

制成水溶液。取浓硫酸 16.41 ml,缓缓加入 50 ml 水中,冷后,再缓缓加入氢氧化钠 18.60 g,再加氯化钙 24.95 g 搅匀,即为恒湿的溶液。

2.3 考察方法

采用加速试验法,在干燥器下部置恒湿溶液,上部置供试品,将干燥器置恒温箱中。分别取复合膜袋装的复方护肺颗粒 3 批样品,置于恒温 40℃、相对湿度为 75% 试验箱内放置 6 个月,每一个月取样 1 次,分别于 0,1,2,3,6 月末取样,按《中国药典》2010 年版一部^[2]对考察项目的各项指标进行测定。

2.4 含量测定

参考文献方法^[3]对主药中岩白菜素的含量进行测定,规定成品中含紫金牛以岩白菜素($C_{14}H_{16}O_9$)计每袋不得少于 30.0 mg。

2.5 考察结果

对复方护肺颗粒 3 个批号的样品(100317、100320、100322)进行考察,3 批样品基本无变化的项目:性状、粒度、溶化性、微生物限度检查结果见表 1;3 批样品量化检查结果如水分、杂菌总数检查、含量测定结果见表 2。

表 1 复方护肺颗粒的加速稳定性试验检查结果

检查项目	0 月	1 月	2 月	3 月	6 月
性状	均为棕黄色颗粒,味微苦	均为棕黄色颗粒,味微苦	均为棕黄色颗粒,味微苦	均为棕黄色颗粒,味微苦	均为棕黄色颗粒,味微苦
粒度	均符合规定	均符合规定	均符合规定	均符合规定	均符合规定
溶化性	全部溶化,无焦屑等异物	全部溶化,无焦屑等异物	全部溶化,无焦屑等异物	全部溶化,无焦屑等异物	全部溶化,无焦屑等异物
霉菌总数 $\leq 100\text{ cfu}\cdot\text{g}^{-1}$	均未检出	均未检出	均未检出	均未检出	均未检出
致病菌、活螨 (不得检出)	均未检出	均未检出	均未检出	均未检出	均未检出

表 2 复方护肺颗粒不同时间水分、杂菌检查、含量测定结果

批号	检查项目	0 月	1 月	2 月	3 月	6 月
100317	水分检查($\leq 5.0\%$)	4.0	4.3	4.3	4.5	4.7
	杂菌总数($\leq 1000\text{ cfu}\cdot\text{g}^{-1}$)	630.0	660.0	680.0	670.0	720.0
	含量测定($\text{mg}/\text{袋}$)($\geq 30.0\text{ mg}/\text{袋}$)	38.6	38.9	38.4	38.5	38.2
100320	水分检查($\leq 6.0\%$)	3.9	4.0	4.1	4.3	4.5
	杂菌总数($\leq 1000\text{ cfu}\cdot\text{g}^{-1}$)	540.0	640.0	680.0	710.0	730.0
	含量测定($\text{mg}/\text{袋}$)($\geq 30.0\text{ mg}/\text{袋}$)	36.8	37.2	37.4	37.5	36.5
100322	水分检查($\leq 6.0\%$)	3.7	3.9	4.1	4.2	4.7
	杂菌总数($\leq 1000\text{ cfu}\cdot\text{g}^{-1}$)	620.0	630.0	650.0	680.0	750.0
	含量测定($\text{mg}/\text{袋}$)($\geq 30.0\text{ mg}/\text{袋}$)	35.5	35.7	35.2	34.9	34.6

3 讨论

本方法利用高效液相色谱法测定复方护肺颗粒中岩白菜素的含量,线性范围 0.27~1.35 μg , $r=0.999\ 9$,平均回收率为 98.3% ($RSD=2.7\%$),重复性好,结果准确可靠^[3]。

由复方护肺颗粒剂的稳定性加速实验结果可知,3 批中试产品在恒温 40℃、相对湿度为 75% 加速实验条件下,经过为期六个月的稳定性考察试验,其性状、粒度、水分、溶化性、微生物限度及岩白菜素的含量均符合本品质量和现行版药典要求,各项指标测定结果均未发生明显变化。表明本品制备工艺能够保证产品的稳定性,目前采用的包装和贮存条件,可以保证本品的质量。

