

# HPLC测定复方首乌降脂胶囊中 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷的含量

刘杰<sup>1</sup>,郑思嘉<sup>2</sup>,韩金玟<sup>△</sup>,胡海燕<sup>2\*</sup> (1.中山大学附属第三医院,广州 510630;2.中山大学药学院,广州 510080)

**摘要:**目的 建立复方首乌降脂胶囊中 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷(TTG)的含量测定方法。方法 采用 HPLC法, Diamonsil C<sub>18</sub>柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm);流动相为甲醇-6.8 × 10<sup>-3</sup> mol·L<sup>-1</sup> pH 3磷酸盐缓冲液(36:64);柱温 35 °C;流速 1 mL·min<sup>-1</sup>;检测波长 320 nm。结果 TTG 在 0.224~3.36 μg内呈良好的线性关系(n=6, r=1.000 0),加样回收率为 98.24%,RSD为 2.61%。结论 该方法灵敏、准确、简便,可用于该制剂的质量控制。

**关键词:**复方首乌降脂胶囊;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:R917.101;R972.6 文献标识码:B 文章编号:1007-7693(2008)08-0719-03

## Determination of 2,3,5,4'-tetrahydroxy-tilbene-2-O-β-D glucoside in Gold Theragran Capsules by HPLC

LIU Jie<sup>1</sup>, ZHENG Si-jia<sup>2</sup>, HAN Jing-wen<sup>△</sup>, HU Hai-yan<sup>2\*</sup> (1. The Third Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510630, China; 2. School of Pharmaceutical Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To develop a method to determine 2,3,5,4'-tetrahydroxy-tilbene-2-O-β-D glucoside in Gold Theragran Capsules. **METHODS** HPLC conditions: A Diamonsil C<sub>18</sub> column, a mixture of methanol-6.8 × 10<sup>-3</sup> mol·L<sup>-1</sup> pH 3 phosphate

作者简介:刘杰,男,硕士研究生,主管药师 \* 通讯作者:胡海燕,女,博士

E-mail: bird-flying73@163.com

<sup>△</sup> 2008届广东药学院毕业生

buffer(36:64) as mobile phase, column temperature 35 °C, flow rate 1 mL·min<sup>-1</sup> and UV detection wavelength at 320 nm.

**RESULTS** The linear range of calibration curve was 0.224 ~ 3.36 μg ( $n=6$ ) with the correlation coefficient of 1.000 0, the average recovery with RSD being (98.24 ± 2.61)%. **CONCLUSION** The method is sensitive, accurate and speedy, therefore suitable for product's quality control

**KEY WORDS:** Gold Thegran Capsules; 2, 3, 5, 4'-tetrahydroxy-tilbene -2-O-β-D glucoside; HPLC

复方首乌降脂胶囊是由何首乌、山楂、大黄、泽泻等五味药材经提取加工而成的纯中药制剂。该制剂主要用于治疗高血脂症、高黏血症、单纯性肥胖症、脂肪肝、动脉硬化等。何首乌中 2, 3, 5, 4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷(TTG)具有确切的降血脂疗效<sup>[1]</sup>。故本文建立了制剂中 TTG 的 HPLC 测定法,以控制产品的质量。

## 1 仪器与试剂

### 1.1 仪器

SB25-12DTD 超声清洗机(宁波新芝生物科技股份有限公司), (上海森信实验仪器有限公司), TW-5.0W 台式离心机(上海离心机械研究所), Waters 1525 高效液相色谱仪, Waters 2487 紫外双波长检测器, Waters 717plus 自动进样器, Breeze 色谱工作站, Diamonsil C<sub>18</sub> 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱。

### 1.2 试剂

TTG 对照品(中国药品生物制品检定所,批号 110844-200606); 复方何首乌降脂胶囊(自制,批号 080126); 甲醇为色谱纯; 水为自制双蒸馏水,其余试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

### 2.1 溶液的配制

**2.1.1**  $6.8 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  pH3 磷酸盐缓冲液的配制:称取 1.0 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 溶于 800 mL 水,用 1 mol·L<sup>-1</sup> HCl 调 pH 至 3.0,加水至 1 000 mL,即得。

