

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2019.03.06

# 高效液相色谱法测定兽药龙胆泻肝散中 龙胆苦苷、栀子苷和黄芩苷的含量

栾庆祥, 黄鑫, 杨强, 金晓峰, 钱莘莘\*

(贵州省兽药饲料监察所, 贵阳 550003)

[收稿日期] 2018-00-00 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2019) 03-0031-06 [中图分类号] S853.7

**[摘要]** 建立测定兽药龙胆泻肝散中龙胆苦苷、栀子苷和黄芩苷的高效液相色谱分析方法。样品经 50% 甲醇水溶液超声提取, C18 色谱柱分离, 254 nm 波长下检测, 外标法定量。龙胆苦苷在 0.400~3.203  $\mu\text{g}$  范围内线性关系良好,  $r=0.9998$ , 平均回收率为 91.5%,  $RSD$  为 0.77%, 栀子苷在 0.252~2.012  $\mu\text{g}$  范围内线性关系良好,  $r=0.9999$ , 平均回收率为 90.2%,  $RSD$  为 1.58%, 黄芩苷在 0.500~3.981  $\mu\text{g}$  范围内线性关系良好,  $r=0.9999$ , 平均回收率为 94.6%,  $RSD$  为 1.74%。该方法简单、快速、准确度高、重复性好, 可以用于兽药龙胆泻肝散的质量控制。

**[关键词]** 高效液相色谱法; 龙胆泻肝散; 龙胆苦苷; 栀子苷; 黄芩苷

## Determination of Gentiopicroside, Geniposide and Baicalin in Longdan Xiegan San by HPLC

LUAN Qing-xiang, HUANG Xin, YANG Qiang, JIN Xiao-feng, QIAN Xin-xin\*

(Guizhou Institute of Veterinary Drug and Feeds Control, Guiyang, Guizhou 550003, China)

Corresponding author: QIAN Xin-xin, E-mail: 594554204@qq.com

**Abstract:** A method for the determination of gentiopicroside, geniposide and baicalin in Longdan Xiegan San were developed by the high performance liquid chromatography (HPLC). The sample was extracted by ultra sonification 50% methanol aqueous solution, and the retention of target compounds was performed on a C18 column and detected at the wavelength of 254 nm, then quantified by the method of external standard. The calibration curves of gentiopicroside were good linear between the peak areas and the concentrations of 0.400~3.203  $\mu\text{g}$  with the correlation coefficient  $r=0.9999$ , and the average recovery rate was 91.5%,  $RSD=0.77\%$ . The calibration curves of geniposide were good linear between the peak areas and the concentrations of 0.252~2.012  $\mu\text{g}$  with the correlation coefficient  $r=0.9999$ , and the average recovery rate was 90.2%,  $RSD=1.58\%$ . The calibration curves of baicalin were good linear between the peak areas and the concentrations of 0.500~3.981  $\mu\text{g}$  with the correlation coefficient  $r=0.9999$ , and the average recovery rate was 94.6%,  $RSD=1.74\%$ . The method is simple, quick,

作者简介: 栾庆祥, 硕士研究生, 实验师, 从事兽药及兽药残留分析研究。

通讯作者: 钱莘莘。E-mail: 594554204@qq.com

accurate and good repeatability, and it can be used for controlling the quality of Longdan Xiegan San.

**Key words:** high performance liquid chromatography; Longdan Xiegan San; gentiopicoside; geniposide; baicalin

龙胆泻肝散是由龙胆、栀子、黄芩、柴胡等 10 味中药制成的散剂,功能泻肝胆实火,清三焦湿热,主治目赤肿痛,淋浊,带下,收录在 2015 年版《中华人民共和国兽药典》二部<sup>[1]</sup>。其药用历史悠久,临床应用广泛,但因各生产厂家的生产条件和工艺不尽相同,质量参差不齐,临床疗效也有所差异,因此,控制龙胆泻肝散的质量才能保证其临床的药用疗效。实验拟建立中药龙胆泻肝散中活性成分龙胆苦苷、栀子苷和黄芩苷的含量测定方法,以控制龙胆泻肝散的质量。

