

# HPLC 同时测定三黄片中盐酸小檗碱、黄芩苷和大黄素的含量

李 映, 屠鹏飞, 王金铃

(北京中医药大学中药学院, 北京 100029)

**摘要:** 目的: 建立利用高效液相色谱 (high performance liquid chromatography, HPLC) 法同时测定盐酸小檗碱、黄芩苷和大黄素含量的方法并用于测定三黄片中三种主要药效成分的含量。方法: 采用 Agilent C18 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱, 流动相为乙腈-0.5%磷酸溶液 (三乙胺调 pH=4.0), 梯度洗脱, 流速 1 mL·min<sup>-1</sup>, 检测波长 275 nm。结果: 盐酸小檗碱、黄芩苷的线性范围为 1~30 μg·mL<sup>-1</sup>, 大黄素的线性范围为 0.5~15 μg·mL<sup>-1</sup>, 方法回收率为 95.83%~100.09%。结论: 该方法简便、准确、重复性好, 定量限低并且能排除其他成分的干扰, 可用于三黄片质量控制的评价。

**关键词:** 药效学; 三黄片; 小檗碱; 黄芩苷; 大黄素; 高效液相色谱

中图分类号: R943 文献标识码: A 文章编号: 1674-2850(2017)17-1972-05

## Simultaneous determination of berberine hydrochloride, baicalin and emodin in Sanhuang tablets by HPLC

LI Ying, TU Pengfei, WANG Jinling

(School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

**Abstract:** Objective: A rapid and specific high performance liquid chromatography (HPLC) method was developed for the analysis of berberine hydrochloride, baicalin and emodin. The method was applied to study the content determination of Sanhuang tablets containing berberine hydrochloride, baicalin and emodin. Methods: The analysis was carried out on a Agilent C18 reversed-phase column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) by gradient elution with acetonitrile and 0.5% phosphoric acid (adjusted pH=4.0 with triethylamine). The flow rate was 1 mL·min<sup>-1</sup> and the detection wavelength was set at 275 nm. Results: Linear responses were obtained for berberine hydrochloride and baicalin ranging from 1 to 30 μg·mL<sup>-1</sup>, emodin ranging from 0.5 to 15 μg·mL<sup>-1</sup>. The extraction recovery ranged from 95.83% to 100.09%. Conclusion: This method is simple, accurate with good repeatability, low detection limit and can eliminate the interference of other components. This validated method could be used in the quality control of Sanhuang tablets.

**Key words:** pharmacodynamics; Sanhuang tablets; berberine hydrochloride; baicalin; emodin; high performance liquid chromatography

## 0 引言

三黄片为 2015 版《中华人民共和国药典》(简称《中国药典》) 收藏药物, 由盐酸小檗碱、黄芩浸膏及大黄组成, 具有清热解毒、泻火通便的作用<sup>[1]</sup>, 为临床常用药物。盐酸小檗碱、黄芩苷和大黄素为三黄片的主要有效成分, 但是药典中只规定了三种成分单独测定的方法, 并未给出三种成分同时测定的方

基金项目: 高等学校博士学科点专项科研基金 (20130013120008); 国家自然科学基金 (81503262)

作者简介: 李映 (1990—), 女, 硕士研究生, 主要研究方向: 中药制剂新技术与新剂型

通信联系人: 王金铃, 助理研究员, 主要研究方向: 中药制剂新技术与新剂型. E-mail: wangjinling22@163.com

法。文献中报道较多的也是对盐酸小檗碱、黄芩苷及大黄素单一成分或某两个成分含量的测定<sup>[2-8]</sup>, 对三种成分同时测定的研究较少。本研究在文献<sup>[9]~[11]</sup>的基础上对同时测定三种成分的方法进行改进, 为进一步有效控制药品质量、完善质量标准提供依据。

## 1 仪器与试剂

### 1.1 仪器

Agilent1260 高效液相色谱仪[二极管阵列检测器、四元泵、标准型自动进样器和 C18 色谱柱 (4.6 mm × 150 mm, 5 μm)]; KQ-500DE 型数控超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); DZG-303A 超纯水机 (艾柯公司); 精密电子天平[0.01 mg, 购自梅特勒-托利多 (Mettler-Toledo) 公司]。

