

中图分类号: R917; R927 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2026)16-0100-04
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2026.16.019



高效液相色谱法同时测定龙丹丸中 11 种成分含量*

王海琴¹, 韩睿思¹, 罗 蹇¹, 谢艳华¹, 王四旺¹, 肖会敏^{2△}

(1. 西北大学生命科学与医学部, 陕西 西安 710069; 2. 西北农林科技大学化学与药学院, 陕西 杨凌 712100)

摘要: **目的** 建立同时测定龙丹丸中 11 种成分含量的高效液相色谱(HPLC)法。**方法** 色谱柱为 Stamsil-BP C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为 0.1% 磷酸-乙腈(梯度洗脱), 流速为 0.8 mL/min, 检测波长为 230 nm(芍药内酯苷、芍药苷)、280 nm(丹参素、隐绿原酸、龙胆苦苷、异绿原酸 B、芹菜素 7-O-葡萄糖苷、黄芩苷、丹酚酸 B、汉黄芩苷、黄芩素), 柱温为 30 ℃, 进样量为 5 μL。**结果** 11 种成分质量浓度分别在 68.07~1 021.87 μg/mL、57.04~855.53 μg/mL、18.66~280.74 μg/mL、1.03~15.67 μg/mL、58.01~870.14 μg/mL、6.31~93.93 μg/mL、6.14~91.68 μg/mL、143.53~2 152.54 μg/mL、49.44~740.84 μg/mL、38.27~574.11 μg/mL、3.03~45.44 μg/mL 范围内与峰面积线性关系良好($r \geq 0.999 0$, $n = 6$); 检测限为 0.098 0~12.993 2 μg/mL; 定量限为 0.326 8~43.310 6 μg/mL; 精密性、稳定性、重复性试验结果的 RSD 均小于 3.0%; 平均加样回收率为 92.34%~102.40%, RSD 为 1.52%~4.46% ($n = 6$)。**结论** 所建方法操作简便, 结果准确, 灵敏度高, 重复性好, 专属性强, 可用于龙丹丸的质量控制。

关键词: 高效液相色谱法; 龙丹丸; 含量测定; 质量控制

Simultaneous Determination of 11 Ingredients in Longdan Pills by HPLC

Wang Haiqin¹, Han Ruishi¹, Luo Qian¹, Xie Yanhua¹, Wang Siwang¹, Xiao Huimin^{2△}

(1. The College of Life Sciences, Northwest University, Xi'an, Shaanxi 710069, China; 2. College of Chemistry and Pharmacy, Northwest Agriculture and Forestry University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: **Objective** To establish a high-performance liquid chromatography (HPLC) method for the simultaneous content determination of 11 ingredients in Longdan Pills. **Methods** The chromatographic column was Stamsil-BP C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was 0.1% phosphoric acid-acetonitrile (gradient elution), the flow rate was 0.8 mL/min, the detection wavelength was 230 nm (albiziflorin, paeoniflorin) and 280 nm (danshensu, cryptochlorogenic acid, gentiopicroside, isochlorogenic acid B, apigenin-7-O-glucoside, baicalin, salvianolic acid B, wogonoside, baicalein), the column temperature was 30 ℃, and the injection volume was 5 μL. **Results** The linear ranges of the above 11 ingredients were 68.07-1 021.87 μg/mL, 57.04-855.53 μg/mL, 18.66-280.74 μg/mL, 1.03-15.67 μg/mL, 58.01-870.14 μg/mL, 6.31-93.93 μg/mL, 6.14-91.68 μg/mL, 143.53-2 152.54 μg/mL, 49.44-740.84 μg/mL, 38.27-574.11 μg/mL, 3.03-45.44 μg/mL, respectively. The limits of detection were 0.098 0-12.993 2 μg/mL, and the limits of quantification were 0.326 8-43.310 6 μg/mL. The RSDs of precision, stability and repeatability test results were all lower than 3.0%. The average recoveries were 92.34%-102.40%, with RSDs of 1.52%-4.46% ($n = 6$). **Conclusion** The established method is simple, accurate, sensitive, reproducible, and specific, and can be used for the quality control of Longdan Pills.