## 1 仪器与材料

1.1 仪器 Agilent 1260 高效液相色谱仪,配四元泵、自动进样器、柱温箱、紫外检测器等(美国 Agilent 公司);Waters 2695 高效液相色谱仪,配四元泵、自动进样器、柱温箱、紫外检测器等(美国 Waters 公司);ZORBAX SB-C18(4.6 mm×250 mm, 5 μm)色谱柱,XDB-C18(4.6 mm×250 mm, 5 μm)色谱柱(美国 Agilent 公司);XS105 型和 ME802E 型电子天平(瑞士 METTLER 公司);KQ-500DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 材料与试剂 龙胆苦苷对照品(中国药品生物制品检定所,批号 110770-201013);黄芩苷对照品(中国食品药品检定研究院,批号 110715-201117);栀子苷对照品(中国药品生物制品检定所,批号 110749-200613);龙胆泻肝散(遵义县兽药厂,批号:120901,120902,120903,140101,140102,140103,140201,140202,140203,140204);甲醇为色谱纯;磷酸为分析纯;实验用水为超纯水。

## 2 方法与结果

2.1 色谱条件 流动相为甲醇(C):0.2%磷酸溶液(A)梯度洗脱,梯度洗脱条件见表 1;柱温为 30 ℃;流速 1.0 mL/min;检测波长为 254 nm;进样量为 10 μL。

2.2 对照品溶液的制备 精密称取龙胆苦苷、栀子苷和黄芩苷对照品适量,以甲醇为溶剂,配制混合对照品溶液,其中含龙胆苦苷 80.09 μg/mL、栀

子苷 50.30 μg/mL、黄芩苷 99.53 μg/mL,即得。

表 1 梯度洗脱条件

时间/min	流动相 C/%	流动相 A/%
0~25	20	80
25~30	20-43	80-57
30~50	43	57
50~55	20	80

2.3 供试品溶液的制备 取本品,研细,取约 1 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入 50% 甲醇 50 mL,密塞,称定重量,超声处理(功率 250 W,频率 50 kHz)20 min,放冷,再称定重量,用 50% 甲醇补足减失的重量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.4 阴性对照溶液的制备 按 2015 年版《中华人民共和国兽药典》二部中龙胆泻肝散项下处方的配比,除去龙胆、黄芩和栀子,然后制得阴性对照样品,取约 0.67 g,精密称定,按供试品溶液的制备方法制成阴性对照溶液。

2.5 系统适用性和专属性试验 分别精密吸取对照品溶液、供试品溶液和阴性对照溶液 10 μL 注入高效液相色谱仪。按 2.1 项下色谱条件测定,结果见图 1,龙胆苦苷峰和栀子苷峰分离度大于 2.0,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 5000,阴性对照在与对照品和供试品色谱峰相同保留时间处无干扰峰;结果表明处方中的其他成分对龙胆苦苷、栀子苷和黄芩苷的定量测定无干扰,专属性能满足检测要求。

2.6 稳定性试验 取同一对照品溶液,于制备后 0、2、4、8、12、24 h 注入液相色谱仪,按 2.1 项下色谱条件分别进行测定,记录各色谱峰面积,龙胆苦苷峰面积的相对标准偏差(RSD)为 0.31%,栀子苷峰面积的相对标准偏差(RSD)为 1.04%,黄芩苷峰面积的相对标准偏差(RSD)为 0.67%,表明溶液在 24 h 内稳定。

