

HPLC 同时测定龙胆中 4 种活性成分含量

冯波^{1,2}, 朱鹤云², 关皎², 郝乘仪², 郭小存², 顾景凯^{1*}

(1. 吉林大学 药物代谢研究中心, 长春 130023;
2. 吉林医药学院 药学院, 吉林 吉林 132013)

[摘要] 目的: 建立 HPLC 同时测定龙胆中龙胆苦苷、马钱酸、獐芽菜苦苷和獐芽菜苷含量的方法。方法: Inertsil ODS-SP 柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm), 流动相甲醇(A)-0.4% 磷酸水溶液(B), 梯度洗脱(0~40 min, 10%~30% A), 流速为 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 25 °C, 检测波长 240 nm。结果: 龙胆苦苷、马钱酸、獐芽菜苦苷和獐芽菜苷的线性范围分别为 1.0~20 μg ($r = 0.9997$), 1.0~20 μg ($r = 0.9996$), 1.0~20 μg ($r = 0.9995$), 0.1~2.0 μg ($r = 0.9995$); 平均加样回收率分别为 98.9%, 99.7%, 99.1%, 99.3%。结论: 该方法准确、灵敏、可靠、重复性好, 可用于龙胆的质量控制研究。

[关键词] 龙胆; 龙胆苦苷; 马钱酸; 獐芽菜苦苷; 獐芽菜苷; 高效液相色谱

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)13-0082-04

[doi] 10.11653/syjf2013130082

Simultaneous Determination of Four Active Components in Radix Gentianae by HPLC

FENG Bo^{1,2}, ZHU He-yun², GUAN Jiao², HAO Cheng-yi², GUO Xiao-cun², GU Jing-kai^{1*}

(1. Research Center for Drug Metabolism, Jilin University, Changchun 130023, China;
2. College of Pharmacy, Jilin Medical College, Jilin 132013, China)

[Abstract] **Objective:** To establish an HPLC method for simultaneous determination of gentiopicroside, loganic acid, swertiamarin and sweroside in Radix Gentianae. **Method:** Chromatographic separation was achieved on an Inertsil ODS-SP column (4.6 mm × 150 mm, 5 μm) with methanol (A) -0.4% phosphoric acid (B) as mobile phase for gradient elution (0-40 min, 10%-30% A) at a flow rate of 1.0 mL·min⁻¹. The column temperature was maintained at 25 °C and the detecting wavelength was set at 240 nm. **Result:** The linear ranges were 1.0-20 μg ($r = 0.9997$) for gentiopicroside, 1.0-20 μg ($r = 0.9996$) for loganic acid, 1.0-20 μg ($r = 0.9995$) for swertiamarin, 0.1-2.0 μg ($r = 0.9995$) for sweroside. The average recoveries of four components were 99.1%, 99.0%, 98.9% and 98.5%, respectively. **Conclusion:** The developed method is accurate, sensitive, credible, and repeatable. It can be applied to the quality control of Radix Gentianae.

[Key words] Radix Gentianae; gentiopicroside; loganic acid; swertiamarin; sweroside; HPLC

龙胆为龙胆科植物条叶龙胆、龙胆、三花龙胆、

坚龙胆的干燥根及根茎, 苦、寒, 归肝、胆经, 具有清热燥湿、泻肝胆火的功效^[1]。主要分布于黑龙江、吉林、辽宁、内蒙古、浙江、湖南、江西、福建、江苏、广东、新疆等省也有分布。龙胆植物所含的主要活性成分为环烯醚萜类化合物, 包括龙胆苦苷(gentiopicroside)、马钱酸(loganic acid)、獐芽菜苦苷(swertiamarin)及獐芽菜苷(sweroside)等。文献报道环烯醚萜类化合物具有广泛的生物活性, 如抗病毒、抗菌、抗肿瘤、抗氧化、保肝利胆、解痉镇痛、增强

[收稿日期] 20120811(005)

[基金项目] 吉林省科技厅项目(200905113)

[第一作者] 冯波, 在读博士, 教授, 从事中药质量控制以及中药新药研发, Tel: 0432-64560529, E-mail: fengbo2@sina.com

