

# 高效液相色谱化学发光测定中药制剂中 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷

卫洪清<sup>1,2</sup>, 刘二保<sup>1\*</sup>, 任荣芳<sup>1</sup>, 赵秀丽<sup>2</sup>, 李晓霞<sup>2</sup>, 江凤仙<sup>2</sup>

1. 天津师范大学化学与生命科学学院, 天津 300074

2. 山西师范大学化学与材料科学学院, 山西 临汾 041004

**摘要** 研究了2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷在硝酸介质中与高锰酸钾的发光行为和光谱现象, 甲醛的存在可使化学发光强度大大增强。由于中药制剂成分复杂, 干扰大, 文章首次采用反相高效液相色谱化学发光技术, 建立了一种测定中药制剂中2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷含量的新方法。对于不同中药制剂样品中2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷测定的回收率为102%~108%。方法的检出限为11.83 μg·mL<sup>-1</sup>, 线性范围为15.75~136.5 μg·mL<sup>-1</sup>, 相对标准偏差为3.45%(Cs=21.0 μg·mL<sup>-1</sup>, n=3)。此法简便、快速, 重复性好, 结果令人满意。

**主题词** 高效液相色谱; 化学发光分析; 高锰酸钾; 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷

**中图分类号:** O657.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-0593(2005)06-0844-04

## 引言

药物分析是分析化学的一个重要领域<sup>[1-3]</sup>, 而中药有效成分分析已成为该领域的一个热点<sup>[4-6]</sup>。2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷(其结构见图1)是中药何首乌(*radix ploygonum multiflorum*)中具有显著生理活性的水溶性有效成分, 具有抗衰老、降血脂药理药效<sup>[7]</sup>及明显降低胆固醇的作用<sup>[8]</sup>和保肝作用<sup>[9]</sup>, 中国药典2000年版<sup>[10]</sup>已将2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷定为何首乌药材的质量控制指标。

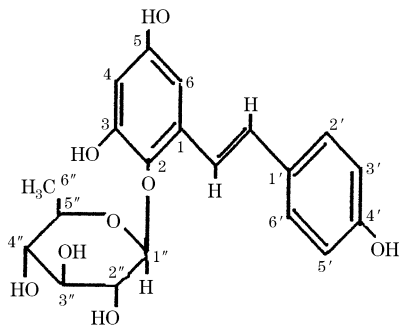


Fig. 1 Structure of 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-O-β-D-glucoside

文献报道<sup>[11-15]</sup>曾用薄层扫描法、紫外分光光度法、荧光分光光度法、酶化学发光法、高效毛细管电泳法等测定2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷的含量, 而用反相高效液相色谱法测定2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷也多用紫外光谱检测<sup>[16, 17]</sup>。反相高效液相色谱化学发光法测定2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷, 还未见文献报道。本文首次发现, 在硝酸介质中, 高锰酸钾能氧化2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷产生化学发光, 但是发光效率很低, 信号很弱, 而甲醛的存在可以大大增强该反应的发光强度。根据这一发现, 提出并建立了反相高效液相色谱化学发光法测定中药制剂中2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷含量的新方法。该方法已成功地用于中药制剂中2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷含量的测定, 结果令人满意。

## 1 实验部分

### 1.1 主要仪器和试剂

HP-1050Q型高效液相色谱仪(惠普公司); 自动进样器(惠普公司); 工作站(惠普3365软件), 八通道蠕动泵及化学发光检测仪(西安瑞迈电子科技有限公司); 色谱柱: hypersil ODS(125 mm×4.0 mm i. d., 5 μm); 何首乌根(安徽亳州); 首乌延寿片(兰州佛慈制药股份有限公司, 20020402); 养血生发胶囊(天津市第五中药厂, 0211103); 水为18 MΩ的纯

收稿日期: 2003-12-16, 修订日期: 2004-03-28

基金项目: 国家自然科学基金(20075017), 山西省自然科学基金(20021022)和天津师范大学校基金资助项目

作者简介: 卫洪清, 女, 1965年生, 山西师范大学化学与材料科学学院实验师 \* 通讯联系人

净水(Ultra-pure water system, Germany)。

2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷标准溶液  $210 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ : 准确称取 0.021 0 g 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷(中国药品生物制品检定所)于 100 mL 容量瓶中,用 7.5 mL 乙醇(95%)溶解后,用水定容,摇匀,作为标准储备液,使用时用水逐级稀释至所需浓度;高锰酸钾储备液:  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ; 甲醛溶液: 7.0%(φ)。所用试剂均为分析纯,水为二次去离子水。

