

# HPLC法同时测定参菊洗剂中4种成分的含量<sup>Δ</sup>

谭璐\*,张广求#,刘文(黄冈市中心医院药剂科,湖北黄冈 438000)

中图分类号 R282.71;R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)30-4257-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.30.26

**摘要** 目的:建立同时测定参菊洗剂中苦参碱、蒙花苷、盐酸小檗碱和蛇床子素含量的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为Dionex C<sub>18</sub>,流动相为乙腈-0.1%三乙胺水溶液(用磷酸调节pH至7.2)(梯度洗脱),流速为1.0 ml/min,检测波长为210 nm,柱温为30 ℃,进样量为20 μl。结果:苦参碱、蒙花苷、盐酸小檗碱和蛇床子素检测进样量线性范围分别为1.400~8.400 μg( $r=0.999\ 4$ )、0.152~0.912 μg( $r=0.999\ 6$ )、0.248~1.488 μg( $r=0.999\ 9$ )、0.128~0.768 μg( $r=0.999\ 4$ );定量限分别为84.85、3.15、15.03、7.76 ng,检测限分别为24.13、0.89、4.27、2.20 ng;精密度、稳定性、重复性试验的RSD<2%;加样回收率分别为96.29%~99.06%(RSD=1.10%, $n=9$ )、96.49%~98.27%(RSD=0.69%, $n=9$ )、99.26%~101.13%(RSD=0.62%, $n=9$ )、96.27%~98.64%(RSD=0.89%, $n=9$ )。结论:该方法操作简便、结果准确、重复性好,可用于同时测定参菊洗剂中苦参碱、蒙花苷、盐酸小檗碱和蛇床子素的含量。

**关键词** 参菊洗剂;苦参碱;蒙花苷;盐酸小檗碱;蛇床子素;高效液相色谱法;含量测定

## Simultaneous Determination of Four Components in Shenju Lotion by HPLC

TAN Lu, ZHANG Guangqiu, LIU Wen (Dept. of Pharmacy, Huanggang Central Hospital, Hubei Huanggang 438000, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To establish a method for simultaneous determination of matrine, linarin, berberine hydrochloride and osthole in Shenju lotion. METHODS: HPLC was performed on the column of Dionex C<sub>18</sub> with mobile phase of acetonitrile - 0.1% triethylamine (pH was adjusted to 7.2 with phosphoric) (gradient elution) at a flow rate of 1.0 ml/min, detection wavelength was 210 nm, column temperature was 30 ℃, and injection volume was 20 μl. RESULTS: The linear range was 1.400-8.400 μg for matrine ( $r=0.999\ 4$ ), 0.152-0.912 μg for linarin ( $r=0.999\ 6$ ), 0.248-1.488 μg for berberine hydrochloride ( $r=0.999\ 9$ ) and 0.128-0.768 μg for osthole ( $r=0.999\ 4$ ); limit of quantitation was 84.85, 3.15, 15.03, 7.76 ng, limit of detection was 24.13, 0.89, 4.27, 2.20 ng; RSDs of precision, stability and reproducibility tests were lower than 2%; recoveries were 96.29%-99.06% (RSD=1.10%, $n=9$ ), 96.49%-98.27% (RSD=0.69%, $n=9$ ), 99.26%-101.13% (RSD=0.62%, $n=9$ ) and 96.27%-98.64% (RSD=0.89%, $n=9$ ). CONCLUSIONS: The method is simple, accurate and reproducible, and can be used for the simultaneous determination of matrine, linarin, berberine hydrochloride and osthole in Shenju lotion.

