

# HPLC 法测定参芪首乌补汁中 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O- $\beta$ -D 葡萄糖苷的含量

## HPLC Determination of 2,3,5,4'-tetrahydroxystibene-2-O- $\beta$ -D-glucoside in Shenqi Shouwu Buzhi

黄 园,陈晓军,梁 霞,廖厚知,庞继梅,廖九明

HUANG Yuan, CHEN Xiao-jun, LIANG Xia, LIAO Hou-zhi, PANG Ji-mei, LIAO Jiu-ming

(广西博科药业有限公司,广西南宁 530007)

(Guangxi Boke Pharmaceutical CO., LTD., Nanning, Guangxi, 530007, China)

**摘要:**建立一种测定参芪首乌补汁中 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O- $\beta$ -D 葡萄糖苷(简称二苯乙烯苷)含量的方法。采用岛津 VP-ODS 色谱柱(150 mm $\times$ 4.6 mm,5 $\mu$ m);乙腈-水(25:75)为流动相;检测波长为 320 nm,流速 1.0 mL $\cdot$ min<sup>-1</sup>。结果表明:二苯乙烯苷在 0.1013~1.013 $\mu$ g 范围内与峰面积呈良好线性关系, $r=0.9999$ ,平均加样回收率为 98.84%,RSD 为 0.87%( $n=6$ ),精密度、稳定性良好。该方法可靠性高,分离度、准确性、重复性好,适用于参芪首乌补汁中二苯乙烯苷含量的测定。

**关键词:**高效液相色谱法 参芪首乌补汁 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O- $\beta$ -D 葡萄糖苷

中图分类号:O657.72,R917 文献标识码:A 文章编号:1005-9164(2013)04-0282-03

**Abstract:** The HPLC determination method was used to detect the 2,3,5,4'-tetrahydroxystibene-2-O- $\beta$ -D-glucoside in Shenqi Shouwu Buzhi by Shimadzu VP-ODS (4.6 mm $\times$ 150 mm, 5 $\mu$ m) chromatographic column. The mobile phase was a mixture of acetonitrile-water (25:75), the flow rate was 1 mL $\cdot$ min<sup>-1</sup>. The detector wavelength was 320 nm. The precision and stability were fine in those conditions. The calibration curve was linear over the range of 0.1013~1.013 $\mu$ g for 2,3,5,4'-tetrahydroxystibene-2-O- $\beta$ -D-glucoside ( $r=0.9999$ ). The average recovery rate ( $n=6$ ) was 98.84%. The proposed method may be used in the quantitative analysis of 2,3,5,4'-tetrahydroxystibene-2-O- $\beta$ -D-glucoside in Shenqi Shouwu Buzhi with high reliability, separation, accuracy and repeatability.

**Key words:** HPLC, Shenqi Shouwu Buzhi, 2,3,5,4'-tetrahydroxystibene-2-O- $\beta$ -D-glucoside

参芪首乌补汁由党参、黄芪、制何首乌、黄精四味药材精制而成,为中华人民共和国卫生部药品标准中药成方制剂第 4 册<sup>[1]</sup> 记载的品种,具有补气养血,益肝肾的功效,用于气血不足,肝肾亏损贫血,神经衰弱,产后血亏等症。原标准中无含量测定项,不利于控制本品的质量,经查阅文献,发现已有文献采用高效液相色谱法测定参芪首乌颗粒(参芪首乌补汁的改剂型品种)中大黄素的含量<sup>[2]</sup>,并未见二苯乙烯苷测定方法的报道。另外有不少文献采用高效液相色谱法测定制剂及制何首乌中二苯乙烯苷的含量<sup>[3~10]</sup>。同时有文献报道制何首乌中没食子酸的含量测定研究<sup>[12]</sup>,还参考了没食子酸的含量测定方法的研究<sup>[12]</sup>。

