

RP-HPLC 测定三黄片中黄芩苷和盐酸小檗碱的含量

王西彬¹, 陈畅², 何希荣², 杨菲^{3,4}, 冯伟红^{2,3*}

(1. 河南省中医院, 郑州 450002; 2. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700;
3. 中药质量控制技术国家工程实验室, 北京 100700; 4. 天津中医药大学, 天津 300193)

[摘要] 目的: 建立用 RP-HPLC 法同时测定三黄片中黄芩苷和盐酸小檗碱含量的方法。方法: 采用 Accurasil® C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 以乙腈-0.2% 磷酸水溶液(25:75)为流动相, 检测波长为 270 nm。结果: 黄芩苷和盐酸小檗碱的线性范围分别为 0.043 6~0.436 μg 和 0.018 5~0.185 μg, 回归方程分别为 $Y = 2.79 \times 10^6 X - 15\ 622$ ($r = 0.999\ 9$) 和 $Y = 3.98 \times 10^6 X - 7\ 512$ ($r = 0.999\ 9$) 加样回收率分别为 105.0%, 103.0%; RSD 分别为 1.28%, 1.80%。结论: 本法简便, 结果准确。

[关键词] 反相高效液相色谱法; 三黄片; 黄芩苷; 盐酸小檗碱

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)13-0128-03

Determination of Contents of Bacalin and Berberin Hydrochloride in Sanhuang Tablets by RP-HPLC

WANG Xi-bin¹, CHEN Chang², HE Xi-rong², YANG Fei^{3,4}, FENG Wei-hong^{2,3*}

(1. Henan Province Hospital of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450002, China;
2. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;
3. National Engineering Laboratory for Quality Control Technology of Chinese Herbal Medicines, Beijing 100700, China; 4. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China)

[Abstract] **Objective:** To establish an RP-HPLC method for determination of bacalin and berberin hydrochloride in Sanhuang tablets. **Method:** The separation was performed on an Accurasil C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) column eluted with a mobile phase consisted of acetonitrile-0.2% phosphoric acid solution (25:75)

[收稿日期] 20120217(170)

[第一作者] 王西彬, 主治医师, Tel: 13783522727, E-mail: wangxibin1976@163.com

[通讯作者] * 冯伟红, 副研究员, 本科, 从事中药质量标准研究, Tel: 010-84014128, E-mail: weihong_bj@126.com

胡皂苷 a、柴胡皂苷 d 转移率计下幅 20%, 同时考虑各种因素的影响, 保证正常工艺条件下的制剂质量合格, 故将乳康胶囊中含柴胡以柴胡皂苷 a (C₁₂H₆₈O₁₃)、柴胡皂苷 d (C₁₂H₆₈O₁₃) 计, 总量不得少于 0.22 mg/粒。

[参考文献]

- [1] 李本淳, 付梅. 采用薄层色谱法控制散结消肿胶囊的质量[J]. 中国实用医药, 2010, 5(6): 140.
- [2] 王鹏, 王玉生, 刘斌. 不同产地柴胡中总皂苷及柴胡皂苷 a 含量测定[J]. 中国药物与临床, 2008, 8(3): 228.

- [3] 谭玲玲, 蔡霞, 胡正海. 不同产地狭叶柴胡中柴胡皂苷含量的测定[J]. 时珍国医国药, 2010, 21(10): 2431.
- [4] 赖克道, 刘元, 文志云, 等. 薄层色谱法定性鉴别小柴胡颗粒中的柴胡、甘草[J]. 广西医学, 2009, 31(6): 886.
- [5] 白雪梅, 田嘉铭, 王德宝. HPLC 测定不同产地柴胡中柴胡皂苷 a 及柴胡皂苷 d 的含量[J]. 中成药, 2006, 28(3): 440.
- [6] 中国药典. 一部[S]. 2010: 264.

[责任编辑 顾雪竹]

at a flow rate of $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. The column temperature was set at $35 \text{ }^\circ\text{C}$, and the detection wavelength was set at 270 nm . **Result:** The linear ranges of bacalin and berberin hydrochloride were $0.0436\text{--}0.436 \mu\text{g}$ ($r=0.9999$) and $0.0185\text{--}0.185 \mu\text{g}$ ($r=0.9999$), the average recoveries of bacalin and berberin hydrochloride were 105.0% and 103.0% , and RSD were 1.28% and 1.80% respectively. **Conclusion:** The method was simple, feasible, and reproducible, and it can be used for the quality control of Sanhuang Tablet.

