

# 胆宁片中金丝桃苷、橙皮苷和白藜芦醇的同时测定

黄媛平

(南昌市第三医院药剂科, 南昌 330009)

[摘要] 目的:建立同时测定胆宁片中金丝桃苷、橙皮苷和白藜芦醇 3 种有效成分含量的方法。方法:应用高效液相色谱法,采用 Venusil XBP-C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm);流动相为乙腈-0.05% 甲酸溶液(三乙胺调 pH 至 5.0),梯度洗脱;柱温为 25 °C,检测波长 358 nm (金丝桃苷)、283 nm (橙皮苷)、306 nm (白藜芦醇)。流速 0.8 mL·min<sup>-1</sup>,进样 20 μL,结果:3 个成分在 40 min 内完全分离,且峰面积与浓度的线性关系良好( $r > 0.999 6$ );加样回收率为 98.13% ~ 101.19%。结论:方法操作简便,结果准确,可以同时测定胆宁片中 3 个不同有效成分的含量,为胆宁片的质量控制方法提供依据。

[关键词] 胆宁片; 金丝桃苷; 橙皮苷; 白藜芦醇; 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(2011)17-0081-03

## Simultaneous Analysis of Hyperin, Hesperidin and Resveratrol in Danning Tablets by HPLC

HUANG Yuan-ping

(Department of Pharmacy, The Third Hospital of Nanchang, Nanchang 330009, China)

[Abstract] **Objective:** To develop an HPLC method for the determination of hyperin, hesperidin and resveratrol in Danning Tablets (DNT). **Method:** The chromatographic separation was performed on a Venusil XBP reversed phase C<sub>18</sub> (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) analytical column by gradient elution with acetonitrile and water buffer (containing 0.05% formic acid, adjusted with triethylamine to pH 5.0) at a flow rate of 0.8 mL·min<sup>-1</sup>. The column temperature was at 25 °C and the optimum detection wavelength was set at 358 nm (hyperin), 283 nm (hesperidin) and 306 nm (resveratrol). **Result:** Three components were separated completely in 40 minutes. They had good linear relationship ( $r > 0.999 6$ ) and recovery (98.13% -101.19%) in their detection scope. **Conclusion:** The method is simple, accurate, and can be used for the quality control of this herbal medicine.

[Key words] Danning Tablets; hyperin; hesperidin; resveratrol; HPLC

胆宁片由大黄、虎杖、青皮、陈皮、白茅根、郁金、山楂 7 味药组成,具有疏肝利胆,清热通下功效,用于肝郁气滞,湿热未清所致右上腹隐痛、食入作胀、胃纳不香、嗝气、便秘;慢性胆囊炎见上述症候者<sup>[1]</sup>。2010 年版《中国药典》规定胆宁片以大黄素和大黄酚的总量作为制剂的含量测定项。中药复方多成分的特点决定了在中药制剂质量控制中同时控制多种成分的必要性。金丝桃苷、橙皮苷和白藜芦

醇分别是胆宁片处方中虎杖、陈皮、青皮和山楂药材中的有效成分<sup>[1]</sup>,有关分别测定金丝桃苷、橙皮苷和白藜芦醇含量的 HPLC 已有报道<sup>[2,4]</sup>,但未见同时检测这 3 种成分的 HPLC 方法。为控制其内在质量,本研究中作者建立了 RP-HPLC 同时测定胆宁片中金丝桃苷、橙皮苷和白藜芦醇这 3 种成分含量的方法,结果显示本方法准确、精密、重复性好。

### 1 仪器与试剂

Agilent 1200 液相色谱仪(美国),包括:四元梯度泵、在线脱气机、柱温箱、G1315A DAD 检测器; Sartorius BS124S 1/千电子分析天平和 Sartorius BT25S1/10 万电子分析天平; KQ-250VDB 型双频数

[收稿日期] 20110309(010)

[第一作者] 黄媛平,本科,主管药师,研究方向:药物制剂分析, Tel:13907081073, E-mail:zhoupunp@sina.com

显超声机(昆山市超声仪器有限公司), PHS-3C 型精密 pH 计(上海精密科学仪器有限公司)。

金丝桃苷(批号 111521-201004), 橙皮苷(批号 110721-200512), 白藜芦醇(批号 111535-20050) 均购自中国药品生物制品检定所; 乙腈(色谱级), 流动相用水为双蒸水(自制), 其余试剂均为分析纯。胆宁片(上海和黄药业有限公司); 大黄(20100930); 虎杖(20090925); 青皮(20100803); 陈皮(20101124); 白茅根(20101215); 郁金(20090722); 山楂(20101016) 药材均购自黄庆仁大药房, 由中药鉴定教研室鉴定符合 2010 年版《中国药典》规定。

## 2 方法与结果

**2.1 色谱条件** 色谱柱 Venusil XBP-C<sub>18</sub> 柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈-0.05% 甲酸水(三乙胺调节调 pH 5.0), 梯度洗脱(流动相梯度见表 1), 柱温为 25 °C, DAD 检测器, 检测波长范围 200 ~ 400 nm, 检测波长 358 nm(金丝桃苷)、283 nm(橙皮苷)、306 nm(白藜芦醇), 进样品量均为 20 μL。

