

UPLC-PDA 法测定龙胆泻肝散中 3 种主要成分的含量

魏秀丽^{1,2} 张志民^{1,2} 张传津^{1,2*} 李有志^{1,2} 强 莉^{1,2} 郭 腾^{1,2} 王尚明²

1. 山东省饲料兽药质量检验中心/山东省畜产品质量安全监测与风险评估重点实验室/动物源细菌耐药性监测与精准化用药山东省工程实验室, 济南 250022; 2. 山东省动物用中药制剂工程实验室, 济南 250100

摘要 本试验采用 UPLC-PDA 法对黄芩苷、栀子苷和龙胆苦苷进行色谱分离和快速定量测定, 以 ACQUITY UPLC™ CSH C₁₈ 色谱柱 (2.1 mm×100 mm, 1.7 μm) 为分离柱, 柱温 35 ℃; 以甲醇-水 (0.1% 磷酸) 进行梯度洗脱; 流速: 0.35 mL/min; 进样量: 1 μL; 检测波长为 254 nm; 通过保留时间、光谱图和峰面积等参数对 3 种主要成分进行定性鉴别和定量检测, 建立超高效液相色谱 (UPLC-PDA) 测定龙胆泻肝散中主成分黄芩苷、龙胆苦苷和栀子苷的含量。试验结果显示: 每 1 mL 含龙胆苦苷 8 μg、栀子苷 5 μg 和黄芩苷 10 μg 的对照品溶液信噪比 ≥ 3 为检出限, 每 1 mL 含龙胆苦苷 16 μg、栀子苷 10 μg 和黄芩苷 20 μg 的对照品溶液信噪比 ≥ 10 为定量限, 完全满足检测需求。该方法前处理简单, 目标物理论塔板数高, 色谱分离度好, 分析速度较快, 节省时间, 适用于龙胆泻肝散中 3 种主要成分的定性鉴别和含量检测。

关键词 龙胆泻肝散; 定性鉴别和含量检测; 二极管阵列检测器; 超高效液相色谱法

龙胆泻肝散是一种中药散剂, 是由龙胆、栀子、黄芩、柴胡、甘草、当归、车前子等 10 味药材粉碎而成的复方粉末, 活性成分主要是龙胆苦苷、栀子苷和黄芩苷; 方中以龙胆泻肝胆经实火, 除下焦湿热为主药; 辅以黄芩、栀子泻火清热, 助龙胆清肝胆实火; 泽泻、木通、车前子利尿, 引湿热从尿而出, 从而可助龙胆清利肝胆湿热; 然而方中主辅药皆为苦寒之品, 为使其

不致苦燥伤阴, 并防止肝胆火盛耗伤阴液, 故加当归、生地养血益阴以和肝, 这样配伍以达泻中有补, 使邪去而不伤正, 均为佐药; 甘草和中协调诸药; 柴胡疏肝胆之气, 并用作引经药, 皆为使药, 诸药合用, 而有泻肝火利湿热之效。功能主治: 泻肝胆实火, 清三焦湿热。主治目赤肿痛, 淋浊, 带下^[1-2]。

在中国兽药典 2015 年版二部等文献对龙胆泻

收稿日期: 2021-04-09

基金项目: 2015 年国家科技支撑计划项目“兽药安全与质量评价技术研究与应用”(BAD11B03-01)

*通讯作者

魏秀丽, 女, 1977 年生, 硕士, 高级兽医师。

参 考 文 献

- [1] 郭青春, 胡辉. 高等职业院校动物繁殖教学改革研究[J]. 黑龙江动物繁殖, 2017, 25(5): 61-64.
- [2] 张响英. 高职院校动物繁殖学实验教学的探讨[J]. 科技信息(科学教研), 2008(3): 216.
- [3] 谢丽娜. “双高计划”背景下畜牧兽医专业群课程体系建设[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2021(3): 150-154.
- [4] 王国华, 郝荣超, 杨国忠, 等. 《动物繁殖学》课程教学改革初探[J]. 畜牧与饲料科学, 2016, 37(8): 83-85.
- [5] 曾长军, 张明, 赖松家, 等. 高等农业院校动物繁殖学教学改革问题与思考[J]. 黑龙江动物繁殖, 2012, 20(3): 58-62.

