

HPLC 法同时测定消结安胶囊中 4 种成分

包刚¹, 左雅敏², 黄建军¹, 周恬¹, 潘卫², 伍庆³, 李兴^{2*}

(1. 贵州医科大学附属医院乳腺外科, 贵州 贵阳 550004; 2. 贵州医科大学医学检验学院, 贵州 贵阳 550004; 3. 贵州师范大学分析测试中心, 贵州 贵阳 550001)

摘要: 目的 建立 HPLC 法同时测定消结安胶囊(连翘、益母草、鸡血藤等)中 4 种成分的含有量。方法 该药物三氯甲烷提取液的分析采用 Diamond C₁₈ 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相乙腈(A) -0.05 mol/L 磷酸二氢钠(B), 梯度洗脱; 体积流量 1.0 mL/min; 检测波长 278 nm; 柱温 30 °C。结果 盐酸小檗碱、盐酸巴马汀、连翘苷、芦丁分别在 0.033 7 ~ 0.337 2 μg ($r = 0.999 1$)、0.054 8 ~ 0.548 3 μg ($r = 0.999 0$)、0.025 9 ~ 0.258 8 μg ($r = 0.999 2$)、0.008 4 ~ 0.084 2 μg ($r = 0.999 6$) 范围内呈良好的线性关系, 平均加样回收率分别为 98.8% (RSD = 1.3%)、99.8% (RSD = 0.7%)、98.8% (RSD = 1.3%)、96.8% (RSD = 1.0%)。结论 该方法灵敏准确, 可用于消结安胶囊的质量控制。

关键词: 消结安胶囊; 盐酸小檗碱; 盐酸巴马汀; 连翘苷; 芦丁; HPLC

中图分类号: R927.2

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2017)03-0536-04

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2017.03.019

Simultaneous determination of four constituents in Xiaojie'an Capsules by HPLC

BAO Gang¹, ZUO Ya-min², HUANG Jian-jun¹, ZHOU Tian¹, PAN Wei², WU Qing³, LI Xing^{2*}

(1. Department of Breast Surgery, Hospital Affiliated to Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China; 2. Department of Clinical Laboratory Sciences, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China; 3. Analysis and Testing Center, Guizhou Normal University, Guiyang 550001, China)

ABSTRACT: **AIM** To establish an HPLC method for the simultaneous content determination of four constituents in Xiaojie'an Capsules (*Forsythiae Fructus*, *Leonuri Herba*, *Spatholobi Caulis*, etc.). **METHODS** The analysis of chloroform extract of this drug was carried out on a 30 °C thermostatic Diamond C₁₈ column(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), with the mobile phase comprising of acetonitrile (A) -0.05 mol/L monosodium phosphate (B) flowing at 1.0 mL/min in a gradient elution manner, and the detection wavelength was set at 278 nm. **RESULTS** Berberine hydrochloride, palmatine chloride, phillyrin and rutin showed good linear relationships within the ranges of 0.033 7 - 0.337 2 μg ($r = 0.999 1$), 0.054 8 - 0.548 3 μg ($r = 0.999 0$), 0.025 9 - 0.258 8 μg ($r = 0.999 2$) and 0.008 4 - 0.084 2 μg ($r = 0.999 6$), whose average recoveries were 98.8% (RSD = 1.3%), 99.8% (RSD = 0.7%), 98.8% (RSD = 1.3%) and 96.8% (RSD = 1.0%), respectively. **CONCLUSION**

This sensitive and accurate method can be used for the quality control of Xiaojie'an Capsules.

KEY WORDS: Xiaojie'an Capsules; berberine hydrochloride; palmatine chloride; phillyrin; rutin; HPLC

消结安颗粒是由功劳木、连翘、益母草、鸡血藤、三叉苦、土茯苓 6 味中药材制备而成的傣

药, 具有活血化瘀, 软坚散结之成效, 用于气滞血瘀所致乳癖、乳腺小叶增生、卵巢囊肿、子宫

收稿日期: 2016-08-26

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81560138); 贵州省科技计划课题任务书(黔科合计省合[2014]7005); 贵州省科技重大专项计划([2013]6006); 贵阳市科技计划项目(筑科合同[20161001]); 贵州省科技厅联合基金项目(黔科合 LH 字[2014]7132)

