

HPLC 法同时测定金胆片中龙胆苦苷等 4 种主成分的含量

吴勇, 刘燕, 丁茹, 余露, 徐婷婷

(马鞍山市食品药品检验和药品不良反应监测中心, 安徽 马鞍山 243000)

摘要 目的: 建立高效液相色谱法同时测定金胆片中 4 种主要活性成分含量的方法。方法: 采用 Agilent Eclipse X DB C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱; 以乙腈 (A) -0.1% 磷酸溶液 (B) 为流动相梯度洗脱, 检测波长为 270 nm; 柱温为 30 °C; 流速 1.0 mL · min⁻¹。结果: 龙胆苦苷、虎杖苷、槲皮素和大黄素质量浓度分别在 7.875 ~ 78.75 μg · mL⁻¹ ($r=0.999\ 9$)、6.75 ~ 67.50 μg · mL⁻¹ ($r=0.999\ 7$)、7.726 ~ 77.26 μg · mL⁻¹ ($r=0.999\ 4$)、3.809 ~ 38.09 μg · mL⁻¹ ($r=0.999\ 8$) 范围内与峰面积呈良好的线性关系, 平均加样回收率分别为 99.31%、99.21%、99.04%、99.59% ($n=6$), RSD 分别为 1.86%、1.24%、1.37%、1.15%。结论: 该实验方法准确性可靠、重复性和稳定性良好, 专属性强, 可为金胆片的质量控制和标准提升提供参考依据。

关键词: 高效液相色谱法; 金胆片; 龙胆苦苷; 虎杖苷; 槲皮素; 大黄素; 含量

中图分类号: R 921.2

文献标识码: A

文章编号: 1009-3656(2024)01-0094-05

doi: 10.19778/j.chp.2024.01.016

Simultaneous determination of four active ingredients including gentiopicrin in Jindan tablets by HPLC

WU Yong, LIU Yan, DING Ru, YU Lu, XU Tingting

(Ma'an Shan Institute for Food and Drug Control and Adverse Drug Reaction, Ma'an Shan 243000, China)

Abstract Objective: To establish a method to determine 4 active ingredients in Jindan tablets by HPLC. **Methods:** Agilent Eclipse X DB C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) column was adopted using acetonitrile (phase A) -0.1% phosphoric acid solution (phase B) as the mobile phase with gradient program at the flow rate of 1.0 mL · min⁻¹, the detection wavelength was 270 nm, Column temperature was set at 30 °C. **Results:** The linear ranges of gentiopicrin, polydatin, quercetin and emodin were 7.875 - 78.75 μg · mL⁻¹ ($r=0.999\ 9$), 6.75 - 67.50 μg · mL⁻¹ ($r=0.999\ 7$), 7.726 - 77.26 μg · mL⁻¹ ($r=0.999\ 4$), 3.809 - 38.09 μg · mL⁻¹ ($r=0.999\ 8$), respectively, the peak area had a good linear relationship with the mass concentration of 4 components, the average recovery were 99.31%, 99.21%, 99.04%, 99.59%, ($n=6$) respectively, and RSDs were 1.86%, 1.24%, 1.37%, 1.15%, respectively. **Conclusion:** This method is reliable, repeatable and stable, and has strong specificity. This method can provide a reference for the quality control and standard improvement of Jindan tablets.

Key words: HPLC; Jindan tablets; gentiopicrin; polydatin; quercetin; emodin; content

金胆片为处方药, 曾用名复方胆炎片, 具有清热解毒、消炎利胆、排石作用^[1], 临床上主要用于急性、慢性胆囊炎、胆石症以及胆道感染, 其处方由龙胆、金钱草、虎杖、猪胆膏 4 味中药组成^[2]。其原标准收

载于卫生部药品标准中药成方制剂第十六册^[3], 后标准进行了修订, 但标准中只有虎杖和猪胆膏的薄层鉴别, 而对组方中其它成分没有定性定量要求^[4]。近年来, 对金胆片的质量控制研究较少, 主

