

HPLC 测定脂清颗粒中 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O- β -D-葡萄糖苷的含量

李钦¹, 郑成², 李晓誉¹, 张信岳^{1*} (1. 浙江省医学科学院, 杭州 310013; 2. 浙江省药品检验所, 杭州 310004)

摘要:目的 建立脂清颗粒中 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O- β -D-葡萄糖苷的高效液相色谱测定方法。方法 采用 Dikma Technologies Diamonsil C₁₈ 柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m); 乙腈-水(25:75)为流动相;流速 1.0 mL $\cdot$ min⁻¹;检测波长为 320 nm。结果 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O- β -D-葡萄糖苷平均回收率为 101.5%, RSD 为 1.0% ($n=9$)。结论 本法简便、快速、灵敏,重复性好,可用于脂清颗粒的质量控制。

关键词:高效液相色谱法;脂清颗粒;2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O- β -D-葡萄糖苷

中图分类号:R917.101;R917.4 文献标识码:B 文章编号:1007-7693(2009)02-0142-03

基金项目:浙江省中医药科技计划重点开发项目(2004Z007)

作者简介:李钦,女,研究实习员 Tel:(0571)88215600

* 通信作者:张信岳,男,硕士,副研究员 Tel:(0571)88215600

E-mail:qindai_1981@sohu.com

Determination of 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-O- β -D-glucoside Content in Zhiqing Granule by HPLC

LI Qin¹, ZHENG Cheng², LI Xiaoyu¹, ZHANG Xinyue^{1*} (1. Zhejiang Academy of Medical Sciences, Hangzhou 310013, China; 2. Zhejiang Institute for Drug Control, Hangzhou 310004, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish an HPLC for the determination of 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-O- β -D-glucoside content in Zhiqing granule. **METHODS** Using Dikma Technologies Diamonsil C₁₈ column (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m), the mobile phase was acetonitrile-water (25:75) at the flow rate of 1.0 mL $\cdot$ min⁻¹. The UV detection wavelength was 320 nm. **RESULTS** The average recovery was 101.5%, RSD was 1.0% ($n=9$). **CONCLUSION** The method is simple and can be used for the quality control of Zhiqing granule.

KEY WORDS: HPLC; Zhiqing granule; 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-O- β -D-glucoside

脂清颗粒是由制何首乌、决明子、郁金、白术、泽泻、桑寄生、山楂、蒲黄等八味中药组成。本处方是已故国家级名老中医、浙江中医药大学教授陆芷青先生的临床经验处方,具有降血脂的功效,已有60多年的临床治疗效果。本试验采用高效液相色谱法对方中主药制何首乌的主要成分2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O- β -D-葡萄糖苷进行定量分析,以控制成品质量。

1 仪器与试剂

Agilent 1100 系列型高效液相色谱仪,紫外检测器,HP-Chemstation 色谱工作站。2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O- β -D-葡萄糖苷(批号110844-200606,供含量测定用)由中国药品生物制品检定所提供。乙腈为色谱纯,其余为分析纯。样品由浙江惠松制药有限公司提供(批号:20060105、20060106、20060107)。

2 色谱条件

色谱柱 Dikma Technologies Diamonsil C₁₈ (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m);流动相为乙腈-水(25:75);检测波长为320 nm;流速1.0 mL $\cdot$ min⁻¹;柱温30 $^{\circ}$ C;理论板数按2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O- β -D-葡萄糖苷峰计算应不低于2 000。

3 溶液制备

3.1 对照品溶液的制备

取在五氧化二磷减压干燥器中干燥24 h的2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O- β -D-葡萄糖苷对照品,精密称定,加稀乙醇溶解制成0.153 6 mg $\cdot$ mL⁻¹的溶液,摇匀,用0.45 μ m微孔滤膜滤过,即得对照品溶液。

3.2 供试品溶液的制备

取本品颗粒研碎成细粉,精密称取0.1 g,置25 mL棕色量瓶中,精密加入稀乙醇20 mL,超声提取

30 min,放冷,用稀乙醇定容至刻度,摇匀,用0.45 μ m微孔滤膜滤过,即得供试品溶液。

3.3 空白溶液的制备

按处方比例及生产工艺自制不含制何首乌的阴性样品,按“3.2”项下制备阴性空白对照溶液。

4 方法与结果

4.1 空白试验

取阴性空白对照溶液,依法测定,结果无干扰,见图1。

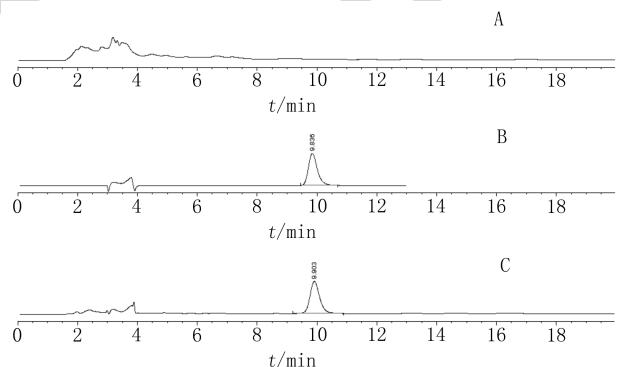


图1 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O- β -D-葡萄糖苷 HPLC 色谱图

A - 阴性样品; B - 对照品; C - 供试品

Fig 1 HPLC chromatogram of 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-O- β -D-glucoside

