

HPLC测定三乌胶中的 2, 3, 5, 4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷

何继祥, 解翠珠, 程 静, 许 庆, 朱正华

(云南省曲靖市食品药品检验所, 云南 曲靖 655000)

摘要: 目的 建立测定三乌胶中 2, 3, 5, 4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷 (THXG)含量的方法。方法 采用 HPLC法, 用 Hypersil C₁₈ 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-水 (20: 80); 柱温为室温; 检测波长为 320 nm。结果 方法精密度和准确度良好; THXG 进样量 0.55~ 2.75 μg 与峰面积呈良好的线性关系 ($r = 0.9999$), 平均回收率为 98.45% ($RSD = 1.1\%$)。结论 所建方法专属性、重复性均好, 可用于三乌胶中 THXG 的含量测定。

关键词: 三乌胶; 2, 3, 5, 4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷; HPLC

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 1006-0103(2008)06-0722-02

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

HE Ji-xiang, XIE Cui-zhu, CHENG Jing, XU Qing, ZHU Zheng-hua

(Qujing Institute for Food and Drug Control, Qujing 655000, China)

Abstract **OBJECTIVE** To develop a method for the determination of 2, 3, 5, 4'-tetrahydroxystilbene-2-O-β-D-glucoside (THXG) in Sanwujiao. **METHODS** HPLC method was used with Hypersil C₁₈ column. The mobile phase was a mixture of acetonitrile-water (20: 80). The column temperature was room temperature with the detection wavelength at 320 nm. **RESULTS** The precision and accuracy were fine. The calibration curve was linear in the range of 0.55~ 2.75 μg for THXG ($r = 0.9999$). The average recovery was 98.45% with RSD of 1.1%. **CONCLUSION** The method is selective and reproducible for the determination of THXG in Sanwujiao.

Key words Sanwujiao; 2, 3, 5, 4'-Tetrahydroxystilbene-2-O-β-D-Glucoside; HPLC

CLC number R917

Document code A

Article ID: 1006-0103(2008)06-0722-02

三乌胶由生草乌、生川乌、何首乌、附子(附片)、生白附子、乳香和鲜猪蹄等组成; 具有祛寒除湿、祛风通络、活血止痛和强筋健骨的功效; 用于风寒湿邪、风痰、淤血引起的各种疼痛、炎症的治疗。何首乌为三乌胶的主药之一, 其主要有效成分为大黄素、大黄酚和 2, 3, 5, 4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷 (THXG), 而 THXG 是其特征成分。三乌胶在卫生部药品标准中药成方制剂中无含量测定。因此, 参照文献^[1, 2], 建立了 HPLC 测定三乌胶中 THXG 含量的方法。

1 实验部分

1.1 仪器及试剂

Agilent 1100 高效液相色谱仪系统 (美国安捷伦); BUG25-06 超声波发生器 (250 W, 25 kHz, 上海必能信超声仪器有限公司)。THXG 对照品 (中国药品生物制品检定所, 批号: 0844-9801); 三乌胶、阴性样品 (云南金乌黑制药公司); 乙腈为色谱纯;

乙醇、石油醚为分析纯; 水为重蒸水。

1.2 方法与结果

1.2.1 色谱条件 色谱柱为大连依利特 Hypersil C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-水 (20: 80), 流速为 1 mL min⁻¹, 检测波长为 320 nm。

1.2.2 溶液的制备 取 10 mg THXG 对照品, 精密称定, 置 100 mL 量瓶中, 加稀乙醇定容, 即得 100 μg mL⁻¹ 的对照品溶液。取样品, 剪碎, 取约 0.7 g 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 加 40 mL 石油醚 (30℃~ 60℃), 密塞, 超声处理 5 min, 弃石油醚, 同法处理两次, 残留物于水浴中挥干, 精密加入 25 mL 稀乙醇, 密塞, 称定重量, 超声处理 15 min, 放至室温, 再称定重量, 用稀乙醇补足减失的重量, 摇匀, 用 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 取续滤液, 即得样品溶液。取不含何首乌的阴性样品, 按上述方法处理, 制得阴性样品溶液。

1.2.3 系统适用性及专属性的考察 照“1.2.1”项的色谱条件, 分别取 10 μL 阴性样品溶液、对照品

溶液与样品溶液, 进样, 记录色谱图。THXG 的保留时间约为 8.9 min, 理论板数按 THXG 峰计算为 8.68×10^3 。阴性样品溶液无干扰峰 (图 1)。