作者简介: 包刚(1970—), 男, 副主任医师, 从事乳腺疾病和乳腺肿瘤的研究。Tel: 18984846632

* **通信作者:** 李兴(1967—), 男, 教授, 研究方向为临床生物化学与分子生物学。Tel: 13765146895

肌瘤等症^[1-4]。方中功劳木为君药，盐酸小檗碱、盐酸巴马汀为其主要有效成分，可扩张血管、改善血流，起到消散作用^[5-6]；连翘中的连翘苷可抗氧化和活血^[7]，而芦丁具有抗血小板聚集的功效^[8-9]，故以上4种成分均与本方主治功效相符。目前，相关质量标准仅对其中的盐酸小檗碱进行定量分析^[1]，实验操作复杂，所测成分单一。为了体现中药复方药理作用具有多靶点、多层次的特点，参考文献[10-13]，本实验建立了HPLC法同时测定其中盐酸小檗碱、盐酸巴马汀、连翘苷、芦丁的含有量，其具有良好的灵敏度、准确度、精密度，可为更好控制该制剂的质量提供了实验基础。

1 材料

1.1 仪器 Agilent 1100系列高效液相色谱仪，配置在线脱气机、四元泵、自动进样器、DAD检测器、Agilent 色谱工作站（安捷伦科技有限公司）；AL-204电子天平（瑞士梅特勒-托利多公司）；CH-250超声波清洗机（北京创新德超声电子研究所）；移液枪（10~100、100~1 000 μL ）。

1.2 试药 盐酸小檗碱（批号110713-201212）、盐酸巴马汀（批号110732-201510）、连翘苷（批号110821-201514）、芦丁（批号100080-201408）对照品均购自中国食品药品检定研究院。消结安胶囊（0.38 g/粒，云南良方制药有限公司，批号15092701、15092702、15092703）。磷酸二氢钠（天津市巴斯夫化工有限公司，含有量 $\geq 99.0\%$ ）；甲醇、乙腈为色谱纯（天津科密欧化学试剂有限公司）；磷酸（成都市科龙化工试剂厂，含有量 $\geq 85.0\%$ ）；三氯甲烷（国药集团化学试剂有限公司，含有量 $\geq 99.0\%$ ）；其他试剂均为分析纯；水为超纯水（自制）。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Diamond C_{18} 色谱柱（250 mm \times 4.6 mm，5 μm ）；流动相乙腈（A）-0.05 mol/L 磷酸二氢钠（磷酸调 pH 至 3，B），梯度洗脱（0 min，10% A；10 min，20% A；50 min，30% A）；体积流量 1 mL/min；检测波长 278 nm；柱温 30 $^{\circ}\text{C}$ ；进样量 10 μL 。

2.2 对照品溶液制备 精密称取盐酸小檗碱、盐酸巴马汀、连翘苷、芦丁对照品适量，甲醇制成质量浓度分别为 0.200 4、0.164 2、0.068 1、0.432 0 mg/mL 对照品贮备液。精密移取适量，甲醇稀释成质量浓度分别为 0.016 9、0.027 4、

0.012 9、0.004 2 mg/mL 混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液制备 取本品适量，研细，精密称取 0.206 3 g，置于锥形瓶中，精密加入三氯甲烷 50 mL，密塞，称定质量，索氏回流提取 8 h，放冷，三氯甲烷补足减失的质量，摇匀，滤过，续滤液挥干，甲醇定容至 2 mL，0.45 μm 微孔滤膜过滤，即得。

2.4 阴性对照溶液 按照组方比例及生产工艺，分别制成缺功劳木、缺连翘、缺功劳木和连翘的阴性样品，按“2.3”项下方法制备阴性对照溶液。

2.5 系统适用性试验 精密吸取供试品、对照品、阴性对照溶液各 10 μL ，在“2.1”项色谱条件下分析，记录色谱图，结果见图 1。由图可知，阴性对照溶液在盐酸小檗碱、盐酸巴马汀、连翘苷及芦丁相应位置均无色谱峰出现，即对其测定均无干扰，并且理论塔板数均不低于 5 000，各峰分离度均不低于 1.5。