**KEYWORDS** Shenju lotion; Matrine; Linarin; Berberine hydrochloride; Osthole; HPLC; Content determination

别用甲醇、乙醇、重蒸馏水提取芍药苷以探讨最佳提取溶剂,提取率分别为3.01%、3.09%、3.07%,表明使用这3种提取溶剂结果无明显差异。因此,本研究基于临床用药多以水煎剂入药,同时考虑到经济、环保、安全性等方面的因素,最终确定水为本试验的提取溶剂。

综上所述,本方法简便、准确、专属性强,可用于测定当归芍药散中芍药苷的含量。

### 参考文献

- [1] 张家礼.金匱要略[M].北京:中国中医药出版社,2010:419.
- [2] 段富津,李飞,康广盛.金匱要略方义[M].哈尔滨:黑龙江科学技术出版社,1984:341.
- [3] 李佳曦.当归芍药散组方配伍规律及其方证相关性研究[D].南京:南京中医药大学,2014.

- [4] Zhou K, Jia N, Jiang N, *et al.* Beneficial effect of Danggui-Shaoyao-San, a traditional Chinese medicine, on drowsiness induced by chronic restraint stress[J]. *Neurosci Lett*, 2015, 597:26.
- [5] 郑世存,李晓宇,欧阳兵,等.芍药苷药理作用研究新进展[J].中国药物警戒,2012,9(2):100.
- [6] 王登,周珺,张锦,等.开心散和当归芍药散对高脂饲料喂养的慢性应激大鼠糖脂代谢的影响及HPA轴相关机制[J].中药材,2015,38(9):1919.
- [7] 贾家丽,卞俊.芍药苷提取与分离纯化的研究进展[J].中国药房,2014,25(31):2969.
- [8] 金利泰.天然药物提取分离工艺学[M].杭州:浙江大学出版社,2011:266.
- [9] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:462.
- [10] 路小平.芍药苷提取溶剂的选择[J].时珍国医国药,2006,17(6):1016.

<sup>Δ</sup>基金项目:黄冈市科技计划项目(No.黄科[字2013]76号)

\*主管药师,硕士。研究方向:医院药学、药物分析。电话:0713-8625312。E-mail:tanlu05@126.com

#通信作者:副主任药师。研究方向:医院药学、药物分析。E-mail:ccnpa@163.com

(收稿日期:2015-11-02 修回日期:2016-07-21)

(编辑:刘柳)

参菊洗剂是黄冈市中心医院自主研发并在临床应用多年的中药制剂(批准文号:鄂药制字Z20110230),由苦参、野菊花、黄柏、蛇床子等12味中药材组成,具有消炎、止痒、除秽、杀菌等功效,可用于细菌性、真菌性、滴虫性阴道炎及多种皮肤瘙痒症,疗效较好<sup>[1]</sup>。方中苦参为君药,野菊花、黄柏、蛇床子为主要药材。苦参具有抗滴虫作用,对痢疾杆菌、大肠杆菌及金黄色葡萄球菌均有明显的抑制作用;野菊花对金黄色葡萄球菌、痢疾杆菌、大肠埃希菌及多种致病性杆菌、皮肤真菌均有一定抗菌作用;黄柏有杀灭阴道滴虫作用,对金黄色葡萄球菌、白色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、大肠埃希菌、铜绿假单胞菌和多种致病性皮肤真菌均有抑制作用;蛇床子有抗滴虫作用,对絮状表皮癣菌、石膏样小芽胞菌、羊毛状小芽胞菌有抑制作用<sup>[2]</sup>。参菊洗剂收录于2011年版《湖北省医疗机构制剂规范》中,该制剂规范只采用薄层色谱法对苦参、野菊花、黄柏、蛇床子进行定性鉴别,而没有对其进行含量测定。因此,本研究采用高效液相色谱法(HPLC)建立了同时测定参菊洗剂中苦参、野菊花、黄柏、蛇床子中的有效成分苦参碱、蒙花苷、盐酸小檗碱和蛇床子素含量的方法,以期为更好地控制该制剂的质量提供参考。

## 1 材料

### 1.1 仪器

Ultimate 3000型HPLC仪,包括Ultimate 3000泵、Ultimate 3000紫外检测器、UltiMate 3000 WPS自动进样器、Chromeleon高效液相数据处理系统(美国Dionex公司);FA1604型万分之一电子天平(上海越平科学仪器有限公司);pHs-3C型pH计(杭州奥立龙仪器有限公司)。