参 考 文 献

- 1 郑仁礼,曾庆岳.复方护肺颗粒的制备及质量控制[J].中国药师,2007,10(4):392-393
- 2 中国药典[S].2010 年版.一部.附录 6-7
- 3 曾庆岳,郑仁礼.HPLC 法测定复方护肺颗粒中岩白菜素的含量[J].中国药师,2007,10(1):43-44

(2011-05-06 收稿 2011-05-30 修回)

HPLC 法测定金胆片中龙胆苦苷、虎杖苷含量

郝立芳 袁晓芳 (淮安药品检验所 江苏淮安 223300)

摘 要 目的:建立测定金胆片中龙胆苦苷、虎杖苷含量的 HPLC 法,分析 151 批金胆片质量,为金胆片质量标准的统一、完善提供依据。方法:色谱柱:Diamonsil C_{18} 柱(250 mm×4.60 mm,5 μm);流动相:甲醇-水,梯度洗脱;检测波长:288 nm;柱温:30℃;进样量 10 μl 。结果:龙胆苦苷线性范围:5~100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ($r=0.999\ 9$),平均加样回收率为 99.4%, RSD 为 1.4% ($n=6$);虎杖苷线性范围:4~80 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ($r=0.999\ 8$),平均加样回收率为 100.4%, RSD 为 1.3% ($n=6$)。结论:该方法简便,快速,准确,可用于测定金胆片中龙胆苦苷、虎杖苷的含量。不同厂家生产的金胆片中龙胆苦苷、虎杖苷的含量差异较大。

关键词 金胆片;龙胆苦苷;虎杖苷;HPLC 法

中图分类号:R927.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1008-049X(2011)09-1369-03

金胆片由龙胆、金钱草、虎杖、猪胆膏四味组成。具有清热解毒、消炎利胆、排石作用,适用于急、慢性胆囊炎、胆石症及胆道感染,该药对于胆道疾患的主要症状腹痛有明显的缓解作用^[1]。其中龙胆中重要成分龙胆苦苷,具有保肝、利胆、健胃、抗炎抗过敏的作用^[2,3]。虎杖中主要化学成分有蒽醌类及白藜芦醇类,白藜芦醇类是一种重要的植物抗毒素,具有抗

菌、抗氧化、抗癌、抗血小板凝聚、抗艾滋病毒活性等药理作用^[4]。白藜芦醇类物质包括白藜芦醇及其苷,虎杖中该类物质的存在形式以后者为主,后者含量是前者的数十倍^[5]。本次分析涉及样品总批数为 151 批,涵盖 10 个生产企业,占全国生产企业的 66.7%;涉及质量标准 8 个,其中 5 个标准控制龙胆苦苷含量,均采用 HPLC 法,但测定方法各不相同,限度

值相差亦较大,最高值是最低值的18倍;8个质量标准均未涉及白藜芦醇苷(即虎杖苷)的测定。本文采用统一的方法同时测定样品中龙胆苦苷和虎杖苷,对151批样品进行分析,为金胆片质量标准的统一、完善提供依据。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

METTLER TOLEDO AG135 型电子分析天平;Agilent 1260 高效液相色谱仪,DAD 检测器;KH7200E 型超声波清洗器(昆山禾创超声仪器有限公司)。

1.2 试剂

龙胆苦苷对照品(中国药品生物制品检定所;批号:110770-201013;含量:96.9%);虎杖苷对照品(中国药品生物制品检定所;批号:111575-200502);甲醇为色谱纯(江苏汉邦科技有限公司);金胆片样品(151批样品均为2010年江苏省评价性抽样所抽取样品);龙胆(坚龙胆)、金钱草、虎杖、猪胆膏及辅料由江苏七〇七天然制药有限公司提供。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Diamonsil C₁₈柱(250 mm×4.60 mm,5 μm);流动相为甲醇(A)-水(B),按表1梯度洗脱;检测波长:288 nm;柱温:30℃;流速:1 ml·ml⁻¹;进样量:10 μl。

