

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

冯有龙^{1,2}, 余伯阳^{1*}, 董小平²

(1. 中国药科大学, 江苏 南京 210009; 2. 江苏省药品检验所, 江苏 南京 210008)

关键词: 高效液相色谱法; 三黄片; 大黄素; 大黄酚; 黄芩苷; 汉黄芩素; 盐酸小檗碱

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0513 - 4870(2006)03 - 0285 - 04

Simultaneous determination of three kinds of components in Sanhuang tablets by high-performance liquid chromatography

FENG You-long^{1,2}, YU Bo-yang^{1*}, DONG Xiao-ping²

(1. China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China; 2. Jiangsu Institute for Drug Control, Nanjing 210008, China)

Abstract: Aim To establish an assay method for the determination of three kinds of biologically active components, five compounds (emodin, chrysophanol, baicalin, wogonin and berberine hydrochloride) simultaneously in Sanhuang tablets. **Methods** HPLC was carried out, using a C₁₈ column (150 mm × 4.6 mm ID, 5 μm) set at 30 °C, acetonitrile-0.02 mol·L⁻¹ acetic ammonium (adjusted pH to 3.50 with acetic acid glacial) as mobile phase (using gradient) with flowing rate 1.00 mL·min⁻¹ and detected at 270 nm. **Results** The calibration curve of emodin was linear from 0.020 7 μg to 0.207 μg with $r = 0.999 9$, the average recovery was 99.65% with RSD 1.25%. The calibration curve of chrysophanol was linear from 0.052 μg to 0.52 μg with $r = 0.999 9$, and the average recovery was 100.36% with RSD 0.96%. The calibration curve of baicalin was linear from 0.250 5 μg to 2.505 μg with $r = 0.999 8$, and the average recovery was 100.22% with RSD 1.29%. The calibration curve of wogonin was linear from 0.047 6 μg to 0.476 μg with $r = 0.999 9$, and the average recovery was 98.97% with RSD 1.20%. The calibration curve of berberine hydrochloride was linear from 0.053 12 μg to 0.531 2 μg with $r = 0.999 5$, and the average recovery was 96.02% with RSD 2.02%. The established method had also been used in the determination of the 5 compounds in 10 different batches of Sanhuang tablets. **Conclusion** This method was proved to be accurate and quick, and can be used for the quality control of the preparation all-around.

Key words: HPLC; Sanhuang tablets; emodin; chrysophanol; baicalin; wogonin; berberine hydrochloride

三黄片由大黄、黄芩浸膏和盐酸小檗碱组成,来源于祖国医学中的传统有效方剂——泻心汤,原方由大黄、黄芩、黄连三味药物组成。河北邯郸制药厂于1958年在大量研究的基础上将该方由传统的汤剂改为片剂,名“三黄片”。目前,全国有近200家企业生产三黄片。该方的主要有效成分是蒽醌类、

黄酮类和盐酸小檗碱。这三类成分文献报道的测定方法较多:大黄素等蒽醌类的测定方法有薄层扫描法、高效液相色谱法^[1];黄芩苷的测定方法有极谱法、薄层扫描法、高效液相色谱法^[2];盐酸小檗碱的测定方法有分光光度法、薄层扫描法、极谱法、离子选择电极法、苦味酸比色法、离子对萃取法、非水毛细管电泳法和高效液相色谱法^[3]等。现行版药典以制剂水解后大黄素和大黄酚的总量来控制质量,未对黄芩苷和盐酸小檗碱进行定量测定,只对二者进行薄层鉴别;因黄芩苷和盐酸小檗碱以明确的处

收稿日期: 2005-05-09.

基金项目: 教育部重点科研项目(2004)资助.

* 通讯作者 Tel: 86 - 25 - 83271383, Fax: 86 - 25 - 83313080,

E-mail: boyangyu@yahoo.com.cn

方量投料(可计算出标示量),若不对二者进行含量控制,则不能全面控制三黄片的质量。而目前尚未见对该方中的 3 类成分同时测定来控制制剂质量。本文采用高效液相色谱法在同一色谱条件下对 5 个成分进行了测定,并进行了系统的方法学考察,结果表明该方法简便、准确、重现性好。

材料和方法

仪器和试剂 Agilent 1100 Series 高效液相色谱仪。大黄素、大黄酚、黄芩苷、汉黄芩素和盐酸小檗碱等对照品购自中国药品生物制品检定所;大黄、黄芩浸膏、盐酸小檗碱原料药由南京小营制药厂提供,10 批三黄片均购自药店;乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