要有 HPLC 测定单味组方的主要药效成分,如测定处方中金钱草的有效成分槲皮素和山柰酚^[5],龙胆中的龙胆苦苷^[6-7],以及龙胆中龙胆苦苷和虎杖中的虎杖苷、白藜芦醇类^[2,8],另有薄层扫描法测定虎杖中的大黄素^[9]和对猪胆膏的薄层鉴别^[10]。金胆片是中药复方制剂,由于成分复杂,给其质量标准的制定增加了一定困难。本研究拟从处方组成的多种有效成分入手,开展相关的研究工作,为更加全面的金胆片的质量标准的制定提供参考依据。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Waters 高效液相色谱仪(型号: e2695, 包括 2998 PAD 检测器、四元泵、全自动进样器);超声波清洗仪(德国 Elma 公司, 型号: Elmasomic S120H);电子天平(瑞士 METTLER TOLEDO 公司, 型号: XPR105(0.1 mg/0.01 mg))。

1.2 试药

对照品虎杖苷(纯度: 87.3%, 批号: 111575-201603)、大黄素(纯度: 96.0%, 批号: 110756-201913)、龙胆苦苷(纯度: 98.1%, 批号: 110770-202219)、槲皮素(纯度: 99.1%, 批号: 100081-201810),以上对照品均来源于中国食品药品检定研究院;乙腈、甲醇(色谱纯, 美国 TEDIA 公司),水为超纯水(四川优普超纯科技有限公司);金胆片为市场上采购,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Agilent Eclipse X DB C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 以乙腈 A-0.1% 磷酸溶液 B 为流动相梯度洗脱, 洗脱程序: 0 ~ 30 min (10% → 40% A), 30 ~ 40 min (40% → 90% A), 40 ~ 50 min (90% → 25% A), 50 ~ 55 min (25% → 10% A); 检测波长: 270 nm; 柱温 30 °C; 流速 1.0 mL · min⁻¹。

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液 分别精密称取龙胆苦苷 20.07 mg、虎杖苷 19.33 mg、槲皮素 19.49 mg 和大黄素 19.84 mg, 加甲醇超声溶解并定量稀释制成单一对照品溶液, 其质量浓度分别为 393.77、337.50、386.29、190.46 μg · mL⁻¹, 精密量取龙胆苦苷、虎杖苷、槲皮素和大黄素对照溶液适量置同一 10 mL 量瓶, 加甲醇定容制成每 1 mL 含龙胆苦苷 78.75 μg、虎杖苷 33.75 μg、槲皮素 38.63 μg、大黄素 19.05 μg

的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 取金胆片 20 粒, 研碎, 精密称取适量, 置具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 50 mL, 密塞, 超声处理 30 min, 取出放置室温, 用甲醇补充减失的重量, 摇匀, 用 0.45 μm 滤膜滤过, 取续滤液作为供试品溶液。

2.2.3 阴性样品溶液 按金胆片处方工艺不加龙胆、虎杖、金钱草制备阴性样品, 取适量样品, 加甲醇超声 30 min, 取出放置室温, 用 0.45 μm 滤膜滤过, 取续滤液作为阴性样品溶液。

2.3 方法学考察

2.3.1 专属性试验 分别吸取对照品溶液、供试品溶液、阴性样品溶液, 按上述“2.1”项下色谱条件进行试验, 考察本方法的系统适宜性。分别进样 10 μL 进行测定, 即得 HPLC 色谱图, 见图 1, 结果表明龙胆苦苷、虎杖苷、槲皮素和大黄素分离良好, 阴性样品无干扰。