考虑到二苯乙烯苷作为中国药典 2010 年版一部制何首乌药材规定的含量测定项更应进行质量控制,故参考上述方法,对本品中的二苯乙烯苷进行含量测定。结果表明,本文方法可靠性高,分离效果好,准确性、重现性法考察均符合含量测定的要求,可用于参芪首乌补汁的质量控制。

### 1 材料与方 法

#### 1.1 实验材料

仪器:Agilent 1200 高效液相色谱仪;VWD 紫外检测器;ChemStation for LC Systems 色谱工作站,美国安捷伦科技有限公司;AB265-S 电子分析天平,梅特勒-托利多集团;UV2450 型紫外可见分光光度计,日本岛津公司;重庆阿修罗 AXLC1820 超纯水机。

收稿日期:2013-05-12

修回日期:2013-09-10

作者简介:黄 园(1980-),男,工程师,主要从事药物开发和研究。

试剂:2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O- $\beta$ -D-葡萄糖苷化学对照品(批号:110844-201109),购于中国食品药品检定研究院;参芪首乌补汁(批号:5212015003,5212016149,5212017149,5212018001),广西灵峰药业有限公司;乙腈为色谱纯;稀乙醇为分析纯;水为自制超纯水。

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 色谱条件

色谱柱:岛津 VP-ODS(4.6mm $\times$ 150mm,5 $\mu$ m);流动相:乙腈-水(25:75);流速:1.0mL $\cdot$ min<sup>-1</sup>;检测波长:320nm;进样量:10 $\mu$ L。理论板数按二苯乙烯苷峰计算应不低于2000。

### 1.2.2 对照品、供试品及阴性样品溶液的制备

对照品溶液的制备:取二苯乙烯苷对照品适量,精密称定,加稀乙醇(取乙醇529mL,加水稀释至1000mL,即得)制成每1mL含40 $\mu$ g的溶液,即得。

供试品溶液的制备:精密量取本品5mL,置25mL量瓶中,加稀乙醇至刻度,摇匀,即得。

阴性样品溶液的制备:按处方比例称取除制何首乌外的药味,按制法制成制何首乌阴性制剂,再取此阴性制剂5mL,置25mL量瓶中,加稀乙醇至刻度,摇匀,即得不含制何首乌的阴性样品溶液。

### 1.2.3 测定波长的选择

取上述对照品溶液用紫外可见分光光度计于200~400nm范围内扫描,绘制光谱图。

### 1.2.4 专属性试验

分别吸取对照品溶液、供试品溶液及不含制何首乌的阴性样品溶液各10 $\mu$ L,注入液相色谱仪,绘制色谱图。

### 1.2.5 标准曲线的测定

精密称取二苯乙烯苷对照品10.13mg,置100mL量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,精密量取1mL,2mL,4mL,8mL,10mL,分别置10mL量瓶中,加稀乙醇至刻度,摇匀,按上述色谱条件,分别进样10 $\mu$ L,测定,以峰面积积分值A对二苯乙烯苷进样量C( $\mu$ g)进行线性回归分析。

### 1.2.6 精密度试验

精密度试验分别精密吸取40.52 $\mu$ g/mL的二苯乙烯苷对照品溶液,按上述色谱条件,重复进样5次。

### 1.2.7 稳定性试验

稳定性试验取供试品溶液,分别在放置0h,2h,4h,6h,8h,24h时进样10 $\mu$ L,依法测定二苯乙烯苷的峰面积。

### 1.2.8 重复性试验

重复性试验取同一批样品,按供试品溶液的制备

方法制备6份供试品溶液,依法测定,计算二苯乙烯苷的含量及相对标准偏差。

### 1.2.9 加样回收率试验

精密量取已测知含量的样品(0.246mg $\cdot$ mL<sup>-1</sup>)2.5mL,再精密加入1.055mg $\cdot$ mL<sup>-1</sup>的二苯乙烯苷对照品溶液(精密称取二苯乙烯苷对照品10.55mg,置10mL量瓶中,加稀乙醇使溶解并稀释至刻度,摇匀,即得0.6mL,按“供试品溶液的制备”方法试验,平行6份,依法测定,计算回收率。

