

# 反相高效液相色谱法测定肝力保胶囊中虎杖苷、白藜芦醇和大黄素的含量

王 慧,周燕妮,费 扬,吕 昉,宋醒醒,张国庆\*

第二军医大学东方肝胆外科医院药材科,上海 200438

[关键词] 高压液相色谱法;虎杖苷;白藜芦醇;大黄素;肝力保胶囊

[中图分类号] R 917.4 [文献标志码] B [文章编号] 0258-879X(2013)12-1390-03

## Reversed-phase high-performance liquid chromatography in determining polydatin, resveratrol and emodin contents in Ganlibao capsule

WANG Hui, ZHOU Yan-ni, FEI Yang, LÜ Fang, SONG Xing-xing, ZHANG Guo-qing\*

Department of Pharmacy, Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438, China

[Key words] high-pressure liquid chromatography; polydatin; resveratrol; emodin; Ganlibao capsule

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2013, 34(12): 1390-1392]

肝力保胶囊是本院自制制剂,由茵陈、虎杖、茯苓、黄芪及苦参碱提取物组成,临床用于各种急、慢性病毒性肝炎治疗,对肝癌所致肝脾肿大、肝硬化腹水等症状有辅助疗效。虎杖是蓼科植物虎杖(*Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc.)的干燥根和根茎,具有利湿退黄、清热解毒、散瘀止痛、止咳化痰功效,用于湿热黄疸、淋浊、带下、风湿痹痛、痈肿疮毒、水火烫伤、肺热咳嗽等<sup>[1]</sup>。虎杖的有效成分包括蒽醌类、二苯乙烯类化合物、鞣酸及黄酮类等。蒽醌类化合物主要包括大黄素、大黄酚、大黄素甲醚等,具有抗菌、抗炎、抗病毒、抑制血小板聚集,改善微循环及抗肿瘤等作用<sup>[2]</sup>。其中大黄素对乙肝病毒、巨细胞病毒、EB病毒、冠状病毒、脊髓灰质炎病毒均有抑制作用<sup>[3]</sup>。大黄素能增强抗癌药物5-氟尿嘧啶、丝裂霉素和甲氨蝶呤对人肝癌BEL-7402细胞的细胞毒作用<sup>[4]</sup>。大黄素对各种人肝癌细胞株表现出有效的抑制效应,其可能成为治疗肝癌的一种有效的化疗药物<sup>[5]</sup>。白藜芦醇及白藜芦醇苷(虎杖苷)是虎杖中2个主要的二苯乙烯类化合物,具有强心、扩血管、抑制血小板凝聚、降血脂、护肝等作用<sup>[2]</sup>。白藜芦醇存在形式主要有顺反式白藜芦醇及顺反式白藜芦醇苷,后者经肠道中糖苷酶的催化作用可释放出白藜芦醇。白藜芦醇在抑制肿瘤增殖、诱导肿

瘤细胞凋亡方面均有作用,已成为预防、抑制、治疗组织癌变和肿瘤发生的研究热点<sup>[6]</sup>。

目前,测定虎杖中有效成分含量方法主要包括高效液相色谱法<sup>[7-8]</sup>、色谱-质谱联用法<sup>[9]</sup>、近红外光谱法快速测定<sup>[2]</sup>。本研究建立反相高效液相色谱法同时测定肝力保胶囊中两类3种成分含量,为进一步完善该制剂质量标准奠定基础。

### 1 仪器和试剂

1.1 仪器 Agilent 1100 高效液相色谱仪,包括在线脱气机、四元泵、自动进样器、柱温箱、二级管阵列检测器、Chemstation 色谱工作站。METTLER AE240 型电子天平。SK2200H 型超声波清洗器(上海科导超声仪器有限公司)。

1.2 试剂 肝力保胶囊(批号:20120301、20120501、20120701、20120801、20120901、20130101、20130301、20130401)由本院制剂室生产,虎杖苷(批号:111575-200502)、白藜芦醇(批号:111535-200502)和大黄素(批号:110756-200110)对照品由中国食品药品检定研究院提供,乙腈、甲醇及甲酸均为色谱纯,水为超纯水。

### 2 方法和结果

2.1 色谱条件 色谱柱:Agilent SB-C<sub>18</sub>(250 mm ×

[收稿日期] 2013-08-08 [接受日期] 2013-10-11

[作者简介] 王 慧,硕士,主管药师. E-mail: wang\_ehbh@126.com

\* 通信作者(Corresponding author). Tel: 021-81875571, E-mail: guoqing\_zhang91@126.com

4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ );以0.1%甲酸(A)和乙腈(B)为流动相。梯度洗脱(体积百分数):0~4 min 80%~70% A, 4~10 min 70%~35% A, 10~16 min 35%~5% A。柱平衡时间5 min;流速1.0 mL/min;柱温25 $^{\circ}\text{C}$ ;检测波长305 nm;进样量5  $\mu\text{L}$ 。