Key words: HPLC; Longdan Pills; content determination; quality control

龙丹丸为第四军医大学西京医院临床经验方, 是治疗糖尿病视网膜病变的纯中药复方制剂, 临床使用近 15 年, 疗效确切。现代药理学研究表明, 方中龙胆、丹

参、菊花、黄芩、赤芍、枸杞等药材均具有治疗糖尿病及其并发症的作用^[1-6], 其中龙胆疏肝明目, 泻肝火以凉血活血, 兼顾脏腑之肝和病因之热^[7]; 丹参活血化瘀、安

* 基金项目: 陕西省工程技术研究中心后补助项目[S2018-ZC-GCZXXY-SF-0005]; 陕西省科学技术研究发展计划项目[2015SF2-08-01]; 陕西省重点研发计划项目[2018SF-315]。

第一作者: 王海琴, 女, 硕士, 研究方向为中药药效物质基础, (电子信箱)250461388@qq.com。

△通信作者: 肖会敏, 男, 博士, 副研究员, 研究方向为中药新药研发, (电子信箱)xhm_0908@163.com。

- 中国医药科技出版社, 2020: 33.
- [11] 向春燕, 况刚, 盘思颖, 等. 小儿健脾丸质量标准研究[J]. 中国药业, 2021, 30(23): 62-65.
- [12] 陆超, 吴磊, 钱芳, 等. 胃痛安合剂的质量标准研究[J]. 中国药房, 2015, 26(3): 396-399.
- [13] 高惠静, 袁圆, 冯文玲, 等. 黑加仑平脂胶囊制备工艺及质量标准研究[J]. 中国药业, 2023, 32(19): 80-85.
- [14] 陈培武, 邓仁华, 黄贵平, 等. 大山楂颗粒质量标准提升研究[J]. 中国药业, 2024, 33(10): 90-92.
- [15] 朱家红, 陈赞, 王影超, 等. 胃炎宁颗粒质量标准研究[J]. 亚太传统医药, 2019, 15(6): 93-96.
- [16] 张笑笑, 张鑫, 贺敬霞, 等. 提高小儿健胃咀嚼片质量标准的研究[J]. 西北药学杂志, 2021, 36(5): 700-704.

(收稿日期: 2025-09-16; 修回日期: 2026-02-09)

神定志^[8],契合视网膜疾病的病因病机;两药共为本方君药。然而,中药复方制剂种类繁多、成分复杂,通过多指标定量方能较全面地反映制剂的整体质量^[9-10]。为进一步加强龙丹丸的质量控制,本研究中建立了同时测定制剂组方药材11种主要活性成分含量的高效液相色谱(HPLC)法。现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

LC-20AD型高效液相色谱仪(含SIL-20AC型自动进样器、SPD-M40型二极管阵列检测器、CTO-40C型柱温箱),AUW220D型电子分析天平(精度为0.01 mg),均购自日本Shimadzu公司;KQ-300DA型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 试药

龙丹丸(空军军医大学药学院中药与天然药物学教研室自制,批号为20240829、20240911、20240925,规格为0.3 g/丸);对照品隐绿原酸(批号为HR8261W11,含量 $\geq 98\%$),异绿原酸B(批号为HR2535W15,含量 $\geq 98\%$),芹菜素7-O-葡萄糖苷(批号为HR2129W7,含量 $\geq 98\%$),黄芩苷(批号为HS1585S1,含量 $\geq 98\%$),丹酚酸B(批号为HS22D6B1,含量 $\geq 98\%$),汉黄芩苷(批号为HR5125S1,含量 $\geq 98\%$),黄芩素(批号为HS5717S2,含量 $\geq 98.19\%$),均购自宝鸡市辰光生物科技有限公司;对照品丹参素(批号为110855-201915,含量 $\geq 97.8\%$),龙胆苦苷(批号为110770-201716,含量 $\geq 98.1\%$),均购自中国食品药品检定研究院;对照品芍药内酯苷(成都埃法生物科技有限公司,批号为MRDE0804,含量 $\geq 98\%$);对照品芍药苷(成都普思生物科技股份有限公司,批号为MUST-23030616,含量 $\geq 98.99\%$);乙腈、甲醇均为色谱纯,磷酸为分析纯,水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Stamsil-BP C₁₈柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m);流动相:0.1%磷酸(A)-乙腈(B),梯度洗脱(0~15 min时5%B $\rightarrow$ 9%B,15~35 min时9%B $\rightarrow$ 20%B,35~88 min时20%B $\rightarrow$ 30%B,88~94 min时30%B $\rightarrow$ 40%B);流速:0.8 mL/min;检测波长:230 nm(芍药内酯苷、芍药苷)、280 nm(丹参素、隐绿原酸、龙胆苦苷、异绿原酸B、芹菜素7-O-葡萄糖苷、黄芩苷、丹酚酸B、汉黄芩苷、黄芩素);柱温:30 $^{\circ}$ C;进样量:5 μ L。