表1 流动相梯度洗脱程序

时间(min)	流动相 A (%)	流动相 B (%)
0	20	80
20	50	50
25	20	80

2.2 对照品溶液的制备

精密称取龙胆苦苷对照品适量,加甲醇制成40 μg·ml⁻¹的溶液,作为对照品溶液;精密称取五氧化二磷干燥器中干燥12 h以上的虎杖苷对照品适量加甲醇制成20 μg·ml⁻¹的溶液,作为对照品溶液(避光操作)。

2.3 样品溶液的制备

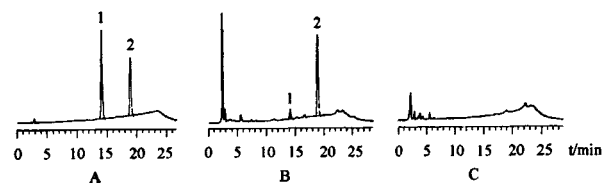
避光操作。取本品10片,精密称定,研细,精密称取适量(约0.33 g),置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇50 ml,称定重量,超声处理(400 W,40 kHz)30 min,放冷,用甲醇补足重量,过滤,取续滤液,即得。

2.4 阴性样品溶液的制备

按处方称取除龙胆、虎杖外其他药味,按标准制法^[1]制成阴性样品。按“2.3”项下方法制备阴性样品溶液。

2.5 干扰试验

取对照品溶液、样品溶液、阴性样品溶液按“2.1”项下色谱条件试验,结果表明:阴性样品溶液的色谱图中在与龙胆苦苷、虎杖苷对照品的色谱图中相同保留时间处无吸收峰,阴性无干扰。见图1。



A. 对照品 B. 样品 C. 阴性样品 1. 龙胆苦苷 2. 虎杖苷

图1 HPLC 色谱图

2.6 线性关系考察

精密称取龙胆苦苷对照品10 mg,置25 ml量瓶中,加甲醇适量使溶解并稀释至刻度。精密量取上述溶液分别制成浓度为5,10,25,50,100 μg·ml⁻¹的溶液,按“2.1”项下色谱条件试验,测定峰面积,以浓度(X)为横坐标,峰面积(Y)为纵坐标,得线性回归方程为Y=11 480X-6,r=0.999 9,表明龙胆苦苷在5~100 μg·ml⁻¹范围内线性关系良好。

避光操作。精密称取置五氧化二磷干燥器中干燥12 h以上的虎杖苷对照品10 mg,置25 ml量瓶中,加甲醇适量使溶解并稀释至刻度。精密量取上述溶液分别制成浓度为4,10,20,40,80 μg·ml⁻¹的溶液,按“2.1”项下色谱条件试验,测定峰面积,以峰面积为纵坐标,浓度为横坐标,进行线性回归,回归方程为Y=26 493X-11,r=0.999 8,表明虎杖苷在4~80 μg·ml⁻¹范围内线性关系良好。

2.7 精密度试验

取龙胆苦苷对照品溶液按“2.1”项下色谱条件进样测定,龙胆苦苷峰面积RSD为0.1%(n=6);虎杖峰面积RSD=0.1%(n=6)。

2.8 稳定性试验

取样品溶液(批号:10030101)在0,1,4,8,12,24 h进样,测定峰面积,虎杖苷RSD为1.4%(n=6),龙胆苦苷RSD为0.2%(n=6),结果表明样品在24 h内稳定。

2.9 重复性试验

取样品(批号:10030101),按“2.3”项下的方法制备样品溶液5份,按“2.1”项下色谱条件试验,测得龙胆苦苷含量为1.296 mg/片,RSD为1.2%(n=5);虎杖苷含量为0.8934 mg/片,RSD为1.4%(n=5)。

2.10 加样回收率试验

取已知含量的供试品适量(批号:10030101)分别加入龙胆苦苷、虎杖苷对照品适量,按“2.3”项下方法制备样品溶液,按“2.1”项下色谱条件试验。结果龙胆苦苷和虎杖苷的平均回收率分别为99.4%(RSD=1.4%,n=6)和100.4%(RSD=1.3%,n=6)。

2.11 样品的测定

取样品溶液按“2.1”项下色谱条件试验,将各生产厂家含量测定结果汇总并进行统计,进行组间比较经方差分析,结果见表2~5,及图2、图3。

表2 不同生产厂家龙胆苦苷含量(mg/片)