2.3.2 线性关系的考察 分别精密吸取“2.2.1”项下混合对照品溶液 1.0、2.0、3.0、5.0、10.0 mL, 置 10 mL 容量瓶中, 加甲醇定容, 摇匀, 得到 5 个浓度梯度混合对照品溶液, 在“2.1”项下色谱条件进样, 以色谱峰面积(Y)为纵坐标, 质量浓度(X, μg · mL⁻¹)为横坐标, 绘制标准曲线, 得到龙胆苦苷、虎杖苷、槲皮素和大黄素的回归方程:

$$Y = 1\,232.1X + 96\,606 \quad r = 0.999\,9$$

$$Y = 1\,003.5X + 35\,698 \quad r = 0.999\,7$$

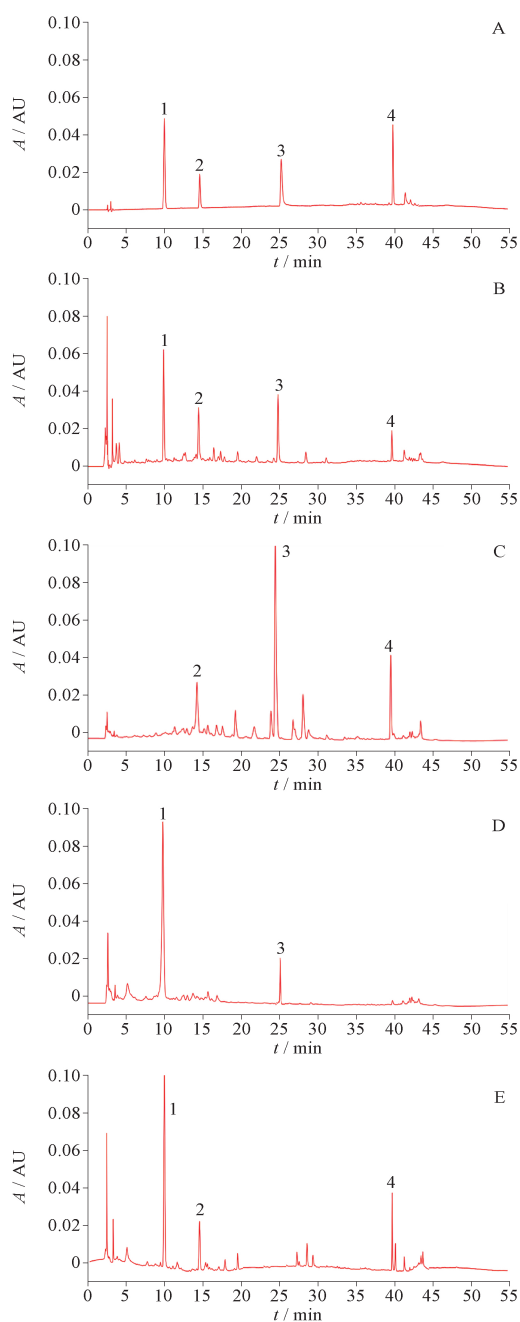
$$Y = 2\,228X - 2\,403 \quad r = 0.999\,4$$

$$Y = 3\,242.8X + 3\,875 \quad r = 0.999\,8$$

结果表明, 龙胆苦苷、虎杖苷、槲皮素和大黄素分别在 7.875 ~ 78.75、6.75 ~ 67.50、7.726 ~ 77.26、3.809 ~ 38.09 μg · mL⁻¹ 范围内线性关系良好。

2.3.3 精密度的试验 精密吸取同一对照品溶液 10 μL, 按相同色谱条件重复进样 6 次, 测定, 结果龙胆苦苷、虎杖苷、槲皮素和大黄素的平均峰面积分别为 2 077 816.5、734 522.7、1 710 707.7、1 280 077.7, RSD 分别为 0.70%、0.21%、0.20% 和 0.19%, 表明该方法精密度良好。