### 1.2 试剂

黄芩苷对照品, 购自金测分析技术天津有限公司, 纯度 98%; 盐酸小檗碱对照品, 购自中国食品药品检定研究院, 纯度 98%; 大黄素对照品, 购自成都曼斯特生物科技有限公司, 纯度 98%; 三黄片, 购自山东健民药业有限公司, 生产批号为 Z37021352。乙腈和甲醇均为色谱纯, 购自赛默飞世尔 (中国) 科技有限公司; 磷酸及三乙胺均为分析纯, 市售; 水为超纯水, 自制。

## 2 方法与结果

### 2.1 对照品溶液的制备

精密称取适量盐酸小檗碱、黄芩苷和大黄素对照品, 分别用无水甲醇定容, 得盐酸小檗碱、黄芩苷和大黄素的质量浓度分别为 1.160, 1.060, 0.750 mg·mL<sup>-1</sup> 的对照品溶液。精密吸取上述单组分对照品溶液盐酸小檗碱 1.42 mL、黄芩苷 1.29 mL、大黄素 1.00 mL 混合, 并定容至 5 mL, 配成混合对照品, 备用。

### 2.2 供试品溶液的制备

取市售三黄片 20 片, 除去包衣, 精密称定, 研细过 60 目筛。精密称取适量 (相当于一片的重量), 加入 10.0 mL 无水甲醇, 称重, 超声处理 (功率 250 W, 频率 40 kHz) 30 min, 放冷, 称重, 用无水甲醇补足失去的重量, 过滤, 并用无水甲醇定容至 10 mL 容量瓶中, 作为样品溶液。