【责任编辑: 刘少雷】

肝散等相关制剂中龙胆苦苷、栀子苷和黄芩苷均采用高效液相色谱方法^[2-14]对含量进行测定,药典中检测采用梯度洗脱的方式,运行时间长,流动相用量多。本试验开发了超高效液相色谱-二极管阵列检测法(UPLC-PDA)对3种主成分进行定性鉴别和含量测定,梯度洗脱所用的时间缩短90%以上,用来测定龙胆泻肝散中3种主要成分的含量,精准快捷,绿色环保。

1 材料与方法

1.1 药品及试剂

龙胆苦苷对照品批号 110770-201314, 含量 99.1%, 购自中国食品药品检定研究院; 栀子苷对照品批号 110749-201316, 含量 97.5%, 购自中国食品药品检定研究院; 黄芩苷对照品批号 z0271504, 含量 96.9%, 购自中国兽医药品监察所; 磷酸为优级

纯, 甲醇为色谱纯; 所用水为超纯水; 龙胆泻肝散, 来自兽药企业报批产品。

1.2 仪器

Waters 2695 高效液相色谱仪; Waters Acquity™ Ultra performance LC 超高效液相色谱仪; 二者均购自美国 waters 公司。

1.3 方法

1) 供试品溶液的配制。严格按照中国兽药典 2015 年版二部龙胆泻肝散质量标准。

2) 标准储备液的配制。精密称取龙胆苦苷、栀子苷和黄芩苷对照品适量, 按照中国兽药典 2015 年版二部龙胆泻肝散质量标准, 配制成含黄芩苷 200 $\mu\text{g/mL}$ 、龙胆苦苷 160 $\mu\text{g/mL}$ 和栀子苷 100 $\mu\text{g/mL}$ 储备液。

3) 标准工作液的配制。取适量标准储备液, 配制成系列标准工作液, 见表 1。

表 1 标准工作液各成分浓度

标准工作液中各成分浓度	黄芩苷	龙胆苦苷	栀子苷
标准工作液 1	200	160	100
标准工作液 2	150	120	75
标准工作液 3	100	80	50
标准工作液 4	50	40	25
标准工作液 5	20	16	10
标准工作液 6	10	8	5

4) 色谱操作条件及参数。色谱柱采用 waters 公司 CSH C₁₈ 色谱柱 (2.1 mm×100 mm, 1.7 μm); 流动相 A 为甲醇, 流动相 B 为 0.1% 磷酸水溶液, 按表 2 程序进行梯度洗脱 (甲醇由 12% 逐步升高到 55%, 又逐渐下降到 12%, 均采用 6 号曲线速度变化模式); 采用二极管阵列检测器, 其扫描范围为 190~400 nm, 检测波长选择 254 nm, 柱温选择 35 $^{\circ}\text{C}$, 进样室温度 10 $^{\circ}\text{C}$, 流速为 0.35 mL/min, 进样量为 1 μL 。

5) 重复性试验和精密度试验。精密吸取龙胆苦苷、栀子苷和黄芩苷对照品储备溶液, 制成含龙胆苦苷 40 $\mu\text{g/mL}$ 、栀子苷 25 $\mu\text{g/mL}$ 和黄芩苷 50 $\mu\text{g/mL}$ 的混合对照品溶液, 重复配制 6 份, 上机测定, 计算 3 种成分峰面积 RSD。精密吸取上述混合对照品溶液 1 份, 重复进样 6 针, 计算 3 种成分峰面积 RSD。

6) 检测限和定量限的测定。对 3 种主要成分的

混合标准工作液采用 UPLC-PDA 进行检测分析, 并倍比稀释成多个不同浓度, 以溶液检测时的信噪比 $S/N \geq 3$ 时作为检测限, $S/N \geq 10$ 时作为定量限。

7) 不同色谱条件样品检测比较。使用超高效液相色谱仪 (流速: 0.35 mL/min; 进样量: 1 μL) 和高效液相色谱仪 (参照中国兽药典 2015 年版二部^[1], 流速: 1.0 mL/min; 进样量: 10 μL) 在不同的色谱条件下上机检测, 对同一样品中龙胆苦苷、栀子苷和黄芩苷的保留时间、峰面积和含量等参数分别进行比较。