**2.1.2** 供试品溶液的制备:精密称取胶囊内容物约 1 g,加入稀乙醇 15 mL,称重,超声 10 min,补足重量。摇匀,用微孔滤膜(0.45 μm)滤过,取续滤液,作为供试品溶液。

**2.1.3** 阴性对照溶液的制备:取不含何首乌的阴性样品约 0.8 g(相当于供试品约 1 g),按供试品溶液制备的方法制备阴性对照溶液。

**2.1.4** 对照品溶液的制备:精密称取 TSG 对照品 11.20 mg,置于 50 mL 量瓶中,加稀乙醇溶解并稀释至刻度,摇匀,制成 0.224 mg·mL<sup>-1</sup> 的对照品溶液。精密称量取该对照品溶液 5 mL,置于 25 mL 的量瓶,用稀乙醇稀释至刻度,制成 TTG 浓度为 0.044 8 mg·mL<sup>-1</sup> 的对照品溶液。

### 2.2 专属性与系统适应性试验

取 0.044 8 mg·mL<sup>-1</sup> 的 TTG 对照品溶液、阴性对照品溶液、供试品溶液各 10 μL,注入高效液相色谱仪测定,记录色谱图。

TTG 保留时间为 14.1 min,阴性对照品对测定无干扰。本实验条件下 TTG 与其他组分峰能达到基线分离,分离度大于 1.5,理论塔板数大于 5 000。方法专属性良好。

### 2.3 方法学考察

**2.3.1 线性关系考察** 分别量取浓度为 0.224 mg·mL<sup>-1</sup> 和 0.044 8 mg·mL<sup>-1</sup> 的 TTG 对照品溶液 5, 10, 15 μL 注入高效液相色谱仪测定。以峰面积 A 对 TTG 进样量 C(μg) 作线性回归,得回归方程  $A = 3\,590\,272\,C + 9\,918$  ( $r = 1.000\,0$ )。TTG 在 0.224 ~ 3.36 μg 内线性关系良好。

**2.3.2 重复进样精密密度试验** 精密吸取同一供试品溶液 10 μL,重复进样 6 次,记录峰面积。结果见表 1。

该方法的精密密度良好。

**2.3.3 重复性试验** 取供试品 6 份,制备供试品溶液,精密吸取 10 μL,注入高效液相色谱仪测定,记录峰面积并计算含量。结果见表 2。

表 1 精密密度实验结果 ( $n=6$ )

| 编号    | 1         | 2         | 3         | 4         | 5         | 6         |
|-------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| 峰面积 A | 2 732 475 | 2 695 188 | 2 675 188 | 2 680 802 | 2 682 433 | 2 688 482 |
| 均值    |           |           |           |           |           | 2 692 428 |
| RSD%  |           |           |           |           |           | 0.77      |

表 2 重复性试验结果 ( $n=6$ )

| 样品                     | 1     | 2     | 3     | 4     | 5     | 6     |
|------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 含量 /mg·g <sup>-1</sup> | 1.057 | 1.075 | 1.141 | 1.074 | 1.139 | 1.052 |
| 均值 /mg·g <sup>-1</sup> |       |       |       |       |       | 1.089 |
| RSD/%                  |       |       |       |       |       | 1.88  |

该方法重现性良好。

### 2.3.4 稳定性试验:

分别于供试品溶液制备后第 0, 1, 2, 4, 6, 8, 10 h 取 10 μL 进样,记录峰面积。结果见表 3。

表 3 稳定性试验结果 ( $n=7$ )

| 时间    | 0         | 1         | 2         | 4         | 6         | 8         | 10        |
|-------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| 峰面积   | 2 694 528 | 2 656 191 | 2 657 091 | 2 675 188 | 2 727 211 | 2 692 338 | 2 694 528 |
| 平均峰面积 |           |           |           |           |           |           | 2 683 758 |
| RSD%  |           |           |           |           |           |           | 1.01      |

