

高效液相色谱法测定补肾益骨膏中对羟基苯乙醇- β -D 葡萄糖苷含量

赵瑞芝 王小云(广州 510120 广东省中医院中心实验室)

摘要 目的:确定补肾益骨膏中对羟基苯乙醇- β -D 葡萄糖苷的含量测定方法。方法:以 HPLC 法测定。色谱条件:Spheris ORB-ODS2 C_{18} 柱(15cm $\times$ 4.6mm),甲醇-水(12:88)为流动相,检测波长 230nm。结果:线性范围为 0.045 mg/ml - 0.225 mg/ml,平均回收率为 98.6%,RSD 为 1.13%($n=5$)。结论:本法简便、灵敏、重现性好,可作为该制剂的质量控制方法。

关键词 HPLC;对羟基苯乙醇- β -D 葡萄糖苷;女贞子;补肾益骨膏

RP-HPLC Determination of p -Hydroxyphenethyl- β -D Glucoside in the Bushen Yigu gao

Zhaoruizhi, Wang xiaoyun(The center Laboratory, Traditional Chinese Medicine Hospital of Guangdong province)

ABSTRACT **OBJECTIVE:**the HPLC method was established for the determination of p -Hydroxyphenethyl- β -D Glucoside in the Bushen Yigu Gao. **METHOD:**The column is ODS- C_{18} (4.6 mm $\times$ 250 mm,5 μ m);The mobile phase consisted of methanol-water(12:88).The detection wavelength was 230nm and flow rate was 1 ml/min. **RESULTS:**The mean recovery was 98.5%,The assay linearity was determined over the range of 0.045 mg/ml-0.225 mg/ml. **CONCLUSION:**The method is simple and sensitive. It can be used as a method for quality control of the preparation.

KEY WORDS HPLC p -Hydroxyphenethyl- β -D Glucoside Ligustrum lucidum, Bushen Yigu Gao

补肾益骨膏为我院医院制剂,由女贞子、淫阳藿、泽泻、熟地、紫河车、川芎、牡蛎等九味药组成,具有补肾、健骨、填髓的功效,临床用于治疗妇女围绝经期骨质疏松症,疗效较好^[1]。对羟基苯乙醇- β -D 葡萄糖苷是方中主药女贞子的主要成分之一^[2],为了控制产品质量,我们制订了对羟基苯乙醇- β -D 葡萄糖苷液相色谱含量测定方法,该成分在复方制剂中含量测定方法尚未见文献报道。

1 仪器、药品与试剂

Waters 高效液相色谱仪,配有 600 泵,996 二极管阵列检测器,2010 数据处理软件;对羟基苯乙醇- β -D 葡萄糖苷对照品(沈阳药科大学天然药化研究室),纯度经 HPLC 检查无杂质峰;补肾益骨膏(本院制剂,批号 2000405,2000406,2000407),女贞子,购自广州市药材公司,经鉴定为木犀科植物女贞的成熟果实。

甲醇(色谱纯),重蒸水,其余为分析纯

2 实验方法与结果

2.1 分离条件考察:

2.2 色谱条件

Spheris ORB-ODS2 C_{18} 柱(15cm $\times$ 4.6mm),柱温 30 $^{\circ}$ C,流速 1.0 ml/min,流动相:进样前色谱柱以水饱和 15 min,进样的同时切换为甲醇-水(12:88),检测波长 230nm。

2.2.1 对照品溶液的配制:取对羟基苯乙醇- β -D 葡萄糖苷对照品约 4.5 mg,精密称定,定容于 10 ml 容量瓶中(1),分别取(1)液 0.2 ml,加甲醇定容于 2 ml 容量瓶中,作为对照品溶液。

2.2.2 缺女贞子的阴性对照品溶液的制备:取缺女贞子的补肾益骨膏 10 ml,按样品处理方法甲醇沉淀、过滤,滤液水浴浓缩至干,以水定容于 25 ml 容量瓶中(2),吸取(2)液 2 ml 以甲醇定容于 10 ml 容量瓶中,即得阴性对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液的制备:同含量测定项下样品制备。色

本文为广东省科委资助项目,课题编号为 SKF9810

谱分析图见图1。结果对羟基-β-D葡萄糖苷可与其它成分较好分离,除去女贞子的阴性处方在此位置无吸收峰。

2.3 线性关系考察:

取对羟基苯乙醇-β-D葡萄糖苷对照品约4.5mg,精密称定,定容于10ml容量瓶中(1),分别取(1)液0.2,0.4,0.6,0.