2 结果与分析

2.1 色谱分离

在超高效液相色谱中, 通过不断优化色谱, 测得龙胆苦苷、栀子苷和黄芩苷色谱峰峰形对称, 分离度良好, 达到基线分离; 在 1.3 中 4) 条件下, 龙胆

表 2 梯度洗脱程序

时间/min	流动相 A/%	流动相 B/%	曲线
0.0	12	88	
0.5	12	88	6
1.0	18	82	6
2.0	18	82	6
2.5	20	80	6
6.0	20	80	6
7.0	48	52	6
11.0	48	52	6
12.0	55	45	6
12.8	20	80	6
13.5	12	88	6
14.0	12	88	6

苦苣、栀子苷和黄芩苷对照品和龙胆泻肝散样品, 色谱保留时间分别约为 4.9、5.5、9.7 min, 分离度均满足要求。

2.2 线性

在优化的色谱条件下, 采用梯度洗脱的方式, 快速有效地分离主要成分的色谱峰, 龙胆苦苣、栀子苷和黄芩苷的线性良好。龙胆苦苣在 16~160 μg/mL 范围内标准曲线: $y=3\ 652.8x+5\ 218$, $R^2=0.999\ 4$ 。栀子苷在 10~100 μg/mL 范围内标准曲线: $y=2\ 897.6x+2\ 683.2$, $R^2=0.999\ 5$ 。黄芩苷在 20~200 μg/mL 范围内标准曲线: $y=5\ 844.5x+521\ 8$, $R^2=0.999\ 4$ 。理论塔板数: 龙胆苦苣、栀子苷和黄芩苷均大于 7 000, 柱效良好。

表 3 不同色谱条件下的主成分保留时间、理论塔板数、运行时间参数的比较

主要成分	UPLC(本次试验方法)				HPLC(中国兽药典 2015 年版二部)			
	理论塔板数	保留时间/ min	进样量/ μL	运行时间/ min	理论塔板数	保留时间/ min	进样量/ μL	运行时间/ min
黄芩苷	39 900~40 100	9.69			10 400~10 600	43.91		
龙胆苦苣	7 800~8 000	4.93	1	14	15 000~15 200	18.87	10	60
栀子苷	8 590~8 890	5.47			14 500~14 930	20.71		

2 种试验色谱方法均已通过其方法学验证, 均可以准确控制其指标成分。从检测效率和色谱图

2.3 重复性试验和精密度试验

配制含龙胆苦苣 40 μg/mL、栀子苷 25 μg/mL 和黄芩苷 50 μg/mL 的混合对照品溶液, 重复配制 6 份, 进样, 并计算龙胆苦苣、栀子苷和黄芩苷其峰面积 RSD 分别为 0.62%、0.64%、0.57%, 完全满足试验要求。

取含龙胆苦苣 40 μg/mL、栀子苷 25 μg/mL 和黄芩苷 50 μg/mL 的混合对照品溶液 1 份, 重复进样 6 次, 并计算龙胆苦苣、栀子苷和黄芩苷其峰面积 RSD 分别为 0.36%、0.42%、0.55%, 完全满足试验要求。

2.4 检测限和定量限

龙胆苦苣 8 μg/mL、栀子苷 5 μg/mL 和黄芩苷 10 μg/mL 对照品溶液信噪比 ≥ 3 定为检出限, 龙胆苦苣 16 μg/mL、栀子苷 10 μg/mL 和黄芩苷 20 μg/mL 的对照品溶液信噪比 ≥ 10 定为定量限。

2.5 不同色谱条件样品检测结果的比较

不同色谱条件下 3 种化合物保留时间、理论塔板数、运行时间等参数的比较见表 3。由表 3 可知, 使用 waters 公司的 CSH C₁₈ 色谱柱保留时间短, 理论塔板数也高, 运行时间短, 性能完全满足检测需求。

通过响应值比较及光谱图各成分的最大吸收波长分别为 274.5、240.2、277.5 nm, 由于 3 种成分的波长相差较远, 为了顾及三者化合物的响应, 依然选择中国兽药典 2015 年版二部选择的 254 nm 作为含量测定的检测波长。UPLC 对照品光谱图见图 1, HPLC 对照品光谱图见图 2; UPLC 对照品色谱图见图 3, HPLC 对照品色谱图见图 4, 不同批次的样品图见图 5~图 10。保留时间分别为 4.9、5.5、9.7 min, 满足实验室的检测要求。

