

RP-HPLC 法测定清热解毒浸膏白头翁皂苷 B₄ 的含量

鹿燕敏, 王 蓓, 薛小平, 唐 林, 李东华, 刘洪斌*
(天津市南开医院中西医结合急腹症研究所, 天津 300100)

[摘要] 目的: 建立清热解毒浸膏中白头翁皂苷 B₄ 的含量测定方法。方法: 采用 RP-HPLC 法, 色谱柱: Kromasil C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 以乙腈-0.1% 磷酸(28: 72) 为流动相, 流速: 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长: 205 nm, 柱温: 30 °C。结果: 白头翁皂苷 B₄ 在 0.294~ 1.47 μg 范围内呈良好线性关系, 相关系数为 0.999 9, 平均回收率为 99.6%, RSD 为 1.37%。结论: 该方法简便、准确、重复性好, 可作为清热解毒浸膏质量控制指标之一。

[关键词] 反相高效液相色谱法; 清热解毒浸膏; 白头翁皂苷 B₄

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2009)10-0008-03

Determination of Pulchinenoside B₄ in Qingre Jiedu Extract by RP-HPLC

LU Yan-min, WANG Qian, XUE Xiao-ping, TANG Lin, LI Dong-hua, LIU Hong-bin*
(Institute of Acute Abdominal Diseases, Nankai Hospital, Tianjin 300100, China)

[Abstract] **Objective:** To develop an HPLC method for determination of pulchinenoside B₄ in Qingre Jiedu extract. The analysis was carried out on a Kromasil C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) column eluted with a mobile phase of

[收稿日期] 2009-01-07

[基金项目] 天津市科技攻关计划重大科技项目(05YFGDSF02600)

[通讯作者] * 刘洪斌, Tel: (022) 27435368; E-mail: jtss@sina.com

acetonitrile watercontaining 0.1% phosphoric acid (V: V = 28: 72). The flow rate was $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ and column temperature was $30 \text{ }^\circ\text{C}$. The detection wavelength was set at 205 nm. **Results:** The calibration curve was linear within the range of $0.294 \sim 1.47 \text{ } \mu\text{g}$ for pulchinoside B_4 . The average recovery was 99.6% and the RSD was 1.37%.

Conclusion: This method is convenient, accurate and repeatable for determination of pulchinoside B_4 in Qingre Jiedu extract.

[**Key words**] RP-HPLC; Qingre Jiedu extract; pulchinoside B_4

清热解毒方由《金匱要略》泻心汤加减化裁而来, 主要由大黄, 黄芩, 白头翁, 败酱草等中药组成, 具有通里攻下, 清热泻火, 凉血解毒之功效。长期临床观察显示其对化脓性阑尾炎, 阑尾脓肿及其他多种原因引起的腹腔感染等具有良好疗效^[1]。白头翁是该方的主要组成部分, 其在制剂中的有效成分为白头翁皂苷 B_4 , 本实验采用反相高效液相色谱法对清热解毒浸膏中白头翁皂苷 B_4 的含量进行测定, 作为该制剂有效成分的检测指标之一, 结果表明, 该方法简便可靠, 重复性好, 可以为质量控制提供参考依据。

1 仪器与试剂

Agilent1100 型高效液相色谱仪(包括在线脱气机、四元输液泵、自动进样器、柱温箱、二极管阵列检测器、ChemStation 工作站), KQ3200 型超声仪(昆山市超声仪器有限公司)。