### 2.3 阴性对照溶液的制备

根据《中国药典》一部<sup>[1]</sup>规定的处方量和提取方法, 按照 2.1 节的方法分别制备盐酸小檗碱、黄芩苷和大黄素的阴性对照品。

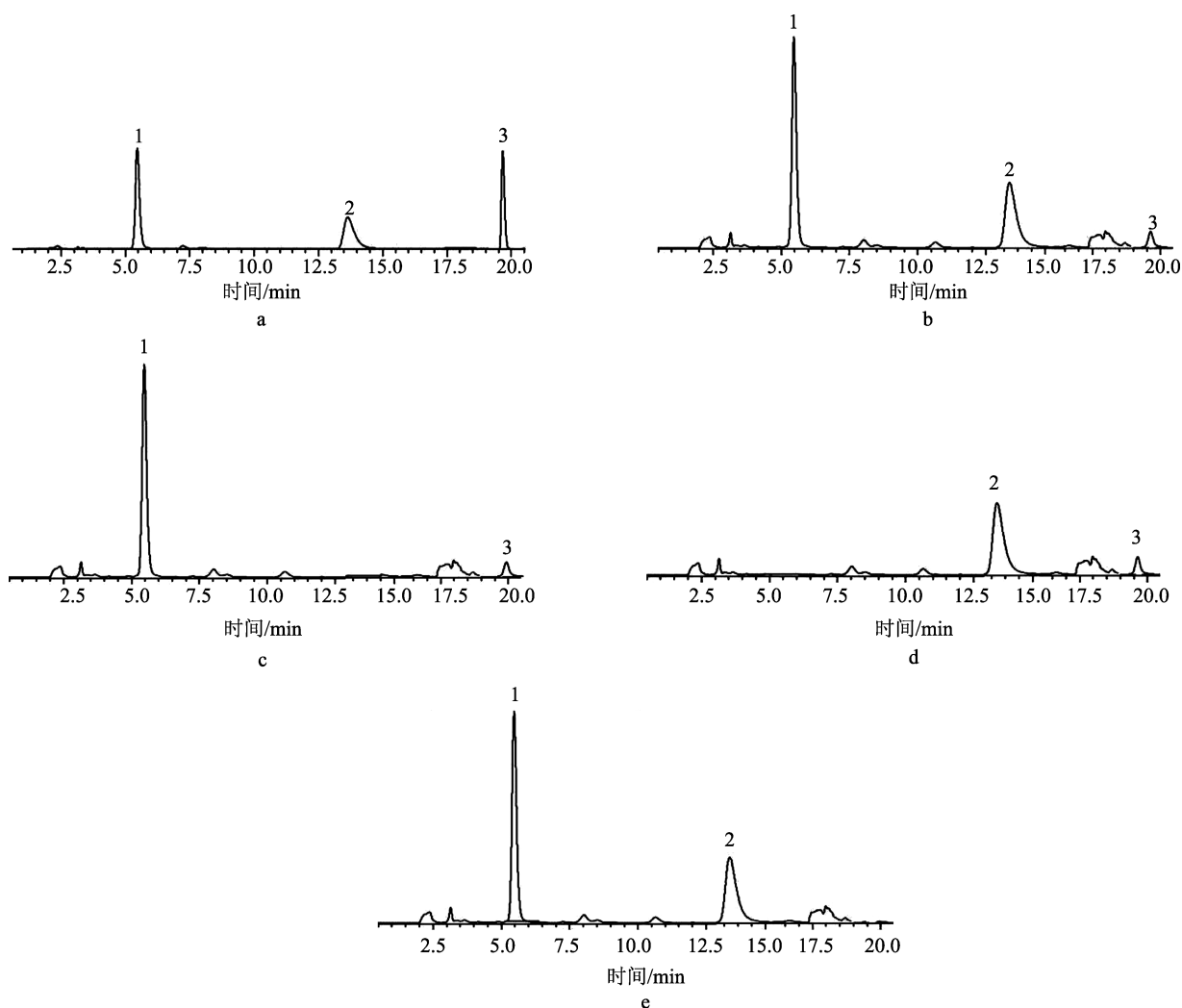
### 2.4 色谱条件

色谱柱为 C18 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相为 A-乙腈、B-0.5%磷酸 (三乙胺调 pH 值为 4.0), 梯度洗脱, 洗脱程序为: 0~14 min A 25%, B 75%; 14~15 min A 25%~90%, B 75%~10%; 15~20 min A 90%, B 10%; 20~21 min A 25%, B 75%。流速为 1 mL·min<sup>-1</sup>, 检测波长为 275 nm, 进样量为 10 μL。

### 2.5 方法学考察

#### 2.5.1 方法专属性

取适量对照品溶液、供试品溶液和阴性对照溶液, 按色谱条件进行测定, 记录色谱图, 考察方法专属性。对照品溶液、供试品溶液、阴性对照溶液的 HPLC 图如图 1 所示, 可以看出, 各个化合物分离良好, 色谱峰的分离度均大于 1.5, 色谱峰理论塔板数均大于 4 000, 盐酸小檗碱、黄芩苷和大黄素的出峰时间分别为 13.41, 5.43, 19.53 min。



注：1—黄芩苷；2—盐酸小檗碱；3—大黄素

图 1 三黄片的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC spectra of Sanhuang tablets

a—三者对照品；b—三黄片样品溶液；c—缺少盐酸小檗碱的阴性对照；d—缺少黄芩苷的阴性对照；e—缺少大黄素的阴性对照

a-References; b-Samples of Sanhuang tablet; c-Negative control without berberine hydrochloride; d-Negative control without baicalin; e-Negative control without emodin

### 2.5.2 线性范围

精密吸取混合对照品 0.03, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mL 于 10 mL 容量瓶内, 用无水甲醇定容至 10 mL, 分别编号为 S1、S2、S3、S4、S5、S6、S7; 按 2.4 节的色谱条件, 分别进样 10  $\mu$ L, 以峰面积 ( $y$ ) 对进样浓度 ( $x$ ) 进行线性拟合, 计算回归方程。三种化合物的线性方程如表 1 所示。结果表明, 盐酸小檗碱、黄芩苷和大黄素在各自浓度范围内与峰面积呈良好的线性关系。

### 2.5.3 精密度考察

精密量取适量混合对照品, 按上述色谱条件进行分析, 重复进样 6 次, 每次进样 10  $\mu$ L, 计算盐酸小檗碱、黄芩苷和大黄素峰面积的相对标准偏差 (relative standard deviation, RSD) 分别为 0.66%、0.09%