上看, 本试验优选超高效液相色谱法, 各色谱图见图 3~图 10。

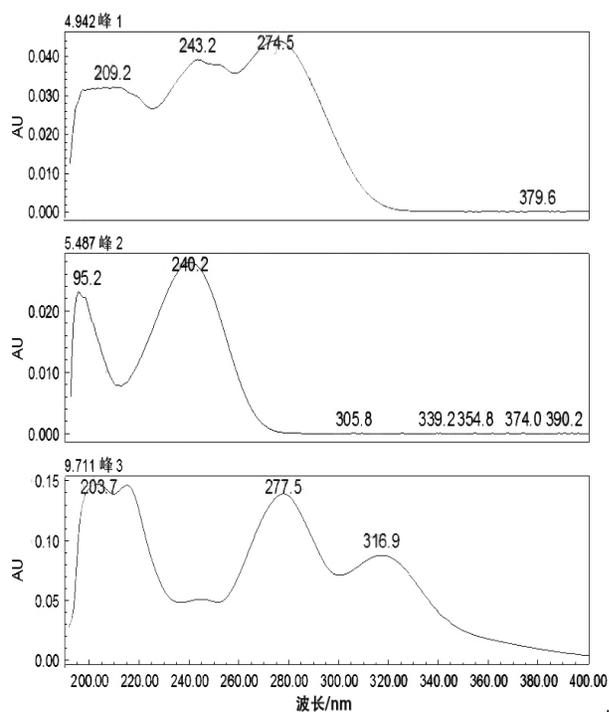


图 1 龙胆苦苷、栀子苷和黄芩苷对照品光谱图(UPLC)

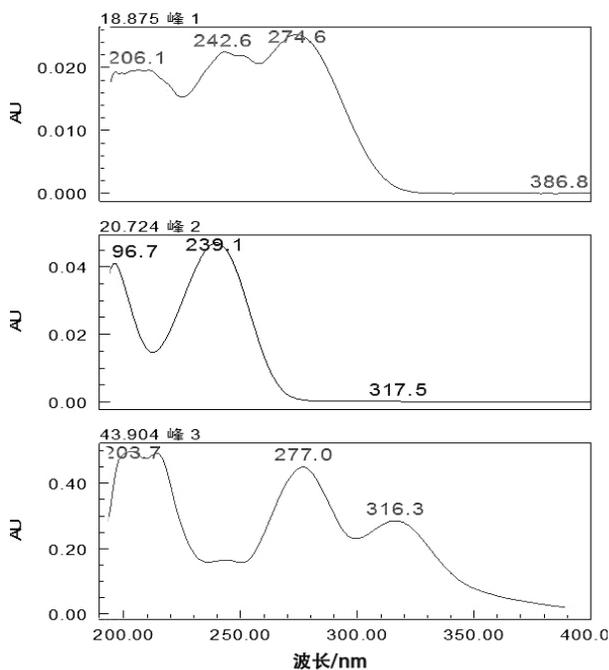


图 2 龙胆苦苷、栀子苷和黄芩苷对照品光谱图(HPLC)

使用 waters 超高效液相色谱仪和普通高效液相色谱仪,对一样品中 3 种化合物的含量测定结果分别进行比较,无显著差异,相对偏差均小于 1.0%,表明本试验方法结果精准可靠,而且简单快速(表 4)。

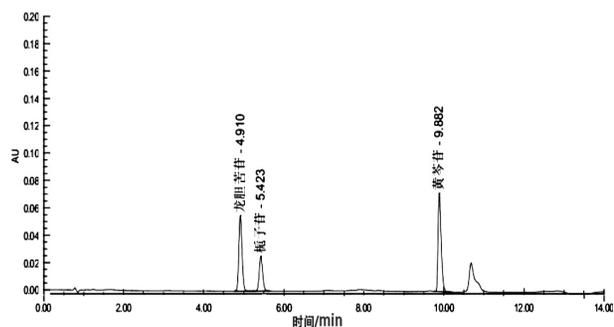


图 3 黄芩苷 100 $\mu\text{g/mL}$ 、龙胆苦苷 80 $\mu\text{g/mL}$ 和栀子苷 50 $\mu\text{g/mL}$ 对照品 UPLC 色谱图(1 μL)