[**Key words**] RP-HPLC; Sanhuang tablet; bacalin; berberin hydrochloride

三黄片由大黄、盐酸小檗碱和黄芩浸膏组成,具有清热解毒、泻火通便的功效,临床用于治疗目赤肿痛、口鼻生疮、咽喉肿痛、牙龈肿痛等疾病^[1]。2010年版《中国药典》中三黄片的含量测定项下采用HPLC分别测定黄芩苷和盐酸小檗碱的含量,我们经过试验建立了黄芩苷和盐酸小檗碱同步测定的方法并进行了方法学考察。

1 仪器与试剂

Shimadzu LC20A型高效液相色谱仪,LC-20AT溶液传输单元,SIL-20A自动进样器,SPD-M20A二极管阵列检测器,LC Solution色谱工作站。

黄芩苷对照品(批号110715-200212)、盐酸小檗碱对照品(批号110713-200208),均购自中国药品生物制品检定所,供含量测定用;三黄片为市售品。甲醇、乙腈均为色谱纯(Fisher)、水为娃哈哈纯净水,其余试剂均为分析纯。

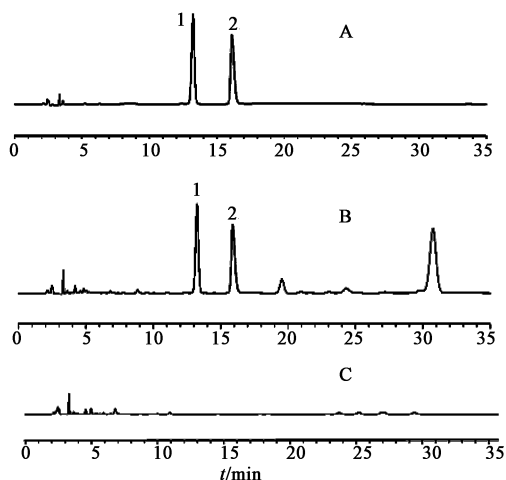
2 方法与结果

2.1 色谱条件 Accurasil® C₁₈色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈-0.2%磷酸水溶液(25:75),检测波长270 nm,柱温35 °C,流速1 mL · min⁻¹,进样量5 μL。理论板数按黄芩苷色谱峰计算不低于4 000。在上述色谱条件下黄芩苷和盐酸小檗碱与其他成分分离良好。见图1。

2.2 对照品溶液的制备 分别精密称取黄芩苷对照品4.36 mg,盐酸小檗碱1.85 mg,置10 mL量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀。精密吸取1 mL,置10 mL量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,作为对照品溶液(黄芩苷质量浓度为 $0.0436 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,盐酸小檗碱质量浓度为 $0.0185 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)。

2.3 供试品溶液的制备 取本品20片,精密称定,研细(过三号筛),取约0.2 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇25 mL,称定质量,超声处理10 min,放冷,再称定质量,用甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液0.5 mL置5 mL量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,即得。

2.4 阴性对照溶液的制备 按三黄片处方配比称取缺黄芩提取物和盐酸小檗碱的阴性对照粉末适



A. 对照品; B. 三黄片供试品; C. 三黄片阴性供试品;
1. 黄芩苷; 2. 盐酸小檗碱

图1 HPLC色谱图

量,按2.3项下方法制备阴性对照溶液。

2.5 方法学考察

2.5.1 线性关系考察 分别精密吸取2.2项下对照品混合溶液1, 2, 4, 6, 8, 10 μL,在上述色谱条件下进样,分别测定黄芩苷、盐酸小檗碱的峰面积,以对照品量为自变量,峰面积为因变量,进行线性回归,结果黄芩苷和盐酸小檗碱分别在 $0.0436 \sim 0.436 \mu\text{g}$ 和 $0.0185 \sim 0.185 \mu\text{g}$ 线性关系良好,回归方程分别为 $Y = 2.79 \times 10^6 X - 15\,622$ ($r = 0.9999$)和 $Y = 3.98 \times 10^6 X - 7\,512$ ($r = 0.9999$)。

2.5.2 精密度试验 取同一份三黄片供试品溶液,连续进样6次,结果黄芩苷和盐酸小檗碱峰面积积分值的RSD分别为0.29%, 0.70%,表明仪器的精密度良好。

2.5.3 稳定性试验 按2.3项下方法制备供试品溶液,分别于供试品溶液配制后第0, 2, 4, 8, 10, 12, 24 h注入液相色谱仪进行测定,黄芩苷和盐酸小檗碱峰面积积分值的RSD分别为0.90%, 0.72%,结果表明供试品溶液在24 h内稳定。