### 1.2 药品与试剂

参菊洗剂(黄冈市中心医院自制,批号:141105、141201、150209,规格:500 ml/瓶);苦参碱对照品(批号:110805-200508,纯度:99.80%)、蒙花苷对照品(批号:111528-201308,纯度:99.50%)、盐酸小檗碱对照品(批号:110713-201212,纯度:99.00%)、蛇床子素对照品(批号:110822-201308,纯度:99.00%)均购自中国食品药品检定研究院;甲醇、乙腈为色谱纯,乙酸乙酯、三乙胺、磷酸、氨水均为分析纯,水为纯化水。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

色谱柱:Dionex C<sub>18</sub>(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:乙腈(A)-0.1%三乙胺水溶液(用磷酸调节pH至7.2)(B),梯度洗脱(洗脱程序见表1);流速:1.0 ml/min;检测波长:210 nm;柱温:30 ℃;进样量:20 μl。

### 2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液 分别精密称取苦参碱对照品0.017 5 g、蒙花苷对照品0.001 9 g、盐酸小檗碱对照品0.003 1 g、蛇床子素对照品0.001 6 g,置于同一25 ml量瓶中,加甲醇溶解并

定容,摇匀,制成质量浓度分别为700、76、124、64 μg/ml的混合对照品溶液。

表1 梯度洗脱程序

Tab 1 Conditions of gradient elution

时间,min	A,%	B,%
0	15	85
22	15	85
23	25	75
43	25	75
44	57	43
62	57	43
63	15	85
76	15	85

2.2.2 供试品溶液 精密量取样品5 ml,置于分液漏斗中,用氨水调节pH至9.3,加乙酸乙酯置于分液漏斗中,振摇提取3次,每次20 ml,合并乙酸乙酯提取液,挥干,残渣加甲醇溶解并定容至10 ml量瓶中,经0.45 μm微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.2.3 阴性对照溶液 按样品的处方比例和制备工艺,分别制备不含苦参、野菊花、黄柏和蛇床子的阴性样品,然后按“2.2.2”项下方法制备阴性对照溶液。

### 2.3 系统适用性试验

取“2.2”项下混合对照品溶液、供试品溶液和阴性对照溶液各适量,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱,详见图1。由图1可知,在该色谱条件下,各成分均能达到基线分离,分离度>1.5;理论板数以苦参碱峰计>2 000,保留时间为20 min。结果表明,其他成分对测定无干扰。

### 2.4 线性关系考察

分别精密量取“2.2.1”项下混合对照品溶液1、2、3、4、5、6 ml,分别置于10 ml量瓶中,加甲醇定容,制成系列线性溶液。取上述溶液适量,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以待测成分进样量(x, μg)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归,得苦参碱、蒙花苷、盐酸小檗碱和蛇床子素的回归方程与线性范围,见表2。

### 2.5 定量限与检测限考察

取“2.2.1”项下混合对照品溶液适量,等倍逐步稀释,按“2.1”项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。当信噪比为10:1时,得定量限(LOQ);当信噪比为3:1时,得检测限(LOD),结果见表3。

### 2.6 精密度试验

取“2.2.1”项下混合对照品溶液适量,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,苦参碱、蒙花苷、盐酸小檗碱和蛇床子素峰面积的RSD分别为0.41%、0.37%、0.58%、0.66%(n=6),表明仪器精密度良好。

### 2.7 稳定性试验

取“2.2.2”项下供试品溶液适量,分别于室温下放置0、2、4、6、8、10、12 h时按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面

积。结果,苦参碱、蒙花苷、盐酸小檗碱和蛇床子素峰面积的RSD分别为0.89%、0.77%、1.15%、1.23% ( $n=7$ ),表明供试品溶液在室温下12 h内稳定性良好。