白头翁皂苷 B_4 对照品(中国药品生物制品检定所, 批号: 111766-200601), 清热解毒浸膏由三九药业协助制作, 甲醇为色谱纯(天津市康科德科技有限公司), 水为自制重蒸水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱为 Kromasil C_{18} (250 mm × 4.6mm, 5 μm), 以乙腈-0.1% 磷酸(28: 72) 为流动相, 流速为 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 检测波长为 205 nm, 柱温为 $30 \text{ }^\circ\text{C}$, 进样量: 10 μL 。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品储备液的制备 精密称取白头翁皂苷 B_4 对照品 1.47 mg, 加甲醇制成每 1 mL 含白头翁皂苷 B_4 147 μg 的溶液, 作为对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液制备 取清热解毒浸膏约 0.3 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 20 mL, 称定重量, 超声处理 30 min, 放冷, 过滤, 滤液置 100 mL 量瓶中, 用少量流动相洗涤容器及残渣, 洗液并入同一量瓶中, 加流动相稀释至刻度, 摇匀, 0.2 μm 滤膜滤过后进样检测。

2.2.3 阴性对照溶液的制备 按清热解毒浸膏处方比例称取除白头翁以外的其他味药, 按制备工艺制成不含白头翁的阴性样品, 按“2.2.2”项下操作, 制成不含白头翁的阴性对照溶液。

在上述色谱条件下, 精密吸取对照品、供试品和阴性对照溶液各 10 μL 进样测定, 结果表明清热解毒浸膏中其他成分对白头翁皂苷 B_4 测定无干扰。色谱图见图 1。

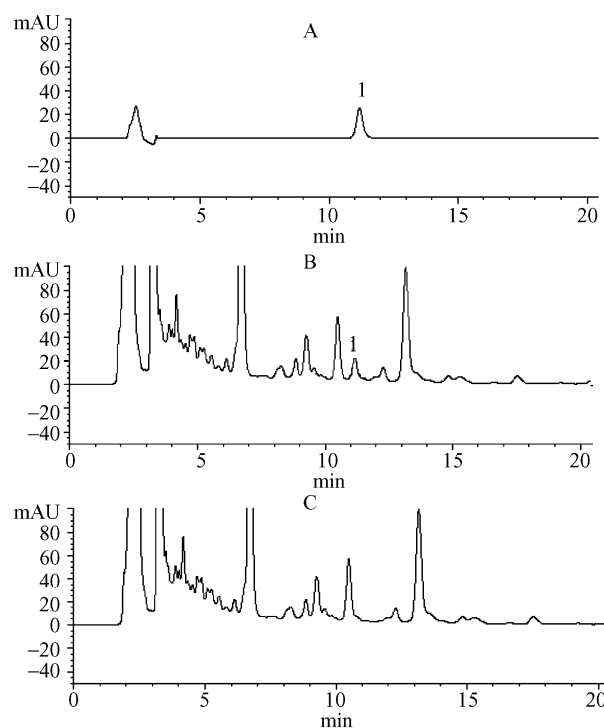


图 1 清热解毒浸膏 HPLC 图

A. 白头翁皂苷 B_4 对照组; B. 清热解毒浸膏样品; C. 阴性样品;
1. 白头翁皂苷 B_4

2.3 系统适用性试验 取供试品溶液, 在上述色谱条件下进样分析, 白头翁皂苷 B_4 与相邻色谱峰的分度度大于 1.5, 理论塔板数不低于 3 000。

取对照品储备液, 按照不同比例稀释, 使白头翁皂苷 B_4 质量浓度分别为 29.4, 58.8, 88.2, 117.6, 147 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。分别取上述溶液各 10 μL 进样测定, 记录色谱图。以对照品质量浓度 X 为横坐标, 峰面积 Y 为纵坐标, 绘制标准曲线并进行回归计算, 回归方程

为: $Y = 2.8844X - 2.04$ ($r = 0.9999$, $n = 5$)。结果表明: 白头翁皂苷 B_4 在 $0.294 \sim 1.47 \mu\text{g}$ 范围内呈良好线性关系。

2.4 精密度试验 取同一对照品溶液, 按上述色谱条件, 重复进样 5 次, 计算白头翁皂苷 B_4 色谱峰面积的 RSD 为 0.32% ($n = 5$)。

2.5 重复性试验 取同一批号的样品, 按“2.2.2”项下方法平行制备 5 份样品, 按“2.1”项下进样分析, 计算白头翁皂苷 B_4 含量, RSD 为 1.44% ($n = 5$)。