和 0.10%，表明精密度良好，满足含量测定要求。

#### 2.5.4 稳定性考察

精密吸取同一样品溶液 10  $\mu\text{L}$ ，分别于 0, 2, 4, 6, 8, 10, 24 h 进样测定，计算得盐酸小檗碱、黄芩苷和大黄素峰面积的 RSD 分别为 0.53%、0.16%、0.71%，说明供试品溶液在 24 h 内稳定。

#### 2.5.5 重复性考察

取同批号的样品 6 份，按 2.2 节的方法制成供试品溶液，在上述色谱条件下进样 10  $\mu\text{L}$ ，测定，计算得盐酸小檗碱、黄芩苷和大黄素浓度的 RSD 分别为 0.38%、0.05%和 0.17%，表明本法重复性良好。

#### 2.5.6 回收率实验

准确称取已测知含量的三黄片样品粉末 6 份，质量分别为 19.97, 19.18, 20.03, 19.85, 19.63, 19.78 mg，分别加入盐酸小檗碱、黄芩苷和大黄素对照品溶液适量，按 2.2 节的方法处理制备供试品溶液，按照 2.4 节的色谱条件进样 10  $\mu\text{L}$ ，计算平均回收率和 RSD。结果显示，盐酸小檗碱的平均回收率为 100.09%，RSD 为 2.67%；黄芩苷的平均回收率为 95.83%，RSD 为 4.24%；大黄素的平均回收率为 96.65%，RSD 为 3.77%。

### 2.6 样品的含量测定

取三黄片，按 2.2 节的方法制备样品溶液，并按色谱条件进行 HPLC 分析，测定三黄片中盐酸小檗碱、黄芩苷和大黄素的含量，结果如表 2 所示。

表 1 三黄片中盐酸小檗碱、黄芩苷和大黄素浓度的线性回归方程

Tab. 1 Linear regression equations of berberine hydrochloride, baicalin and emodin in Sanhuang tablets

组分	回归方程	相关系数	线性范围/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$
盐酸小檗碱	$y=62.045x-18.836$	0.999 1	1~30
黄芩苷	$y=33.798x-18.836$	0.999 3	1~30
大黄素	$y=18.111x+4.991 2$	0.999 0	0.5~15

表 2 三黄片中盐酸小檗碱、黄芩苷和大黄素含量的测定结果 ( $n=3$ )

Tab. 2 Content determination of berberine hydrochloride, baicalin and emodin in Sanhuang tablets ( $n=3$ )

组分	平均含量/(mg/片)	RSD/%
盐酸小檗碱	21.78	0.27
黄芩苷	4.72	3.29
大黄素	0.33	1.66

## 3 讨论

### 3.1 检测波长的选择

本实验所测定的三种指标成分具有不同的化学结构，其紫外吸收亦不相同，为保证各成分均具有适宜的灵敏度和精密度，研究了黄芩苷、盐酸小檗碱及大黄素在流动相中的紫外区吸收特性。通过全波长扫描发现，黄芩苷在 200 nm 及 275 nm 波长处有最大吸收，盐酸小檗碱在 220 nm 及 280 nm 处有最大吸收，而大黄素在 200 nm 及 275 nm 处吸收较大，三种成分在 275 nm 左右均具有最大吸收，并且在 275 nm 时检测的峰形、分离度、各色谱峰之间的距离、峰强度及图谱的基线最佳，且在此波长下阴性样品没有干扰。因此，本研究采用 275 nm 作为检测波长。

### 3.2 流动相的选择

由于本实验所测定的指标成分大黄素为游离蒽醌，其极性较小、不溶于水，而黄芩苷、盐酸小檗碱分别为黄酮类和生物碱类化合物，其极性较大且不易溶于极性小的溶剂。因此，为同时得到三种指标成分满意的提取结果，选择甲醇为提取溶剂，并根据文献[2]，选择了超声 30 min 的提取方法，方法回收率

表明该提取方法符合分析的要求。

## 4 结论

本研究建立了测定三黄片中黄芩苷、小檗碱和大黄素含量的 HPLC 法,经方法学验证该方法的精密性、稳定性和回收率均符合要求,适合测定 3 种化合物的含量。并且本研究实现了黄酮类、生物碱类、蒽醌类三类化合物的同时测定。

