

HPLC 法测定通乐颗粒中 2, 3, 5, 4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷

崔玲¹, 李跃辉^{2*}

1. 益阳市中医院, 湖南 益阳 413000

2. 湖南省中医药研究院, 湖南 长沙 410011

摘要: 目的 建立测定通乐颗粒中 2, 3, 5, 4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷的方法。方法 采用 HPLC 法, 色谱柱为 Phenomenex C₁₈ 柱, 检测波长为 320 nm, 流动相为乙腈-水 (20:80), 体积流量为 1.0 mL/min。结果 2, 3, 5, 4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷在 10~100 μg/mL 与峰面积呈良好线性关系 ($r=0.999\ 7$), 平均回收率为 99.74%。结论 本方法准确、简便、重复性好, 可用于通乐颗粒中 2, 3, 5, 4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷的含量测定。

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

中图分类号: R **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2013)05-0371-03

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2013.05.012

Determination of 2, 3, 5, 4'-tetrahydroxy-stilbene-2-O-β-D-glucoside in Tongle Granule by HPLC

CUI Ling¹, LI Yue-hui²

1. Traditional Chinese Medicine Hospital of Yiyang, Yiyang 413000, China

2. Hunan Academy of Chinese Medicine, Changsha 410011, China

Abstract: Objective To establish an HPLC method for the determination of 2, 3, 5, 4'-tetrahydroxy-stilbene-2-O-β-D-glucoside in Tongle Granule. **Methods** The content of 2, 3, 5, 4'-tetrahydroxy-stilbene-2-O-β-D-glucoside was detected by HPLC. The separation was performed on a Phenomenex C₁₈ column with UV detection at 320 nm, the mobile phase consisted of acetonitrile-water (20:80), and the flow rate was 1.0 mL/min. **Results** The calibration curve of 2, 3, 5, 4'-tetrahydroxy-stilbene-2-O-β-D-glucoside was linear within the range of 10—100 μg/mL ($r = 0.999\ 7$), and the average recovery was 99.74%. **Conclusion** The method to determine the content of 2, 3, 5, 4'-tetrahydroxy-stilbene-2-O-β-D-glucoside is accurate, simple, and reproducible, and could be used in the quantitative analysis of 2, 3, 5, 4'-tetrahydroxy-stilbene-2-O-β-D-glucoside in Tongle Granule.

Key words: Tongle Granule; 2, 3, 5, 4'-tetrahydroxy-stilbene-2-O-β-D-glucoside; HPLC

通乐颗粒是由何首乌、地黄、当归、麦冬、玄参等提取制成的复方中药制剂, 具有滋阴补肾、润肠通便的作用。临床上主要用于阴虚便秘, 症见大便秘结、口干、咽燥、烦热, 以及习惯性、功能性便秘^[1]。其中何首乌为君药, 现代药理研究表明何首乌可以补益精血、降血脂、润肠通便, 主要化学成分为二苯乙烯苷类、聚合原花青素类和蒽醌类, 其中以 2, 3, 5, 4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷居多^[2]。为了更好的控制通乐颗粒的内在质量, 确保用药安全有效, 本实验建立了采用 HPLC 法测定通乐颗粒中 2, 3, 5, 4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷的方法。

1 材料

1.1 仪器

Agilent1200 高效液相色谱仪 (美国安捷伦科技公司), Phenomenex C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), FA2104 电子分析天平 (杭州汇尔仪器设备有限公司)。

1.2 试药

2, 3, 5, 4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷对照品 (中国食品药品检定研究院, 批号 110844-201006, 供含量测定用, 质量分数 94.7%); 通乐颗粒购自华颐药业有限公司 (批号 120811、120813、120815), 乙腈为色谱纯, 其他试剂为分析纯。

收稿日期: 2013-06-28

作者简介: 崔玲 (1979—), 女, 湖南益阳人, 学士, 主要从事中药制剂质量标准研究。Tel: 13511110726 E-mail: 645547780@qq.com

*通信作者 李跃辉 (1978—), 女, 副研究员, 硕士, 主要从事中药制剂开发研究。E-mail: liyuehui.216@163.com

2 方法与结果

2.1 色谱条件^[3]