2.5.4 重复性试验 取同一批市售三黄片,按2.3项下方法平行制备6份供试品溶液,注入液相色谱

仪,分别测定样品含量,结果三黄片中黄芩苷和盐酸小檗碱含量的 RSD 分别为 1.84%,0.34%,表明样品制备方法的重复性良好。

2.5.5 回收率测定 取已知含量的市售三黄片 0.1 g,平行 6 份,精密称定,每份分别精密加入含黄芩苷(0.166 g·L⁻¹)和盐酸小檗碱(0.104 2 g·L⁻¹)的混合对照品的溶液 25 mL,按 2.3 项下方法制备供试品溶液,依法测定,计算回收率。结果黄芩苷和盐酸小檗碱的平均回收率($n=6$)分别为 105.0% 和 103.0%,RSD 分别为 1.28% 和 1.80%,表明方法的准确度良好。见表 1~2。

表 1 黄芩苷加样回收率试验

| No. | 样品中 含量 /mg | 加入量 /mg | 测得量 /mg | 回收率 /% | 平均值 /% | RSD /% |
|-----|------------------|------------|------------|-----------|-----------|-----------|
| 1 | 4.086 | 4.15 | 8.409 | 104.2 | 105.0 | 1.28 |
| 2 | 4.086 | 4.15 | 8.476 | 105.8 | | |
| 3 | 4.086 | 4.15 | 8.533 | 107.2 | | |
| 4 | 4.086 | 4.15 | 8.454 | 105.3 | | |
| 5 | 4.086 | 4.15 | 8.414 | 104.3 | | |
| 6 | 4.086 | 4.15 | 8.378 | 103.4 | | |

表 2 盐酸小檗碱加样回收率试验

| No. | 样品中 含量 /mg | 加入量 /mg | 测得量 /mg | 回收率 /% | 平均值 /% | RSD /% |
|-----|------------------|------------|------------|-----------|-----------|-----------|
| 1 | 2.535 | 2.604 | 5.239 | 103.8 | 103.0 | 1.80 |
| 2 | 2.535 | 2.604 | 5.257 | 104.5 | | |
| 3 | 2.535 | 2.604 | 5.275 | 105.2 | | |
| 4 | 2.535 | 2.604 | 5.191 | 102.0 | | |
| 5 | 2.535 | 2.604 | 5.203 | 102.4 | | |
| 6 | 2.535 | 2.604 | 5.143 | 100.2 | | |

2.5.6 样品测定结果 分别精密称取不同市售三黄片样品粉末(过 40 目筛)各 0.2 g,平行两份,精密称定,按 2.3 项下方法制备供试品溶液,测定峰面积,并计算含量,测定结果见表 3。

表 3 市售三黄片中黄芩苷和盐酸小檗碱的含量($n=2$)

| No. | 样品 | 生产厂家 | 含量/% | |
|-----|-----------|--------------|------|-------|
| | | | 黄芩苷 | 盐酸小檗碱 |
| 1 | 三黄片(薄膜衣片) | 河南百年康鑫药业有限公司 | 3.96 | 2.54 |
| 2 | 三黄片(糖衣片) | 山东健民药业有限公司 | 4.41 | 1.66 |
| 3 | 三黄片(糖衣片) | 襄樊隆中药业有限责任公司 | 0.47 | 0.79 |

3 讨论

文献报道的三黄片中盐酸小檗碱和黄芩苷的同步含量测定方法多采用缓冲盐或离子对体系^[2-7],离子对试剂对色谱柱的填料具有不可逆的改性作用,缓冲盐容易堵塞色谱柱并对高效液相色谱仪泵系统具有较大的磨损作用,因而均不宜采用。本实验采用乙腈-0.2%磷酸水溶液流动相系统分离三黄片中的盐酸小檗碱和黄芩苷,简单易操作,避免了离子对试剂和缓冲盐对色谱柱产生的副作用,分离效果良好。

[参考文献]

- [1] 中国药典.一部[S].2010:457.
- [2] 田书霞,蒋晔. RP-HPLC 同时测定三黄片中 4 种有效成分的含量[J]. 中国药学杂志,2006,41(3):220.
- [3] 李建勋,张亮,王淑珍. HPLC 法同时测定三黄片中盐酸小檗碱与黄芩苷的含量[J]. 中国药师,2005,8(6):479.
- [4] 冯有龙,余伯阳,董小平. 高效液相色谱法同时测定三黄片中的蒽醌类、黄酮类及生物碱类化合物[J]. 药学学报,2006,41(3):285.
- [5] 张艳菊,王晓玲. 不同厂家三黄片中黄芩苷、盐酸小檗碱的溶出度[J]. 安徽中医学院学报,2010,29(6):62.
- [6] 刘丽芳. 三黄片中黄芩苷和盐酸小檗碱的含量测定[J]. 长春中医药大学学报,2007,23(6):24.
- [7] 李文霞,宋平顺. HPLC 法同时测定三黄片中黄芩苷和盐酸小檗碱的含量[J]. 药学进展,2011,35(4):178.

[责任编辑 顾雪竹]