### 1.2.10 样品测定

按上述“供试品溶液制备方法”制备供试品溶液,按照上述色谱条件,测定3批样品,以峰面积按外标一点法计算含量。

## 2 实验结果

### 2.1 检测波长的确定

通过紫外可见分光光度计对二苯乙烯苷对照品溶液的扫描,确定二苯乙烯苷在320nm处有最大吸收峰,故选择320nm为检测波长。

### 2.2 专属性试验结果

专属性试验的色谱见图1,分离度 $R > 1.5$ 。表明其他组分对测定组分二苯乙烯苷无干扰,所选用的方法及条件符合含量测定的专属性要求。

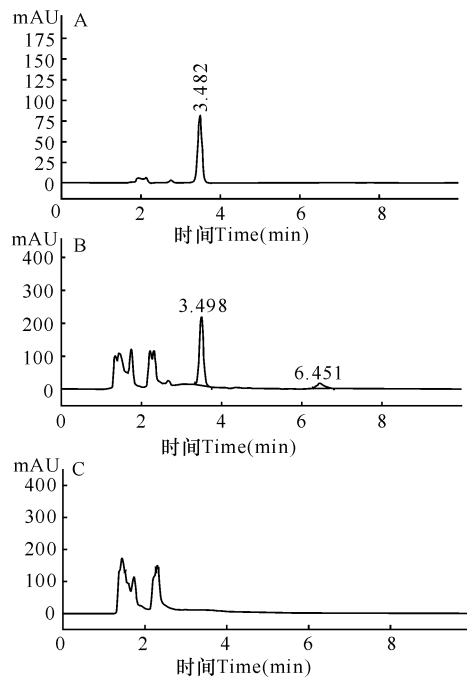


图1 HPLC 色谱

Fig.1 HPLC chromatography

A. 对照品, B. 参芪首乌补汁样品, C. 制何首乌阴性样品: 1,2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O- $\beta$ -D-葡萄糖苷。

A. Reference substances chromatogram, B. Sample of Shenqi Shouwu Buzhi chromatogram, C. Negative sample without Radix Polygoni Multiflori Preparata chromatogram 1,2,3,5,4'-tetrahydroxystibene-2-O- $\beta$ -D-glucoside.

表 1 加样回收率试验

Table 1 Experiments of recovery

编号 No.	样品含量 Sample contents (mg)	加入量 Adding amount (mg)	测得量 Measured amount(mg)	回收量 Recovery amount(mg)	回收率 Recovery rate(%)	平均回收率 Average recovery(%)	RSD (%)
1	0.615	0.633	1.249	0.634	100.16	98.84	0.87
2	0.615	0.633	1.238	0.623	98.42		
3	0.615	0.633	1.244	0.629	99.37		
4	0.615	0.633	1.234	0.619	97.79		
5	0.615	0.633	1.242	0.627	99.05		
6	0.615	0.633	1.237	0.622	98.26		

2.3 标准曲线的测定结果

通过对二苯乙烯苷对照品的线性回归分析,得到线性回归方程为  $A = 3.19 \times 10^3 C - 43.55, r = 0.9999$ 。表明二苯乙烯苷进样量在  $0.1013 \sim 1.013 \mu\text{g}$  范围内线性关系良好,符合线性回归的要求。

2.4 精密度试验结果

通过仪器精密度试验,得到对照品峰面积平均值为 1233.6, RSD 为 0.33%,表明仪器精密度良好,仪器满足含量测定的要求。

2.5 稳定性试验结果

通过供试品溶液稳定性试验,得到 24h 内供试品溶液峰面积平均值为 1480.3, RSD 为 0.84%,表明供试品溶液在 24h 内稳定性良好,符合含量测定的要求。

