

HPLC 法测定补肾腰痛颗粒中二苯乙烯苷的含量

冯伟红, 李曼玲

(中国中医研究院中药研究所, 北京 100070)

摘要: 目的: 建立高效液相色谱法测定补肾腰痛颗粒中二苯乙烯苷的含量。方法: 采用高效液相色谱法, 十八烷基硅烷键合硅胶柱; 乙腈-水(25: 75)为流动相; 检测波长为 320nm。结果: 2, 3, 5, 4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷的线性范围为 0.05 ~ 0.25μg, $r = 0.99999$; 回收率为 97.47%, RSD 为 2.23%。结论: 该方法操作简便、快速、准确。

关键词: 补肾腰痛颗粒; 二苯乙烯苷; 高效液相色谱法

中图分类号: R284.1 文献标识码: B 文章编号: 1005-9903(2004)02-0004-02

Determination of 2, 3, 5, 4'-tetrahydroxystibene-2-O-β-D-glucoside in Bushenyaotong Granule by HPLC Method

FENG Wei-hong, LI Man-ling

(Institute of Chinese Material medica, China Academy of Traditional Chinese medicine, Beijing 100700, China)

Abstract: Object: To develop a HPLC method to determine the content of 2, 3, 5, 4'-tetrahydroxystibene-2-O-β-D-glucoside in BUSHENYAOTONG granule. Method: The HPLC method was carried out on an ODS column using a mobile phase of acetonitrile-water(25: 75), and detection wavelength was 320nm. Result: with a relation efficient of 0.9999. Good linear relationships between wrea and amount was noted for 0.05 ~ 0.25μg. The average recovery of 2, 3, 5, 4'-tetrahydroxy stibene-2-O-β-D-glucoside and RSD were 97.47% and 2.23%, respectively. Conclusion: It was proved that the method was available, simple and accurate.

Key words: Bushenyaotong granule; 2, 3, 5, 4'-tetrahydroxystibene-2-O-β-D-glucoside; HPLC

补肾腰痛颗粒是由当归、山茱萸、龟甲、那阵子、何首乌等二十味中药组成。主要功能为滋补肝肾, 活血祛瘀, 强筋壮骨, 补气血等。临床主要用于妇科疾病。该处方中何首乌为蓼科植物何首乌的干燥块根。其有效成分之一为 2, 3, 5, 4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷。本实验采用高效液相色谱法测定补肾腰痛颗粒中二苯乙烯苷的含量作为该制剂的质量检测指标, 现报道如下。

1 仪器与试剂

高效液相色谱仪: 美国 HP100 高效液相色谱仪, G1311A 四元泵, G1313 自动进样器, G1316A 柱温箱, G1315A 二极管矩阵检测器及 HPCHAM 色谱工作站。化学试剂: 乙腈为色谱纯, 水为高纯水。2, 3, 5, 4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷对照品: 化学对照品(0844-9802), 购于中国药品生物制品检定所, 含量测定用。

2 方法与结果

2.1 检测波长的确定 称取二苯乙烯苷对照品适量, 用 40% 乙醇配制成 0.1mg/ml 的溶液, 在 200~400nm 波长处扫描, 结果二苯乙烯苷在 320nm 波长处有最大吸收。

2.2 色谱条件 色谱柱: 十八烷基硅烷键合硅胶(Luna C₁₈ 4.6mm × 250mm); 流动相: 乙腈-水(25: 75); 流速为 0.7ml/min, 柱温: 35℃, 检测波长为 320nm, 理论板数按二苯乙烯苷峰计算不低于 4000, 分离度大于 2.0。

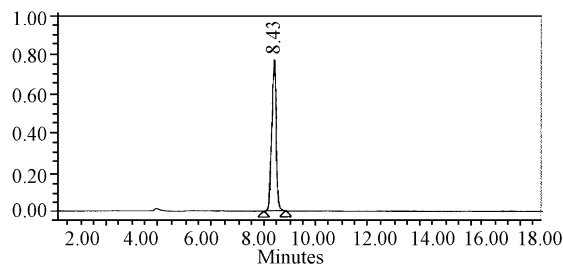


图 1 二苯乙烯苷对照品的 HPLC 图谱

2.3 供试品溶液制备 取本品内容物约 1g, 精密称定, 置锥形瓶中, 精密加入 40% 乙醇 25ml, 称重, 超声处理 20min(超声波频率 40KHz, 功率 100W), 取出,

