

# 双波长HPLC法测定酸性龙胆合剂中龙胆苦苷和橙皮苷的含量<sup>Δ</sup>

王文月<sup>1,2\*</sup>, 刘志宏<sup>1</sup>, 黄爱文<sup>1</sup>, 宋洪涛<sup>1#</sup> (1.南京军区福州总医院药学科, 福州 350025; 2.福建医科大学药学院, 福州 350108)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)09-1241-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.09.31

**摘要** 目的:建立双波长高效液相色谱(HPLC)法同时测定酸性龙胆合剂中龙胆苦苷和橙皮苷的含量。方法:采用HPLC法。色谱柱为Agilent ZORBAX SB-C<sub>18</sub>,流动相为甲醇-0.1%磷酸水溶液(梯度洗脱),检测波长为270 nm(龙胆苦苷)、283 nm(橙皮苷),柱温为30 ℃,进样量为10 μl。结果:龙胆苦苷和橙皮苷的质量浓度分别在14.4~100.8 μg/ml( $r=0.9997$ )、8.0~104 μg/ml( $r=0.9997$ )范围内与峰面积呈良好线性关系;精密性、稳定性、重复性试验的RSD均<2%;平均加样回收率分别为99.92%、102.55%,RSD分别为0.41%、1.84%( $n$ 均为9)。结论:该方法简便、快速、灵敏,适用于酸性龙胆合剂中龙胆苦苷和橙皮苷的含量测定。

**关键词** 酸性龙胆合剂;龙胆苦苷;橙皮苷;高效液相色谱法

## Content Determination of Gentiopicrosin and Hesperidin in Acid Gentian Mixture by Dual-wavelength HPLC

WANG Wen-yue<sup>1,2</sup>, LIU Zhi-hong<sup>1</sup>, HUANG Ai-wen<sup>1</sup>, SONG Hong-tao<sup>1</sup> (1.Dept. of Pharmacy, Fuzhou General Hospital of Nanjing PLA, Fuzhou 350025, China; 2.College of Pharmacy, Fujian Medical University, Fuzhou 350108, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To establish the dual-wavelength HPLC method for content determination of gentiopicrosin and hesperidin in Acid gentian mixture. METHODS: HPLC was conducted. The analysis was performed on Agilent ZORBAX SB-C<sub>18</sub> column with the mobile phase of methanol-0.1% phosphoric acid solution (gradient elution); the detection wavelength was 270 nm (gentiopicrosin) and 283 nm (hesperidin); the column temperature was 30 ℃ and the volume was 10 μl. RESULTS: The linear range of gentiopicrosin was 14.4-100.8 μg/ml ( $r=0.9997$ ) and that of hesperidin was 8.0-104 μg/ml ( $r=0.9997$ ); the RSDs of precision, stability, repeatability tests was all less than 2%; average recoveries were 99.92% (RSD=0.41%,  $n=9$ ) and 102.55% (RSD=1.84%,  $n=9$ ), respectively. CONCLUSIONS: The method is simple, accurate and sensitive and can be used for content determination of gentiopicrosin and hesperidin in Acid gentian mixture.

**KEYWORDS** Acid gentian mixture; Gentiopicrosin; Hesperidin; HPLC

酸性龙胆合剂临床主要用于治疗食欲不振及胃酸缺乏等症。本品处方收载于《中国人民解放军医疗机构制剂规范》(2002年版)中,在该标准的含量测定项中,仅有盐酸的含量测定项,使得其制剂质量难以控制。有研究分别对龙胆苦苷或橙皮苷进行了单独测定<sup>[1-4]</sup>,但单一指标成分测定难以反映中药质量的整体特征。因此,本研究建立了双波长高效液相色谱(HPLC)法同时测定龙胆苦苷、橙皮苷两种成分含量的方法,以为进一步控制该制剂的质量水平提供参考。

## 1 材料

### 1.1 仪器

1100型HPLC仪(美国Agilent公司);SZ-97A型自动三重纯水蒸馏器(上海亚荣生化仪器厂)。

### 1.2 药品与试剂

酸性龙胆合剂(自制,批号:20131030、20131106、20131113、

<sup>Δ</sup> 基金项目:军队医疗机构制剂标准提高科研专项课题(No.13ZJ01)