## 1.2 实验步骤

准确移取一定体积的 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷标准溶液或样品溶液于 25 mL 容量瓶中,加水稀释至标线,摇匀,作为试液,如图 2 所示,未加入样品时,由蠕动泵以  $0.18 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  的速度输入高锰酸钾、甲醛和硝酸,记录仪出现一预定的本底信号,加入 20 μL 样品后,流动相以  $0.8 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  的流速带动样品通过色谱分离,分离后的物质直接进入柱后化学发光体系,此时,发光信号出现正峰即增强信号,测定 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷依据  $\Delta = I_s - I_0$ , 其中  $I_s$  为有样品存在时的发光强度值,  $I_0$  为无样品存在时的发光强度值。

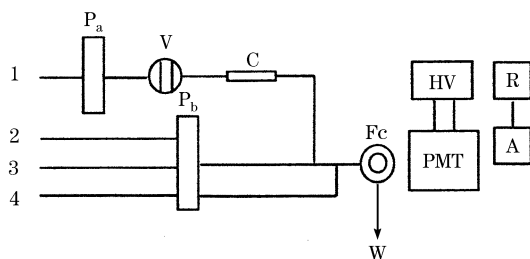


Fig. 2 Schematic diagram of flow injection chemiluminescence analyzer

- (1) 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-O-β-D-glucoside;  
 (2)  $\text{KMnO}_4$ ; (3)  $\text{HCHO}$ ; (4)  $\text{HNO}_3$ ;  $P_a$ , High pressure pump;  
 $P_b$ , Peristaltic pump; C, Analysis column; V, Injection valve;  
 Fc, Flow cell; W, Waste; HV, High voltage; PMT, Photo-multiplier;  
 R, Recorder; A, Amplifier

## 2 结果与讨论

### 2.1 流路参数的选择

在高锰酸钾浓度为  $7.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 甲醛溶液 7.0%(φ), 硝酸浓度为  $2.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷浓度为  $21.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 实验了流路参数对发光的影响,结果表明当各管路中试液流速为  $0.18 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$ , 流通管内径为 0.8 mm, 最后混合点距测量池 5 cm 时具有最大的化学发光强度。

### 2.2 化学发光反应动力学性质

由图 3 可见,高锰酸钾-硝酸-甲醛-2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷体系的化学发光反应为快反应,反应开始到发光强度最大值,历时仅 2 s。

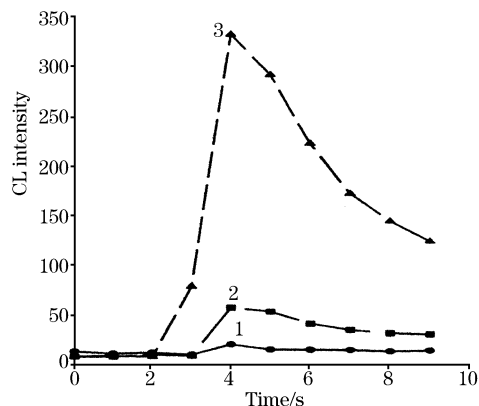


Fig. 3 Chemiluminescence kinetic curves

- (1)  $\text{KMnO}_4 (3.5 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}) - \text{HNO}_3 (1.25 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}) - 2,3,5,4'$ -tetrahydroxystilbene-2-O-β-D-glucoside ( $11.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ );  
 (2)  $\text{KMnO}_4 (3.5 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}) - \text{HNO}_3 (1.25 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}) - \text{HCHO}$  (1.17%);  
 (3)  $\text{KMnO}_4 (3.5 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}) - \text{HNO}_3 (1.25 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}) - 2,3,5,4'$ -tetrahydroxystilbene-2-O-β-D-glucoside ( $11.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) -  $\text{HCHO}$  (1.17%)

### 2.3 发光条件的选择

#### 2.3.1 反应介质及其浓度

分别以  $0.1 \sim 4.0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的盐酸、磷酸、硝酸、硫酸为反应介质,测量高锰酸钾-甲醛-2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷体系反应的化学发光强度,结果表明,在硝酸介质中发光强度最大且背景噪音最低。化学发光强度在一定范围内随硝酸浓度的增大而增大,当硝酸浓度为  $2.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  时,发光强度最大,当硝酸浓度超过  $3.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  时,发光信号反而减小。本文所选硝酸浓度为  $2.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  (如图 4 所示)。