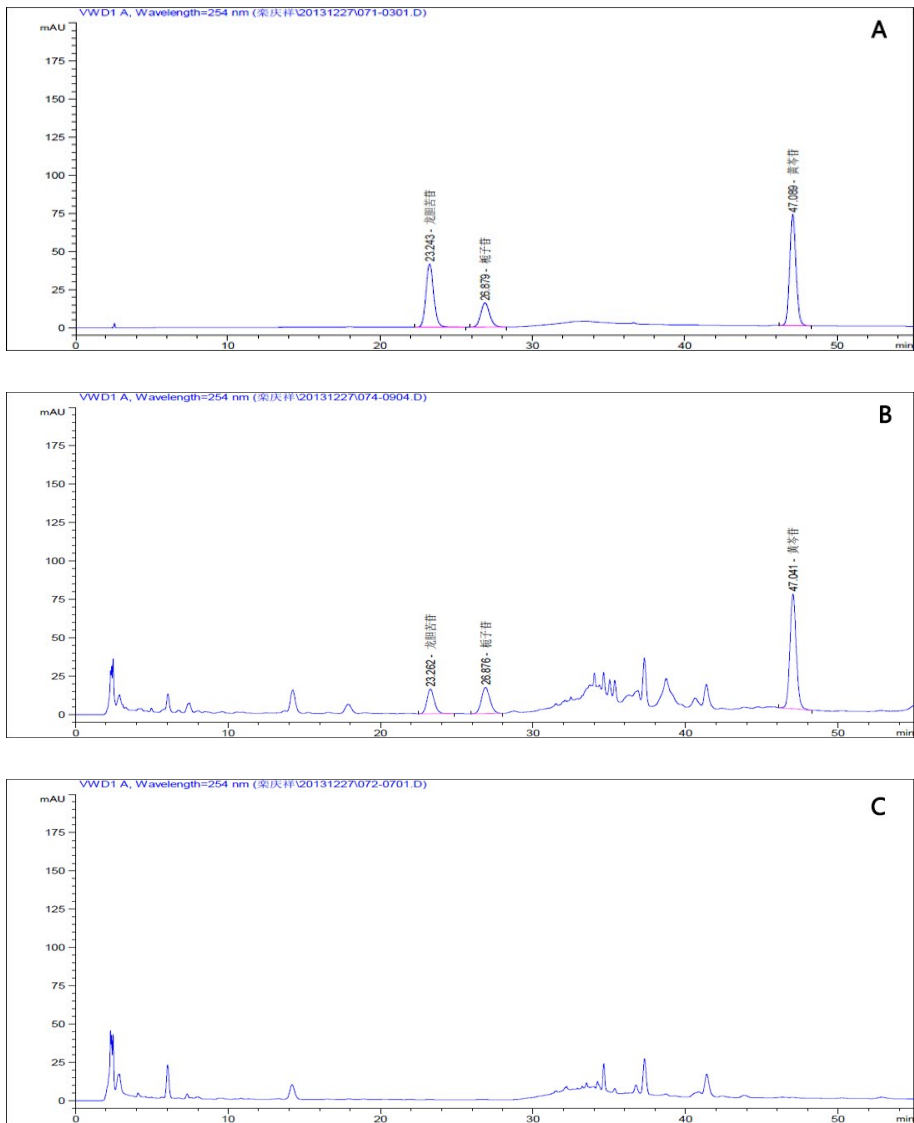


图 1 专属性试验色谱图(A、B、C 分别为对照品、供试品、阴性对照)

Fig 1 HPLC chromatograms of specific test(A: reference substances, B: Test samples, C: negative samples)

2.7 线性关系考察 取 2.2 项下制得的混合对照品溶液,分别进样 5、10、15、20、25、40  $\mu\text{L}$ ,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,进行线性回归。龙胆苦苷回归方程  $A = 11.87C + 1.40$ ,  $r = 0.9998$ ,龙胆苦苷在 0.400~3.203  $\mu\text{g}$  范围内线性关系良好;栀子苷回归方程  $A = 8.55C + 25.56$ ,  $r = 0.9999$ ,栀子苷在 0.252~2.012  $\mu\text{g}$  范围内线性关系良好;黄芩苷回归方程  $A = 14.08C + 6.53$ ,  $r = 0.9999$ ,黄芩苷在 0.500~3.981  $\mu\text{g}$  范围内线性关系良好。

