以满足分析要求。

3.3 多指标成分的分离测定对于复方中药的质量控制具有重要意义。在同一方剂中, 药味的不同配伍比例对指标成分体内药动学特征及复方药效具有显著影响<sup>[5,6]</sup>。复方中药配伍以后, 各指标成分的量及其比例不仅可以反映制剂工艺水平, 而且可以表征和保证复方中药 (及其制剂) 的药效, 本实验建立了 HPLC 法同时测定龙胆泻肝丸的 3 个指标成分的方法, 并计算了组分的比例, 相对于单指标的测定, 该法可以直接表征龙胆泻肝丸的内在质量; 为了能够更好地标示原处方配伍比例, 提议应当制备该处方的标准制剂 (或标准汤剂) 以作对照, 计算指标成分的量及其比例范围。

### References:

- [1] Li C Y, Lan H M, Yuan X W. HPLC Determination of baicalin in Longdanxiegan Pills [J]. *Guangdong Pharm J* (广东药学), 2004, 14(6): 21-22.
- [2] Cheng A H, Han M H, Shi B R. RP-HPLC Determination of baicalin in Longdanxiegan Pills [J]. *Chin J Inf Tradit Chin Med* (中国中医药信息杂志), 2002, 9(5): 46-47.
- [3] Jia S X, Li J X, Zhao W, et al. Determination of baicalin in Longdanxiegan Pill by reverse-phase HPLC [J]. *Chin J New Drugs* (中国新药杂志), 2002, 11(10): 782-783.
- [4] Li H X. Determination of geniposide in Longdanxiegan Pills by RP-HPLC [J]. *Chin J Inf Tradit Chin Med* (中国中医药信息杂志), 2003, 10(1): 29-30.
- [5] Yang W, Jin X L, Yu Y H, et al. The correspondence analysis of the function and combined ratio between *Rhizoma Coptidis* and *Fructus Evodiae* [J]. *Chin J Basic Med Tradit Chin Med* (中国中医基础医学杂志), 2003, 9(11): 49-50.
- [6] Zhang Z, Liu N, Chen K J, et al. Effects of Chuanxiong-Chishao dispensing ratio on the pharmacokinetics of ferulic acid in canine [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form* (中国实验方剂学杂志), 2005, 11(3): 28-31.