色谱条件 色谱柱:日本 Shimadzu VP-ODS (4.6 mm × 150 mm, 5 μm);流动相: A-乙腈, B-0.02 mol·L⁻¹ 醋酸铵溶液(用冰醋酸调至 pH 3.50),梯度洗脱,洗脱程序为: 0 ~ 9 min, A(%) 25 → 28, B(%) 75 → 72; 9 ~ 15 min, A(%) 28, B(%) 72; 15 ~ 26 min, A(%) 28 → 42, B(%) 72 → 58; 26 ~ 36 min, A(%) 42 → 62, B(%) 58 → 38; 36 ~ 43 min, A(%) 62 → 75, B(%) 38 → 25; 43 ~ 45 min, A(%) 75 → 25, B(%) 25 → 75; 检测波长为 270 nm。

供试品溶液的制备 取本品 10 片,除去包衣,精密称定总重量,求得平均片重,研细,精密称取适量(相当于 1 片的重量),加甲醇 95 mL,于水浴上加热回流提取 2 h,取出,冷至室温,定量转移入 100 mL 量瓶中,以少许甲醇洗涤提取器,洗涤液并入量瓶中,定容,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

对照品溶液的制备 精密称取大黄素、大黄酚、黄芩苷、汉黄芩素、盐酸小檗碱对照品各适量,分别加甲醇制成适宜浓度的对照品溶液。

阴性对照溶液的制备 按三黄片处方配比精密称取分别缺大黄、黄芩浸膏、盐酸小檗碱的阴性对照粉末各适量,按“供试品溶液的制备”项下方法分别制备各阴性对照溶液。

结果

1 专属性试验

分别精密吸取前述对照品溶液、供试品溶液与阴性对照溶液各 10 μL 注入液相色谱仪,在选定的色谱条件下进样测定,结果见图 1。由图看出,黄芩浸膏、盐酸小檗碱及大黄两两存在时均对第 3 种物质的成分测定无干扰。

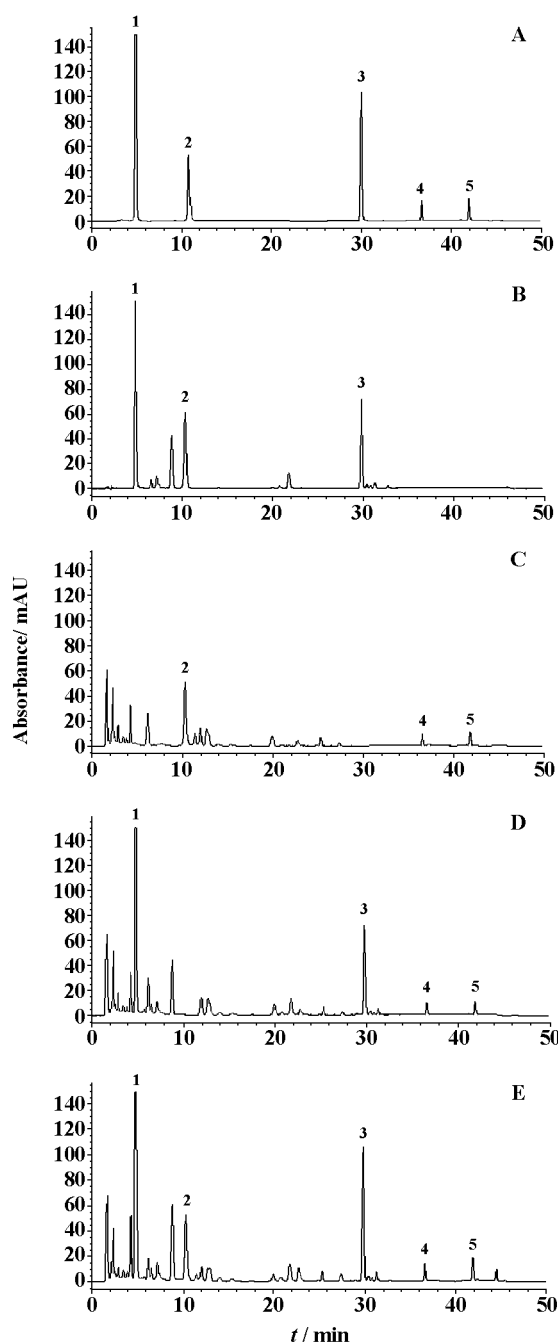


Figure 1 Chromatograms of mixed standard substances (A), Dahuang-free (B), Huangqi-free (C), berberine hydrochloride-free (D) and Sanhuang tablets (E). 1: Baicalin; 2: Berberine hydrochloride; 3: Wogonin; 4: Emodin; 5: Chrysophanol