2.8 准确度试验 采用加标回收的方法,在已知

含量的龙胆泻肝散供试品中加入一定质量的龙胆苦苷、栀子苷和黄芩苷对照品,使其制备后在供试品中的量为其含量的 100%,平行制备 6 份。再按照 2.1 项下色谱条件测定峰面积,计算出实际加入的标对照品的含量,用实际计算出来的加入量比上由称量得到的加入量,即得。取已测定栀子苷、龙胆苦苷和黄芩苷的龙胆泻肝散样品(批号:120902)6 份,每份 1 g,精密称定,每份分别精密加入 2.003 mg/mL 龙胆苦苷对照品溶液、3.850 mg/mL 栀子苷对照品溶液和 7.100 mg/mL 黄芩苷对照品溶液 1.0 mL,按 2.3 项下制备供试品溶液,精密吸取

10  $\mu\text{L}$  上机测定。龙胆苦苷回收率为 90.5%~92.4%, 平均回收率为 91.5%,  $RSD$  为 0.77%; 栀子苷回收率为 88.1%~92.4%, 平均回收率为 90.2%,  $RSD$  为

1.58%; 黄芩苷回收率为 92.8%~96.7%, 平均回收率为 94.6%,  $RSD$  为 1.74%; 结果见表 2。

表 2 龙胆苦苷、栀子苷和黄芩苷加样回收率试验

Tab 2 Recovery results of gentiopicroside, geniposide and baicalin

组分	样品	样品含量/mg	加入对照品量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	$RSD$ /%
龙胆苦苷	1	2.036	2.003	3.879	92.0	91.5	0.77
	2	2.036	2.003	3.862	91.2		
	3	2.036	2.003	3.858	91.0		
	4	2.036	2.003	3.886	92.4		
	5	2.036	2.003	3.873	91.8		
	6	2.036	2.003	3.848	90.5		
栀子苷	1	3.855	3.850	7.246	88.1	90.2	1.58
	2	3.855	3.850	7.316	89.9		
	3	3.855	3.850	7.413	92.4		
	4	3.855	3.850	7.323	90.1		
	5	3.855	3.850	7.306	89.6		
	6	3.855	3.850	7.356	90.9		
黄芩苷	1	7.091	7.100	13.685	92.9	94.6	1.74
	2	7.091	7.100	13.678	92.8		
	3	7.091	7.100	13.917	96.2		
	4	7.091	7.100	13.768	94.0		
	5	7.091	7.100	13.954	96.7		
	6	7.091	7.100	13.828	94.9		

2.9 精密度试验 取龙胆泻肝散供试品(批号: 120902)溶液,精密吸取 10  $\mu\text{L}$ ,按 2.1 项下色谱条件进样,重复进样 6 次,测定龙胆苦苷、栀子苷和黄

芩苷的峰面积,计算得出龙胆苦苷峰面积的  $RSD$  为 0.78%,栀子苷峰面积的  $RSD$  为 0.79%,黄芩苷峰面积的  $RSD$  为 0.70%,结果见表 3。

表 3 精密度试验

Tab 3 Precision test

组分	进样次数	峰面积(A)	峰面积平均值(A)	$RSD$ /%
龙胆苦苷	1	538.56	543.13	0.78
	2	550.95		
	3	542.95		
	4	540.81		
	5	544.01		
	6	541.51		

续表

组分	进样次数	峰面积(A)	峰面积平均值(A)	RSD/%
栀子苷	1	656.03	662.20	0.79
	2	671.69		
	3	662.40		
	4	660.39		
	5	662.98		
	6	659.74		
黄芩苷	1	2177.31	2182.95	0.70
	2	2211.58		
	3	2186.72		
	4	2168.05		
	5	2175.31		
	6	2178.73		

