

## [质 量]

# HPLC 法同时测定清热治痢丸中 6 种成分

赵 曦<sup>1</sup>, 杨东生<sup>1</sup>, 张 瑶<sup>1</sup>, 李忠保<sup>2</sup>, 周晓东<sup>3</sup>

(1. 吉林大学珠海学院, 广东 珠海 519041; 2. 珠海市药检所, 广东 珠海 519000; 3. 珠海市食品药品监督管理局, 广东 珠海 519000)

**摘要:** 目的 建立 HPLC 法同时测定清热治痢丸(三颗针和马齿苋)中盐酸小檗碱、盐酸药根碱、盐酸巴马汀、山柰酚、木犀草素、芹菜素的含有量。方法 该药物甲醇提取液的分析采用 Agilent TC-C<sub>18</sub> 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 以乙腈-0.02% 磷酸二氢钾为流动相, 梯度洗脱; 体积流量 0.9 mL/min; 检测波长 265 nm 和 360 nm; 柱温 35 °C。结果 6 种成分分别在各自范围内线性关系良好 ( $r \geq 0.9993$ ), 平均加样回收率 97.16% ~ 99.90%, RSD 0.62% ~ 1.48%。结论 该方法简便快速, 可用于清热治痢丸的质量控制。

**关键词:** 清热治痢丸; 盐酸小檗碱; 盐酸药根碱; 盐酸巴马汀; 山柰酚; 木犀草素; 芹菜素; HPLC

中图分类号: R927.2

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2017)05-0956-04

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2017.05.014

## Simultaneous determination of six constituents in Qingre Zhili Pills by HPLC

ZHAO Xi<sup>1</sup>, YANG Dong-sheng<sup>1</sup>, ZHANG Yao<sup>1</sup>, LI Zhong-bao<sup>2</sup>, ZHOU Xiao-dong<sup>3</sup>

(1. Zhuhai College of Jilin University, Zhuhai 519041, China; 2. Zhuhai Municipal Institute for Drug Control, Zhuhai 519000, China; 3. Zhuhai Municipal Food and Drug Administration, Zhuhai 519000, China)

**ABSTRACT: AIM** To develop an HPLC method for the simultaneous content determination of berberine hydrochloride, jatrorrhizine hydrochloride, palmatine hydrochloride, kaempferol, luteolin and apigenin in Qingre Zhili Pills (*Berberidis Radix* and *Portulacae Herba*). **METHODS** The analysis of methanol extract of this drug was performed on a 35 °C thermostatic Agilent TC-C<sub>18</sub> column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), with the mobile phase comprising of acetonitrile-0.02% potassium dihydrogen phosphate flowing at 0.9 mL/min in a gradient elution manner, and the detection wavelengths were set at 265 nm and 360 nm. **RESULTS** Six constituents showed good linear relationships within their own ranges ( $r \geq 0.9993$ ), whose average recoveries were 97.16% – 99.90% with the RSDs of 0.62% – 1.48%. **CONCLUSION** This simple method can be used for the rapid quality control of Qingre Zhili Pills.

**KEY WORDS:** Qingre Zhili Pills; berberine hydrochloride; jatrorrhizine hydrochloride; palmatine hydrochloride; kaempferol; luteolin; apigenin; HPLC

清热治痢丸收载于《卫生部颁药品标准》中, 药成方制剂第4册<sup>[1]</sup>, 为浓缩水丸, 由三颗针和马齿苋加工而成, 临幊上主要用于治疗湿热痢(菌痢)、热泻等病症。三颗针根茎中含多种异喹啉类生物碱, 具有清热燥湿、泻火解毒、抗菌消炎等作用<sup>[2]</sup>, 其中主要成分为盐酸小檗碱、盐酸药根碱和盐酸巴马汀, 用于治疗细菌性痢疾、肺结核等疾

病<sup>[3-4]</sup>, 临幊上主要用于湿热泻痢、黄疸、湿疹、咽痛目赤、聴耳流脓、痈肿疮毒等症<sup>[5]</sup>; 马齿苋具有清热解毒、凉血止血、止痢的功效, 其主要成分为山柰酚、木犀草素和芹菜素, 用于菌痢肠炎、泄泻、疔疮疖肿、热淋等疾病的治疗<sup>[6]</sup>。