2.6 重复性试验结果

通过重复性试验,得到 6 份供试品的平均含量为  $0.246 \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ , RSD 为 0.67%,表明方法重复性良好,符合含量测定的要求。

2.7 加样回收率试验结果

通过加样回收率试验,得到方法的平均回收率为 98.84%, RSD 为 0.87%,结果见表 1。表明方法回收率良好,符合含量测定的要求。

2.8 样品测定结果

应用本文的方法对 3 批样品中二苯乙烯苷的含量进行测定,结果 3 批样品的 RSD 均小于 2%,数据平行性较好,结果比较理想,见表 2。

表 2 样品测定结果(n=3)

Table 2 Content of 2,3,5,4'-tetrahydroxystibene-2-O-β-D-glucoside

样品批号 Lot No. of sample	含量 Content(mg · mL <sup>-1</sup> )	RSD (%)
5212016149	0.203	1.26
5212017149	0.235	0.67
5212018001	0.218	0.81

3 结论

在方法研究过程中,流动相比较了甲醇-水(35 : 65)及乙腈-水(25 : 75),结果显示,乙腈-水(25 : 75)为流动相,分离度高,且峰型较好,理论塔板数高,故

选用。本文采用高效液相色谱法对参芪首乌补汁中二苯乙烯苷含量测定进行方法学的研究,结果二苯乙烯苷在  $0.1013 \sim 1.013 \mu\text{g}$  范围内与峰面积呈良好线性关系,  $r = 0.9999$ ,平均加样回收率为 98.84%, RSD 为 0.87% ( $n = 6$ ),仪器精密度、供试品溶液的稳定性和重复性良好。表明本方法简便可行,可靠性高,重复性、准确性好,适用于参芪首乌补汁的质量控制。

参考文献:

[1] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中华人民共和国卫生部药品标准——中药成方制剂第四册 [M]. 北京: 中华人民共和国卫生部药典委员会编, 1991: 98.

[2] 江帆, 朱亭潘. RP-HPLC 法测定参芪首乌颗粒中大黄素含量[J]. 贵州中医学院学报, 2008, 30(5): 76-78.

[3] 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.

[4] 张振娟, 刘代华, 梁健成. HPLC 法测定降脂方中 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D 葡萄糖苷的含量[J]. 中国医药指南, 2012, 10(25): 472-473.

[5] 李洪斌, 余翔, 李洪刚. HPLC 法测定尿毒清颗粒中 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D 葡萄糖苷的含量[J]. 西北药学杂志, 2012, 27(3): 221-222.

[6] 杨宇, 万玉华, 黄春静, 等. HPLC 法检测中药洗发水中何首乌二苯乙烯苷的含量[J]. 应用化工, 2013, 42(2): 380-382.

[7] 邢加慧, 汪勤双, 叶晶莹, 等. 不同产地何首乌有效成分的含量研究[J]. 海峡药学, 2012, 24(1): 59-61.

[8] 成旭东, 孙芸, 刘扬. 高效液相色谱法测定首乌丸中 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D 葡萄糖苷含量[J]. 中国药物警戒, 2012, 9(1): 1-3.

[9] 朱宽鹏, 生书晶, 赵炜, 等. 何首乌不同部位二苯乙烯苷含量以及芪合酶 FM-STS 时空表达差异[J]. 现代生物医学进展, 2012, 12(30): 5819-5822.

[10] 李燕, 王慧娟, 林冰, 等. 指纹图谱条件下何首乌中二苯乙烯苷的含量[J]. 山地农业生物学报, 2012, 31(3): 264-267.

[11] 陈庆堂, 卓丽红, 徐文, 等. 制何首乌炮制过程中 5 种化学成分的含量变化[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(5): 66-71.

[12] 陈明生, 黄艳, 林霄, 等. 高效液相色谱法测定互叶白千层中没食子酸的含量[J]. 广西科学, 2012, 19(1): 71-73.

(责任编辑:尹 闯)