[通讯作者] * 顾景凯, 教授, 博士生导师, 从事药物代谢动力学研究, Tel: 0432-85619955, E-mail: gujk@mail.jlu.edu.cn

免疫、降糖降脂等多种活性,并且对神经系统、心血管系统和消化系统具有有益的作用^[2-4]。目前针对龙胆中活性成分进行含量测定的方法主要有薄层扫描法^[5]和高效液相色谱法^[6-11],但龙胆中龙胆苦苷、马钱酸、獐牙菜苦苷和獐牙菜苷4种环烯醚萜成分含量的同时测定尚未见文献报道。本研究建立HPLC同时测定龙胆中龙胆苦苷、马钱酸、獐牙菜苦苷和獐牙菜苷的含量,为龙胆的质量控制提供依据。

1 材料

日本岛津 LC-20A 型系列高效液相色谱仪(包括 SIL-20A 自动进样器,LC-20AD 二元泵, DGU-20A 脱气机, CTO-20A 型柱温箱, SPD-20A 紫外检测器、LC solution 色谱工作站等), KQ-500GVDV 型三频恒温数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司), FA1104N 型电子天平(上海精密科学仪器有限公司)。

对照品龙胆苦苷(批号 110770-200611)、獐牙菜苦苷(批号 110785-200203)购自中国食品药品检定研究院,獐牙菜苷(批号 100622)、马钱酸(批号 120107)购自上海融禾医药科技有限公司,纯度均 >99.5%,甲醇(色谱纯,美国 Fisher 公司),甲醇(分析纯,天津市大茂化学试剂厂),磷酸(分析纯,北京化工厂),所用水为娃哈哈纯净水。

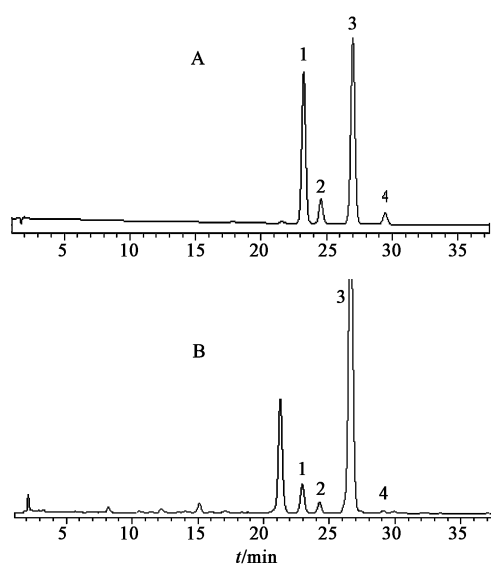
龙胆药材经吉林医药学院生药教研室李景华副教授鉴定为龙胆科植物龙胆 *Gentiana scabra* Bge. 的干燥根及根茎。

2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适用性试验 Inertsil ODS-SP 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm),流动相甲醇(A)-0.4% 磷酸水溶液(B),梯度洗脱(0~40 min, 10%~30% A),柱温 25℃,流速 1.0 mL·min⁻¹,检测波长 240 nm,进样量 5 μL。在选定的色谱条件下,各相邻色谱峰之间分离度均 >1.5,拖尾因子均在 0.95~1.05,理论塔板数均 >4 000。色谱图见图 1。

2.2 对照品溶液的配制 分别精密称取对照品龙胆苦苷、马钱酸、獐牙菜苦苷和獐牙菜苷适量,用甲醇分别配制龙胆苦苷 1.0 g·L⁻¹、马钱酸 1.0 g·L⁻¹、獐牙菜苦苷 1.0 g·L⁻¹、獐牙菜苷 0.1 g·L⁻¹ 的单一成分对照品储备液。精密量取上述 4 种对照品溶液 1.0, 0.2, 0.2, 0.5 mL,置于 10 mL 量瓶中,用甲醇定容至刻度,即得到含龙胆苦苷 0.1 g·L⁻¹、马钱酸 0.02 g·L⁻¹、獐牙菜苦苷 0.02 g·L⁻¹、獐牙菜苷 0.005 g·L⁻¹ 的混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液的配制 取龙胆粉末(过 40 目