2.3.4 稳定性试验 取同一供试品溶液, 分别在 0、3、7、11、19 及 33 h 进样测定, 进样量为 10 μL, 记录峰面积, 4 种成分龙胆苦苷、虎杖苷、槲皮素和大黄素峰平均面积分别为 1 562 558.3、147 435.5、220 876.3、259 739.7, RSD 分别为 1.52%、2.54%、1.01%、0.30%, 结果表明供试品溶液在 33h 内稳定。



A. 混合对照品 (mixed reference) B. 供试品 (sample) C. 缺龙胆阴性对照 (negative sample without gentianae Radix ET Rhizoma) D. 缺虎杖阴性对照 (negative sample without Polygoni Cuspidati Rhizoma ET Radix) E. 缺金钱草阴性对照 (negative sample without Lysimachiae Herba)
1. 龙胆苦苷 (gentiopicrosin) 2. 虎杖苷 (polydatin) 3. 槲皮素 (quercetin) 4. 大黄素 (emodin)

图1 金胆片各成分 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of various constituents in Jindan Tablets

2.3.5 重复性试验 取批号为 230101 的金胆片样品 6 份, 按“2.2.2”项下方法备供试品溶液, 分别进样 10 μL 注入液相色谱仪进行测定, 按上述色

谱条件, 计算峰面积与取样量的关系, 结果龙胆苦苷、虎杖苷、槲皮素和大黄素的含量分别为 12.404、1.149、1.094、0.691 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, RSD 分别为 2.60%、2.43%、1.61%、1.35%, 表明该方法重复性良好。

2.3.6 加样回收率试验 精密称取已知含量批号 230101 的金胆片样品 0.25 g, 分别精密加入一定量的对照品溶液, 均按“2.3”项下方法制备, 按“2.1”项下色谱条件进行测定, 分别计算龙胆苦苷、虎杖苷、槲皮素和大黄素的加样回收率, 结果见表 1。

2.3.7 样品的含量测定 取不同厂家的金胆片, 按上述供试品溶液方法进行制备, 按“2.1”项下色谱条件各进样 10 μL , 依法测定, 记录色谱峰面积, 按外标法计算含量, 结果见表 2。

3 讨论

3.1 检测波长的确定

龙胆苦苷、槲皮素、虎杖苷和大黄素均有紫外吸收, 且吸收波长均不一样, 龙胆为处方中君药, 中国药典 2020 年版一部中测定波长为 270 nm^[11], 处方中猪胆膏中有效成分在近紫外末端才有吸收^[12], 故本次研究没有考虑。取混合对照品在 200 ~ 400 nm 下扫描, 结果 370、294、269、218 nm 下有最大吸收, 经 PDA 检测, 分别在上述几个波长处考察峰形大小及对称性, 以及参考文献[6-7]进行比较后, 270 nm 波长处吸收较优, 故最终选择 270 nm 为检测波长。

3.2 样品提取方法的选择

预试验中用甲醇、乙醇, 80% 甲醇、50% 乙醇作为提取溶剂, 分别超声处理 30、60 min 及热水水浴 60 min, 发现甲醇提取优于乙醇, 水浴处理略高超声 30 min, 但甲醇提取液中干扰成分较少^[2], 因超声处理相对于加热回流提取简单, 故选择甲醇超声处理 30 min 为提取的方法。

3.3 色谱柱的选择

分别用 Agilent ZORBAX Eclipse XDB C₁₈、Welch Ultimate XB C₁₈、Thermo Hypersil GOLD C₁₈ 进行比较, 发现不同色谱柱对样品的分离效果均良好, 出峰时间适中, 表明不同品牌的色谱柱对目标成分的分离影响较小, 此方法适应不同的 C₁₈ 色谱柱。

3.4 流动相的选择

液相测定预试验中, 先采用不同比例甲醇、乙腈、0.1% 磷酸溶液等度洗脱, 能够检出 1 ~ 2 个成分, 且发现要么是分离度达不到要求, 要么就是出峰时间过快或过长, 后采用梯度洗脱, 发现能取得良好的效果。

表 1 加样回收率测定结果($n=6$)