生产厂家	样品批数	均值	标准差	均值的95%置信区间		极小值	极大值
				下限	上限		
A	77	0.365	0.097	0.343	0.387	0.148	0.643
B	52	1.153	0.279	1.075	1.231	0.446	1.700
C	2	2.004	0.595	-3.341	7.351	1.583	2.425
D	2	0.784	0.080	0.065	1.503	0.728	0.841
E	4	0	...	...	...	...	...
F	1	0.875	...	...	...	...	...
G	7	2.538	0.216	0.016	0.416	2.126	2.755
H	2	1.226	0.026	0.992	1.460	1.207	1.244
I	1	0.189	...	...	...	...	...
J	3	0.281	0.018	0.236	0.326	0.261	0.295

表3 不同生产厂家龙胆苦苣方差分析

	离差平方和	<i>f</i>	方差	<i>F</i>
组间	49.02	9	5.45	144
组内	5.33	141	0.038	

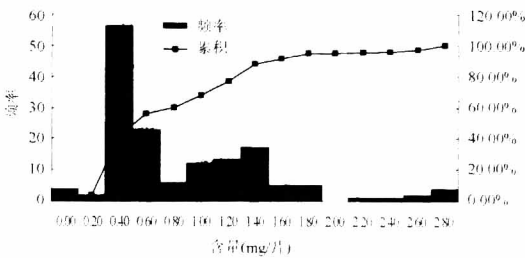


图2 金胆片中龙胆苦苣含量样本分布图

金胆片中龙胆苦苣含量组间比较,差异有统计学意义($P<0.05$),可认为各生产厂家样品中龙胆苦苣含量测定结果差异同样有统计学意义。

表4 不同生产厂家虎杖苷含量(mg/片)

生产厂家	<i>N</i>	均值	标准差	均值的95%置信区间		极小值	极大值
				下限	上限		
A	77	1.065	0.313	0.994	1.136	0.252	1.815
B	52	0.622	0.199	0.567	0.677	0.369	0.987
C	2	2.827	1.117	-7.210	12.864	2.037	3.617
D	2	0.777	0.027	0.534	1.020	0.758	0.796
E	4	0.514	0.079	0.388	0.640	0.398	0.573
F	1	0.098	...	...	...	...	...
G	7	1.953	0.373	1.608	2.298	1.679	2.738
H	2	0.372	0.001	0.363	0.381	0.372	0.373
I	1	0.367	...	...	...	...	...
J	3	1.266	0.306	0.506	2.026	0.921	1.504

表5 不同生产厂家虎杖苷方差分析表

	离差平方和	<i>f</i>	方差	<i>F</i>
组间	23.53	9	2.61	31.4
组内	11.75	141	0.08	

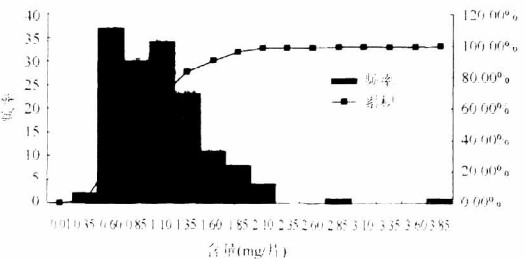


图3 金胆片中虎杖苷含量样本分布图

金胆片中虎杖苷含量组间比较,差异有统计学意义($P<0.05$),可认为各生产厂家样品中虎杖苷含量测定结果差异同样有统计学意义。

10个生产厂家的龙胆苦苣、虎杖苷含量差异显著,表明龙胆、虎杖药材品质及投料量的差异。个别厂家未检出龙胆苦苣,提示存在未投龙胆的可能性。部分厂家依然存在不同批次的样品含量差异较大的现象,说明企业在生产质量管理控制上存在不稳定的情况。