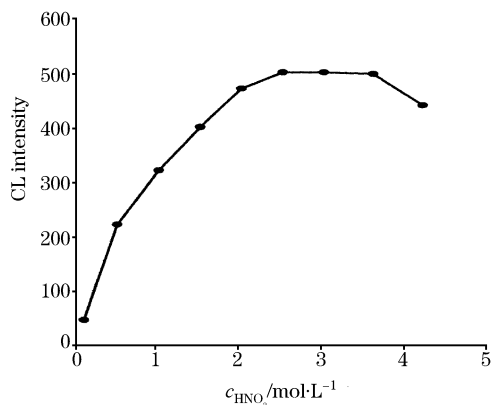


Fig. 4 Influence of  $\text{HNO}_3$  concentration on CL intensity

- (1)  $\text{HCHO}$  (11%);  
 (2)  $\text{KMnO}_4 (3.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1})$ ;  
 (3) 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-O-β-D-glucoside ( $69.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )

#### 2.3.2 高锰酸钾浓度的选择

高锰酸钾在此化学发光反应中是氧化剂,影响反应的化学发光强度。本文试验了高锰酸钾浓度对化学发光强度的影

响。结果表明,选择高锰酸钾的浓度为  $7.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  时,化学发光强度最大,如图 5 所示。

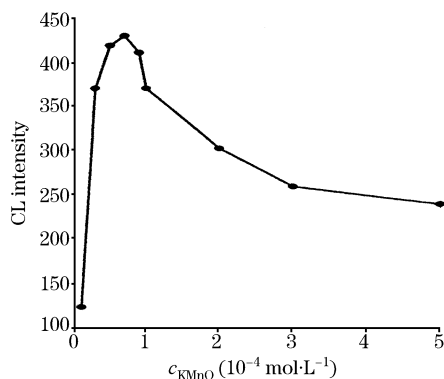


Fig. 5 Influence of  $\text{KMnO}_4$  concentration on CL intensity

$\text{HNO}_3 (2.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1})$ ;  $\text{HCHO} (11\%) (\varphi)$ ;

2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-O- $\beta$ -D-glucoside ( $69.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )

### 2.3.3 甲醛浓度的选择

在  $\text{KMnO}_4$ - $\text{HNO}_3$ -2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O- $\beta$ -D-葡萄糖苷发光体系中,对甲醛、甲酸、亚硫酸钠、硫代硫酸钠、 $\text{Tb}^{3+}$  五种增敏剂进行了选择。结果表明,甲醛对此发光体系的增强作用最强。同时,对 SDS ( $1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $1 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ), CTMAB ( $1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $1 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ), Tween-80 ( $1 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $1 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 三种表面活性剂进行了选择,结果表明,这三类表面活性剂对  $\text{KMnO}_4$ - $\text{HNO}_3$ - $\text{HCHO}$ -2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O- $\beta$ -D-葡萄糖苷体系无增敏作用。

甲醛在此化学发光反应中是增敏剂,甲醛的存在可以大大增强化学发光强度。实验表明,化学发光强度随甲醛浓度的增大而增大(如图 6 所示)。考虑到信噪比,实验中选用 7.0% ( $\varphi$ ) 的甲醛溶液。

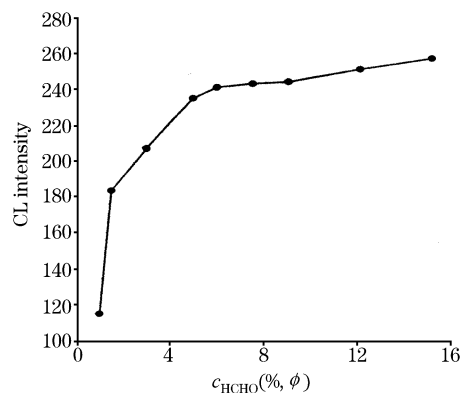


Fig. 6 Influence of  $\text{HCHO}$  concentration on CL intensity

$\text{HNO}_3 (2.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1})$ ;  $\text{KMnO}_4 7.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ;