8,1.0ml,加甲醇定容于2ml容量瓶中。分别进样20ul,以峰高(H)对浓度(C)进行线性回归,得回归方程为:H=1375.4+555136.8c,r=0.9994,对羟基苯乙醇-β-D葡萄糖苷在0.045mg/ml-0.225mg/ml范围内线性关系良好。

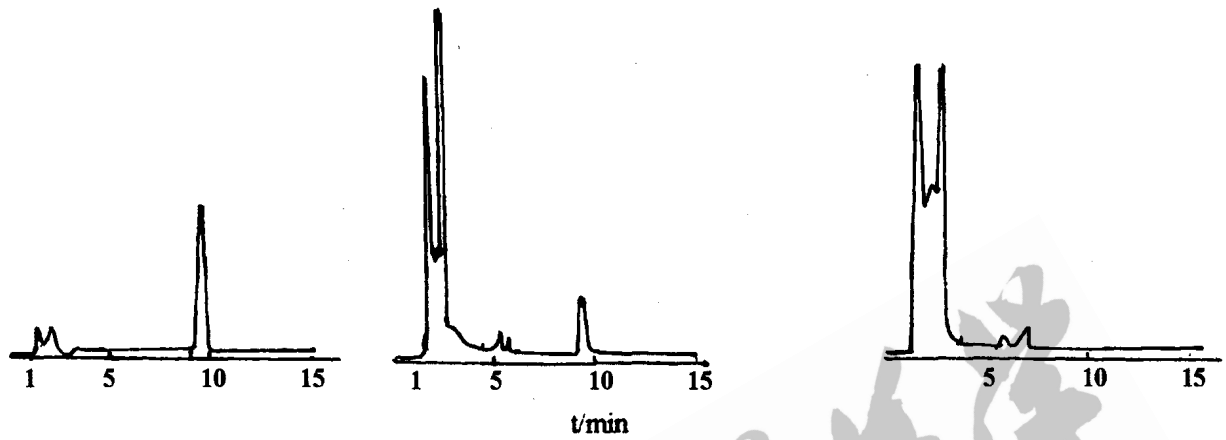


图1 对羟基-β-D葡萄糖苷 HPLC 色谱图
1.对照品 2.补肾益骨膏样品 3.去女贞子的阴性样品

2.4 精密度试验:

按前述色谱条件,精密吸取对照品溶液20ul,每h进样一次,重复5次,结果峰高基本不变,日内RSD为2.38%,另每天进样一次,重复5次,计算日间精密度,为3.55%。

2.5 供试液的制备:

取样品约1g,精密称定。加入甲醇25ml,搅拌,放置过夜,过滤,滤渣以5ml甲醇洗涤,重复3次,合并滤液,水浴浓缩至干,以甲醇定容于10ml容量瓶中,即得。

2.6 方法重现性实验

同一批产品取5份,分别照上述方法提取,测定,结果RSD为3.5%。

2.7 样品含量测定:

取供试液20ul进样,读取峰高值,以外标法计算含量,结果见表1。

表1 样品含量测定结果(n=3)

批号	含量 (mg/g)							平均值 (mg/g)	RSD (%)
2000405	1.26	1.33	1.29	1.33	1.33	1.32	1.31	1.31	2.21
2000406	1.30	1.30	1.35	1.34	1.36	1.37	1.34	1.34	2.24
2000407	1.44	1.39	1.38	1.37	1.42	1.39	1.40	1.40	2.08

2.8 含量测定回收率实验:

取已测定含量的补肾益骨膏约1.2g,精密称定。分别加入对照品溶液,按样品处理方法处理,测定,结果见表2。

表2 回收率实验结果(n=3)

样品中含量 (mg)	对照品加入量 (mg)	实际测得含量 (mg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
1.17	0.45	1.60	98.8	98.6	1.13
1.88	0.44	2.33	100.3		
1.68	0.45	2.08	97.6		
1.68	0.44	2.07	97.6		
1.17	0.44	1.59	98.8		

3 讨论

3.1 本处方中氨基酸、蛋白、多糖等均为有效成分,因此制剂过程中未将其除去,由于其含量较大,且成分复杂,对同属水溶性成分的对羟基-β-D葡萄糖苷的测定干扰很大。我们采用大量甲醇沉淀的方法,可除去大部分蛋白、氨基酸、多糖类成分,减少干扰和对色谱柱的污染,使测定成分可达到较好的分离。

3.2 本实验色谱条件摸索时,曾试过以多种流动相比比例洗脱,对照品均难以得到峰型较窄的峰形,后采用文献方法^[2]以水饱和色谱柱后,在进样的同时进行流动相的切换,则可得峰形较窄的峰形,并与其它峰达到较好的分离。

3.3 以女贞子为主药的中药制剂常以齐墩果酸和熊果酸作为质量控制指标,由于此两种成分为脂溶性,水提工艺很难提出。我们曾做过本制剂中齐墩果酸的鉴别实验,没有检测出齐墩果酸,但以乙醇提取药材中的齐墩果酸,则含量很高。因此,考虑本制剂为水提工艺,因此选择水溶性成分作为其质量控制指标。

参考文献

1 王小云,徐琨,张春玲等.补肾益骨膏治疗更年期妇女骨质疏松症的临床观察.广州中医药大学学报,1998,15(2):84.
2 石力夫,王鹏,陈海生等.不同产地女贞子中水溶性活性成分及齐墩果酸的反相高效液相分析.中国中药杂志,1998;23(2):77.

收稿日期:2001-06-04