本研究与文献[9]~[11]相比,不仅降低了测定 3 种成分时对仪器的要求,测定只需要二元梯度洗脱,在一般的紫外检测器上就能完成;而且本研究通过梯度洗脱,缩短了测定时间,又保证了良好的分离。

### [参考文献] (References)

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 2015 版. 北京: 中国医药科技出版社, 2015.  
Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China[M]. 2015 ed. Beijing: China Medical Science Press, 2015. (in Chinese)
- [2] 祝忠民, 卢晓荣. HPLC 法同时测定三黄片中 4 种成分的含量[J]. 西北药学杂志, 2008, 23 (5): 300-301.  
ZHU Z M, LU X R. Simultaneous determination of four components in Sanhuang tablets by HPLC[J]. Northwest Pharmaceutical Journal, 2008, 23(5): 300-301. (in Chinese)
- [3] 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, 2013, 35 (4): 178-181.  
LI W X, SONG P S. Simultaneous determination of the content of baicalin and berberine hydrochloride in Sanhuang tablets by HPLC[J]. Progress in Pharmaceutical Sciences, 2013, 35(4): 178-181. (in Chinese)
- [4] 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): 479-480.  
LI J X, ZHANG L, WANG S Z. Simultaneous determination of berberine hydrochloride and baicalin in Sanhuang tablets by HPLC[J]. China Pharmacist, 2005, 8(6): 479-480. (in Chinese)
- [5] 霍永昌, 高卫东. HPLC 测定三黄片中黄芩苷的含量[J]. 中国现代中药, 2010, 12 (7): 36-37.  
HUO Y C, GAO W D. Determination of baicalin in Sanhuang tablets by HPLC[J]. Modern Chinese Medicine, 2010, 12(7): 36-37. (in Chinese)
- [6] 李淑盈, 郭增军, 王利. HPLC 测定三黄片中大黄素、大黄酚及黄芩苷的含量[J]. 中成药, 2001, 23 (6): 445-448.  
LI S Y, GUO Z J, WANG L. Determination of emodin, chrysofanol and baicalin in three yellows tablets by HPLC[J]. Chinese Traditional Patent Medicine, 2001, 23(6): 445-448. (in Chinese)
- [7] 刘翠哲, 刘喜纲, 陈大为, 等. RP-HPLC 测定三黄片中黄芩苷的含量[J]. 中成药, 2005, 27 (9): 1116.  
LIU C Z, LIU X G, CHEN D W, et al. Determination of baicalin in Sanhuang tablets by RP-HPLC[J]. Chinese Traditional Patent Medicine, 2005, 27(9): 1116. (in Chinese)
- [8] 张宇洁, 井艳. RP-HPLC 法测定三黄片中黄芩苷和小檗碱的含量[J]. 安徽农业科学, 2013, 41 (17): 7456-7458.  
ZHANG Y J, JING Y. Determination of baicalin and berberine hydrochloride in Sanhuang tablet by HPLC[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2013, 41(17): 7456-7458. (in Chinese)
- [9] 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): 220-222.  
TIAN S X, JIANG Y. Simultaneous determination of rhein, emodin, baicalina and berberine hydrochloride in Sanhuang tablets by RP-HPLC[J]. Chinese Pharmaceutical Journal, 2006, 41(3): 220-222. (in Chinese)
- [10] 解军波, 张彦青, 戚务勤. RRLC-MS/MS 法测定三黄片中小檗碱、黄芩苷和大黄素[J]. 中草药, 2010, 41 (5): 739-741.  
XIE J B, ZHANG Y Q, QI W Q. Determination of berberine, baicalin and emodin in Sanhuang tablet by HPLC[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2010, 41(5): 739-741. (in Chinese)
- [11] 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]. 药学报, 2006, 41 (3): 285-288.  
FENG Y L, YU B Y, DONG X P. Simultaneous determination of three kinds of components in Sanhuang tablets by high-performance liquid chromatography[J]. Acta Pharmaceutica Sinica, 2006, 41(3): 285-288. (in Chinese)