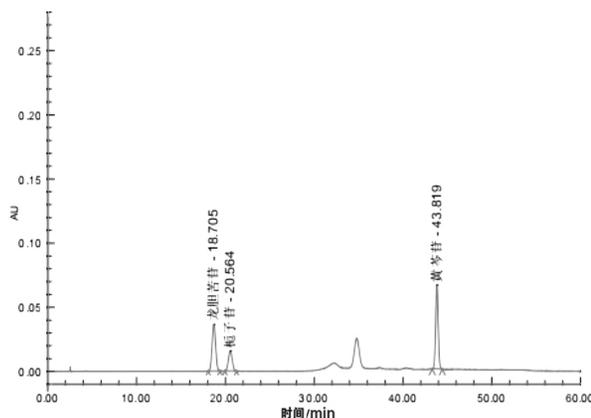


图 4 黄芩苷 100 $\mu\text{g/mL}$ 、龙胆苦苷 80 $\mu\text{g/mL}$ 和栀子苷 50 $\mu\text{g/mL}$ 对照品 HPLC 色谱图(10 μL)

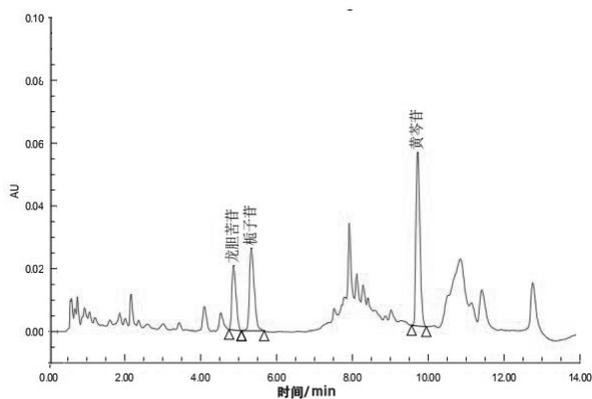


图 5 龙胆泻肝散 1 UPLC 色谱图(1 μL)

3 讨论

3.1 流动相的选择

本研究采用的甲醇和 0.1% 磷酸水溶液进行梯度洗脱,原药典方法^[1]采用的是甲醇和 0.2% 磷酸水溶液,因为 0.1% 磷酸水溶液可以很好地达到分离要求,为了保护色谱柱,就选择了较低浓度的磷酸。

3.2 检测波长和流速、柱温的选择

本研究将龙胆苦苷、栀子苷和黄芩苷的对照溶液

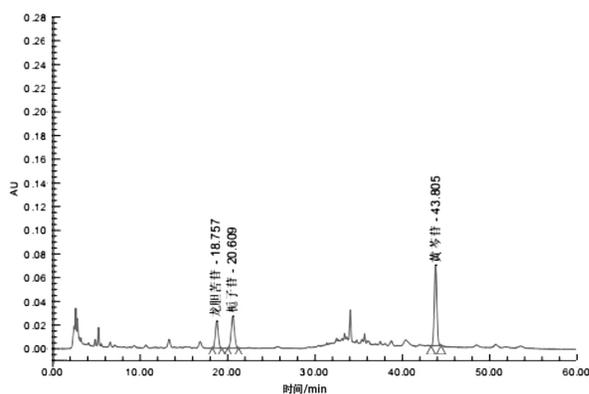


图6 龙胆泻肝散1 HPLC 色谱图(10 μL)

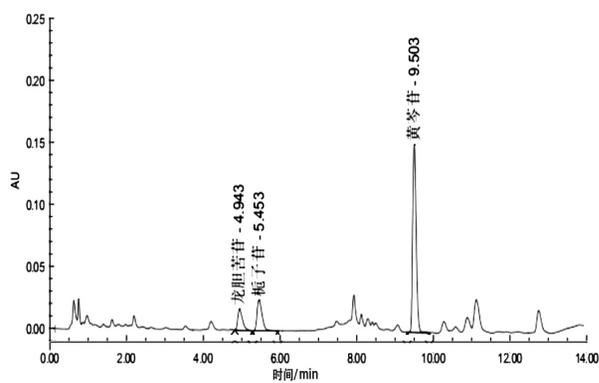


图7 龙胆泻肝散2 UPLC 色谱图(1 μL)