色谱柱: Phenomenex C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-水 (20:80), 检测波长为 320 nm, 体积流量 1.0 mL/min, 柱温 30 ℃, 进样量 10 μL。

2.2 对照品溶液的配制

精密称取 2, 3, 5, 4'-四羟基二苯乙烯-2-*O*-β-*D*-葡萄糖苷对照品 10 mg, 加甲醇配成质量浓度为 0.2 mg/mL 的对照品溶液。

2.3 供试品溶液的配制

取通乐颗粒研细, 精密称取 1 g 置 50 mL 棕色量瓶中, 加稀乙醇 40 mL 超声处理 (功率 250 W, 频率 33 kHz) 30 min, 放冷, 再用稀乙醇稀释至刻度, 摇匀, 取续滤液。

2.4 阴性样品溶液的配制

以处方配比取除何首乌以外的药材, 按照制备工艺制成缺何首乌的阴性样品。

2.5 系统适应性试验

取对照品溶液、供试品溶液和不含何首乌的阴性溶液各 10 μL, 按上述色谱条件进样测定, 色谱图见图 1。结果 2, 3, 5, 4'-四羟基二苯乙烯-2-*O*-β-*D*-葡萄糖苷 ($t=6.84$ min) 与其他组分达到了基线分离, 峰形对称, 且阴性无干扰, 专属性良好。

2.6 线性关系

取以上配制好的 0.2 mg/mL 2, 3, 5, 4'-四羟基二苯乙烯-2-*O*-β-*D*-葡萄糖苷对照品溶液, 精密吸取 1、2、4、6、8、10 mL 至 20 mL 量瓶中, 分别加甲醇溶解并加至刻度, 精密吸取 10 μL 注入液相色谱仪。以峰面积 (Y) 对其质量浓度 (X) 进行线性回归分析, 得回归方程: $Y=1\ 987X+8.984$; $r=0.999\ 7$, 结果表明 2, 3, 5, 4'-四羟基二苯乙烯-2-*O*-β-*D*-葡萄糖苷在 10~100 μg/mL 线性关系良好。

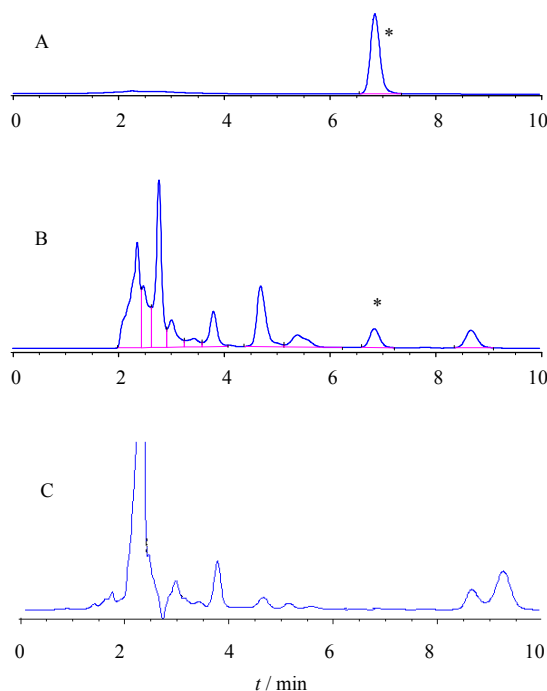
2.7 精密度试验

精密吸取对照品溶液 (质量浓度为 60 μg/mL) 10 μL 注入液相色谱仪, 重复进样 6 次, 测定峰面积, 结果 RSD 为 0.74%, 表明精密度良好。

2.8 重复性试验

取批号 1120813 通乐颗粒样品 6 份, 制备供试品溶液, 进样测定, 计算 2, 3, 5, 4'-四羟基二苯乙烯-2-*O*-β-*D*-葡萄糖苷的质量分数。结果平均质量分数为 2.18 mg/g, RSD 为 0.85%, 表明重复性良好。

2.9 稳定性试验



*-2, 3, 5, 4'-四羟基二苯乙烯-2-*O*-β-*D*-葡萄糖苷

*-2, 3, 5, 4'-tetrahydroxy-stilbene-2-*O*-β-*D*-glucoside

图 1 对照品 (A)、供试品 (B)、阴性对照品 (C)

HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC chromatograms of reference substance (A), Tongle Granule sample (B), and negative sample (C)

