

反相高效液相色谱法测定小儿清热灌肠剂中 6 种成分的含量研究

许家鸾 王京霞(杭州 310006 浙江省中医院)

摘要 目的:建立了测定小儿清热灌肠剂中 6 种成分含量的方法。方法:反相高效液相色谱法。以 ODS($5\mu\text{m}$, $4.6\text{mm} \times 250\text{mm}$)为色谱柱,流动相 A: $\text{CH}_3\text{OH} - \text{H}_2\text{O} - \text{HCOOH}$ (10:90:1), 流动相 B: $\text{CH}_3\text{OH} - \text{H}_2\text{O} - \text{HCOOH}$ (80:20:1), 检测波长为 280nm。结果:柴胡皂甙 A 含量为 0.4190, 加样回收率为 $90.1\% \pm 2.2\%$, $n=6$, $RSD=2.4\%$, 番泻甙 A 含量为 0.7790, 加样回收率为 $93.99\% \pm 3.8\%$, $n=6$, $RSD=4.0\%$, 苦参碱含量为 0.1290, 加样回收率为 $100.6\% \pm 2.7\%$, $n=6$, $RSD=2.9\%$, 大黄素甲醚含量为 0.3390, 加样回收率为 $95.8\% \pm 1.4\%$, $n=6$, $RSD=1.5\%$, 大黄酸含量为 0.2590, 加样回收率为 $91.3\% \pm 2.1\%$, $n=6$, $RSD=2.3\%$, 大黄素含量为 0.3190, 加样回收率为 $94.6\% \pm 3.3\%$, $n=6$, $RSD=3.5\%$ 。结论:该方法简便,重现性好。

关键词 反相高效液相色谱法;小儿清热灌肠剂;6 种成分

Determination of six constituents in Xiaoerqinre sausage by RP-HPLC

Xu Jialuan(Xu JL), Wang Jinxia(Wang JX)(Zhejiang Hospital of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou 310006)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** A reversed-phase HPLC method was established for determination of six constituents in Xiaoer. **METHODS:** A HPLC method was developed under the following conditions: flow rate: 1.0ml/min , the UV detector was set at 280nm, the mobile phase A was methanol-water-formic acid (10:90:1), the mobile phase B was methanol-water-formic acid (80:20:1). **RESULTS:** The quantity of skatole A was 0.4190 the recovery was $90.1\% \pm 2.2\%$, $n=6$, the relative standard deviation (RSD) was 2.4%, the quantity of sennoside A was 0.7790, the recovery was $93.99\% \pm 3.8\%$ ($n=6$), the RSD was 4.0%, the quantity of matrine was 0.1290, the recovery was $100.6\% \pm 2.7\%$ ($n=6$), the RSD was 2.9%, the quantity of physcion was 0.3390, the recovery was $95.8\% \pm 1.4\%$ ($n=6$), the RSD was 1.5%, the quantity of rhein was 0.2590, the recovery was $91.3\% \pm 2.1\%$ ($n=6$), the RSD was 2.3%, the quantity of emodin was 0.3190, the recovery was $94.6\% \pm 3.3\%$ ($n=6$), the RSD was 3.5%. **CONCLUSION:** This method was simple and showing good reproducibility.

KEY WORDS RP-HPLC, Xiaoerqinre Sausage, six constituents

小儿清热灌肠剂系我院儿科用以治疗小儿高热症的纯中药制剂,由大黄、苦参、柴胡 3 味中药组成,为保证制剂质量,采用反相高效液相色谱法对小儿清热灌肠剂中 6 种主要有效成分(大黄素、大黄酸、大黄素甲醚、苦参碱、番泻甙 A、柴胡皂甙 A)的含量进行了测定,并对色谱分离条件的选择进行了研究。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Beckman 334 型高效液相色谱仪(包括 110B 双泵, 163 可变波长紫外检测器, 421A 控制器, 427 积分仪), CQ_{50} 超声波清洗器(上海生物仪器厂)。

1.2 试剂

大黄素、大黄酸、大黄素甲醚、苦参碱、柴胡皂甙 A 对照品(中国药品生物制品检定所);番泻甙 A(北京医科大学药学院生药教研室),以上标准品用面积归一化法测试其含量在 99% 以上。试剂:甲醇为色谱纯,甲酸、丙酮为分析纯,水为重蒸馏水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 ODS($5\mu\text{m}$, $4.6\text{mm} \times 250\text{mm}$), 紫外检测波长为 280nm, 流速: 1.0ml/min 。流动相 A: $\text{CH}_3\text{OH} - \text{H}_2\text{O} - \text{HCOOH}$ (10:90:1); 流动相 B: $\text{CH}_3\text{OH} - \text{H}_2\text{O} -$

HCOOH(80:20:1)。进样量:20 μ l,梯度程度(时间,min):(B浓度%):(0~5):(5)→(5~20):(5~20)→(20~30):(20~65)→(30~50):(65)→(50~75):(65~100)→(75~80):100%甲醇→90:STOP。