\* 硕士研究生。研究方向:药物新剂型与制剂新技术。电话:0591-22859972。E-mail: shishishijiahaiyue@163.com

# 通信作者:教授,博士生导师。研究方向:药物新剂型与制剂新技术。电话:0591-22859459。E-mail: sohoto@vip.163.com

20131120、20131127、20131204);稀盐酸(郑州天耀科技有限公司,批号:130419,分析纯);橙皮酊(福州海王金象中药制药有限公司,批号:121205);龙胆苦苷和橙皮苷对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为:110770-201013、110721-201115,纯度分别为:96.9%、95.3%)。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱:Agilent ZORBAX SB-C<sub>18</sub>(150 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:甲醇(A)-0.2%磷酸水溶液(B),梯度洗脱(0~10 min, 25%→30% A; 10~20 min, 30%→40% A; 20~23 min, 40% A);流速:1.0 ml/min;检测波长:270 nm(龙胆苦苷)、283 nm(橙皮苷);柱温:30 ℃;进样量:10 μl。在此色谱条件下,龙胆苦苷和橙皮苷的色谱峰形良好,保留时间分别为6.757、19.910 min,两种组分的理论板数分别以龙胆苦苷峰和橙皮苷峰计均>3 000,分离度均>2.0。色谱见图1。

### 2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液 精密量取龙胆苦苷和橙皮苷对照品各适量,加甲醇制成每1 ml分别含龙胆苦苷和橙皮苷400、80 μg的混合对照品溶液,即得。

2.2.2 供试品溶液 精密量取本品2.5 ml,置于10 ml量瓶中,

加甲醇稀释至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

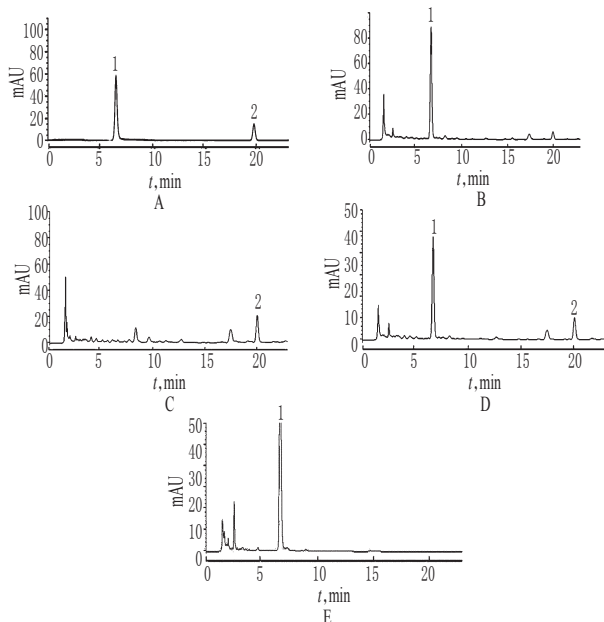


图1 高效液相色谱图

A.混合对照品;B.供试品(270 nm);C.不含龙胆的阴性对照(270 nm);D.供试品(283 nm);E.不含陈皮阴性对照(283 nm);1.龙胆苦苷;2.橙皮苷

Fig 1 HPLC chromatograms

A.mixed substance control; B.test sample (270 nm); C.negative control without *R. Gentianae*(270 nm); D.test sample(283 nm); E.negative control without *C. reliculata*(283 nm); 1.gentiopicroside; 2.hesperidin

2.2.3 阴性对照溶液 按处方分别取各味药材适量,按处方工艺分别制备不含龙胆和陈皮的阴性样品,再按“2.2.2”项下供试品溶液的制备方法分别制备阴性对照溶液,即得。

### 2.3 线性关系考察

精密量取混合对照品溶液0.5、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 ml,置于10 ml量瓶中,加甲醇稀释至刻度,混匀,经0.45微孔滤膜滤过,分别按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以峰面积( $A$ )为纵坐标、对照品的质量浓度( $c, \mu\text{g/ml}$ )为横坐标,绘制标准曲线,得龙胆苦苷的回归方程为 $A=10.037 3c-65.697 6$  ( $r=0.999 7$ )、橙皮苷的回归方程为 $A=9.132 7c-5.688 5$  ( $r=0.999 7$ )。结果表明,龙胆苦苷和橙皮苷的质量浓度分别在20~200、4~40  $\mu\text{g/ml}$ 范围内与峰面积呈良好线性关系。

### 2.4 精密度试验

精密量取混合对照品溶液适量,按“2.1”项下色谱条件重复进样测定6次,记录峰面积。结果,龙胆苦苷和橙皮苷的峰面积RSD分别为0.54%、1.16% ( $n=6$ ),表明仪器精密度良好。