A - blank sample; B - chemical reference substance; C - sample

4.2 线性关系考察

精密吸取上述对照品储备溶液(0.153 6 mg $\cdot$ mL⁻¹)适量,加稀乙醇配成0.115 2, 0.076 8, 0.053 76, 0.038 4, 0.023 04, 0.007 68 mg $\cdot$ mL⁻¹的系列浓度溶液,分别取20 μ L注入液相色谱仪,测定峰面积Y,得回归方程: $Y = 65\,363X - 38.367$, $r = 0.999\,9$,显示进样浓度在0.007 68 ~ 0.115 2 mg $\cdot$ mL⁻¹内与峰面积有良好的线性关系。

4.3 重复进样精密度试验

取对照品溶液,按上述色谱条件,重复进样 5 次,测定峰面积,结果 RSD = 0.6%。

4.4 日间精密度试验

在校正曲线线性范围内,配制高、中、低 3 种浓度的供试品溶液,相同条件下,连续测定 5 d,计算日间精密度,结果 RSD 均小于 2%,符合方法学要求。

4.5 稳定性试验

对照品溶液分别于配制后 0,1,2,4,7.5,13,21.5 h,依法测定得 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷峰面积,结果 RSD = 1.2%。

4.6 重复性试验

取同一批号样品(20060105)5 份,按“3.2”项下方法处理,进样测定,结果 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷的平均含量为 3.430 9 mg·g⁻¹,RSD 为 1.4%。

4.7 回收率试验

精密称定已知含量样品(批号 20060105)9 份,精密加入 2,3,5,4'-四羟基-2-O-β-D-葡萄糖苷对照品适量,按“3.2”项下方法处理后测定峰面积并计算含量,结果显示 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷平均回收率为 101.5%,RSD = 1.0%,见表 1。

表 1 回收率测定结果

Tab 1 Results of recovery					
已知量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD/%
0.187 3	0.122 9	0.312 7	102.0		
0.182 0	0.122 9	0.308 7	103.1		
0.187 1	0.122 9	0.310 7	100.6		
0.190 9	0.153 6	0.345 5	100.7		
0.193 6	0.153 6	0.350 3	102.0	101.5	1.0
0.179 5	0.153 6	0.334 0	100.6		
0.190 0	0.184 3	0.374 2	99.9		
0.180 1	0.184 3	0.362 2	98.8		
0.180 1	0.184 3	0.364 7	100.2		

4.8 样品测定结果

对 3 批样品进行含量测定,结果见表 2。

5 讨论

5.1 波长的选择。按文献中的含量测定方法^[1],

表 2 样品含量测定结果(n=2)

Tab 2 The results of sample determination(n=2)

批号	2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷含量/mg·g ⁻¹
20060105	3.430 9
20060106	3.587 9
20060107	3.588 6

选择波长为 320 nm,在此波长阴性对照无干扰。

5.2 提取条件的选择。根据方法考察的结果可以认为稀乙醇 25 mL 超声处理 30 min 的提取方法即可提取完全。

5.3 经多批样品中的 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷含量测定,样品含量在 3.42 ~ 3.58 mg·g⁻¹,因此暂定本品每 g 含制何首乌以 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷计不得少于 2.0 mg。

5.4 制何首乌为方中君药,具有补肝肾,益精血,乌须发,强筋骨的功效,是常用抗衰老药物之一。药理实验表明,制何首乌具有明显降低大鼠血清中总胆固醇的作用,能显著增加老年小鼠的脑和肝中蛋白质含量,降低脑和肝丙二醛的含量^[2]。何首乌的主要有效成分是蒽醌类、羟芪衍生物及磷脂类等。羟芪衍生物是何首乌的水溶性主要有效成分,以 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷(简称二苯乙烯苷)含量最高。二苯乙烯苷具有抗衰老、降低胆固醇、提高免疫功能、防治动脉硬化及保肝等作用^[3]。若测定制首乌中的降血脂成分二苯乙烯苷,则与脂清颗粒的功效更为吻合。故以二苯乙烯苷的含量测定为指标,来反映和控制脂清颗粒的内在质量。

REFERENCES

[1] Ch. P(2005) Vol I (中国药典 2005 年版. 一部) [S]. 2005: 123.
[2] HUO Y P, ZHANG S L, et al. Determination of 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-O-β-D-glucoside in Jiangzhi capsule by HPLC. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2007, 32 (19): 2066-2067.
[3] LIAO H M, HU Z H. Progress in biological characteristics and chemical component of polygonum multiflorum [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2005, 36 (2): 311-314.

收稿日期: 2008-07-21