2.6 线性关系考察 吸取“2.2”项下对照品溶液 2、5、10、15、20 μL ，注入液相色谱仪。以峰面积积分为纵坐标（Y），进样量为横坐标（X）进行线性回归，结果见表 1，可知各成分在各自范围内线性关系良好。

表 1 4 种成分的线性关系

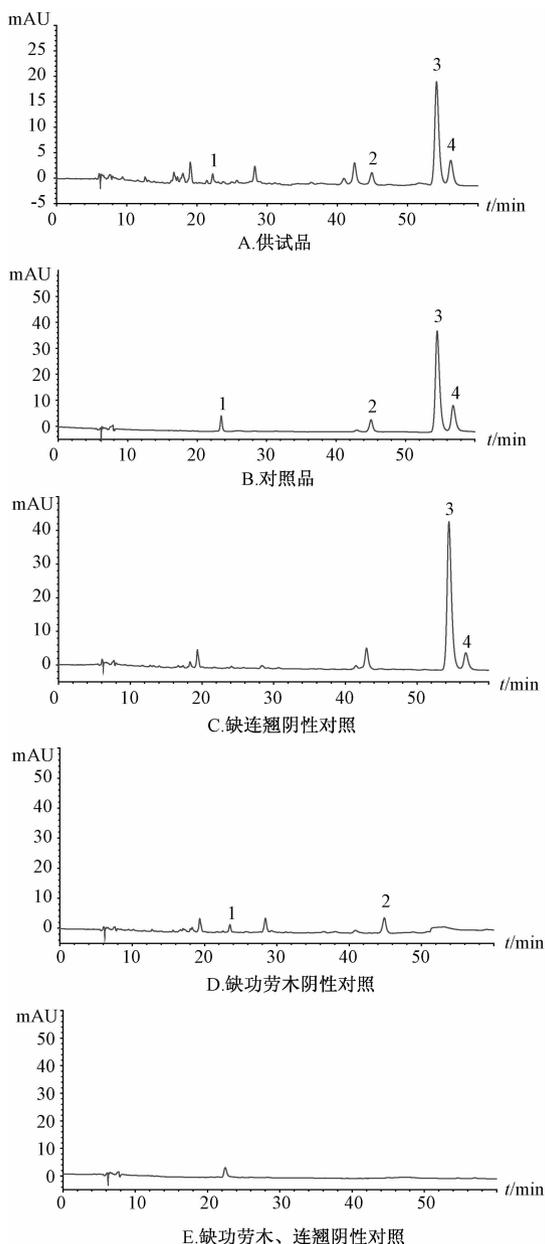
Tab. 1 Linear relationships of four constituents

成分	回归方程	r	线性范围/ μg
盐酸小檗碱	$Y = 1\ 183X - 9.656\ 4$	0.999 1	0.033 7 ~ 0.337 2
盐酸巴马汀	$Y = 2\ 889.6X + 25.008$	0.999 0	0.054 8 ~ 0.548 3
连翘苷	$Y = 532.48X + 0.709\ 3$	0.999 2	0.025 9 ~ 0.258 8
芦丁	$Y = 1\ 412.9X + 0.361\ 6$	0.999 6	0.008 4 ~ 0.084 2

2.7 精密度试验 精密吸取“2.2”项下对照品溶液 10 μL ，在“2.1”项色谱条件下连续进样 6 次，测得盐酸小檗碱、盐酸巴马汀、连翘苷、芦丁峰面积 RSD 分别为 1.8%、1.6%、2.0%、1.3%，表明仪器精密度良好。

2.8 稳定性试验 精密吸取“2.3”项下同一供试品溶液（批号 15092701）各 10 μL ，在“2.1”项色谱条件下于 0、4、8、12、16、24 h 进样测定，测得盐酸小檗碱、盐酸巴马汀、连翘苷、芦丁峰面积 RSD 分别 1.2%、1.9%、1.0%、1.5%，表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.9 重复性试验 取同一份样品（批号 15092701），按“2.3”项下方法平行制备 6 份供试品溶液，在“2.1”项色谱条件下测定，测得盐酸小檗碱、盐酸巴马汀、连翘苷、芦丁含有量