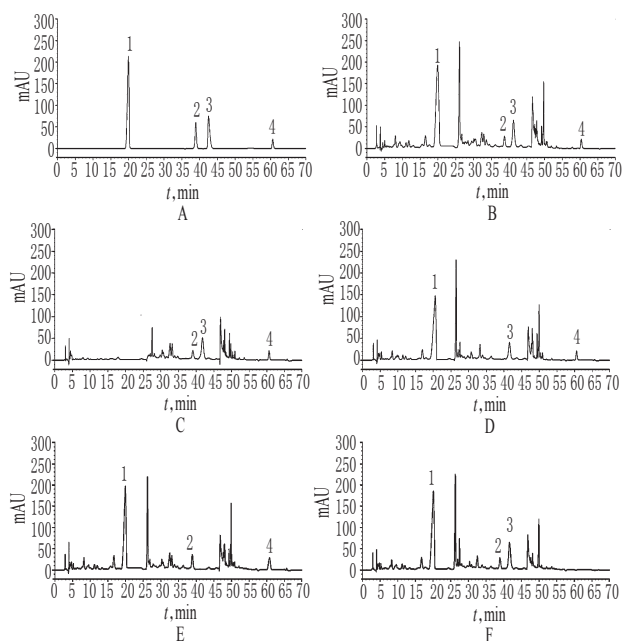


图1 高效液相色谱图

A.混合对照品;B.供试品;C.缺苦参的阴性对照;D.缺野菊花的阴性对照;E.缺黄柏的阴性对照;F.缺蛇床子素的阴性对照;1.苦参碱;2.蒙花苷;3.盐酸小檗碱;4.蛇床子素

Fig 1 HPLC chromatograms

A.mixed reference substance; B.test sample; C.negative control without *Sophora flavescens*; D.negative control without *Chrysanthemum indicum*; E.negative control without *Phellodendron chinese*; F.negative control without *Cnidium monnieri*; 1.matrine; 2.linarin; 3.berberine hydrochloride; 4.osthole

表2 回归方程与线性范围

Tab 2 Regression equations and linear ranges

待测成分	回归方程	$r$	线性范围, $\mu\text{g}$
苦参碱	$y=26.518x+2.397$	0.999 4	1.400~8.400
蒙花苷	$y=59.65x+0.293 3$	0.999 6	0.152~0.912
盐酸小檗碱	$y=60.57x-0.167$	0.999 9	0.248~1.488
蛇床子素	$y=129.12x+10.549$	0.999 4	0.128~0.768

表3 定量限与检测限测定结果

Tab 3 Determination results of quantitation limit and detection limit

待测成分	LOQ,ng	LOD,ng
苦参碱	84.85	24.13
蒙花苷	3.15	0.89
盐酸小檗碱	15.03	4.27
蛇床子素	7.76	2.20

## 2.8 重复性试验

取同一批样品(批号:150209)适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,苦参碱、蒙花苷、盐酸小檗碱和蛇床子素的平均含量分别为297.76、10.88、47.33、11.06  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; RSD分别为0.69%、0.85%、1.00%、0.91% ( $n=6$ ),表明本方法重复性良好。

## 2.9 加样回收率试验

精密量取已知含量的样品(批号:141105)适量,共9份,分别加入低、中、高质量的苦参碱、蒙花苷、盐酸小檗碱和蛇床子素对照品,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算加样回收率,结果见表4。

表4 加样回收率试验结果( $n=9$ )

Tab 4 Results of recovery tests ( $n=9$ )