表 1 流动相梯度

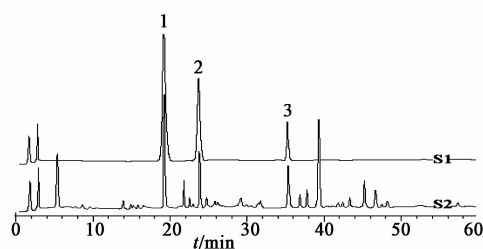
t/min	乙腈/%	0.05% 甲酸/%
0	15	85
40	35	65
50	50	50
60	100	0

**2.2 混合对照品溶液的配制** 取金丝桃苷、橙皮苷、白藜芦醇对照品适量, 精密称定, 置量瓶中, 加甲醇配制成 1 mL 含 142.36 μg 金丝桃苷、101.24 μg 橙皮苷、10.43 μg 白藜芦醇的混合对照品溶液母液。

**2.3 供试品溶液的制备** 取胆宁片 10 片, 除去包衣, 60 °C 干燥恒重, 粉碎磨成粉末, 过 100 目筛。称取约 0.1 g, 精确称定, 置 10 mL 量瓶中, 加 70% 甲醇 8 mL, 超声提取 45 min。冷却至室温, 用 70% 甲醇定容至刻度, 摇匀, 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 即得。

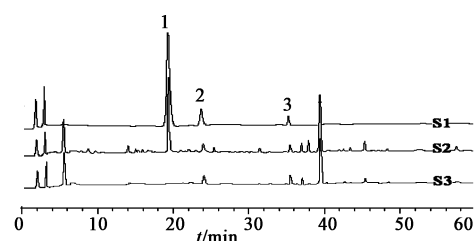
**2.4 阴性对照溶液的制备** 按胆宁片处方比例和制备工艺分别制备不含虎杖、青皮、陈皮和山楂的胆宁片, 并按供试品溶液的制备方法制备得到阴性对照溶液, 按色谱条件测定, 结果阴性对照样品对测定无干扰。(图 1~4)。

**2.5 测定方法** 分别吸取混合对照品溶液、供试品溶液、阴性对照品溶液, 按上述色谱条件测定, 采用外标法计算即得。



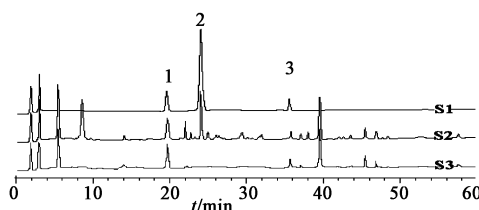
1. 金丝桃苷; 2. 橙皮苷; 3. 白藜芦醇;  
图 1 混合对照品(S<sub>1</sub>)和供试品(S<sub>2</sub>)

在 345 nm 处的 HPLC



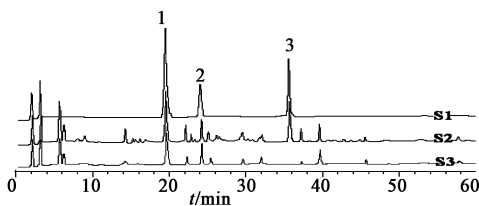
1. 金丝桃苷; 2. 橙皮苷; 3. 白藜芦醇

图 2 混合对照品(S<sub>1</sub>)、供试品(S<sub>2</sub>)和  
缺山楂阴性样品(S<sub>3</sub>)在 358 nm 下 HPLC



1. 金丝桃苷; 2. 橙皮苷; 3. 白藜芦醇

图 3 混合对照品(S<sub>1</sub>)、供试品(S<sub>2</sub>)和缺陈皮、  
青皮阴性样品(S<sub>3</sub>)在 283 nm 下 HPLC



1. 金丝桃苷; 2. 橙皮苷; 3. 白藜芦醇

图 4 混合对照品(S<sub>1</sub>)、供试品(S<sub>2</sub>)和  
缺虎杖阴性样品(S<sub>3</sub>)在 306 nm 下 HPLC

**2.6 线性关系考察** 分别准确吸取按 2.2 项下方法制备的混合对照品母液 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1 mL 置 1 mL 量瓶中, 甲醇定容, 摇匀, 即得 6 种不同浓度的混合对照品溶液。分别吸取上述浓度对照品溶液 20 μL, 注入色谱仪, 记录色谱图。以峰面积(Y)对浓度(X, mg·L<sup>-1</sup>)进行线性回归, 得回归方程(表 2)。

表2 线性关系试验 ( $n=6$ )

名称	$\lambda/\text{nm}$	回归方程	$r$	线性范围 $/\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$
金丝桃苷	358	$Y=17\ 229X-9\ 983$	0.999 6	14.24~142.36
橙皮苷	283	$Y=24\ 038X+29\ 380$	0.999 6	10.14~101.24
白藜芦醇	306	$Y=126\ 583X-36\ 760$	0.999 7	1.04~10.43