1. 獐牙菜苦苷;2. 马钱酸;3. 龙胆苦苷;4. 獐牙菜苷

图 1 混合对照品(A)、样品(B)液相色谱

筛)约 0.5 g,精密称定,置 50 mL 具塞锥形瓶中,加入甲醇 20 mL,称定质量,40℃ 超声(400 W, 45 kHz)提取 30 min,放冷后再称重,用甲醇补足减失的质量,摇匀、滤过。取续滤液经 0.22 μm 微孔滤膜过滤后作为供试品溶液。

2.4 线性关系考察 分别精密吸取 2.2 项下制备的龙胆苦苷、马钱酸、獐牙菜苦苷、獐牙菜苷单一对照品溶液 1, 2, 5, 10, 15, 20 μL,按上述色谱条件进样,测定色谱峰面积,以进样量 X (μg) 为横坐标,色谱峰面积积分值(Y) 为纵坐标,进行线性回归,得到回归方程。龙胆苦苷 $Y = 1.000 \times 10^6 X - 3.944 \times 10^5$ ($r = 0.9997$),在 1.0~20 μg 呈良好的线性关系;马钱酸 $Y = 1.965 \times 10^6 X - 3.257 \times 10^5$ ($r = 0.9996$),在 1.0~20 μg 呈良好的线性关系;獐牙菜苦苷 $Y = 2.000 \times 10^6 X - 4.566 \times 10^5$ ($r = 0.9995$),在 1.0~20 μg 呈良好的线性关系;獐牙菜苷 $Y = 2.739 \times 10^5 X - 1.781 \times 10^4$ ($r = 0.9995$),在 0.1~2.0 μg 呈良好的线性关系。

2.5 精密度试验 精密吸取 2.2 项下制备的混合对照品溶液 5 μL,连续进样 6 次,结果龙胆苦苷、马钱酸、獐牙菜苦苷、獐牙菜苷峰面积的 RSD 分别为 0.18%, 0.58%, 0.67%, 0.28%,表明仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验 精密吸取 2.3 项下制备的供试品溶液各 5 μL,分别于 0, 4, 8, 12, 24, 48 h 进样测定,结果龙胆苦苷、马钱酸、獐牙菜苦苷、獐牙菜苷峰面积的 RSD 分别为 0.29%, 1.80%, 1.21%, 1.89%,表明供试品溶液在 48 h 内稳定性良好。

2.7 重复性试验 取同一批龙胆样品(批号 201201)5 份,精密称定,按 2.3 项下方法制备供试品溶液,进样 5 μL ,计算龙胆苦苷、马钱酸、獐牙菜苦苷、獐牙菜苷的含量,结果上述 4 种成分含量平均值分别为 4.33% ,0.20% ,0.09% ,0.029% ,RSD 分别为 0.92% ,0.82% ,0.90% ,0.65% 。

2.8 加样回收率试验 精密称取已知含量(龙胆苦苷、马钱酸、獐牙菜苦苷和獐牙菜苷质量分数分别为 4.33% ,0.20% ,0.09% ,0.029%)的龙胆样品(批号 201201)9 份,每份 0.25 g,分别加入相当于样品中龙胆苦苷、马钱酸、獐牙菜苦苷和獐牙菜苷含有量的 80% ,100% ,120% 的对照品溶液适量,各 3 份。按 2.3 项下的方法制备供试品溶液,进样 5 μL 测定,计算龙胆苦苷、马钱酸、獐牙菜苦苷和獐牙菜苷的回收率和 RSD,结果见表 1。