2.2 溶液制备

混合对照品溶液:取11种对照品各适量,精密称定,加甲醇制成含丹参素280.74 μ g/mL、隐绿原酸15.67 μ g/mL、龙胆苦苷870.14 μ g/mL、芍药内酯苷1021.87 μ g/mL、

芍药苷855.53 μ g/mL、异绿原酸B93.93 μ g/mL、芹菜素7-O-葡萄糖苷91.68 μ g/mL、黄芩苷2152.54 μ g/mL、丹酚酸B740.84 μ g/mL、汉黄芩苷574.11 μ g/mL、黄芩素45.44 μ g/mL的混合对照品溶液。

供试品溶液:取样品10丸,研细,取约1.0 g,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇50 mL,密塞,称定质量,超声(功率300 W,频率40 kHz)处理30 min,放冷至室温,再次称定质量,用甲醇补足减失的质量,摇匀,经0.22 μ m微孔滤膜过滤,取续滤液,即得。

阴性对照品溶液:按龙丹丸处方和工艺分别制备缺龙胆、丹参、菊花、赤芍、黄芩的阴性样品,同供试品溶液制备方法制备,即得。

2.3 方法学考察

专属性试验:精密吸取2.2项下各溶液,按2.1项下色谱条件进样测定,记录色谱图。结果供试品溶液在与混合对照品溶液相同保留时间处有相应色谱峰,分离效果好,阴性对照无干扰。详见图1。

线性关系考察:精密吸取2.2项下混合对照品溶液适量,加甲醇逐级稀释,得不同质量浓度的系列混合对照品溶液,按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积,以待测成分质量浓度(X , μ g/mL)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归。结果见表1。

检测限与定量限考察:吸取混合对照品溶液适量,按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以信噪比(S/N)为3和10时待测成分质量浓度分别作为检测限和定量限。结果见表1。

精密度试验:精密吸取2.2项下供试品溶液适量,按2.1项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果丹参素、隐绿原酸、龙胆苦苷、芍药内酯苷、芍药苷、异绿原酸B、芹菜素7-O-葡萄糖苷、黄芩苷、丹酚酸B、汉黄芩苷、黄芩素峰面积的RSD分别为1.56%,0.76%,0.32%,0.69%,1.50%,0.60%,0.61%,0.22%,1.64%,0.40%,0.56%($n=6$),表明方法精密度良好。

稳定性试验:精密吸取2.2项下供试品(批号为20240829)溶液适量,分别于室温放置0,2,4,6,8,12,24,48 h时按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果丹参素、隐绿原酸、龙胆苦苷、芍药内酯苷、芍药苷、异绿原酸B、芹菜素7-O-葡萄糖苷、黄芩苷、丹酚酸B、汉黄芩苷、黄芩素峰面积的RSD分别为1.07%,2.04%,0.70%,2.95%,1.85%,2.24%,1.54%,0.57%,2.34%,0.84%,0.71%($n=8$),表明供试品溶液室温放置48 h内基本稳定。

重复性试验:取样品(批号为20240829)适量,共6份,精密称定,按2.2项下方法制备供试品溶液,按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算含量。