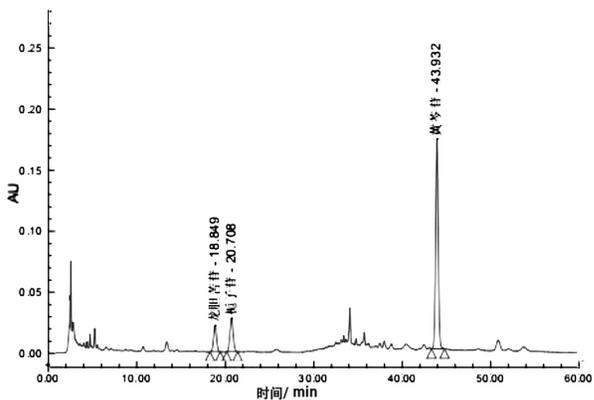


图8 龙胆泻肝散2 HPLC 色谱图(10 μL)

利用 PDA 检测器采集其光谱图,在波长 190~400 nm

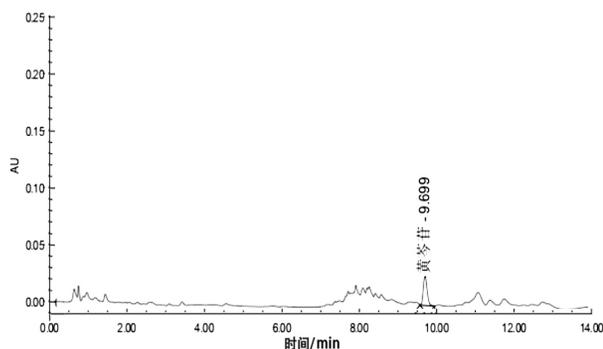


图9 龙胆泻肝散3 UPLC 色谱图(1 μL)

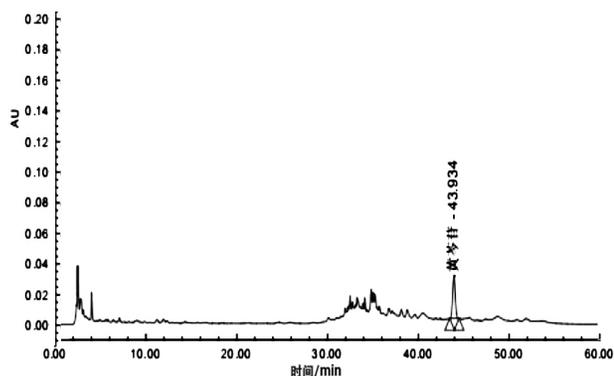


图10 龙胆泻肝散3 HPLC 色谱图(10 μL)

范围内进行扫描,龙胆苦苷、栀子苷和黄芩苷分别在 274.5、240.2、277.5 nm 处有最大吸收,根据光谱图的波形变化可以判断其是否含有主成分。改变色谱柱柱温 33、37 °C,流速 0.35 mL/min 不变,保留时间上下浮动 0.5 min 以内;改变流动相流速 0.34、0.36 mL/min,柱温 35 °C 不变,保留时间上下浮动 0.5 min 以内,均能达到良好的分离度和精确的含量测定结果。色谱柱性能稳定,适合本项目 3 种目标化合物龙胆苦苷、栀子苷和黄芩苷含量的测定。最终选择 254 nm 作为检测波长,35 °C 柱温,不同条件下保留时间见表 5。

3.3 流动相流速的比较

超高效液相流动相的流速为 0.35 mL/min,需要运行 14 min,每针运行需要 4.9 mL 流动相,而且平衡和冲柱子的时间也大大缩短,检测 1 个样品大约需要 2.5 h;高效液相色谱仪流速为 1.0 mL/min,运

表 4 不同色谱条件检测结果 (n=4) mg/g

不同企业报批产品	黄芩苷		龙胆苦苷		栀子苷	
	HPLC	UPLC	HPLC	UPLC	HPLC	UPLC
龙胆泻肝散制剂 1	4.43	4.44	1.99	1.98	3.63	3.62
龙胆泻肝散制剂 2	11.42	11.43	1.96	1.98	3.41	3.42
龙胆泻肝散制剂 3	1.89	1.88	0	0	0	0

行时间 1 h, 每针运行需要 60 mL 流动相, 平衡色谱柱和洗脱色谱柱的时间都很长(大约各需要 1 h), 检测 1 个样品大约需要 10 h。超高效液相色谱更节约试验耗材溶剂等, 每运行 1 针节省 55 mL 流动相, 超高效液相色谱方法产生废液少, 更环保和快捷。