## 2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液 精密称取虎杖苷对照品10.45 mg、白藜芦醇对照品10.00 mg及大黄素对照品9.46 mg,分别置于10 mL棕色量瓶中,甲醇定容,摇匀,得浓度为1.045、1.000、0.946 mg/mL母液,置4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。

2.2.2 供试品溶液 取10粒肝力保胶囊内容物混匀,精密称取1.00 g置于25 mL的棕色量瓶中,用甲醇

定容,超声30 min,放冷,用甲醇溶液补足减少的质量,经0.45  $\mu\text{m}$ 微孔滤膜滤过,取滤液备用。

2.2.3 阴性供试品 以相同处方比例,按肝力保胶囊制备工艺制备不含虎杖的阴性样品。

## 2.3 方法学考察

2.3.1 系统适应性 按2.1项下色谱条件,以对照品、制剂样品及阴性样品溶液分别进样,见图1,虎杖苷保留时间8.34 min,白藜芦醇保留时间11.88 min,大黄素保留时间18.59 min,制剂中其他成分对待测峰无干扰。分离度大于1.5,理论塔板数大于5 000,对称因子均在0.95~1.05之间。

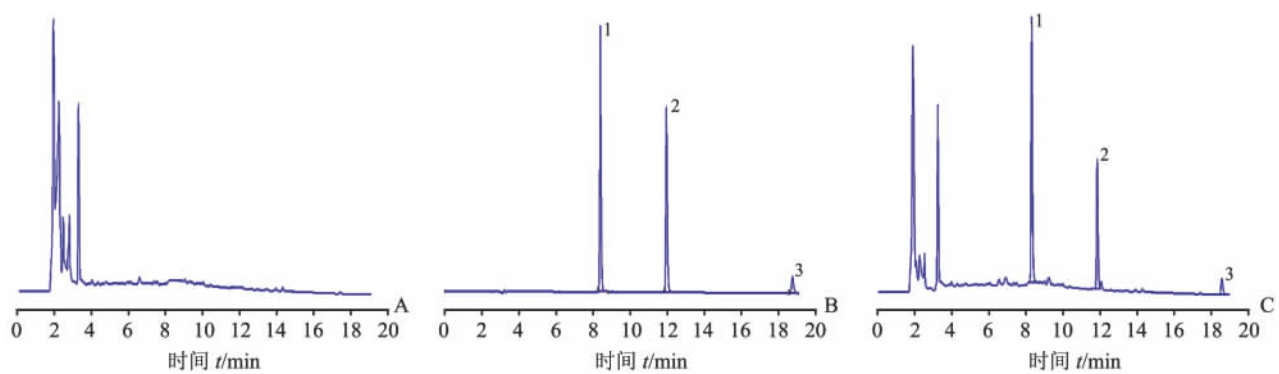


图1 阴性样品(A)、对照品(B)和制剂样品(C)高效液相色谱图

1: 虎杖苷; 2: 白藜芦醇; 3: 大黄素

2.3.2 定量限 将虎杖苷、白藜芦醇及大黄素分别进行稀释,按2.1项下色谱条件进样,以信噪比10:1计,定量限分别为0.209、0.071 4、1.19  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

2.3.3 标准曲线及线性 配制虎杖苷对照品浓度为12.54、26.13、52.25、104.5、125.4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,白藜芦醇对照品浓度为5.0、10.0、20.0、40.0、50.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,大黄素对照品浓度为2.37、4.73、9.46、18.92、23.65  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 混合对照品溶液。以浓度为横坐标(X),色谱峰面积为纵坐标(Y)进行线性回归,得回归方程。虎杖苷: $Y=18.802X+23.672$  ( $r=0.9996$ );白藜芦醇: $Y=38.585X+6.5433$  ( $r=0.9998$ );大黄素: $Y=11.894X+0.17$  ( $r=0.9994$ )。

2.3.4 精密度 取混合对照品溶液(虎杖苷52.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、白藜芦醇20.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 及大黄素9.46  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ),在2.1项下色谱条件重复进样6次。虎杖苷峰面积RSD=0.13%,白藜芦醇RSD=0.14%,大黄素RSD=0.29%,结果表明仪器精密度良好。

2.3.5 重复性 取肝力保胶囊(批号:20130101),按2.2.2项下制备6份样品,按照2.1项下色谱条件进样,虎杖苷含量为1 071.69  $\mu\text{g}/\text{g}$ ,RSD=1.51%;白藜芦醇含量为247.59  $\mu\text{g}/\text{g}$ ,RSD=1.41%;大黄素含量为198.47  $\mu\text{g}/\text{g}$ ,RSD=1.51%,结果表明该方法重复性良好。