供试品溶液放置 10 h 内稳定性良好。

### 2.3.5 回收率试验

采取加样回收法。取已知含量的供试品溶液 9 份,分别加入 0.224 mg·mL<sup>-1</sup> 的对照品溶液 2 mL, 4 mL, 8 mL 各三份,照样品测定项下操作,测定,测定结果见表 4。

表 4 回收率试验结果 ( $n=9$ )Tab 4 Results of recovery tests ( $n=9$ )

| 峰面积       | 进样量 / $\mu\text{g}$ | 总量 /mg   | 含量 / $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ | 称量样 /g   | 加入量 /mg | 回收率 /%  | 平均回收率 /% | RSD /% |
|-----------|---------------------|----------|------------------------------------|----------|---------|---------|----------|--------|
| 3 702 701 | 1. 028 55           | 1. 542 8 | 1. 055 75                          | 1. 007 0 | 0. 448  | 99. 41  |          |        |
| 3 737 543 | 1. 038 26           | 1. 557 4 | 1. 073 97                          | 1. 007 9 | 0. 448  | 102. 45 |          |        |
| 3 767 169 | 1. 046 51           | 1. 569 8 | 1. 139 66                          | 1. 022 9 | 0. 448  | 101. 57 |          |        |
| 4 678 596 | 1. 300 37           | 1. 950 6 | 1. 097 45                          | 1. 008 6 | 0. 896  | 95. 02  |          |        |
| 4 698 543 | 1. 305 92           | 1. 958 9 | 1. 098 40                          | 1. 007 6 | 0. 896  | 96. 07  | 98. 24   | 2. 61  |
| 4 756 893 | 1. 322 18           | 1. 983 3 | 1. 114 75                          | 1. 007 6 | 0. 896  | 98. 79  |          |        |
| 5 776 076 | 1. 606 05           | 2. 409 1 | 1. 099 16                          | 1. 026 4 | 1. 344  | 96. 02  |          |        |
| 5 853 036 | 1. 627 49           | 2. 441 2 | 1. 098 13                          | 1. 032 0 | 1. 344  | 97. 96  |          |        |
| 5 805 124 | 1. 614 14           | 2. 421 2 | 1. 098 09                          | 1. 027 3 | 1. 344  | 96. 85  |          |        |

试验结果表明,本法回收率良好。

### 2.3.6 定量限试验

精密移取 1 mL  $0.224\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  的对照品溶液,置 10 mL 量瓶中,用稀乙醇稀释至刻度,摇匀。精密移取稀释液 1 mL 于 25 mL 量瓶中,用稀乙醇稀释至刻度。摇匀,进样 10  $\mu\text{L}$ ,得对照品峰高为 994  $\mu\text{V}$ ,约为噪音的 3 倍。故本方法 TTG 的定量限为 8.96 ng。

## 3 讨论

3.1 曾根据文献<sup>[2-3]</sup>,以甲醇-水作流动相,发现拖尾严重,可能因为被测物为多羟基酚类化合物,易与  $\text{C}_{18}$  柱游离羟基结合,导致洗脱困难。另采取 0.5% 冰醋酸代替水,拖尾现象未改善。后试着将改为  $6.8\times 10^{-3}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  pH 3.0 的磷酸盐缓冲溶液(36:64),拖尾现象明显改善,测定的重复性与准确度理想。

3.2 与超声 10 min 相比较,超声 20 min 并不能增加提取效率,故供试品溶液的制备采取超声 10 min。

## 参考文献

- [1] GAO X, HU Y J, FU L C. Blood lipid-regulation of stilbene glycoside from *Polygonum multiflorum* [J]. *China J Chin Mater Med*(中国中药杂志), 2007, 32(4): 323-326.
- [2] SHI W Z, HUANG L H, XU D S, *et al*. HPLC method in determination of content of Stilbene Glucoside in prepared Radix *Polygoni Multiflori* and the compound Migu capsule [J]. *Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol*(中药新药与临床药理), 2001, 12(5): 359-361.
- [3] ZHANG C, YANG S L, YUAN H L, *et al*. Determination of stilbene in Radix *Polygoni Multiflori* by HPLC and its stability study [J]. *China J Chin Mater Med*(中国中药杂志), 1999, 24(6): 357-359.

收稿日期: 2008-05-19