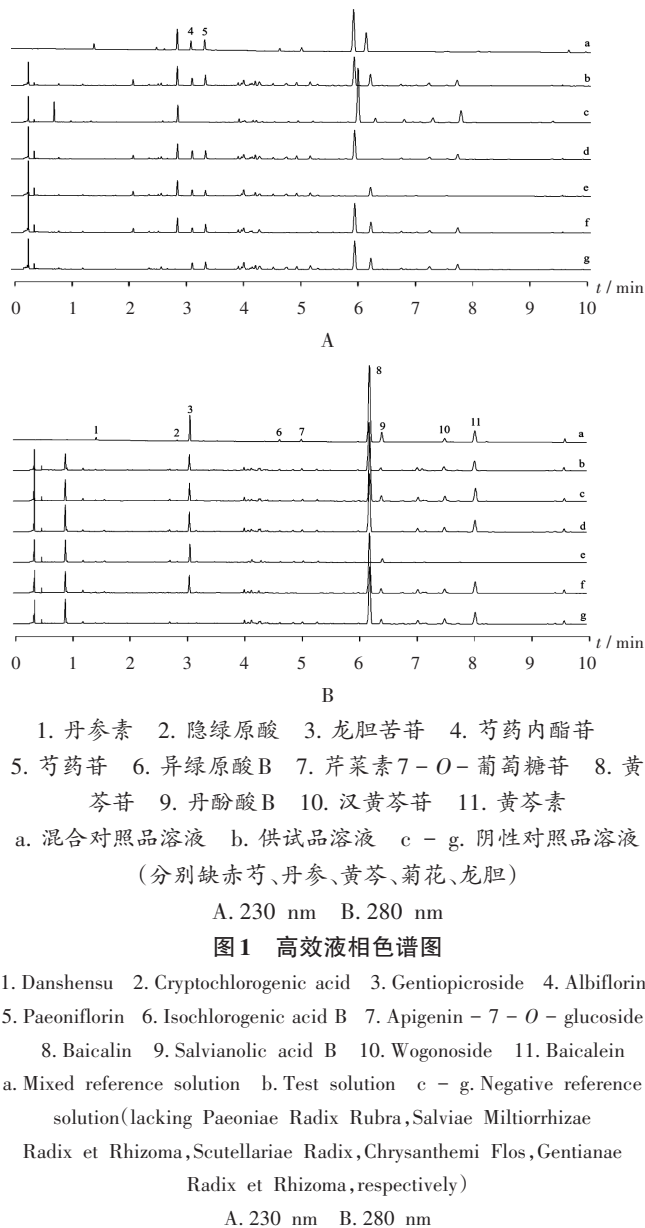


图1 HPLC chromatograms

结果丹参素、隐绿原酸、龙胆苦苷、芍药内酯苷、芍药苷、异绿原酸B、芹菜素7-O-葡萄糖苷、黄芩苷、丹酚酸B、汉黄芩苷、黄芩素平均含量分别为2.7767,0.4562,11.7214,8.5178,13.0150,1.3535,1.4908,29.2469,5.2813,6.6160,0.8000mg/g,RSD分别为1.22%,2.98%,0.94%,2.72%,0.56%,0.66%,1.26%,1.12%,2.58%,0.76%,0.73%(n=6),表明方法重复性良好。

加样回收试验:取样品(批号为20240829)约0.1g,共6份,精密称定,精密加入同一质量浓度的混合对照品溶液,按2.2项下方法制备供试品溶液,按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算加样回收率。结果丹参素、隐绿原酸、龙胆苦苷、芍药内酯苷、芍药苷、异绿原酸B、芹菜素7-O-葡萄糖苷、黄芩苷、丹酚

表1 线性关系考察及检测限、定量限结果

Tab.1 Results of the linear relationship,limit of detection and limit of quantification

待测成分	回归方程	r	线性范围 (μg/mL)	检测限 (μg/mL)	定量限 (μg/mL)
丹参素	$Y_1=3334.086-146.9$	0.9991	18.66~280.74	0.9135	3.0450
隐绿原酸	$Y_2=10398.672-5X_2+1588.6$	0.9994	1.03~15.67	0.1312	0.4374
龙胆苦苷	$Y_3=7398.957-8X_3-12552.1$	1.0000	58.01~870.14	0.3015	1.0050
芍药内酯苷	$Y_4=2965.415-2X_4+15553.23$	0.9993	68.07~1021.87	12.3315	41.1051
芍药苷	$Y_5=3270.593-9X_5-5218.6$	0.9996	57.04~855.53	12.9932	43.3106
异绿原酸B	$Y_6=8282.415-4X_6-2460.9$	1.0000	6.31~93.93	0.3724	1.2414
芹菜素7-O-葡萄糖苷	$Y_7=10556.166-1X_7-2036.1$	0.9992	6.14~91.68	0.3278	1.0925
黄芩苷	$Y_8=18566.556-4X_8-198073.5$	0.9998	143.53~2152.54	0.2405	0.8017
丹酚酸B	$Y_9=5798.234-0X_9+30838.4$	0.9990	49.44~740.84	0.7086	2.3619
汉黄芩苷	$Y_{10}=19926.251-9X_{10}-18510.7$	1.0000	38.27~574.11	3.1072	10.3572
黄芩素	$Y_{11}=35625.844-3X_{11}-5899.3$	0.9999	3.03~45.44	0.0980	0.3268