2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-O- $\beta$ -D-glucoside ( $69.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )

## 2.4 色谱条件的选择

对 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O- $\beta$ -D-葡萄糖苷的色谱分离常采用反相色谱,而流动相的组成、浓度、pH 值等因素对色谱分离和化学发光反应均有影响。实验表明,使用 hypersil ODS (125 mm  $\times$  4.0 mm i. d., 5  $\mu\text{m}$ ) 色谱柱时,当流速为  $0.8 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 柱温 40  $^\circ\text{C}$ ; 流动相为乙腈:0.3%  $\text{H}_3\text{PO}_4 = 25:75$  时,分离效果较好,增强效果明显。

## 2.5 线性范围及检出限

在选定的最佳实验条件下,2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O- $\beta$ -D-葡萄糖苷浓度在  $15.75 \sim 136.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  范围内与发光强度呈良好的线性关系。对浓度为  $21.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O- $\beta$ -D-葡萄糖苷进行 3 次平行测定,得方法的相对标准偏差为 3.45%。根据 IUPAC 规定,以 3 倍的空白标准偏差为标准,计算得方法的检出限为  $11.83 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

## 2.6 实际样品的色谱分离及分析

何首乌根:精称样品 0.238 5 g,按照国家药典(一部)方法处理后用于分析;首乌延寿片:精称药片 0.200 8 g,去糖衣后,磨碎,加入 50% 的乙醇溶解,置于 25 mL 容量瓶定容,密塞称重,超声处理 30 min 后取出,称重,补足所失重量,摇匀,过滤后用于分析;养血生发胶囊:精称本品内容物 0.780 4 g,于 25 mL 容量瓶中,用 50%~70% 甲醇定容,密塞称重,超声处理 30 min 后过滤,取 15 mL 过滤液于 25 mL 的圆底烧瓶中,减压浓缩至约 3 mL,加入 10 mL 水,摇匀,再加入乙酸乙酯萃取 3 次(10 mL/次),合并萃取液后,蒸干,再用甲醇复溶,定至 3 mL,进样分析。在最佳条件下,按图 2 所示流路进行分离与检测,在 3 min 内完成,2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O- $\beta$ -D-葡萄糖苷与干扰组分的分离(见图 7)。采用标准加入法作回收率实验,平均测定 3 次,不同样品的测定结果见表 1。

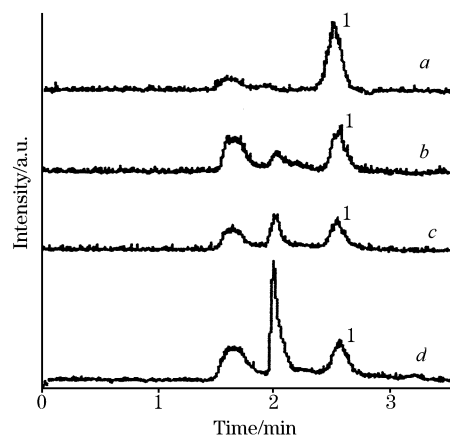


Fig. 7 HPLC-CL chromatogram

a,  $69.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  of 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-O- $\beta$ -D-glucoside standard solution;

b, Radix polygoni multiflori; c, Caulis polygoni prolong life tablet;

d, Yangxueshengfa capsules; 1, 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-O- $\beta$ -D-glucoside;  $t_R = 2.63 \text{ min}$

Table 1 Analytical results of samples

样品	样品中含量	加入量/mg	测得值/mg	回收率/%	相对标准偏差 RSD/%
何首乌根(安徽亳州)	0.034 78 g·g <sup>-1</sup>	3.15×10 <sup>-4</sup>	3.39×10 <sup>-4</sup>	108	5.0
首乌延寿片	0.017 31 g·g <sup>-1</sup>	3.15×10 <sup>-4</sup>	3.21×10 <sup>-4</sup>	102	5.3
养血生发胶囊	1.653 9 mg·g <sup>-1</sup>	6.30×10 <sup>-4</sup>	6.48×10 <sup>-4</sup>	102	2.2