2.9 样品含量测定 精密称取 3 批辽宁产龙胆样

表 1 龙胆样品中龙胆苦苷、马钱酸、獐牙菜苦苷和獐牙菜苷的回收率试验结果

| 组分 | 样品中含有量 /mg | 加入量 /mg | 测得量 /mg | 回收率 /% | RSD /% | 平均值 /% |
|-------|------------|---------|---------|--------|--------|--------|
| 龙胆苦苷 | 10.83 | 10.01 | 20.69 | 98.6 | 0.5 | 98.9 |
| | 10.83 | 10.02 | 20.75 | 99.2 | | |
| | 10.83 | 9.98 | 20.65 | 98.2 | | |
| | 10.83 | 9.98 | 20.78 | 99.5 | | |
| | 10.83 | 9.99 | 20.69 | 98.6 | | |
| | 10.83 | 10.00 | 20.76 | 99.3 | | |
| 马钱酸 | 0.500 | 0.494 | 0.992 | 99.6 | 1.0 | 99.7 |
| | 0.500 | 0.492 | 0.993 | 100.2 | | |
| | 0.500 | 0.495 | 0.987 | 98.4 | | |
| | 0.500 | 0.493 | 0.989 | 99.2 | | |
| | 0.500 | 0.490 | 0.996 | 101.2 | | |
| | 0.500 | 0.497 | 0.994 | 99.4 | | |
| 獐牙菜苦苷 | 0.225 | 0.221 | 0.443 | 98.6 | 0.8 | 99.1 |
| | 0.225 | 0.226 | 0.448 | 98.7 | | |
| | 0.225 | 0.225 | 0.451 | 100.4 | | |
| | 0.225 | 0.223 | 0.447 | 99.6 | | |
| | 0.225 | 0.228 | 0.451 | 99.1 | | |
| | 0.225 | 0.226 | 0.447 | 98.2 | | |
| 獐牙菜苷 | 0.073 | 0.072 | 0.144 | 98.6 | 1.2 | 99.3 |
| | 0.073 | 0.078 | 0.150 | 98.7 | | |
| | 0.073 | 0.071 | 0.145 | 101.4 | | |
| | 0.073 | 0.072 | 0.145 | 100.0 | | |
| | 0.073 | 0.076 | 0.148 | 98.7 | | |
| | 0.073 | 0.074 | 0.146 | 98.6 | | |

品粉末,按 2.3 项下方法制备供试品溶液,进样 5 μL ,用外标法计算龙胆苦苷、马钱酸、獐牙菜苦苷和獐牙菜苷的含量。3 批样品测定结果见表 2。

表 2 龙胆样品中龙胆苦苷、马钱酸、獐牙菜苦苷和獐牙菜苷的含量(n=3) %

| 批号 | 含量(RSD) | | | |
|---------|-----------|------------|------------|-------------|
| | 龙胆苦苷 | 马钱酸 | 獐牙菜苦苷 | 獐牙菜苷 |
| 2012001 | 4.32(0.8) | 0.204(0.6) | 0.094(0.9) | 0.0293(0.8) |
| 2012002 | 4.33(0.5) | 0.198(0.4) | 0.093(0.7) | 0.0291(0.5) |
| 2012003 | 4.33(0.6) | 0.202(0.5) | 0.091(0.5) | 0.0294(0.7) |

3 讨论

本实验对甲醇-0.4% 磷酸水溶液、甲醇-水溶液和乙腈-水溶液 3 种流动相体系进行了考察。采用甲醇-水溶液作为流动相,分析时间长,4 种物质不能很好的分离,基线噪音较大。采用乙腈-水溶液作为流动相时,样品中存在较大的杂质峰干扰獐牙菜苦苷的测定。结果表明,甲醇-0.4% 磷酸水溶液流动相体系能够获得较好的分离效果,且分析时间较短,杂质峰不干扰样品的测定。

通过 DAD 检测器进行紫外光谱扫描,龙胆苦苷有 2 个最大吸收波长,分别为 274,243 nm,獐牙菜苦苷最大吸收波长为 238 nm,马钱酸最大吸收波长为 232 nm,獐牙菜苷最大吸收波长为 246 nm。实验最终选择 240 nm 作为检测波长,在此波长下,色谱峰的信息量最大,基线平稳且各色谱峰峰形较好。

本实验建立了 HPLC 同时测定龙胆中龙胆苦苷、马钱酸、獐牙菜苦苷和獐牙菜苷的含量,并应用该方法测定了 3 批辽宁产龙胆中 4 种活性成分的含量。从龙胆样品的 HPLC 图中可以看出,在獐牙菜苦苷峰前还有 4 个组分峰,峰形、分离度均好,因此,只要获得这 4 个组分的对照品,在同一色谱条件下即可对其进行含量测定,进一步全面提高龙胆的质量控制水平。

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社, 2010:89.
- [2] 郑虎占,董泽宏,余靖. 中药现代研究与应用. 第 2 卷[M]. 北京:学苑出版社,1997:1398.
- [3] 刘占文,陈长勋,金若敏,等. 龙胆苦苷的保肝作用研究[J]. 中草药,2002,33(1):47.
- [4] 陈雷,王海波,孙晓丽,等. 龙胆苦苷镇痛抗炎药理学作用研究[J]. 天然产物研究与开发,2008,20(5):903.