待测成分	取样量, ml	样品含量, $\mu\text{g}$	加入量, $\mu\text{g}$	测得量, $\mu\text{g}$	加样回收率, %	平均加样回收率, %	RSD, %			
苦参碱	2.50	758.03	602.00	1 341.97	97.00	97.62	1.10			
	2.50	758.03	602.00	1 351.84	98.64					
	2.50	758.03	602.00	1 353.89	98.98					
	2.50	758.03	770.00	1 511.32	97.83					
	2.50	758.03	770.00	1 506.55	97.21					
	2.50	758.03	770.00	1 499.77	96.33					
	2.50	758.03	910.00	1 642.82	97.23					
	2.50	758.03	910.00	1 659.48	99.06					
	2.50	758.03	910.00	1 634.27	96.29					
	蒙花苷	2.50	26.80	20.80	47.04			97.31	97.48	0.69
		2.50	26.80	20.80	46.87			96.49		
		2.50	26.80	20.80	46.93			96.78		
2.50		26.80	26.00	52.17	97.58					
2.50		26.80	26.00	52.33	98.19					
2.50		26.80	26.00	52.29	98.04					
2.50		26.80	31.20	57.00	96.79					
2.50		26.80	31.20	57.34	97.88					
2.50		26.80	31.20	57.46	98.27					
盐酸小檗碱		2.50	115.23	90.00	206.25	101.13	100.29	0.62		
		2.50	115.23	90.00	205.73	100.56				
		2.50	115.23	90.00	205.11	99.87				
	2.50	115.23	115.00	230.17	99.95					
	2.50	115.23	115.00	229.99	99.79					
	2.50	115.23	115.00	231.01	100.68					
	2.50	115.23	135.00	251.62	101.03					
	2.50	115.23	135.00	250.69	100.34					
	2.50	115.23	135.00	249.23	99.26					
	蛇床子素	2.50	26.25	22.00	47.83	98.09			97.42	0.89
		2.50	26.25	22.00	47.91	98.45				
		2.50	26.25	22.00	47.43	96.27				
2.50		26.25	26.40	51.98	97.46					
2.50		26.25	26.40	51.74	96.55					
2.50		26.25	26.40	51.88	97.08					
2.50		26.25	31.68	57.50	98.64					
2.50		26.25	31.68	56.85	96.59					
2.50		26.25	31.68	57.19	97.66					

## 2.10 样品含量测定

取3批样品各适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算苦参碱、蒙花苷、盐酸小檗碱和蛇床子素的含量,结果见表5。

表5 样品含量测定结果( $n=3, \mu\text{g}/\text{g}$ )

Tab 5 Results of contents determination of samples ( $n=3, \mu\text{g}/\text{g}$ )

样品批号	苦参碱	蒙花苷	盐酸小檗碱	蛇床子素
141105	303.21	10.72	46.09	10.50
141201	297.63	11.05	46.71	11.23
150209	297.76	10.88	47.33	11.06

## 3 讨论

### 3.1 测定波长的选择

苦参碱的检测波长主要为210<sup>[3]</sup>、220<sup>[4-5]</sup>、230 nm<sup>[6]</sup>等,蒙花苷的检测波长为268、334 nm<sup>[7]</sup>,盐酸小檗碱的检测波长为228、264、346 nm<sup>[8]</sup>,蛇床子素的检测波长为206<sup>[9]</sup>、322 nm<sup>[10]</sup>。笔者尝试在不同检测波长处测定参菊洗剂中4种待测成分,结果在210 nm波长处,4种成分均有较好的响应值,且其他杂质干扰较小,故本试验选择210 nm为检测波长。

### 3.2 提取溶剂的考察

预试验时,笔者考察了甲醇、乙醚、乙酸乙酯作为提取溶剂。结果,相同提取条件下,乙酸乙酯提取率最高,故本试验选择乙酸乙酯作为提取溶剂。为确定最佳提取溶剂体积和提取次数,笔者选用乙酸乙酯30、20、15 ml/次分别振摇提取3次或者4次,以峰面积比较提取效果。结果,乙酸乙酯20 ml/次振摇提取3次即可有效提取出样品中4种待测成分,故本试验选择乙酸乙酯的提取体积为20 ml/次,提取次数为3次。

### 3.3 流动相的选择

笔者参考相关文献<sup>[11-15]</sup>,考察了乙腈-不同浓度磷酸溶液、乙腈-0.05 mol/L 磷酸二氢钾水溶液和乙腈-0.1% 三乙胺水溶液(磷酸调节不同pH)等不同流动相进行等度和梯度洗脱。结果,以乙腈-0.1% 三乙胺水溶液(磷酸调节pH至7.2)梯度洗脱效果最佳,各色谱峰峰形、分离度均较好且基线较平稳。因此,本试验选择乙腈-0.1% 三乙胺水溶液(磷酸调节pH至7.2)为流动相,洗脱方式为梯度洗脱。