2.10 耐用性试验 取 2.8 准确度测定项下制得的样品,按既定流动相梯度洗脱条件和流速不变,在 Waters2695 和 Agilent 1260 高效液相色谱仪上分别使用 Agilent ZORBAX SB-C18(4.6 mm×250 mm, 5 μm) 色谱柱和 Agilent XDB-C18(4.6 mm×250 mm, 5 μm) 色谱柱,于 20℃、30℃、40℃ 条件下进行测试,考察方法的耐用性,结果表明该方法能够耐受不同液相色谱仪、色谱柱、柱温等因素的小范围变

化,测定龙胆泻肝散中龙胆苦苷、栀子苷和黄芩苷的含量无显著差异,说明耐用性良好。

2.11 样品测定 取不同批号的龙胆泻肝散,分别按 2.3 项下方法制备供试品溶液,精密吸取 10 μL 上机测定峰面积,根据上述拟合的曲线方程外标法定量,计算出供试样品中龙胆苦苷、栀子苷和黄芩苷的含量,结果见表 4。

表 4 供试样品中龙胆苦苷、栀子苷和黄芩苷含量测定结果

Tab 4 Content determination results of gentiopicroside, geniposide and baicalin

样品类别	龙胆苦苷平均含量/mg	栀子苷平均含量/mg	黄芩苷平均含量/mg
120901	2.01	3.88	7.18
120902	2.03	3.85	7.12
120903	2.07	3.84	6.97
140101	3.39	3.67	7.98
140102	3.39	3.39	7.41
140103	3.57	3.73	7.59
140201	3.41	3.98	7.53
140202	3.41	3.93	7.10
140203	3.41	3.69	6.71
140204	3.50	3.97	6.86

### 3 讨论与结论

3.1 含量测定成分的选择 龙胆泻肝散是由龙

胆、栀子、黄芩等 10 味中药制成的散剂,其中龙胆为君药,栀子和黄芩为臣药<sup>[2]</sup>。《中国兽药典》2015

年版中龙胆、栀子和黄芩质量控制的目标成分分别是龙胆苦苷、栀子苷和黄芩苷;龙胆苦苷是龙胆的主要活性成分之一,具有保肝、利胆、抗炎、抗过敏、健胃等多种药理作用<sup>[3-5]</sup>;栀子苷具有降血压、改善胃功能、保护肝脏、促进胆汁分泌、镇痛镇静等作用,在医药、农业方面有重要作用<sup>[6]</sup>;黄芩苷具有强效的清除氧自由基、抗过敏反应、抑制炎症分子、病毒和细菌、解痉、利尿作用<sup>[7]</sup>;且在《中国兽药典》2015 年版中龙胆泻肝散质量控制的目标成分是龙胆苦苷、栀子苷和黄芩苷,所以龙胆泻肝散含量测定的成分选择龙胆苦苷、栀子苷和黄芩苷。

**3.2 样品前处理方法的选择** 龙胆苦苷和栀子苷为环烯醚萜苷类化合物,易溶于水和甲醇,提取方法一般采用回流法<sup>[8-9]</sup>,黄芩苷为黄酮类化合物,易溶于甲醇,提取方法一般采用回流法和超声法<sup>[10]</sup>,参考《中国兽药典》2015 年版二部龙胆泻肝散含量测定项下前处理方法,采用 50% 甲醇超声提取 20 min,结果表明该方法能够较完全的提取出龙胆泻肝散中的龙胆苦苷、栀子苷和黄芩苷。

**3.3 检测波长的选择** 分别取龙胆苦苷、栀子苷和黄芩苷的对照品溶液,经紫外-可见分光光度法测定,龙胆苦苷在 271 nm 处有最大吸收,黄芩苷在 278 nm 处有最大吸收,栀子苷在 237 nm 处有最大吸收,本试验选取 254 nm 同时测定这 3 个组分,结果在选定的条件下 3 组分均有较高的紫外吸收值,且各组分分离度良好,故选择检测波长为 254 nm。