目前, 该标准仅对清热治痢丸进行了性状、鉴别及丸剂通则项检查, 尚无定量测定的研究报道,

收稿日期: 2016-10-31

基金项目: 2014 年广东省中医药局项目 (20141206); 吉林大学珠海学院“百人工程”培养项目 (2014)

作者简介: 赵 曦 (1984—), 女, 硕士生, 讲师, 从事中药检验分析和质量标准提高工作。Tel: 13926968240, E-mail: zhaoxizhuai@163.com

难以有效确保其质量和疗效。因此,本实验采用HPLC法对清热治痢丸中三颗针的成分盐酸小檗碱、盐酸药根碱、盐酸巴马汀,以及马齿苋的成分山柰酚、木犀草素和芹菜素进行定量测定,该方法简便快捷,可为完善其质量标准提供有力支持。

## 1 仪器

AUD220D电子天平(0.01 mg,日本岛津公司);KQ-500DE超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);Agilent 1100系列高效液相色谱仪(配置在线真空脱气装置、四元梯度泵、100位自动进样器、柱恒温箱、VWD可变波长检测器,美国安捷伦公司)。

## 2 试药

盐酸小檗碱(110713-201212)、盐酸巴马汀(110732-201611)、木犀草素(111520-200504)、芹菜素(111901-201102)对照品均购自中国食品药品检定研究院;盐酸药根碱(6681-15-8)、山柰酚(520-18-3)对照品均购自上海纯优生物科技有限公司。清热治痢丸(浓缩水丸,每100粒重12 g)购自北京同仁堂科技发展股份有限公司制药厂。乙腈为色谱纯;其他试剂均为分析纯;水为重蒸馏水。

## 3 方法与结果

**3.1 色谱条件** Agilent TC-C<sub>18</sub>色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm);流动相A为乙腈,B为0.02%磷酸二氢钾,梯度洗脱<sup>[7-10]</sup>(0~12 min, 20% A; 12~26 min, 20%→27% A; 26~44 min, 27%→50% A; 44~50 min, 50%→20% A);0~26 min时在265 nm<sup>[7]</sup>波长下检测盐酸小檗碱、盐酸药根碱和盐酸巴马汀,26~50 min时在360 nm<sup>[11-12]</sup>波长下检测山柰酚、木犀草素和芹菜素;体积流量0.9 mL/min;柱温35 °C;进样量10 μL。

**3.2 对照品溶液制备** 精密称取各对照品适量,置于6个20 mL量瓶中,甲醇溶解定容,振摇均匀,作为对照品贮备液(盐酸小檗碱0.690 mg/mL、盐酸药根碱0.464 mg/mL、盐酸巴马汀0.516 mg/mL、山柰酚2.970 mg/mL、木犀草素1.598 mg/mL、芹菜素0.612 mg/mL)。量取1.0、2.5、5.0、6.0、5.0、5.0 mL,置于同一100 mL量瓶中,甲醇稀释定容,振摇均匀,即得(盐酸小檗碱0.0069 mg/mL、盐酸药根碱0.0116 mg/mL、盐酸巴马汀0.0258 mg/mL、山柰酚0.1782 mg/mL、木犀草素0.0799 mg/mL、芹菜素0.0306 mg/mL)。

**3.3 供试品溶液制备** 取清热治痢丸适量,研细,

精密称取约2.0 g,置于具塞锥形瓶中,精密加入50 mL甲醇,称定质量,超声(500 W、40 kHz)提取60 min,放冷,甲醇补足减失的质量,摇匀,过滤,取续滤液,即得。

**3.4 阴性样品溶液制备** 按清热治痢丸处方工艺,制备不含三颗针、马齿苋的阴性样品,按“3.3”项下方法制备,即得。

**3.5 系统适用性试验** 精密吸取“3.2”~“3.4”项下溶液适量,在“3.1”项色谱条件下检测,结果见图1。由图可知,各成分分离度均大于1.5,理论塔板数均大于3 500,阴性无干扰,表明该方法专属性良好。

**3.6 线性关系考察** 精密吸取“3.2”项下对照品贮备液0.1、0.2、0.5、1.0、1.5、2.0 mL,甲醇稀释并定容至6个20 mL量瓶中,振摇均匀,得到6个质量浓度的对照品溶液。以质量浓度为横坐标(X),峰面积为纵坐标(Y)进行回归,结果见表1,可知各成分在各自范围内线性关系良好。