### 2.5 重复性试验

精密称取同一批号的样品(批号:20131204)各适量,共6份,按“2.2.2”项下方法制备供试溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定6次,记录峰面积。结果,龙胆苦苷、橙皮苷的峰面积RSD分别为1.39%、1.32% ( $n=6$ ),表明该方法重复性良好。

### 2.6 稳定性试验

精密称取同一批样品制备的供试品溶液适量,分别于放置0、1、4、8、12、24 h时按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,龙胆苦苷、橙皮苷的峰面积RSD分别为1.89%、

1.46% ( $n=6$ ),表明供试品溶液在室温下24 h内稳定性良好。

### 2.7 加样回收率试验

取已知含量的样品适量,共9份,分别精密加入一定量的龙胆苦苷和橙皮苷对照品,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,混匀,经0.45  $\mu\text{m}$ 微孔滤膜滤过。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,结果见表1。

表1 加样回收率试验结果( $n=9$ )

待测成分	样品含量, $\mu\text{g}$	加入量, $\mu\text{g}$	测得量, $\mu\text{g}$	加样回收率, %	平均加样回收率, %	RSD, %			
龙胆苦苷	330.12	264.10	598.89	101.77	99.92	1.16			
	330.12	264.10	593.68	99.80					
	330.12	264.10	592.57	99.38					
	330.12	330.12	664.36	101.25					
	330.12	330.12	658.65	99.52					
	330.12	330.12	657.24	99.09					
	330.12	396.14	720.33	98.50					
	30.12	396.14	730.62	101.10					
	330.12	396.14	721.91	98.90					
	橙皮苷	78.61	62.89	141.95			100.72	103.16	1.12
		78.61	62.89	143.85			103.74		
		78.61	62.89	142.89			102.21		
78.61		78.61	160.18	103.77					
78.61		78.61	159.22	102.54					
78.61		78.61	160.25	103.85					
78.61		94.33	176.25	103.51					
78.61		94.33	177.28	104.60					
78.61		94.33	176.26	103.52					

### 2.8 样品含量测定

精密称取6批酸性龙胆合剂样品各适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算各指标成分的质量浓度,结果见表2。

表2 样品含量测定结果( $n=6, \text{mg/ml}$ )

Tab 2 Results of content determination of samples ( $n=6, \text{mg/ml}$ )

批号	龙胆苦苷	橙皮苷
20131030	0.339	0.074
20131106	0.335	0.072
20131113	0.330	0.076
20131120	0.332	0.075
20131127	0.330	0.070
20131204	0.335	0.069
均值	0.333	0.073

## 3 讨论

### 3.1 测定指标的选择

酸性龙胆合剂是由龙胆、陈皮和豆蔻3味中药材加工制成的制剂。龙胆的主要成分包括裂环环烯醚萜及其苷类、生物碱、三萜类、黄酮类等化合物。其中,裂环环烯醚萜为龙胆的主要活性部位,包括龙胆苦苷、獐牙菜苦苷和当药苷等,龙胆苦苷为其指标性成分,故选其为含量测定指标<sup>[5]</sup>。陈皮主要含挥发油及橙皮苷为主的黄酮类成分等,故选择橙皮苷为其含量测定指标<sup>[6]</sup>。豆蔻又称白豆蔻,其中含有的大量挥发油是其重要的药效成分,由于挥发油的含量测定采用的是气相色谱法,故本研究未将其进行同时测定。

### 3.2 流动相的选择

# RP-HPLC法测定含银杏化妆品中槲皮素的含量<sup>Δ</sup>

蒋瑶\*, 褚燕斌, 孔荔, 张浩琳, 王若晨, 童杰, 马宁<sup>#</sup>(长沙医学院药学院, 长沙 410219)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)09-1243-03  
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.09.32

**摘要** 目的:建立含银杏化妆品中槲皮素的含量测定方法。方法:采用反相高效液相色谱法。色谱柱为ODS-2HYPERASIL,流动相为甲醇-0.5%磷酸溶液(50:50, V/V),流速为1.0 ml/min,检测波长为360 nm,柱温为30℃,进样量为20 μl。结果:槲皮素的进样量在0.011 3~0.067 8 μg范围内与峰面积呈良好线性关系( $r=0.999 6$ );精密性、稳定性、重复性试验的RSD<2%;平均加样回收率为97.88%,RSD为0.67%( $n=9$ )。结论:该方法准确、稳定、重复性好,可用于银杏化妆品的质量控制。