2.6 稳定性试验 取同一供试品溶液, 分别于 0, 2, 4, 6, 8, 12, 24 h 注入液相色谱仪, 依法测定。计算白头翁皂苷 B_4 色谱峰面积的 RSD 为 1.4% ($n = 7$)。结果表明, 样品溶液在 24 h 内稳定。

2.7 回收率试验 精密称取已知含量的清热解毒浸膏 6 份, 分别精密加入高、中、低质量浓度的对照品(相当于浸膏中白头翁皂苷 B_4 含量的 80%, 100%, 120%, 每一质量浓度 2 份), 按上述方法测定分析, 白头翁皂苷 B_4 平均回收率为 99.6% ($n = 6$), 结果见表 1。

表 1 白头翁皂苷 B_4 回收率试验结果 ($n = 6$)

编号	样品量(g)	样品中量(mg)	加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	平均回收率(%)	RSD(%)
1	0.15	2.85	2.28	5.08	99.1		
2	0.17	3.23	2.58	5.75	98.9		
3	0.15	2.85	2.85	5.66	99.3		
4	0.14	2.66	2.66	5.24	98.5	99.6	1.37
5	0.16	3.04	3.65	6.84	102.3		
6	0.15	2.85	3.42	6.23	99.4		

2.8 含量测定 取 3 批供试品, 按“2.2.2”项下操作, 在上述条件下进样分析, 记录色谱峰面积, 采用外标一点法计算白头翁皂苷 B_4 在清热解毒浸膏中的质量分数为 1.9% ($n = 3$), 结果见表 2。

表 2 清热解毒浸膏样品中白头翁皂苷含量测定结果 ($n = 3$)

编号	样品量(g)	样品中白头翁皂苷 B_4 (mg)	样品中白头翁皂苷 B_4 含量(%)	平均含量(%)
1	0.32	6.43	2.0	
2	0.31	6.52	2.1	1.9
3	0.31	5.28	1.7	

3 讨论

我们进行了样品的全波长扫描, 发现在 $200 \sim 205 \text{ nm}$ 波长范围内, 样品均呈现较强吸收, 以甲醇和水为流动相基线极不平稳, 参考相关文献^[2-3], HPLC 法测定白头翁含量所用的流动相是比例不同的甲醇-0.1% 磷酸系统和乙腈-0.1% 磷酸等系统。本文经过多次实验摸索, 发现由乙腈-0.1% 磷酸系统在 205 nm 波长下基线平稳, 分别选用不同比例的该流动相系统: 乙腈-0.1% 磷酸(30: 70); 乙腈-0.1% 磷酸(29: 71); 乙腈-0.1% 磷酸(25: 75), 发现乙腈-0.1% 磷酸比例为 28: 72 能够使白头翁皂苷 B_4 得到较好分离, 且重复性好。

样品提取条件的选择: 我们分别采用回流和超声两种方法进行提取, 超声提取效果明显好于回流提取法: 分别采用甲醇、70% 乙醇、95% 乙醇作溶剂进行提取, 结果显示甲醇提取效果更好。

本实验为清热解毒浸膏中白头翁有效成分的检测提供了可靠的方法, 为该制剂的质量控制提供了参考依据。

[参考文献]

- [1] 吴咸中. 中西医结合急腹症方药诠释[M]. 天津: 天津科学技术出版社, 2001: 416.
- [2] 冯果, 刘文, 刘梦莹, 等. HPLC 测定白头翁药材中白头翁皂苷 B_4 的含量[J]. 中国民族民间医药, 2007, 6(89): 331-333.
- [3] 时维静, 周其应, 王海侠, 等. 产地加工对白头翁皂苷 B_4 含量的影响[J]. 中药材, 2008, 8(31): 24-25.