表1 6种成分线性关系

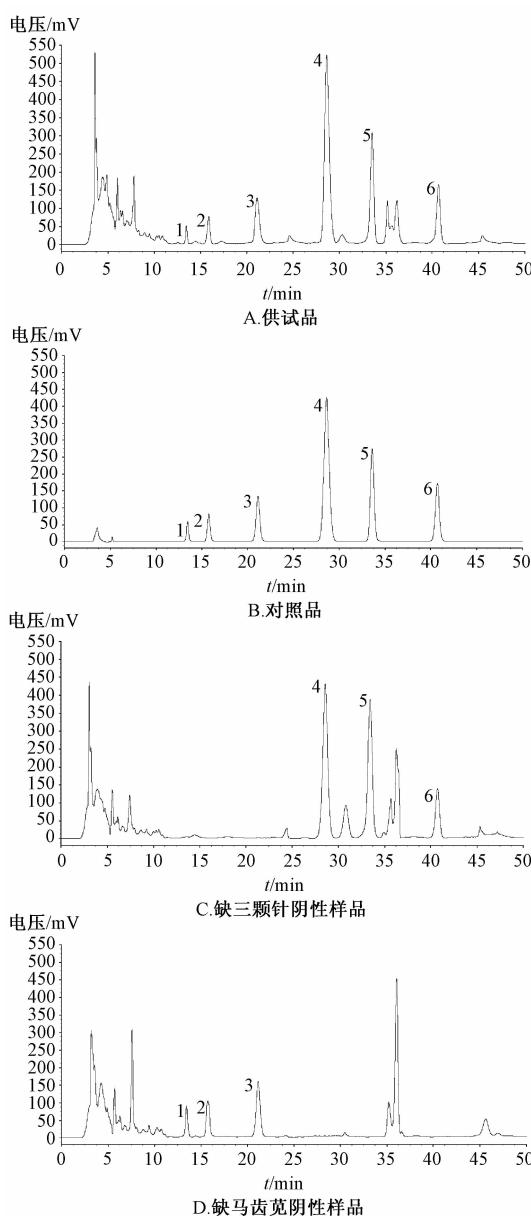
Tab. 1 Linear relationships of six constituents

成分	回归方程	线性范围/ (μg·mL <sup>-1</sup> )	r
盐酸小檗碱	$Y = 7.5014 \times 10^5 X - 227.1$	3.450~69.00	0.999 9
盐酸药根碱	$Y = 8.3581 \times 10^5 X + 481.2$	2.320~46.40	0.999 5
盐酸巴马汀	$Y = 9.0057 \times 10^5 X - 353.8$	2.580~51.60	0.999 7
山柰酚	$Y = 1.3316 \times 10^6 X + 408.0$	14.85~297.0	0.999 3
木犀草素	$Y = 1.1079 \times 10^6 X + 196.4$	7.990~159.8	0.999 6
芹菜素	$Y = 8.7213 \times 10^5 X - 266.9$	3.060~61.20	0.999 4

**3.7 精密度试验** 取对照品溶液适量,在“3.1”项色谱条件下测定,进样6次,测得盐酸小檗碱、盐酸药根碱、盐酸巴马汀、山柰酚、木犀草素、芹菜素峰面积RSD(n=6)分别为1.29%、1.15%、1.08%、0.91%、1.01%、0.98%,表明仪器精密度良好。

**3.8 重复性试验** 取样品(批号15080847)6份,按“3.3”项下方法制备供试品溶液,在“3.1”项色谱条件下测定,测得盐酸小檗碱、盐酸药根碱、盐酸巴马汀、山柰酚、木犀草素、芹菜素含有量RSD分别为1.02%、0.66%、1.19%、1.36%、0.42%、1.54%,表明该方法重复性良好。

**3.9 稳定性试验** 取样品(批号15080847)1份,在室温下放置0、2、4、6、8、10 h后在“3.1”项色谱条件下测定,测得盐酸小檗碱、盐酸药根碱、盐酸巴马汀、山柰酚、木犀草素、芹菜



1. 盐酸小檗碱 2. 盐酸药根碱 3. 盐酸巴马汀 4. 山柰酚  
5. 木犀草素 6. 芹菜素  
1. berberine hydrochloride 2. jatrorrhizine hydrochloride 3. palmatine hydrochloride 4. kaempferol 5. luteolin 6. apigenin