2 线性范围

分别精密称取大黄素、大黄酚、黄芩苷、汉黄芩素和盐酸小檗碱对照品各适量,加甲醇使溶解制成混合对照品溶液,其浓度分别为大黄素 10.35 μg·mL⁻¹、大黄酚 26.00 μg·mL⁻¹、黄芩苷 125.25 μg·mL⁻¹、汉黄芩素 23.80 μg·mL⁻¹、盐酸小檗碱

26.56 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。在选定的色谱条件下分别进样 2, 5, 10, 15 和 20 μL , 记录各色谱峰面积, 以峰面积为纵坐标, 进样量为横坐标进行线性回归, 各化合物的回归方程及相关系数见表 1。

Table 1 Regression equation and correlation coefficient

Compound	Regression equation	Correlation coefficient
Emodin	$Y = 2\,976.9X - 3.2$	0.999 9
Chrysophanol	$Y = 2\,168.6X - 2.6$	0.999 9
Baicalin	$Y = 1\,978.3X + 33.6$	0.999 8
Wogonin	$Y = 4\,967.2X - 8.1$	0.999 9
Berberine hydrochloride	$Y = 2\,184.8X + 27.5$	0.999 5

3 检测限与定量限

分别精密称取大黄素、大黄酚、黄芩苷、汉黄芩素、盐酸小檗碱对照品各适量, 加甲醇溶解并稀释制成质量浓度分别为 0.192, 0.276, 0.162, 0.102 和 0.286 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照品稀释液, 分别精密吸取 10 μL 进样测定, 结果各化合物的信噪比 (S/N) 均大于 10; 进一步稀释得浓度分别为 0.057 6, 0.082 8, 0.048 6, 0.030 6 和 0.085 8 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照品稀释液, 分别精密吸取 10 μL 进样测定, 结果各化合物的信噪比 (S/N) 均大于 3; 根据有关技术规定, 确定大黄素、大黄酚、黄芩苷、汉黄芩素、盐酸小檗碱的定量限分别为 1.92, 2.76, 1.62, 1.02 和 2.86 ng; 各化合物的检测限分别为 0.58, 0.83, 0.49, 0.31 和 0.86 ng。

4 重复性试验

取同一批三黄片细粉 5 份, 各相当于 1 片的量, 依法制备供试品溶液, 在相同的色谱条件下进样测定并计算含量, 结果大黄素、大黄酚、黄芩苷、汉黄芩素、盐酸小檗碱的含量分别为 0.510 1, 0.941 7, 15.293 9, 2.634 3 和 4.377 4 mg/片, 其 RSD 分别为 0.72%, 0.95%, 0.52%, 0.44% 和 0.69%, 表明本方法重复性较好。

5 精密度试验

取同一混合对照品溶液, 分别在同一天及不同天按前述色谱条件进样测定, 计算方法的日内、日间精密度, 结果见表 2, 表明本法的精密度良好。

6 回收率试验

取已测知各成分含量的三黄片细粉约 0.175 g, 精密称定, 分别精密加入混合对照品溶液 (大黄素 13.00 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、大黄酚 23.60 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、黄芩苷 381.80 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、汉黄芩素 66.20 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、盐酸小檗碱 108.60 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 16, 16, 20, 20, 24 和 24

mL, 再加入甲醇适量, 摇匀, 按“供试品溶液的制备”项下方法制备供试品溶液, 依法测定, 计算各化合物的回收率, 见表 3, 结果表明该方法的回收率好、准确度高。

Table 2 Results of precision test ($n = 5$)

Compound	RSD / %	
	Within-day	Between-day
Emodin	0.36	0.59
Chrysophanol	0.29	0.73
Baicalin	0.31	0.26
Wogonin	0.65	0.17
Berberine hydrochloride	1.68	1.90

Table 3 Results of recovery test ($n = 3$)