Tab. 1 Recovery of 4 component in Jindan tablets

成分 (components)	取样量 (sample weight)/ g	样品中含量 (sample conten)/ μg	加入量 (added amount)/ μg	测得量 (detected amount)/ μg	回收率 (recovery)/ %	平均回收率 (average recovery)/ %	RSD /%
龙胆苦苷 (gentiopicrin)	0.251 2	3 115. 82	393. 77	3 501. 21	97. 87	99. 31	1. 86
	0.250 6	3 108. 37	393. 77	3 492. 56	97. 57		
	0.257 6	3 195. 20	393. 77	3 599. 51	102. 67		
	0.250 3	3 104. 65	393. 77	3 494. 72	99. 06		
	0.250 7	3 109. 62	393. 77	3 502. 99	99. 90		
	0.248 1	3 077. 37	393. 77	3 466. 49	98. 82		
虎杖苷 (polydatin)	0.251 2	288. 54	84. 38	372. 10	99. 03	99. 21	1. 24
	0.250 6	288. 15	84. 38	371. 24	98. 48		
	0.257 6	296. 20	84. 38	379. 20	98. 37		
	0.250 3	287. 80	84. 38	370. 76	98. 32		
	0.250 7	288. 26	84. 38	372. 28	99. 57		
	0.248 1	285. 28	84. 38	370. 93	101. 52		
槲皮素 (quercetin)	0.251 2	274. 73	96. 57	370. 25	98. 91	99. 04	1. 37
	0.250 6	274. 07	96. 57	367. 96	97. 22		
	0.257 6	281. 73	96. 57	376. 44	98. 08		
	0.250 3	273. 74	96. 57	371. 06	100. 77		
	0.250 7	274. 18	96. 57	371. 16	100. 42		
	0.248 1	271. 34	96. 57	366. 80	98. 84		
大黄素 (emodin)	0.251 2	173. 50	47. 62	221. 50	100. 80	99. 59	1. 15
	0.250 6	173. 09	47. 62	220. 38	99. 31		
	0.257 6	177. 92	47. 62	224. 39	97. 58		
	0.250 3	172. 88	47. 62	220. 55	100. 12		
	0.250 7	173. 16	47. 62	220. 45	99. 33		
	0.248 1	171. 36	47. 62	219. 15	100. 38		

表 2 金胆片中 4 种成分的含量测定结果($n=3$)

Tab. 2 Determination results of 4 components in Jindan tablets

生产厂家 (manufacturer)	批号 (batch No.)	含量 (content)/(mg · g ⁻¹)			
		龙胆苦苷 (gentiopicrin)	虎杖苷 (polydatin)	槲皮素 (quercetin)	大黄素 (emodin)
A	230101	12. 404	1. 149	1. 094	0. 691
B	220405	1. 113	3. 168	2. 157	0. 511
B	220604	1. 172	3. 245	2. 033	0. 497
C	20220203	3. 905	3. 039	1. 935	0. 271
C	20210801	3. 765	3. 142	1. 837	0. 288
D	221002	2. 276	4. 357	3. 902	1. 064
D	230201	2. 294	4. 311	3. 847	1. 099

本试验对 4 个厂家的金胆片进行检测,发现不同厂家的金胆片中有效成分含量相差较大,尤其是龙胆苦苷相差近 10 倍,有文献报道龙胆苦苷相差近 14 倍,甚至还有没有检出^[2],《中国药典》2020 年版中龙胆来源分为龙胆和坚龙胆,而【含量测定】项下

规定,龙胆中龙胆苦苷不少于 0. 30%,坚龙胆中不得少于 0. 15%^[11],另外就是标准过低,没有定量要求,可能会导致采用含量较低的坚龙胆,或劣质药材进行投料,故为保证药品疗效,一方面应加强源头监管,另一方面其质量标准亟待提高。