图1 6种成分HPLC色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of six constituents

素峰面积 RSD 分别为 1.31%、0.24%、1.19%、0.93%、1.02%、1.17%，表明供试品溶液在室温下 10 h 内稳定性良好。

**3.10 加样回收率试验** 精密称取样品(批号 15080847)6份，每份约1.0 g，置于具塞锥形瓶中，精密加入“3.2”项下混合对照品溶液25 mL、甲醇25 mL，称定质量，超声(500 W、40 kHz)提取60 min，放冷，甲醇补足减失的质量，摇匀，

过滤，在“3.1”项色谱条件下测定，计算加样回收率，结果见表2。

表2 6种成分加样回收率试验结果( $n=6$ )Tab. 2 Results of recovery tests for six constituents( $n=6$ )

成分	取样量/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	1.002 0	0.171 3	0.172 5	0.340 9	98.32	98.41
盐酸巴马汀	1.000 1	0.171 0	0.172 5	0.342 2	99.25	(1.03)
盐酸药根碱	0.998 2	0.170 7	0.172 5	0.341 5	99.01	
山柰酚	0.999 5	0.170 9	0.172 5	0.339 1	97.51	
木犀草素	1.001 3	0.171 2	0.172 5	0.342 7	99.42	
芹菜素	0.997 9	0.170 6	0.172 5	0.337 8	96.93	
4.1 流动相选择	1.002 0	0.264 5	0.290 0	0.553 8	99.76	99.15
4.2 梯度洗脱	1.000 1	0.264 0	0.290 0	0.554 6	100.21	(1.48)
4.3 流速	0.998 2	0.263 5	0.290 0	0.556 3	100.97	
4.4 柱温	0.999 5	0.263 9	0.290 0	0.551 0	99.00	
4.5 波长	1.001 3	0.264 3	0.290 0	0.545 6	97.00	
4.6 流动相组成	0.997 9	0.263 4	0.290 0	0.547 5	97.97	
4.7 流动相配比	1.002 0	0.676 4	0.645 0	1.300 2	96.71	97.68
4.8 流速	1.000 1	0.675 1	0.645 0	1.311 2	98.62	(0.80)
4.9 柱温	0.998 2	0.673 8	0.645 0	1.305 7	97.97	
4.10 检测波长	0.999 5	0.674 7	0.645 0	1.309 4	98.40	
4.11 流动相组成	1.001 3	0.675 9	0.645 0	1.301 1	96.93	
4.12 流速	0.997 9	0.673 6	0.645 0	1.302 0	97.43	
4.13 柱温	1.002 0	4.581 1	4.455 0	9.046 2	100.23	99.90
4.14 检测波长	1.000 1	4.572 5	4.455 0	9.017 8	99.78	(0.62)
4.15 流动相组成	0.998 2	4.563 8	4.455 0	9.031 9	100.29	
4.16 流速	0.999 5	4.569 7	4.455 0	9.052 8	100.63	
4.17 柱温	1.001 3	4.577 9	4.455 0	8.983 5	98.89	
4.18 检测波长	0.997 9	4.562 4	4.455 0	8.999 0	99.59	
4.19 流动相组成	1.002 0	2.042 1	1.997 5	4.035 2	99.78	98.69
4.20 流速	1.000 1	2.038 2	1.997 5	4.028 6	99.64	(1.35)
4.21 柱温	0.998 2	2.034 3	1.997 5	4.009 1	98.86	
4.22 检测波长	0.999 5	2.037 0	1.997 5	4.002 8	98.41	
4.23 流动相组成	1.001 3	2.040 6	1.997 5	3.961 7	96.18	
4.24 流速	0.997 9	2.033 7	1.997 5	4.015 9	99.23	
4.25 柱温	1.002 0	0.745 5	0.765 0	1.500 2	98.65	97.16
4.26 检测波长	1.000 1	0.744 1	0.765 0	1.486 8	97.08	(0.94)
4.27 流动相组成	0.998 2	0.742 7	0.765 0	1.481 9	96.63	
4.28 流速	0.999 5	0.743 6	0.765 0	1.480 8	96.37	
4.29 柱温	1.001 3	0.745 0	0.765 0	1.493 5	97.84	
4.30 检测波长	0.997 9	0.742 4	0.765 0	1.479 8	96.39	