2.3.6 稳定性 取肝力保胶囊(批号:20130101),按2.2.2项下制备样品,在放置0、2、4、8、24 h时,分别测定虎杖苷、白藜芦醇及大黄素色谱峰峰面积,RSD均 $<2\%$  ( $n=3$ ),结果表明制剂样品溶液在24 h内稳定。

2.3.7 加样回收率 取肝力保胶囊(批号:20130101)6份,精密称定,每份1.000 g,加入浓度为1.045 mg/mL虎杖苷对照品1 mL,浓度为1.000 mg/mL白藜芦醇对照品0.3 mL,浓度为0.946 mg/mL大黄素对照品0.2 mL,按2.2.2项下处理样品,按2.1项下色谱条件进样,计算回收率。虎杖苷回

收率为 99.93%, RSD=2.96%, 白藜芦醇回收率为 101.47%, RSD=2.96%, 大黄素回收率为 99.29%, RSD=2.18%。

2.4 样品测定 按 2.2.2 项制备供试品溶液,在 2.1 项下色谱条件测定峰面积,根据回归方程计算 8 批次肝力保胶囊中虎杖苷、白藜芦醇及大黄素含量,结果见表 1。

表 1 8 批次肝力保胶囊中虎杖苷、白藜芦醇和大黄素含量测定结果

$w_B/(\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}), n=3, \bar{x} \pm s$

制剂批号	虎杖苷	白藜芦醇	大黄素
20120301	1 523.35±10.25	162.76±0.70	173.39±0.91
20120501	1 468.83±13.57	131.50±0.78	137.00±0.86
20120701	1 988.89±12.31	170.80±0.69	130.54±0.99
20120801	2 122.94±10.52	183.59±0.68	157.74±0.73
20120901	2 942.58±14.30	224.32±0.65	376.64±0.92
20130101	1 071.69±13.90	247.59±0.71	198.47±0.83
20130301	1 130.85±10.00	256.45±0.92	198.09±0.86
20130401	1 088.87±9.59	292.83±0.65	290.40±1.08

### 3 讨论

虎杖苷、白藜芦醇及大黄素的极性差异较大,本实验比较甲醇-水、甲醇-0.1%甲酸、乙腈-水、乙腈-0.1%甲酸,不同比例梯度洗脱,最终采用 0.1%甲酸和乙腈梯度洗脱,在 20 min 内快速完成测定,且制剂中其他成分对测定结果无干扰。虎杖苷和白藜芦醇的紫外最大吸收波长在 305 nm,大黄素检测波长一般选择 254 nm,但选择 254 nm 检测波长基线噪音大且制剂其他成分有干扰,故选择 305 nm 作为检测波长,可同时满足 3 个成分检测要求。白藜芦醇在强光与高温条件下质量分数下降,易发生部分分解或顺反异构化,需在阴凉处保存<sup>[7]</sup>。故本实验溶液均放置于棕色量瓶中 4℃冰箱保存。

总之,本研究建立的测定肝力保胶囊中虎杖苷、白藜芦醇和大黄素含量的方法快速、结果准确、重现性好且成本低,可用于全面控制肝力保胶囊中虎杖药材的质量。

### 4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[本文编辑] 尹 茶

### [参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 一部. 中国

医药科技出版社,2010:194.

- [2] 吴利敏,杨 琼,周 尚,蒙杰丹,朱乾华,张 敏,等. 近红外光谱法快速测定虎杖中虎杖苷、白藜芦醇、大黄素的含量[J]. 药物分析杂志,2012,32:1583-1585.
- [3] 丁 艳,黄志华. 大黄素药理作用研究进展[J]. 中药药理与临床,2007,23:236-238.
- [4] 张斯时. 大黄素的药理研究概况[J]. 中国医药导报,2006,3:12-14.
- [5] 丁 艳,黄志华. 大黄素的抗肿瘤作用研究进展[J]. 时珍国医国药,2008,19:1272-1274.
- [6] 任彦荣,吴洪斌. 白藜芦醇的检测手段及药理作用[J]. 安徽农业科学,2012,40:788-790.
- [7] 欧彩娟,柳文媛,吴玉兰,杨治华. RP-HPLC 法同时测定虎杖提取物中 4 种组分含量[J]. 广东药学院学报,2011,27:609-612.
- [8] 张 煜,于树宏,李 倩,查建蓬. RP-HPLC 法同时测定虎杖中虎杖苷、白藜芦醇、大黄素和大黄素甲醚的含量[J]. 河北医科大学学报,2009,30:1049-1051.
- [9] 于 澎,张 虹. HPLC-ESI-MS 法同时测定虎杖提取物中的 17 种成分[J]. 沈阳药科大学学报,2011,28:963-968.