3 讨论

- 3.1 龙胆苦苣在270 nm波长处,虎杖苷在306 nm波长处有最大吸收,已有相关文献报导在等度洗脱的条件下测定金胆片中龙胆苦苣的含量^{6,7}。本文的方法旨在同一色谱条件下同时测定金胆片中龙胆苦苣和白藜芦醇含量,故参考相关文献,选择288 nm为测定波长⁸。
- 3.2 为考察提取的较佳条件,采用甲醇和乙醇分别超声提取,发现甲醇提取液中干扰成分较少。采用甲醇分3次超声提取,每次20 ml,分别超声20、10、10 min的方法与采用50 ml甲醇超声30 min方法提取率相同,但后者较为简便,故采用后者。
- 3.3 笔者考察了不同梯度洗脱条件下样品中各成分相互干扰程度。在本文的色谱条件下,样品中各成分分离良好,在25 min内即可完成样品检测。
- 3.4 《中国药典》2010版龙胆[含量测定]项下规定:龙胆含龙胆苦苣不得少于3.0%;坚龙胆含龙胆苦苣不得少于1.5%⁹。我们自制样品所用龙胆(坚龙胆)中龙胆苦苣为15.10 mg·g⁻¹,我们自制的样品(按处方100%投料)中龙胆苦苣为0.70 mg/片。《中国药典》2010版虎杖项下规定:按干燥品计算,含虎杖苷不得少于0.15%⁹。我们自制样品所用虎杖中虎杖苷为3.23 mg·g⁻¹,我们自制的样品(按处方100%投料)中,虎杖苷为0.72 mg/片。药材的品质和生产工艺是影响样品中各成分含量的重要因素,此外,对于含量较低的A、E、F、I、J厂家来说,违法违规生产可能是产品中龙胆苦苣或虎杖苷含量低的最主要因素。
- 3.5 经分析,按现行标准检验,不能有效控制产品质量,部分生产厂家存在违法违规投料的可能性。故建议严格按照GAP的要求,建立规范化的药材生产基地,保证药材质量的稳定、可靠;统一并提高现行质量标准,多指标控制产品质量;加强生产监管工作及市场监督,从而保证药品的质量,保障用药安全有效。

参考文献

1 卫生部药品标准[S]. 中药成方制剂. 第16册. 1998. 99

2 南京中医药大学. 中药大辞典(上册)[M]. 第2版. 上海: 上海科学技术出版社, 2006. 869-872

3 金香子, 徐明. 龙胆草提取物抗炎、镇痛、耐缺氧及抗疲劳作用的研究[J]. 时珍国医国药, 2005, 16(9): 842-843

4 彭彩云, 肖浩, 程文明, 等. 虎杖中白藜芦醇的研究进展[J]. 中药药导报, 2010, 16(8): 121-123

5 衣洪福. 虎杖的质量研究[D]. 上海: 第二军医大学硕士学位论文, 2002

6 葛卫红, 郭建友, 蔡金娜, 等. 高效液相色谱法测定金胆片中龙胆苦苣的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2006, 12(11): 10-12

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): 52-54

8 李米生, 刘妙芬, 杨汉荣, 等. HPLC同时测定金胆片中的龙胆苦苣和白藜芦醇及其苷的含量[J]. 南昌大学学报, 2007, 31(6): 572-575

9 中国药典[S]. 2010年版. 一部. 89, 194

(2011-03-22 收稿 2011-07-07 修回)

HPLC法测定金胆片中龙胆苦苷、虎杖苷含量

作者：[郝立芳](#)，[袁晓芳](#)
作者单位：[淮安药品检验所](#) [江苏淮安223300](#)
刊名：[中国药师](#) 
英文刊名：[China Pharmacist](#)
年，卷(期)：2011, 14(9)

参考文献(9条)

1. [彭彩云;肖浩;程文明](#) [虎杖中白藜芦醇的研究进展](#) 2010(08)
2. [金香子;徐明](#) [龙胆草提取物抗炎、镇痛、耐缺氧及抗疲劳作用的研究](#) 2005(09)
3. [南京中医药大学](#) [中药大辞典](#) 2006
4. [李来生;刘妙芬;杨汉荣](#) [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](#) 2007(06)
5. [丛培臣;门雨梅;袁继峰](#) [金胆片质量标准的研究](#) 2007(06)
6. [葛卫红;郭建友;蔡金娜](#) [高效液相色谱法测定金胆片中龙胆苦苷的含量](#) 2006(11)
7. [中国药典](#). 2010年版(一部)
8. [衣洪福](#) [虎杖的质量研究](#) 2002
9. [中药成方制剂](#) 1998

本文链接：http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_zgys201109060.aspx