**关键词** 化妆品;银杏;槲皮素;反相高效液相色谱法;含量测定

## Content Determination of Quercetin in Cosmeceuticals Containing Ginkgo by RP-HPLC

JIANG Yao, CHU Yan-bin, KONG Li, ZHANG Hao-lin, WANG Ruo-chen, TONG Jie, MA Ning (School of Pharmacy, Changsha Medical University, Changsha 410219, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To establish a method for content determination of quercetin in cosmeceuticals containing ginkgo. METHODS: RP-HPLC method was adopted. The determination was performed on ODS-2HYPERASIL column with mobile phase of methanol-0.5% phosphoric acid (50:50, V/V) at the flow rate of 1.0 ml/min. The detection wavelength was 360 nm, the column temperature was 30℃ and the volume was 20 μl. RESULTS: There was a good linear relationship between the volume of quercetin and peak area in the range of 0.011 3-0.067 8 μg ( $r=0.999 6$ ). RSDs of precision, stability and reproducibility tests was all less than 2%. Average recovery rate was 97.88% (RSD=0.67%,  $n=9$ ). CONCLUSIONS: The method is accurate, reliable and reproducible, and can be used for quality control of cosmeceuticals containing ginkgo.

**KEYWORDS** Cosmeceuticals; Ginkgo; Quercetin; RP-HPLC; Content determination

龙胆苦苷的含量测定方法收载于2010年版《中国药典》(一部)中,以十八烷基硅烷键合硅胶柱为填充剂,以甲醇-水(25:75, V/V)为流动相,检测波长为270 nm<sup>[7]</sup>。《中国药典》中橙皮苷的含量测定方法中流动相为甲醇-醋酸-水(35:4:61, V/V/V),检测波长为283 nm<sup>[7]</sup>。因龙胆苦苷和橙皮苷的流动相皆为甲醇-水,并参考相关文献<sup>[1-4]</sup>,试验时以甲醇-水为流动相系统,并加入醋酸和磷酸作改性剂时,各峰峰形较好,分离度较高。

### 3.3 含量限度的确定

本研究结果表明,合剂中龙胆苦苷的质量浓度为0.330~0.339 mg/ml,橙皮苷质量浓度为0.069~0.076 mg/ml。2010年版《中国药典》(一部)中龙胆药材规定龙胆苦苷的质量分数不得低于3.0%,陈皮药材规定橙皮苷的质量分数不得低于3.5%。按处方量折算,酸性龙胆合剂中龙胆苦苷质量浓度理论值为0.6 mg/ml,橙皮苷质量浓度理论值为0.63 mg/ml。考虑到药材不同及渗滤工艺的提取率较低,根据6批样品的质量浓度测定结果,取平均值的一半,规定合剂龙胆苦苷质量浓度

每1 ml不得少于0.017 mg,橙皮苷质量浓度每1 ml不得少于0.036 mg。

综上所述,本研究可为拟订《中国人民解放军医疗机构制剂规范》中酸性龙胆合剂的含量测定提供可靠依据。

### 参考文献

- [1] 杨慧玲,司庆文,侯勤正,等.HPLC法测定不同海拔长柄秦艽中龙胆苦苷、马钱酸、獐牙菜苦苷和獐牙菜苷[J].中草药,2010,41(10):1 720.
- [2] 许秋霞,李小芳,舒予,等.干燥方法对龙胆炮制品中龙胆苦苷含量的影响[J].中国药房,2013,24(7):622.
- [3] 汪金玉,帅欧,林励,等.橘叶黄酮类成分的研究与薄层色谱鉴别[J].广州中医药大学学报,2011,28(2):191.
- [4] 马秋菊,孙萍.消脂通脉颗粒的质量标准研究[J].中国药房,2013,24(35):3 325.
- [5] 杨维霞.秦岭龙胆的化学成分研究[D].杨凌:西北农林科技大学,2004.
- [6] 王元清,严建业,师白梅,等.不同批次枳壳中柚皮苷、新橙皮苷、总黄酮、挥发油的含量比较及质量评价[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(7):146.
- [7] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2010版.北京:中国医药科技出版社,2010:89-176.

(收稿日期:2014-03-12 修回日期:2014-09-04)

(编辑:孙冰)

<sup>Δ</sup> 基金项目:2013年度国家级大学生研究性学习和创新性实验计划项目(No.201310823003);2013年度湖南省大学生研究性学习和创新性实验计划项目(No.湘教通[2013]36号)

\* 本科生。研究方向:中药质量控制。E-mail:949402144@qq.com

<sup>#</sup> 通信作者:教授。研究方向:中西药质量控制。电话:0731-88498780。E-mail:majsjym@163.com