1. 芦丁 2. 连翘苷 3. 盐酸巴马汀 4. 盐酸小檗碱

1. rutin 2. phillyrin 3. palmatine chloride 4. berberine hydrochloride

图1 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms

RSD 分别为 1.1%、0.9%、1.2%、0.8%，表明该方法重复性良好。

2.10 加样回收率试验 精密称取含有量已知的样品(批号 15092701)6 份, 每份 0.10 g, 置于 50 mL 锥形瓶中, 精密加入“2.2”项下 0.200 4 mg/mL 盐酸小檗碱贮备液 69、84、100 μ L 各 2 份, 0.164 2 mg/mL 盐酸巴马汀贮备液 131、164、196 μ L 各 2 份, 0.068 1 mg/mL 连翘苷贮备液 140、

175、210 μ L 各 2 份, 0.432 0 mg/mL 芦丁贮备液 8、10、12 μ L 各 2 份, 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 在“2.1”项色谱条件下测定。结果见表 2。

表 2 加样回收率试验结果 (n=6)

Tab. 2 Results of recovery tests (n=6)

成分	称样量/ g	原有量/ mg	加入量/ mg	测得量/ mg	回收率/ %	平均回收 率/% (RSD/%)
盐酸小檗碱	0.101 1	0.016 6	0.013 8	0.030 2	98.3	98.8 (1.3)
	0.103 3	0.016 8	0.013 8	0.030 5	99.3	
	0.102 1	0.016 7	0.016 8	0.033 2	98.1	
	0.103 5	0.016 8	0.016 8	0.033 1	97.0	
	0.102 4	0.016 7	0.020 0	0.036 9	100.7	
盐酸巴马汀	0.104 6	0.016 9	0.020 0	0.036 8	99.5	99.8 (0.7)
	0.101 1	0.026 6	0.021 5	0.048 0	99.5	
	0.103 3	0.026 9	0.021 5	0.048 2	99.1	
	0.102 1	0.026 7	0.026 9	0.053 8	100.5	
	0.103 5	0.026 9	0.026 9	0.053 6	99.2	
连翘苷	0.102 4	0.026 8	0.032 2	0.059 2	100.8	98.8 (1.3)
	0.104 6	0.027 1	0.032 2	0.059 1	99.5	
	0.101 1	0.011 8	0.009 5	0.021 1	97.5	
	0.103 3	0.011 9	0.009 5	0.021 2	97.6	
	0.102 1	0.011 9	0.011 9	0.023 9	101.0	
芦丁	0.103 5	0.011 9	0.011 9	0.023 7	98.8	96.8 (1.0)
	0.102 4	0.011 9	0.014 3	0.026 1	99.5	
	0.104 6	0.012 0	0.014 3	0.026 1	98.6	
	0.101 1	0.004 3	0.003 5	0.007 6	96.9	
	0.103 3	0.004 5	0.003 5	0.007 9	98.1	
平均值	0.102 1	0.004 3	0.004 3	0.008 4	95.6	95.7
	0.103 5	0.004 5	0.004 3	0.008 7	97.7	
	0.102 4	0.004 5	0.005 2	0.009 5	96.9	
	0.104 6	0.004 6	0.005 2	0.009 6	95.7	

2.11 样品含有量测定 取 3 批样品, 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 每批平行制备 3 份, 在“2.1”项色谱条件下测定含有量, 结果见表 3。

表 3 含有量测定结果 (n=3)

Tab. 3 Results of content determination (n=3)

批号	盐酸小檗碱/ (mg·粒 ⁻¹)	盐酸巴马汀/ (mg·粒 ⁻¹)	连翘苷/ (mg·粒 ⁻¹)	芦丁/ (mg·粒 ⁻¹)
15092701	0.063 7	0.102 0	0.045 2	0.016 3
15092702	0.064 5	0.102 2	0.046 0	0.016 6
15092703	0.064 2	0.103 2	0.045 8	0.016 8
平均值	0.064 1	0.102 5	0.045 7	0.016 6