参考文献

- [1] 茹丽, 郭起岳, 徐勤, 等. 舒胆胶囊抗炎利胆作用的研究[J]. 中南药学, 2017, 15(11):1528.
RU L, GUO QY, XU Q, *et al.* Anti-inflammation and cholagogic effect of Shudan capsules [J]. Cent South Pharm, 2017, 15(11):1528.
- [2] 郝立芳, 袁晓芳. HPLC 法测定金胆片中龙胆苦苷、虎杖苷含量[J]. 中国药师, 2011, 14(9):1369.
HAO LF, YUAN XF. Determination of gentiopicroin and polydatin from Jindan Tablets by HPLC [J]. China Pharm, 2011, 14(9):1369.
- [3] 卫生部药品标准: 中药成方制剂. 第十六册[S]. 1998:99.
Drug Specifications Promulgated by the Ministry of Public Health. PR China. Chinese Material Medica preparation Vol 16 [S]. 1998:99.
- [4] 国家药品标准: 金胆片质量标准[J]. 中国药品标准, 2003, 4(2):17.
National Drug Standards: Quality Standard for Jindan tablet [J]. Drug Stand China, 2003, 4(2):17.
- [5] 杨燕飞. HPLC 测定金胆片中山柰素和槲皮素的含量[J]. 中成药, 2005, 27(11):1263.
YANG YF. Determination of kaempferol and quercetin from Jindan Tablets by HPLC [J]. Chin Tradit Pat Med, 2005, 27(11):1263.
- [6] 张良, 刘永俊. 金胆片中龙胆苦苷的含量测定[J]. 齐鲁药事, 2010, 29(7):400.
ZHANG L, LIU YJ. Determination of gentiopicroin in Jindan Tablets by HPLC [J]. Qilu Pharm Aff, 2010, 29(7):400.
- [7] 从培臣, 门雨梅, 袁继峰, 等. 金胆片质量标准的研究[J]. 中国药品标准, 2007, 8(6):52.
CONG PC, MEN YM, YUAN JF, *et al.* Study on Quality Standard for Jindan Tablets [J]. Drug Stand China, 2007, 8(6):52.
- [8] 李来生, 刘妙芬, 杨汉荣, 等. HPLC 同时测定金胆片中的龙胆苦苷和白藜芦醇及其苷的含量[J]. 南昌大学学报(理科版), 2007, 31(6):572.
LI LS, LIU MF, YANG HR, *et al.* Simultaneous determination of gentiana, resveratrol and polydatin in Jindan tablets by HPLC [J]. J Nanchang Univ (Nat Sci), 2007, 31(6):572.
- [9] 戴军平, 张平兰. 薄层扫描法测定金胆片中大黄素的含量[J]. 西北药学杂志, 1998, 13(2):55.
DAI JP, ZHANG PL. The content of emodin in Jindan tablets was determined by thin layer scanning [J]. Northwest Pharm J, 1998, 13(2):55.
- [10] 江申英, 胡玉敏, 张允仁, 等. 金胆片中 α -猪去氧胆酸和猪胆酸的检测[J]. 中成药, 1987(3):11.
JIANG SY, HU RM, ZHANG YR, *et al.* Determination of α -hyodeoxycholic acid and hyocholic acid in Jindan tablets [J]. Chin Tradit Pat Med, 1987(3):11.
- [11] 中华人民共和国药典 2020 年版. 一部[S]. 2020:99.
ChP 2020. Vol I [S]. 2020:99.
- [12] 杜梓萱, 郭琳, 黄平情, 等. 高效液相色谱法同时测定猪胆粉中 4 种结合型胆酸含量及其特征图谱研究[J]. 中南药学, 2019, 17(6):880.
DU ZX, GUO L, HUANG PQ, *et al.* Simultaneous determination of 4 conjugated cholic acids and their specific chromatograms by HPLC [J]. Cent South Pharm, 2019, 17(6):880.

(收稿日期:2023-08-08)