## 参 考 文 献

- [1] LU Yan-wei(卢宛伟). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2003, 23(4): 759.
- [2] JIANG Cong-qiu, GAO Ming-xia(江崇球, 高明霞). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2003, 23(5): 937.
- [3] XU Yong-qun, SUN Su-qin, FENG Xue-feng, HU Shi-lin(徐永群, 孙素琴, 冯学峰, 胡世林). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2003, 23(3): 502.
- [4] WANG Zhen-gang, et al. Trends in Pharmacological Sciences, 2002, 23(8): 347.
- [5] Ku Yoe-ray, et al. J. Chromatography A, 1999, 848: 537.
- [6] Lau Aik-Jiang. J. Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2003, 31(2): 401.
- [7] DENG Wen-long, et al(邓文龙, 等). J. Chinese Herbal Medicine(中草药), 1987, 18(3): 42.
- [8] MEI Mei-zhen, et al(梅美珍, 等). Acta Pharmaceutica Sinica(药学报), 1979, 14(1): 8.
- [9] SU Wei, et al(苏 玮, 等). J. Chinese Herbal Medicine(中草药), 1997, 28(2): 119.
- [10] Pharmacopoeia Committee of Ministry of Public Health, P. R. China(中华人民共和国卫生部药典委员会编). The Pharmacopoeia of People's Republic of China(Part 1)(中华人民共和国药典·一部). Beijing: Chemical Industry Press(北京: 化学工业出版社), 2000. 139.
- [11] MA Chang-hua, et al(马长华, 等). Chinese Traditional Medicine(中药材), 1995, 18(7): 662.
- [12] YAO Gui-gen, et al(姚桂根, 等). Chinese J. Pharmaceutical Anal. (药物分析杂志), 1984, 4(1): 28.
- [13] YAO Gui-gen, et al(姚桂根, 等). Chinese Traditional Patent Medicine Study(中成药研究), 1986, (10): 10.
- [14] LI Guang-dao, et al(李光道, 等). J. Tongji Medical Courses in General University(同济医科大学学报), 1995, 24(4): 289.
- [15] YUAN Hai-long, et al(袁海龙, 等). Pharm. J. Chin. PLA. (解放军药学报), 2000, 16(3): 152.
- [16] WANG Chun-ying, et al(王春英, 等). Acta Pharmaceutica Sinica(药学报), 2002, 37(12): 955.
- [17] LU Jing, et al(鲁 静, 等). Research on Shizhen Medicine of the Nation(时珍国医国药), 2001, 12(9): 104.

## Determination of 2,3,5,4'-Tetrahydroxystilbene-2-O-β-D-Glucoside in the Traditional Chinese Preparation by High Performance Liquid Chromatography with Chemiluminescence Detection

WEI Hong-qing<sup>1,2</sup>, LIU Er-bao<sup>1\*</sup>, REN Rong-fang<sup>1</sup>, ZHAO Xiu-li<sup>2</sup>, LI Xiao-xia<sup>2</sup>, JIANG Feng-xian<sup>2</sup>

1. School of Chemistry and Life Sciences, Tianjin Normal University, Tianjin 300074, China

2. College of Chemistry and Materials Science, Shanxi Normal University, Linfen 041004, China

**Abstract** Based on the chemiluminescence reaction of  $\text{KMnO}_4\text{-HNO}_3\text{-2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-O-}\beta\text{-D-glucoside}$  sensitized by HCHO, an analytical method for 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-O-β-D-glucoside by RP-HPLC with chemiluminescence detector was developed. The chromatographic conditions were optimized. AN ODS hypersil column(25 mm×4.0 mm, 125×4.0 mm i. d. 5 μm) was used with acetonitrile-0.3%  $\text{H}_3\text{PO}_4$ [25:75, (φ)] as mobile phase, and the flow rate was 0.8 mL·min<sup>-1</sup> at the column temperature of 40 °C. The linear range of calibration curve was from 15.75 to 136.5 μg·mL<sup>-1</sup>, the detection limit was 11.83 μg·mL<sup>-1</sup> with a concentration of 21 μg·mL<sup>-1</sup> of 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-O-β-D-glucoside, and the recovery was 102%-108%. The relative standard deviation was 3.45%(Cs=21.0 μg·mL<sup>-1</sup>, n=3). The method has been applied to the determination of 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-O-β-D-glucoside in a few Chinese medicines, and the results were satisfactory. The method was simple, rapid and highly selective.

**Keywords** HPLC; Chemiluminescence; Potassium permanganate; 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-O-β-D-glucoside

(Received Dec. 16, 2003; accepted Mar. 28, 2004)

\* Corresponding author