**2.7 精密度试验** 精密吸取 2.6 项中间浓度梯度点的混合对照品溶液 20  $\mu\text{L}$ , 重复进样 6 次, 按色谱条件测定峰面积值。求得日内 RSD, 金丝桃苷为 0.96%, 橙皮苷为 0.45%, 白藜芦醇为 0.62%。

**2.8 稳定性试验** 取同一份供试品溶液, 分别于 0, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12 h, 按上述色谱条件测定峰面积。结果表明: 供试品溶液在 12 h 内, 色谱峰面积无明显变化, RSD 金丝桃苷为 1.26%, 橙皮苷为 1.61%, 白藜芦醇为 1.19%。说明供试品溶液在制备后至少 12 h 内稳定。

**2.9 重复性试验** 取同一批样品 6 份 (批号 20100504), 按供试品溶液制备方法制备, 依法测定, 计算各物质含量。结果金丝桃苷、橙皮苷、白藜芦醇的平均含量分别为 7.36, 4.95, 0.53  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ , 其 RSD 分别为金丝桃苷为 1.43%, 橙皮苷为 0.66%, 白藜芦醇为 1.39%。

**2.10 加样回收率试验** 取已知含量的供试品粉末 6 份, 每份重约 0.05 g (含金丝桃苷 7.45  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 、橙皮苷 5.12  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 、白藜芦醇 0.51  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ) 混匀, 精密称定, 置 10 mL 量瓶中, 分别精密加入 373.5  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  的金丝桃苷、250.4  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  的橙皮苷、26.5  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  的白藜芦醇 3 种对照品溶液各 1.0 mL, 按供试品溶液制备方法制备, 按色谱条件测定, 计算平均回收率, 结果金丝桃苷、橙皮苷、白藜芦醇平均回收率 ( $n=6$ ) 分别为 98.13%, 101.19%, 99.63%; RSD 分别为 1.41%, 0.72%, 1.15%。

**2.11 样品含量测定** 取 3 批胆宁片样品, 按 2.3 项下方法制备样品溶液, 按色谱条件测定, 采用外标法计算含量, 结果见表 3。

表3 胆宁片中 3 种成分的含量测定 ( $n=3$ )  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 

批号	金丝桃苷	橙皮苷	白藜芦醇
20100501	7.65	4.85	0.47
20100502	7.51	5.24	0.53
20100503	7.82	5.08	0.49

### 3 讨论

采用 DAD 检测器可以进行全波长扫描, 提取多个波长下的色谱图, 实现了胆宁片中金丝桃苷、橙皮苷、白藜芦醇含量的同时测定。实验中在 200~400 nm 分别扫描金丝桃苷、橙皮苷、白藜芦醇对照品溶液, 结果金丝桃苷最大吸收波长 358 nm, 橙皮苷为 283 nm, 白藜芦醇 306 nm。样品含量测定时, 金丝桃苷提取 358 nm 色谱图, 橙皮苷提取 284 nm 色谱图, 白藜芦醇提取 306 nm 色谱图。色谱图 1 中提供的是在 345 nm 下的图谱, 因为在此波长下供试品的图谱信息最大。

本实验对超声和回流 2 种提取方法进行比较, 取相同量的样品粉末 2 份, 分别加 70% 甲醇 10 mL, 采用 2 种不同的方法提取 30 min, 表明超声提取的 3 种成分含量均高于回流提取, 因此选择超声提取。实验中考察了以水、50% 甲醇、70% 甲醇、90% 甲醇、甲醇及乙醇作为提取溶剂, 发现甲醇提取的 3 种成分含量均高于乙醇提取, 且随着甲醇体积分数的增加, 样品中各有效成分提取效率也随之增加, 而 70% 甲醇与 90% 甲醇和纯甲醇有效成分的含量差别不大, 故确定样品的提取溶媒为 70% 甲醇。

本实验考察了各种比例的乙腈-水、甲醇-水、乙腈缓冲液和甲醇甲酸缓冲液洗脱系统。结果表明, 采用乙腈-0.05% 甲酸缓冲液 (用三乙胺调 pH 5.0), 目标成分色谱峰于邻近的峰能达到基线分离, 峰形较好, 理论塔板数高, 分离效果最好。此外发现柱温在 25  $^{\circ}\text{C}$  时比 30  $^{\circ}\text{C}$  的分离效果更好。

#### [参考文献]

- [1] 中国药典. 一部[S]. 2010:540.
- [2] 陈宝龙, 黄琦, 郑朝华, 等. 高效液相色谱法测定山楂中金丝桃苷的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2008, 14(3):24.
- [3] 魏福荣, 聂丽云, 刘云峰. 等 HPLC 法测定复方健胃胶囊中橙皮苷的含量[J]. 齐鲁药事, 2010, 29(5):269.
- [4] 季梅, 娄红祥, 王小宁. 液相色谱-质谱联用法测定不同产地虎杖中白藜芦醇及其糖苷的含量[J]. 药物分析杂志, 2008, 28(12): 1987.

[责任编辑 蔡仲德]