采用高效液相色谱法测定龙胆泻肝散中龙胆苦苷、栀子苷和黄芩苷的含量,该方法简单、快速,准确度高,重复性好,可有效控制该制剂的中主药龙胆、栀子和黄芩的质量,通过对三个批次的 10 个实际样品的测定,龙胆苦苷含量为 2.01~3.57 mg,栀子苷含量为 3.39~3.98 mg,黄芩苷含量为 6.71~7.98 mg,均满足《中国兽药典》2015 年版二部中龙胆泻肝散项下对龙胆苦苷、栀子苷和黄芩苷含量的要求,说明制剂生产过程中质量稳定。

## 参考文献:

[1] 中国兽药典委员会.《中华人民共和国兽药典》2015 年版二部[S].  
China Veterinary Pharmacopoeia Committee. People's Republic

of China Veterinary Pharmacopoeia volume II 2015 edition[S].

- [2] 冯亦颖,王巨存,徐学锐. 高效液相色谱法测定龙胆泻肝丸中栀子苷的含量[J]. 天津药学, 2008, 20(3): 11-13.  
Feng Y Y, Wang J C, Xu X R. Assay of jasminoidin in Longdan Xiegan Pills by HPLC[J]. Tianjin Pharmacy, 2008, 20(3): 11-13.
- [3] 南京中医药大学. 中药大辞典(上册)[M]. 上海科学技术出版社, 2006: 869-871.  
Nanjing University of Chinese medicine. Traditional Chinese medicine dictionary (I) [M]. Shanghai Scientific and technical publishers, 2006: 869-871.
- [4] 姚鸿雁,席璐. HPLC 法测定龙胆泻肝丸中栀子苷的含量[J]. 中国现代药物应用, 2013, 7(5): 131-132.  
Yao H Y, Xi L. Assay of jasminoidin in Longdan Xiegan Pills by HPLC[J]. Chin J Mod Drug Appl, 2013, 7(5): 131-132.
- [5] 陈庆文,郝自新. HPLC 同时测定龙胆泻肝丸(浓缩丸)中龙胆苦苷、栀子苷和黄芩苷的含量[J]. 北方药学, 2018, 15(3): 1-3.  
Chen Q W, Hao Z X. Simultaneous Determination of Gentiopicroside, Geniposide and Baicalin in Longdanxiegan Pills (Concentrated Pills) by HPLC[J]. Journal of North Pharmacy, 2018, 15(3): 1-3.
- [6] 孔树佳. 龙胆泻肝丸中 3 种活性成分的 HPLC-DAD 法测定[J]. 辽宁中医杂志, 2017, 44(1): 114-116.  
Kong S J. HPLC - DAD Method Determination of Three Kinds of Active Ingredients in Longdan Xiegan Pill[J]. Liaoning Journal of Traditional Chinese Medicine, 2017, 44(1): 114-116.
- [7] 赵森铭. 龙胆泻肝丸薄层色谱鉴别方法的研究与改进[J]. 中国药业, 2013, 22(20): 51-53.  
Zhao S M. Longdanxiegan Pill thin layer the search and betterment that discriminate a method [J]. China Pharmaceuticals, 2013, 22(20): 51-53.
- [8] 穆亚琦,王慧森,李更生,等. 正交设计法优选龙胆中龙胆苦苷的提取工艺研究[J]. 医药论坛杂志, 2017, 38(4): 19-21.  
Mu Y Q, Wang H S, Li G S, et al. Optimization of extraction of gentiopicroside from radix gentiana based on orthogonal design [J]. Journal of Medical Forum, 2017, 38(4): 19-21.
- [9] 康艳萍,黄婉. 栀子中栀子苷的提取研究[J]. 广州化工, 2018, 46(12): 73-74.  
Kang Y P, Huang W. Study on Extraction of Geniposide from Gardeniajasminoides Ellis[J]. GuangZhou Chemical Industry and Technology, 2018, 46(12): 73-74.
- [10] 吴史博. 不同提取方法对黄芩苷提取率的影响[J]. 安徽农业科学, 2017, 45(15): 134-136.  
Wu S B. Effects of Different Extraction Methods on the Extraction Rate of Baicalin [J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2017, 45(15): 134-136.