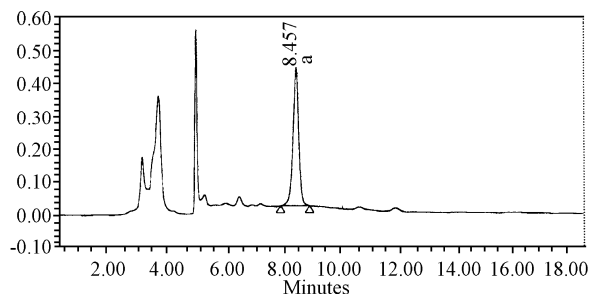


图 2 补肾腰痛颗粒供试品的 HPLC 图谱

a. 对照品二苯乙烯苷

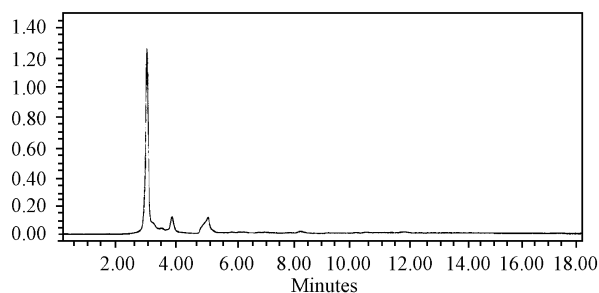


图 3 缺何首乌的空白补肾腰痛颗粒 HPLC 图谱

放至室温后再称定重量,用 40% 乙醇补足减失的重量,摇匀,用微孔滤膜滤过,滤液作为供试品溶液。

2.4 对照品溶液的制备 精密称取干燥至恒重的 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D 葡萄糖苷对照品 5mg,置 50ml 量瓶中,加 40% 乙醇适量使溶解并稀释至刻度,摇匀后,精密吸取此溶液 1ml,置 10ml 量瓶中,加 40% 乙醇适量使溶解并稀释至刻度,摇匀即得。

2.5 空白试验 取自制不含何首乌的空白制剂样品,按照供试品溶液制备方法制备,依法测定,结果在对照品二苯乙烯苷出峰的位置无其他干扰峰出现,证明其它药材对二苯乙烯苷峰无干扰。

2.6 线性关系的考察 分别精密吸取对照品溶液 (0.01mg/ml) 5、10、15、20、25μl 进样,依上述色谱条件测定二苯乙烯苷峰面积,结果见表 1。以峰面积积分为纵坐标,2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D 葡萄糖苷含量为横坐标绘制标准曲线,得回归方程: $Y = 1.05 + 3.9897 \times 10^3 X$, $r = 0.99999$,表明 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D 葡萄糖苷在 0.05μg ~ 0.25μg 范围内成线性关系。

2.7 精密度试验 精密吸取对照品溶液 15μl 进样,重复 5 次, RSD 为 1.73%。

2.8 重现性试验 精密称取同一批号的供试品 5 份,依前法制备,测定结果 RSD 为 2.561%。

2.9 稳定性试验 取供试品溶液,分别于配制液 0、1、2、4、8、16、24h 依法测定,结果在 24h 内 RSD 为 1.046%。

2.10 加样回收率试验 精密称取已知二苯乙烯苷含量的供试品内容物,分别置 50ml 锥形瓶中,精密加入等量对照品,按供试品溶液制备方法制备,依法测定。结果见表 1。平均回收率 (%) 97.47, RSD 为 2.23%。

表 1 二苯乙烯苷回收率测定

样品中含量 (mg)	加入量 (mg)	测得量 (mg)	回收率 (%)
0.082	0.095	0.172	94.74
0.084	0.095	0.175	95.79
0.088	0.095	0.183	100.00
0.087	0.095	0.181	98.95
0.085	0.095	0.178	97.89

2.11 供试品含量测定 取如下批号补肾腰痛颗粒依法制备,测定,结果补肾腰痛颗粒中二苯乙烯苷含量如下。结果见表 2。

表 2 样品含量测定结果

批号	二苯乙烯苷含量 (mg/g)
980704	0.208
000508	0.211
000809	0.204

3 讨论

3.1 在对二苯乙烯苷测定色谱条件的流动相选择时,曾对乙腈-水 (25:75)、甲醇-水 (52.5:47.5) 作了比较研究,结果表明选用乙腈-水 (25:75) 作为流动相,2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D 葡萄糖苷与其他组分均能达到基线分离。

3.2 在试验过程中,还对乙醇作为提取溶媒的浓度加入量做了比较试验,结果表明选用 40% 乙醇,加入 25ml 为最佳条件。

3.3 试验中还对不同提取方法 (冷浸、加热回流、超声提取) 进行了选择,结果表明超声处理测得的二苯乙烯苷含量与加热回流基本一致,故选用超声处理提取方法。

3.4 含量测定中,样品超声处理时间曾选择 20、30、40min,经考察,选定 20min。

参考文献:

[1] 中华人民共和国药典.一部[S].北京:化学工业出版社,2000.147.
[2] 赵陆华.高效液相色谱法分析中药成分手册[M].北京:中国医药科技出版社,1994.376.