酸B、汉黄芩苷、黄芩素平均加样回收率分别为95.69%,102.40%,100.66%,96.55%,99.68%,95.72%,96.05%,101.98%,100.99%,99.26%,92.34%,RSD分别为2.44%,1.89%,1.89%,2.90%,4.46%,4.24%,2.33%,1.52%,4.17%,1.97%,1.96%(n=6)。

2.4 样品含量测定

取3批样品各适量,精密称定,按2.2项下方法制备供试品溶液,按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算含量。结果见表2。

表2 样品含量测定结果(mg/g,n=3)

Tab.2 Results of the content determination in samples (mg/g, n=3)

待测成分	20240829	20240911	20240925
丹参素	2.8083	2.8226	2.8143
隐绿原酸	0.4581	0.4623	0.4714
龙胆苦苷	12.2053	12.2887	12.4114
芍药内酯苷	8.5271	8.5690	8.2654
芍药苷	13.2182	13.4567	13.2379
异绿原酸B	1.3352	1.3264	1.3601
芹菜素7-O-葡萄糖苷	1.4376	1.4633	1.4882
黄芩苷	28.8832	29.0448	29.3103
丹酚酸B	4.8672	4.9521	5.2150
汉黄芩苷	6.5011	6.6154	6.5220
黄芩素	0.7837	0.7859	0.7944

3 讨论

3.1 指标成分选择

龙丹丸成分复杂,由龙胆、丹参、菊花、黄芩等中药材组方。研究发现,龙胆苦苷为环烯醚萜类成分,具有抗炎、抗氧化、降糖、调脂等多种生物活性^[11-12],可改

善2型糖尿病小鼠骨骼肌的胰岛素抵抗^[13]。丹参素能降低血糖水平及改善糖尿病大鼠肾脏、心肌损伤^[14-16]。参考2020年版《中国药典》和文献^[17-22],选取黄芩中的黄酮类成分等11种成分作为检测指标。

3.2 检测方法考察

因待测成分较多,本研究中选择HPLC法进行检测。该方法的分离效率、检测灵敏度、操作自动化程度均较高,而且选择性好,分析速度快,可同时对多种成分进行检测。色谱条件,预试验中比较了不同流动相[乙腈-水、乙腈-水(含0.1%磷酸)、乙腈-水(含0.05%磷酸)]、柱温(20、25、30、35℃)、流速(0.6、0.7、0.8、1.0 mL/min)的检测效果,最终选择乙腈-0.1%磷酸、30℃、0.8 mL/min,该条件下各成分色谱峰峰形较好,保留时间适中,且分离度较好。提取方式,根据制剂成分溶解性及制备工艺,预试验中提取方式选择超声提取,该法无需高温加热,可减少热敏性成分的降解,提取耗时短,重复性好。并进一步对超声提取的溶剂选择和超声时间进行了考察,其中超声提取溶剂分别考察了50%甲醇、70%甲醇、90%甲醇、甲醇^[23-24],超声时间分别考察了15、30、45、60 min,结果显示,以甲醇为溶剂超声提取30 min时,各待测成分含量较高。检测波长,预试验中在190~800 nm波长范围内进行全波长扫描,发现不同成分的最大吸收波长不一致,故采用双波长检测。其中芍药苷和芍药内酯苷最大吸收波长均为230 nm,故两种成分均在该波长处检测;龙胆苦苷、汉黄芩苷、黄芩素、黄芩苷、丹参素、丹酚酸B、隐绿原酸、异绿原酸B、芹菜素7-O-葡萄糖苷最大吸收波长分别为270、270、274、278、279、286、327、327、336 nm,但隐绿原酸、异绿原酸B、芹菜素7-O-葡萄糖苷在336 nm波长处分离度欠佳,而上述9种成分在280 nm波长处的灵敏度均较好,杂质峰干扰较小,故选择280 nm作为此9种成分的检测波长。

3.3 方法评价

本研究中成功建立了可同时测定龙丹丸中11种成分含量的HPLC法,该法操作简便,结果准确,且稳定性、重复性均良好,可为该制剂的质量控制提供参考。

参考文献

[1] 鲁义,姚嘉茵,王保,等. 龙胆苦苷对糖尿病周围神经痛大鼠神经保护作用[J]. 实用医学杂志,2020,36(5):565-569.
[2] 姚欣卉,肖洪彬,卞敬琦,等. 丹参有效成分在治疗糖尿病及其并发症中的作用机制研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2021,27(7):209-218.
[3] 赵凯迪,王秋丹,林长青. 菊花多糖对2型糖尿病大鼠的降血糖作用[J]. 食品与机械,2022,38(1):168-174.
[4] 曲芳莹,边义莹,于洋,等. 枸杞多糖通过TLR4/Myd88通路抑制糖尿病肾病大鼠炎症反应[J]. 解剖科学进展,2020,

26(4):378-382.