**3.11 样品含有量测定** 取6批样品，按“3.3”项下方法制备供试品溶液，在“3.1”项色谱条件下测定，结果见表3。

#### 4 讨论

**4.1 流动相选择** 本实验先采用乙腈-水系统进行初始实验，发现各成分分离效果不佳，拖尾现象严重。考虑到缓冲液能够提供离子平衡的反离子，可使流动相保持一定离子强度和 pH 值，有效减少拖尾现象，提高所测成分分离度，最终选择乙腈-0.02% 磷酸二氢钾作为流动相。

表3 6种成分含有量测定结果 (mg/g)

Tab. 3 Results of content determination of six constituents (mg/g)

批号	盐酸小檗碱	盐酸药根碱	盐酸巴马汀	山柰酚	木犀草素	芹菜素
15080847	0.171	0.264	0.675	4.572	2.038	0.744
15080850	0.158	0.247	0.630	4.922	2.176	0.801
15083001	0.180	0.273	0.725	4.693	2.108	0.779
15081376	0.167	0.235	0.613	4.915	2.203	0.741
16080465	0.192	0.291	0.729	4.287	1.874	0.696
16083457	0.189	0.276	0.691	5.013	1.977	0.738
平均值	0.176	0.264	0.677	4.734	2.063	0.750

4.2 柱温选择 本实验考察了 30、35、40 ℃柱温时对样品峰形、保留时间、分离度的影响，最终选择 35 ℃作为最佳柱温。

4.3 含有量限度确定 根据所测成分含有量平均值的 80%，暂定清热治痢丸的含有量限度为每 1 g 含三颗针以盐酸小檗碱计不得低于 0.14 mg，以盐酸药根碱计不得低于 0.21 mg，以盐酸巴马汀计不得低于 0.54 mg；含马齿苋以山柰酚计不得低于 3.80 mg，以木犀草素计不得低于 1.65 mg，以芹菜素计不得低于 0.60 mg。

#### 参考文献:

[1] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 卫生部药品标准(中药成方制剂): 第4册 [S]. 北京: 人民卫生出版社,

1991; 189.

- [2] 王志东, 宋宝安, 杨松, 等. 贵州中草药三颗针化学成分研究[J]. 贵州大学学报, 2009, 26(3): 11-13.
- [3] 杨志学, 陈百双, 黄爱华, 等. 正交试验优选三颗针中盐酸小檗碱的提取工艺[J]. 中国民族医药杂志, 2004(S1): 184-185.
- [4] 李敬光. 盐酸小檗碱保留灌肠治疗小儿侵袭性细菌性肠炎的疗效观察[J]. 现代诊断与治疗, 2015, 26(11): 2467-2468.
- [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: 13-14, 39-40.
- [6] 李鹏飞, 苗明三. 马齿苋的现代研究及临床应用 [J]. 中医学报, 2014, 29(9): 1342-1344.
- [7] 王柳卜, 贾宪生, 胡成刚, 等. 三颗针中盐酸小檗碱, 盐酸药根碱及盐酸巴马汀的含量测定[J]. 时珍国医国药, 2011, 22(1): 175-177.
- [8] 田妮娜, 封士兰, 周丽. 一测多评法测定三颗针中 4 种生物碱类成分的含量[J]. 卫生职业教育, 2015, 33(15): 113-116.
- [9] 樊晓霞, 万里燕, 袁丽萍, 等. 高效液相色谱法测定二妙丸中盐酸药根碱, 盐酸巴马汀和盐酸小檗碱的含量[J]. 中国药学杂志, 2006, 41(12): 942-944.
- [10] 陈庄元, 董立莎, 曹佩雪, 等. 枳子金花汤不同拆方组合方式下盐酸药根碱, 盐酸巴马汀, 盐酸小檗碱的含量变化[J]. 北方药学, 2013, 10(10): 10-11.
- [11] 韩成龙, 白玉华, 于春月, 等. 高效液相色谱法同时测定大庆马齿苋中山柰酚和槲皮素的含量[J]. 中国医药导报, 2014, 21(7): 91-93.
- [12] 王锦军, 杨成雄. 马齿苋中黄酮化合物的高效液相色谱分析[J]. 解放军药学学报, 2010, 26(4): 345-347.