综上所述,本方法简便、准确,重复性好,可用于同时测定参菊洗剂中苦参碱、蒙花苷、盐酸小檗碱和蛇床子素的含量。

### 参考文献

[1] 刘文,谭璐,张广求,等.参菊洗剂治疗阴道炎的疗效观察[J].临床合理用药杂志,2015,8(9):21.  
[2] 张广求,刘文,谭璐,等.参菊洗剂体外抑菌作用[J].医药导报,2015,34(8):1 032.  
[3] 李翔,刘皈阳,马建丽,等.HPLC法测定扁咽口服液中苦

参碱的含量[J].解放军药学学报,2014,30(6):532.

[4] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:202-203.  
[5] 侯杰荣,柯发敏,侯思奎.HPLC法同时测定苦参中3种生物碱的含量[J].中药材,2014,37(2):273.  
[6] 王慧,毛春芹,周渊,等.HPLC法同时测定舒乐洗剂中苦参碱和小檗碱[J].中国实验方剂学杂志,2014,20(12):88.  
[7] 王伯涛,王峰,张同波,等.反相高效液相色谱法测定野菊花中蒙花苷的含量[J].时珍国医国药,2009,20(1):166.  
[8] 徐璐扬,李中东,刘庆丰,等.HPLC测定三黄汤中4种成分含量[J].中国现代应用药学,2011,28(12):1 135.  
[9] 杨娟,黄敬群.除湿止汗散的制备及质量控制[J].中国医院药学杂志,2011,31(2):154.  
[10] 黄良永,郑江萍,甘春英.独活药材及其配方颗粒中蛇床子素的含量比较[J].医药导报,2010,29(1):90.  
[11] 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.  
[12] 唐春丽,陆石英,覃文慧,等.多波长 HPLC 法同时测定清胃黄连片中4种成分的含量[J].中药材,2014,37(6):1 062.  
[13] 孙艳涛.HPLC法同时测定安脑丸中栀子苷、盐酸小檗碱和黄芩苷的含量[J].中国药房,2016,27(3):389.  
[14] 韩永成,龚海燕,刘伟,等.UPLC同时测定野菊花中蒙花苷和绿原酸含量[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(20):88.  
[15] 李义敏,张巧艳,秦路平,等.HPLC法测定蛇床子中3种香豆素类成分的含量[J].中药材,2015,38(7):1 441.

(收稿日期:2015-11-27 修回日期:2016-08-13)

(编辑:刘柳)

## 国家卫生和计划生育委员会基层卫生司召开“新农合”大病保险和健康扶贫工作座谈会

**本刊讯** 为贯彻落实《国务院办公厅关于全面实施城乡居民大病保险的意见》(国办发〔2015〕57号)和《关于实施健康扶贫工程的指导意见》(国卫财务发〔2016〕26号)的有关要求,交流各地“新农合”大病保险工作和“新农合”健康扶贫相关工作进展,规范化推进“新农合”大病保险工作,助力健康扶贫,不断提高“参合”农民医疗保障水平,2016年7月29日,国家卫生计生委基层卫生司在辽宁省丹东市召开了“新农合”大病保险和健康扶贫工作座谈会。国家卫生计生委基层卫生司、财务司、体改司有关负责人,财政部社会保障司相关人,全国各省(区、市)卫生计生委基层(体改)处负责人以及国家卫生计

生委“新农合”研究中心有关专家共计50余人参加了会议。

会上,财务司和基层司相关负责人分别就“新农合”大病保险和健康扶贫的相关政策进行了解读。各省卫生计生委基层(体改)处负责人对“新农合”大病保险进展情况以及通过“新农合”和大病保险支持健康扶贫的工作情况进行了汇报。有关专家对2015年全国“新农合”大病保险运行情况进行分析。

会议肯定了各省(区、市)相关工作的进展,并就进一步做好“新农合”大病保险和健康扶贫工作提出了具体要求。