3.4 本方法与药典方法的结果对比

本试验针对 3 个企业批次的龙胆泻肝散进行含量

检测, 分别采用超高效液相色谱方法和高效液相色谱方法, 龙胆泻肝散和龙胆苦苣、栀子苣和黄芩苣含量相对偏差均小于 1.0%, 2 批次合格, 1 批次不合格。企业可以根据快速的检测结果, 返工查找不合格的原因, 查找是药材不合格还是混合不均匀等因素导致的。本方法运行 1 针需要 14 min, 比药典方法 60 min 节约时间 46 min, 提高了检测效率。本方法高效快速准确可行。

表 5 龙胆苦苣、栀子苣、黄芩苣不同条件下保留时间

不同条件	龙胆苦苣	栀子苣	黄芩苣
0.35 mL/min 柱温 35 °C	4.92	5.51	9.88
0.34 mL/min 柱温 35 °C	5.06	5.59	10.09
0.36 mL/min 柱温 35 °C	4.84	5.34	9.70
0.35 mL/min 柱温 33 °C	5.04	5.57	9.91
0.35 mL/min 柱温 37 °C	4.89	5.40	9.85

3.5 结论

本研究建立的 UPLC-PDA 检测法, 对龙胆泻肝散中 3 种主成分龙胆苦苣、栀子苣和黄芩苣进行定性鉴别和含量测定, 具备精准快捷、经济环保的特点, 能有效控制龙胆泻肝散的质量, 可以作为备选内控标准方法。

参考文献

- [1] 王建国, 付春雨, 吴峰, 等. 龙胆泻肝散的临床应用[J]. 中国兽医杂志, 2008, 44(12): 84-85.
- [2] 中华人民共和国兽药典: 龙胆泻肝散质量标准[M]. 北京: 中国农业出版社, 2015.
- [3] 栾庆祥, 黄鑫, 杨强, 等. 高效液相色谱法测定兽药龙胆泻肝散中龙胆苦苣、栀子苣和黄芩苣的含量[J]. 中国兽药杂志, 2019, 53(3): 31-36.
- [4] 陈庆文, 郝自新. HPLC 同时测定龙胆泻肝丸(浓缩丸)中龙胆苦苣、栀子苣和黄芩苣的含量[J]. 北方药学, 2018, 15(3): 1-3.
- [5] 关皎, 朱鹤云, 尹树铸, 等. HPLC 法同时测定龙胆泻肝丸中 8 个活性成分的含量[J]. 药物分析杂志, 2017, 37(12): 2253-2259.
- [6] 张艳. HPLC 法同时测定泻肝安神丸中龙胆苦苣、栀子苣、

黄芩苣的含量[J]. 中国药师, 2017, 20(6): 1125-1127.

- [7] 杨必浩, 周应硕. 高效液相色谱法同时测定龙胆泻肝片中龙胆苦苣、栀子苣和黄芩苣的含量[J]. 系统医学, 2017, 2(8): 127-131.
- [8] 刘莉, 李婷婷, 孔卫东, 等. HPLC 法测定龙胆泻肝散中龙胆苦苣、栀子苣、黄芩苣的含量[J]. 江西化工, 2017(2): 93-95.
- [9] 郭俊国, 毕宏生, 宋继科, 等. 龙胆泻肝散配方颗粒 HPLC-DAD 指纹图谱的建立及主要成分含量测定[J]. 时珍国医国药, 2016, 27(5): 1106-1109.
- [10] 朱雯静, 冯波, 郝乘仪. HPLC-DAD 法同时测定龙胆泻肝丸中 3 种主要活性成分的含量[J]. 吉林医药学院学报, 2016, 37(1): 4-6.
- [11] 梁秀清, 黄静文, 刘东文, 等. HPLC 法同时测定龙胆泻肝片中两种苣类成分含量[J]. 内蒙古中医药, 2014, 33(26): 56-57.
- [12] 郑佳, 罗华玲. HPLC 法同时测定龙胆泻肝散中 4 种活性成分的含量[J]. 西南医科大学学报, 2020, 43(4): 340-343.
- [13] 王莉萍, 官炜, 邓小晨. HPLC 法同时测定龙胆泻肝丸中 10 个成分的含量[J]. 中药材, 2018, 41(8): 1923-1925.
- [14] 张勇, 薛昆鹏, 何美, 等. 固相萃取/超高效液相色谱法测定龙胆泻肝丸中栀子苣、龙胆苦苣与黄芩苣[J]. 分析测试学报, 2013, 32(1): 122-126.

【责任编辑: 胡 敏】