[5] 徐锋,陈滕,汪祖华,等. 黄芩抗糖尿病作用与机制的近十年研究进展[J]. 环球中医药,2022,15(2):342-348.
[6] 郭林,杨宇峰,石岩. 赤芍对糖尿病肾病保护作用及其机制研究[J]. 辽宁中医药大学学报,2022,24(12):217-220.
[7] 张锡纯,柳西河. 重订医学衷中参西录[M]. 北京:人民卫生出版社,2023:412.
[8] 王小平,王振国. 基于本草考证的丹参功效研究[J]. 中医药信息,2023,40(7):58-61.
[9] 赵冬青. 中药复方制剂的质量控制方法探讨[J]. 中医药管理杂志,2022,30(3):200-202.
[10] 吕玥,汤湧,李立言,等. 中药复方制剂质量控制体系的研究进展[J]. 中国中西医结合外科杂志,2020,26(1):170-172.
[11] 于学霖,刘佳怡,杜俊楠,等. 龙胆质量标志物的预测分析及评价研究[J]. 中国新药杂志,2025,34(8):871-880.
[12] 葛珊,魏昀,吴晨,等. 秦艽、威灵仙主要成分龙胆苦苷、木兰花碱对RA模型大鼠抗炎作用机制研究[J]. 中药药理与临床,2022,38(4):62-67.
[13] 王星,龙冬梅,李佳瑄,等. 龙胆苦苷调控PI3K/Akt信号通路改善2型糖尿病小鼠骨骼肌胰岛素抵抗[J]. 药物评价研究,2025,48(3):655-666.
[14] 魏小敏,王丽丽,刘海霞,等. 丹参素通过STAT3/JAK2/SOCS1信号通路在妊娠期糖尿病干预中的作用机制研究[J]. 陕西医学杂志,2023,52(5):508-512.
[15] 陈霞,米爱红,秦丽. 丹参素对糖尿病肾病大鼠Notch1/免疫球蛋白κJ区重组信号结合蛋白/Msh同源异型基因2信号通路及钙磷代谢的影响[J]. 安徽医药,2023,27(1):50-54.
[16] 陈洁,袁桥玉,刘斌. 基于PPARγ/PGC-1α通路探讨丹参素对糖尿病心肌病大鼠心肌线粒体功能的影响[J]. 中药新药与临床药理,2024,35(9):1329-1336.
[17] 吴玲芳,王子墨,赫柯芊,等. 赤芍的化学成分和药理作用研究概况[J]. 中国实验方剂学杂志,2021,27(18):198-206.
[18] 刘平,赵俊超,李日光. 芍药苷药理作用及其机制研究进展[J]. 中医药导报,2023,29(8):84-88.
[19] 龚发萍,郑鸣. 黄芩的化学成分及药理作用[J]. 临床合理用药杂志,2021,14(34):176-178.
[20] 侯晓杰,张建锋,侯长周,等. 黄芩苷药理活性和作用机制研究进展[J]. 药物评价研究,2024,47(11):2688-2696.
[21] 张伟,吴瑞,常相伟,等. 基于HPLC特征图谱结合化学计量学的菊花特征标志物的研究[J]. 天然产物研究与开发,2022,34(8):1289-1300.
[22] 周衡朴,任敏霞,管家齐,等. 菊花化学成分、药理作用的研究进展及质量标志物预测分析[J]. 中草药,2019,50(19):4785-4795.
[23] 龙玉堂,陈浩,刘晶. HPLC法同时测定当飞利肝宁胶囊中7种成分[J]. 中成药,2017,39(6):1187-1190.
[24] 王雪梅,刘校栓,王宝才,等. HPLC-DAD法同时测定益肾健胃丸中5种成分[J]. 中成药,2021,43(1):34-38.

(收稿日期:2025-06-21;修回日期:2026-02-13)