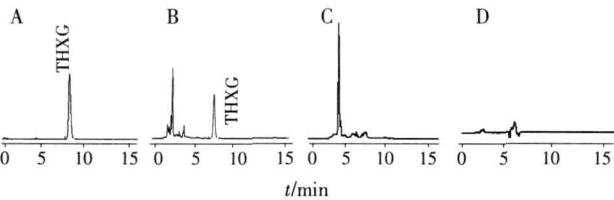


图 1 对照品 (A)、样品 (B)、阴性样品 (C) 和石油醚提取物 (D) 溶液的色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms of control solution (A), sample solution (B), negative sample solution (C) and extracts with petroleum ether solution (D)

1.2.4 样品的测定 分别精密量取 10 μl 对照品溶液与样品溶液, 进样, 记录色谱峰面积, 按外标法计算, 即得。3 批样品的含量测定结果分别为 4.07、4.09、4.06 mg·g⁻¹。

1.2.5 线性关系 精密吸取 5、10、15、20、25 μl THXG 对照品溶液, 分别进样, 测定色谱峰面积。以 THXG 进样量为横坐标, 3 次峰面积的均值为纵坐标进行线性回归, 得回归方程为: $Y = 3.59 \times 10^3 X + 3.50$ ($r = 0.9999$)。进样量 0.55~2.75 μg 与峰面积的线性关系良好。

1.2.6 进样精密度试验 精密量取 10 μl THXG 对照品溶液, 连续进样 5 次, THXG 的峰面积分别为 3.934×10^3 、 3.949×10^3 、 3.925×10^3 、 3.942×10^3 、 3.931×10^3 , $RSD = 0.2\%$ ($n = 5$)。

1.2.7 重复性试验 取三乌胶样品 5 份, 分别按“1.2.2”项的方法制备成样品溶液后, 按“1.2.4”项的方法测定。测得其含量分别为 4.07、4.05、4.04、4.07、4.08 mg·g⁻¹, $RSD = 0.4\%$ ($n = 5$)。

1.2.8 稳定性的考察 精密吸取 10 μl 三乌胶 (批号: 20070817) 样品溶液, 分别于 0、0.5、1、2、4、6、8、12 h 时进样, 测得 THXG 的峰面积分别为 4.287×10^3 、 4.297×10^3 、 4.274×10^3 、 4.265×10^3 、 4.275×10^3 、 4.251×10^3 、 4.240×10^3 、 4.232×10^3 , 其 $RSD = 0.5\%$ ($n = 8$)。结果表明, 样品溶液在制备后 12 h 内稳定。

1.2.9 回收率试验 取约 0.35 g 已测定含量的三

乌胶 (批号: 20070817), 精密称定, 精密加入 1 ml 对照品溶液 (含 $1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ THXG), 水浴蒸干, 按“1.2.2”项的制备方法处理后, 再按“1.2.4”项下方法测定含量, 并计算回收率。平均回收率为 98.45%, $RSD = 1.1\%$ ($n = 5$), 结果见表 1。

表 1 回收率试验结果

Table 1 Results of recovery

Original/mg	Added/mg	Detected/mg	Recovery/%	$\bar{X}$ /%	RSD/%
1.4259	1.0000	2.4155	98.96	98.45	1.1
1.4214	1.0000	2.4206	99.92		
1.4299	1.0000	2.4002	97.03		
1.4198	1.0000	2.4045	98.47		
1.4226	1.0000	2.4011	97.85		

2 讨论

按“1.2.2”项的样品溶液制备方法, 保留石油醚提取液, 然后合并石油醚液, 于水浴挥干, 残渣精密加入 25 ml 稀乙醇, 密塞, 超声处理 (250 W, 25 kHz) 15 min, 放至室温, 摇匀, 用 0.45 μm 微孔滤膜过滤。取续滤液 10 μl 进样, 记录色谱图。色谱图中在与对照品保留时间相同处无色谱峰出现, 说明石油醚脱脂对样品中 THXG 含量无影响 (图 1)。

在石油醚提取后的残渣中加入稀乙醇后, 曾实验了 5、10、15、20、25 min 超声提取的效果。结果表明, 超声处理 (250 W, 25 kHz) 15 min 能将样品中 THXG 充分提取, 因此, 确定超声处理时间为 15 min。参考文献^[1,2], 对测定何首乌中 THXG 所用的流动相和检测波长进行试验。结果显示, 乙腈-水 (20:80) 为流动相能使 THXG 峰与杂质峰得到很好分离, 且阴性样品无干扰, 分离效果满意。

所建方法专属性、重复性好, 可用于三乌胶中 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷的含量测定。

参考文献:

[1] 中华人民共和国国家药典委员会. 中国药典 [S]. 一部. 北京: 化学工业出版社, 2005. 122-123.
[2] 杜钢, 安淑芳, 刘仲义. HPLC 测定乌苓苁蓉口服液 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷的含量 [J]. 华西药学杂志, 2003, 18(4): 297-299.

收稿日期: 2007-11