3 讨论

3.1 色谱条件选择 本实验比较了不同检测波长(254、278、280、320 nm)、流动相(甲醇-0.05 mol/L 磷酸二氢钠、乙腈-0.03% 磷酸、乙腈-0.05 mol/L 磷酸二氢钠)检测体系, 发现在 278 nm 波长处杂峰较少, 分离度和响应值均较理想; 乙腈-0.05 mol/L 磷酸二氢钠(磷酸调 pH 至 3) 梯度洗脱后, 所得各

色谱峰分离效果最佳,而且流动相配比简单。

3.2 提取方法选择 本实验比较了超声提取(纯甲醇、含0.03%磷酸的甲醇)、回流提取(1%盐酸水、甲醇、三氯甲烷),发现以三氯甲烷索氏回流提取8 h时,各成分提取效率最高。

3.3 提取溶剂选择 本实验发现,功劳木中的盐酸小檗碱可直接通过三氯甲烷被有效地提取出来,而其传统提取方法有酸水法、石灰乳法、醇提法^[14-15]。文献[16-18]也有相关报道,如李定芬等^[16]发现,以乙腈-0.1%磷酸(含十二烷基磺酸钠)为提取溶剂时,黄柏中盐酸小檗碱的含有量最高。

参考文献:

[1] 赵建波,吴玲,张华芸,等. 消结安颗粒的质量标准研究[J]. 中国医院药学杂志, 2008, 28(24): 2134-2136.

[2] 包刚,黄建军,周恬,等. 消结安对乳腺增生的临床疗效及激素水平和免疫功能的影响[J]. 中国临床药理学杂志, 2015, 31(20): 2005-2007.

[3] 刘晓哲,张东方. HPLC同时测定复方黄连素片中3种成分的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(1): 70-73.

[4] 陆昕,王永毅,徐康康. 儿童咳颗粒质量标准研究[J]. 安徽医药, 2011, 15(12): 1504-1506.

[5] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2015年版一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 79.

[6] 杨庆珍,郑司浩,黄林芳. 小檗碱提取方法和药理活性研究进展[J]. 中国新药杂志, 2015, 24(5): 519-525.

[7] 谭高好,杜莹,乙引,等. HPLC同时测定复方双花咀嚼片中5个成分[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(1): 40-43.

[8] 李玉山. 芦丁的资源、药理及主要剂型研究进展[J]. 氨基酸和生物资源, 2013, 35(3): 13-16.

[9] 田建坤,赵永和,时文中. 芦丁及其衍生物应用研究进展[J]. 天中学刊, 2007, 22(5): 18-21.

[10] 胡军林,谭静玲,费毅琴,等. 高效液相色谱法同时测定一清颗粒中3种原小檗碱型生物碱的含量[J]. 中国医院药学杂志, 2014, 34(1): 50-52.

[11] 唐洪梅,廖小红,何嘉仑,等. HPLC测定肠激安制剂中芍药苷、盐酸巴马汀和盐酸小檗碱[J]. 中成药, 2012, 34(5): 853-857.

[12] 裴香萍,张淑蓉,闫艳,等. 不同采集期青翘中连翘苷、连翘脂苷和芦丁的含量测定[J]. 中国药事, 2011, 25(5): 438-440.

[13] 牟英迪,林吉茂. HPLC程序波长法测定牛黄上清丸中黄芩苷、连翘苷和盐酸小檗碱[J]. 中成药, 2013, 35(9): 1933-1936.

[14] 程咏梅,陈仁华. 小檗碱提取工艺的研究[J]. 时珍国医国药, 2007, 18(6): 1445-1447.

[15] 李学哲,朴惠顺. 小檗碱的提取工艺及药理作用研究进展[J]. 延边大学医学学报, 2011, 34(4): 314-317.

[16] 李定芬,陈新华,戴剑锋. 不同方法对黄柏中盐酸小檗碱的提取比较[J]. 微量元素与健康研究, 2010, 27(1): 52-54.

[17] 刘婷,梁宗锁,丁美海,等. 黄连叶片中盐酸小檗碱提取工艺研究[J]. 西北林学院学报, 2010, 25(6): 144-147.

[18] 王玥,杜守颖,戴俊东,等. 黄柏中盐酸小檗碱的闪式提取工艺研究[J]. 中国药业, 2013, 22(6): 72-73.