HPLC 测定田七跌打风湿软膏中盐酸小檗碱的含量

段冀江¹, 李沙沙², 翁立冬², 张璐², 刘莉², 刘强^{2*}

(1. 广州市海珠区素社街社区卫生服务中心, 广州 510515; 2. 南方医科大学, 广州 510515)

[摘要] 目的: 建立田七跌打风湿软膏中盐酸小檗碱的含量测定方法。方法: 采用高效液相色谱法, 色谱柱为 Agilent TC-C₁₈ 柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 以乙腈-0.05 mol·L⁻¹ 磷酸二氢钠(用磷酸调节 pH 3.0)(25:75)为流动相, 流速 1 mL·min⁻¹, 检测波长 265 nm。结果: 盐酸小檗碱在 0.043 74 ~ 0.437 4 mg 与峰面积呈良好的线性关系, $Y = 0.000 2X + 0.007 1$ ($r = 0.999 9$); 平均回收率 99.34%, RSD 1.73%。结论: 方法简便、可靠、准确, 专属性强, 可用于该制剂的质量控制。

[关键词] 田七跌打风湿软膏; 盐酸小檗碱; 高效液相色谱; 质量标准

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)13-0085-03

[doi] 10.11653/syjf2013130085

Determination of Hydrochloric Berberine in Tianqidiedafengshi Ointment by HPLC

DUAN Ji-jiang¹, LI Sha-sha², WENG Li-dong², ZHANG Lu², LIU Li², LIU Qiang^{2*}

(1. Community Health Center of Sushe Street, Haizhu District, Guangzhou 510515, China;
2. Southern Medical University, Guangzhou 510515, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a method for determination of hydrochloric berberine in Tianqidiedafengshi ointment. **Method:** Samples were analyzed on an Agilent TC-C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) using acetonitrile-0.05 mol·L⁻¹ sodium dihydrogen phosphate (adjust the pH to 3.0 with phosphoric acid) (25:75) as mobile phase. Speed of flow was 1.0 mL·min⁻¹ and examination wave length was 265 nm. **Result:** Hydrochloric berberine showed a good linearity in the range of 0.043 74-0.437 4 mg, regression equation was $Y = 0.000 2X + 0.007 1$ ($r = 0.999 9$) and the average recovery was 99.34% (RSD 1.73%). **Conclusion:** The

[收稿日期] 20110810(003)

[基金项目] 广东省科技计划项目(2007B03140007)

[第一作者] 段冀江, 主管药师, 从事药剂学研究, Tel:020-62789408, E-mail:s19861020@126.com

[通讯作者] * 刘强, 教授, 博士, 从事中药新制剂与新剂型研究, Tel:020-61648264, E-mail:gzlq2002@163.com

- [5] 江蔚新, 闫丽丽. 双波长薄层扫描法测定东北龙胆中龙胆苦苷的含量[J]. 黑龙江中医药, 2008, 21(1):5.
- [6] 肖琳, 贾娜, 何姣, 等. 青叶胆药材及饮片中獐牙菜苦苷和龙胆苦苷的含量测定[J]. 药物分析杂志, 2009, 29(5):876.
- [7] 沈涛, 金航, 杨涛, 等. 不同产地野生滇龙胆中主要裂环烯醚萜类成分的含量比较[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(13):70.
- [8] 王金鹏, 王砚, 任华忠. HPLC 测定复方茵陈糖浆中龙胆苦苷[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(11):71.
- [9] 董婷霞, 詹华强, 王峥涛, 等. 龙胆药材中龙胆苦苷的含量测定[J]. 上海中医药杂志, 2009, 29(5):876.
- [10] 白兰, 赵明琴, 尹蓉莉, 等. 龙胆苦苷脂质体含量测定及包封率测定[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(7):48.
- [11] 曹悦, 樊飞, 左代英, 等. 龙胆药材中 3 种功效成分含量的同时测定[J]. 时珍国医国药, 2011, 22(5):1100.

[责任编辑 顾雪竹]