2.2 混合对照品溶液的配制及回归曲线的绘制

精密称取对照品(柴胡皂甙 A、番泻甙 A 苦参碱、大黄素甲醚、大黄酸、大黄素)各 0.5mg,置于同一个 10ml 试管中,用无水甲醇 5.0ml 溶解,超声波助溶 15min,取此溶液 5 份各 0.1ml 分别置 5ml 量瓶中,分别用 80% 甲醇配成含对照品 0.05,0.02,0.01,0.005 和 0.002mg/ml 的稀释液,密封后置冰箱中备用。

分别取不同浓度对照品溶液各 20 μ l,在上述色谱条件下按梯度程度,进行 HPLC 定量分析,以进样量(mg $\times 10^{-3}$)为纵坐标,峰面积积分值为横坐标,得各对照品回归曲线方程:柴胡皂甙 A: $Y = 0.031 \times 10^{-3} X - 0.0137 \times 10^{-3}$ ($r = 0.922$);番泻甙 A: $Y = 0.341 \times 10^{-3} X - 0.136 \times 10^{-3}$ ($r = 0.9998$);苦参碱: $Y = 0.07 \times 10^{-3} X - 0.026 \times 10^{-3}$ ($r = 0.9120$);大黄素甲醚: $Y = 0.0921 \times 10^{-3} X - 0.047 \times 10^{-3}$ ($r = 0.992$);大黄酸: $Y = 0.121 \times 10^{-3} X - 0.032 \times 10^{-3}$ ($r = 0.997$);大黄素: $Y = 0.0201 \times 10^{-3} X - 0.0739 \times 10^{-3}$ ($r = 0.994$)。

对照品色谱图,见图 1。

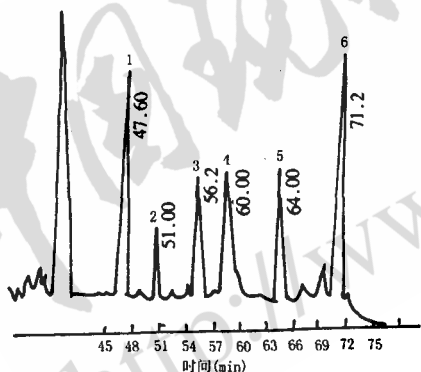


图 1 对照品色谱图

1-柴胡皂甙 A;2-番泻甙 A;3-苦参碱;4-大黄素甲醚;5-大黄酸;6-大黄素(图 2 同)

2.3 样品分析

2.3.1 样品处理方法:取药液 10ml,置 50ml 刻度带塞的离心管中加入 50% 丙酮 10ml,振荡提取 30min 后,离心将上清液吸出,残液再加入丙酮 10ml 超声波助溶 30min,再用纯丙酮 5ml 重复提取 2 次,将所得滤液置于 50ml 量瓶中,用 50% 丙酮稀释至刻度,摇匀,从中取出 10ml,减压(150 $^{\circ}$ C 以下)蒸出丙酮至无丙酮味,再用甲醇

稀释至 10ml 待测。

2.3.2 样品色谱图:见图 2。

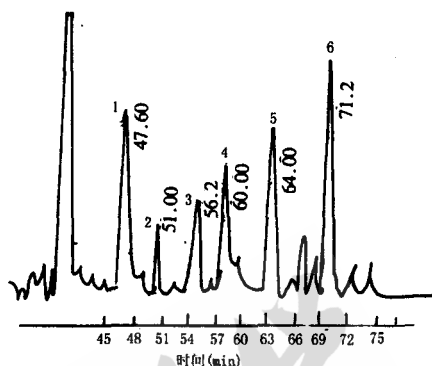


图 2 样品色谱图

2.3.3 样品测定结果:柴胡皂甙 A、番泻甙 A、苦参碱、大黄素甲醚、大黄酸、大黄素 6 种成分的含量分别为 0.41%,0.77%,0.12%,0.33%,0.25% 和 0.31%。

2.3.4 加样回收实验:取同一样品提取液 7 份,一份不加对照品,其余 6 份(等量)加入各对照品适量,按样品实验条件,梯度程度进行 HPLC 定量分析,结果见附表。

附表 样品加样回收实验($n = 6$)

成分	加入量 (μ g)	回收量 (μ g)	加样回收率 (%)	RSD (%)
柴胡皂甙 A	0.2121	0.1911	90.1 $\pm$ 2.2	2.4
番泻甙 A	0.3130	0.2942	93.99 $\pm$ 3.8	4.0
苦参碱	0.15	0.151	100.6 $\pm$ 2.7	2.9
大黄素甲醚	0.214	0.205	95.8 $\pm$ 1.4	1.5
大黄酸	0.115	0.105	91.3 $\pm$ 2.1	2.3
大黄素	0.054	0.0511	94.6 $\pm$ 3.3	3.5

从加样回收实验可知本实验方法可行。

3 讨论

3.1 用分光光度计在 200~700nm 波长范围内扫描大黄素、大黄酸、大黄素甲醚、番泻甙 A 在 280 和 350nm 处有吸收,且在 280nm 处吸收较强。苦参碱、柴胡皂甙 A 在 280nm 处有强吸收,因此选择 280nm 波长为测定波长。

3.2 6 种对照品中既有水溶性又有脂溶性化合物,本文选择了反相 ODS 柱,采用甲醇和水,并加入甲酸的混合流动相,增强了溶剂对分离的选择性,采用梯度洗脱使分离更完全,每个成分的保留时间处无杂质峰的干扰。

收稿日期:1997-07-11