Compound	Average recovery / %	RSD / %
Emodin	99.65	1.25
Chrysophanol	100.36	0.96
Baicalin	100.22	1.29
Wogonin	98.97	1.20
Berberine hydrochloride	96.02	2.02

7 稳定性试验

取同一份供试品溶液, 分别于 0, 3, 6, 12, 18 和 24 h 进样测定, 记录各化合物的峰面积, 结果各化合物峰面积的 RSD 均 $< 1.5\%$, 表明供试品溶液在 24 h 内能够保持稳定。

8 样品测定

按所建立的方法对来自不同生产企业的 10 批三黄片进行了含量测定, 结果见表 4。

讨论

结果显示, 有 2 批样品其黄芩苷和盐酸小檗碱的含量明显低于其他 8 批。对盐酸小檗碱作进一步研究, 发现其中一批的 HPLC 色谱图中可检出盐酸药根碱 (t_R 6.7 min) 和盐酸巴马汀 (t_R 9.6 min) 色谱峰, 疑为以含小檗碱的药材替代盐酸小檗碱投料, TLC 色谱图中也可检出盐酸药根碱和盐酸巴马汀的斑点; 另一批样品其 HPLC 和 TLC 色谱中均未检出盐酸药根碱和盐酸巴马汀, 且其 HPLC 色谱图的峰形和峰数目与其他批无明显差异, 仅峰面积小而已, 疑为减量投料。

本方法的意义在于: 首先是降低了对色谱仪器的要求, 只要具备二元梯度洗脱条件, 在一般的紫外检测器上就可以完成测定; 其次, 可以节约时间和成

Table 4 Content of different compounds in Sanhuang tablets from different companies (mg/tablet, $n = 4, \bar{x} \pm s$)

No.	Emodin	Chrysophanol	Baicalin	Wogonin	Berberine hydrochloride
1	0.446 6 ± 1.06	1.243 3 ± 0.63	14.753 6 ± 1.37	0.595 5 ± 0.17	4.207 4 ± 0.79
2	0.364 8 ± 1.93	0.826 8 ± 1.56	15.050 5 ± 0.59	0.090 6 ± 0.66	4.235 4 ± 0.61
3	0.151 4 ± 0.33	0.244 7 ± 0.96	19.883 8 ± 0.71	0.079 9 ± 0.79	4.534 5 ± 0.59
4	0.395 4 ± 1.17	0.766 6 ± 1.01	16.355 2 ± 0.96	0.080 6 ± 0.60	4.852 1 ± 0.21
5	0.251 8 ± 0.67	1.603 7 ± 0.38	12.358 8 ± 0.22	0.334 5 ± 0.83	4.335 0 ± 0.47
6	0.282 1 ± 0.29	1.727 5 ± 0.16	17.647 5 ± 0.82	0.277 5 ± 0.72	4.376 2 ± 0.38
7	0.402 9 ± 1.27	0.914 3 ± 1.87	4.609 1 ± 0.91	0.503 4 ± 1.66	2.029 7 ± 1.18
8	0.253 3 ± 0.87	0.508 4 ± 1.53	9.264 3 ± 1.73	0.256 9 ± 0.43	1.728 8 ± 0.83
9	0.215 4 ± 0.66	0.622 9 ± 0.37	16.175 6 ± 0.85	0.096 6 ± 0.75	4.753 0 ± 0.62
10	0.387 5 ± 1.43	0.716 3 ± 1.09	16.053 1 ± 0.95	2.405 5 ± 1.60	4.247 8 ± 0.96

本,避免了多次提取,多次测定的麻烦;另外,采取直接测定的方法,若与药典方法相结合则能更全面地反映制剂的内在质量,因黄芩浸膏和盐酸小檗碱在三黄片处方中所占比例较大,故应同时测定其含量,以达到全面控制制剂质量之目的。

References

[1] The State Pharmacopoeia Committee of the People's Republic of China. Pharmacopoeia of the People's

Republic of China (中华人民共和国药典) [S]. 2005 Ed. Part I. Beijing: Chemical Industry Press, 2005: 328.

[2] Wu HQ. Determination of content of Baicalin in Sanhuang Tablet by HPLC [J]. Strait Pharm J (海峡药学), 2003, 15: 34 - 36.

[3] Li XY. Assay of berberine hydrochloride in Sanhuang Tablets by HPLC [J]. Chin Tradit Pat Med (中成药), 2002, 24: 679 - 680.