配置批号 1120813 样品的供试品溶液, 在室温下不同时间 (0、2、4、6、10 h) 放置, 测定 2, 3, 5, 4'-四羟基二苯乙烯-2-*O*-β-*D*-葡萄糖苷的峰面积值, 计算得其 RSD 值为 0.92%。结果表明, 供试品溶液在 10 h 内稳定性良好。

2.10 加样回收率试验

取已知含量的通乐颗粒 (批号 120813, 含量为 2.18 mg/g) 6 份, 精密称定 0.6 g, 分别精密加入 0.2 mg/mL 的 2, 3, 5, 4'-四羟基二苯乙烯-2-*O*-β-*D*-葡萄糖苷对照品溶液 8 mL, 制备供试品溶液, 进样测定, 记录峰面积, 以外标法计算回收率, 结果平均回收率为 99.74%, RSD 值为 1.08%。

2.11 样品含量测定

分取不同批号的通乐颗粒样品, 依“2.3”项下方法配制成样品溶液, 按照上述色谱条件进样测定, 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 2.17 mg/g, 结果见表 1。

3 讨论

何首乌中含大黄素、大黄酚等多种蒽醌类成分, 但这些成分不是何首乌的专属性成分, 根据《中国药典》2010 年版通乐颗粒选择 2, 3, 5, 4'-四羟基二

表1 样品含量测定结果 ($n=3$)
Table 1 Result of sample determination

批号	2, 3, 5, 4'-四羟基二苯乙烯- 2- <i>O</i> - β - <i>D</i> -葡萄糖苷/(mg·g ⁻¹)	$\bar{x} \pm s$	RSD / %
120811	2.15	2.17 ± 0.02	0.96
120813	2.18		
120815	2.19		

苯乙烯-2-*O*- β -*D*-葡萄糖苷为含量指标, 故笔者选择该成分作为通乐颗粒质量标准的控制指标。实验过程中曾选用系列浓度的甲醇-水或乙腈-水进行洗脱, 结果乙腈-水 (20:80) 为流动相时, 峰型对称, 分离度良好, 保留时间也较合理, 并且空白样品无明显干扰组分, 经方法学考察, 精密度、稳定性、重复性和回收率试验均符合有关规定, 因此确立该色谱条件作为通乐颗粒指标性成分 2, 3, 5, 4'-四羟基二苯乙烯-2-*O*- β -*D*-葡萄糖苷的含量检测方法。

结合参考文献^[4-6], 笔者对提取溶剂(甲醇、50%甲醇、95%乙醇、70%乙醇、50%乙醇)进行了系列

对比考察, 发现甲醇提取时, 杂质峰干扰严重, 故选择乙醇作为提取溶剂, 最终以 50%乙醇, 超声提取 30 min, 即能将 2, 3, 5, 4'-四羟基二苯乙烯-2-*O*- β -*D*-葡萄糖苷完全提取出来, 且杂质含量低, 峰型好。

参考文献

- [1] 章曙丹, 徐 强, 倪 晟. 薄层扫描法测定通乐颗粒中大黄素的含量 [J]. 基层中药杂志, 2001, 15(5): 15-16.
- [2] 蔡丽芬, 钟国跃, 张 倩, 等. HPLC 测定不同生长年限及采收期何首乌中二苯乙烯苷和蒽醌类成分的含量 [J]. 中国中药杂志, 2010, 35(10): 1221-1225.
- [3] 中国药典 [S]. 一部. 2010: 1051-1052.
- [4] 魏淑萍, 孙晓娟, 高 睿. HPLC 法测定首乌胶囊中 2, 3, 5, 4'-四羟基二苯乙烯-2-*O*- β -*D*-葡萄糖苷的含量 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2009, 11(12): 21-23.
- [5] 孟 勤, 赵俊艳, 李慧颖, 等. 桃红清血胶囊中 2, 3, 5, 4'-四羟基二苯乙烯-2-*O*- β -*D*-葡萄糖苷 HPLC 检测方法的建立及评价 [J]. 吉林大学学报: 医学版, 2010, 36(4): 803-805.
- [6] 张 俐, 王 玉. 强身酒质量标准研究 [J]. 中成药, 2009, 31(8): 11-13.