

## HPLC 测定乙肝宁颗粒中川楝素

张秋蓉<sup>1\*</sup>, 周浓<sup>2</sup>, 杨敏<sup>2</sup>

(1. 大理学院临床医学院, 云南 大理 671000; 2. 大理学院 药学院, 云南 大理 671000)

[摘要] 目的: 建立测定乙肝宁颗粒中川楝素含量的方法。方法: 色谱柱为 Agilent Zorbax SB - C<sub>18</sub> (4.6 mm × 150 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-水 (30/70), 流速为 1.0 mL · min<sup>-1</sup>, 检测波长为 210 nm, 柱温为 35 ℃。结果: 川楝素在 0.5 ~ 5.0 μg 范围内具有良好的线性关系 ( $r = 0.9999$ ), 平均回收率为 97.11%, RSD 为 1.91% ( $n = 6$ )。结论: 该方法准确、可靠、重复性好, 可为该产品的质量控制提供参考。

[关键词] 乙肝宁颗粒; 川楝素; 高效液相色谱法

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)10-0078-03

## Determination of Toosendanin in Yiganning Granules by HPLC

ZHANG Qiu-rong<sup>1\*</sup>, ZHOU Nong<sup>2</sup>, YANG Min<sup>2</sup>

(1. College of Clinic Medicine, Dali University, Dali 671000, China; 2. College of Pharmacy, Dali University, Yunnan Province Dali 671000, China)

**[ Abstract ] Objective:** To establish a HPLC method for determination of toosendanin in Yiganning Granules. **Method:** The determination was performed on a Agilent zorbax SB-C<sub>18</sub> column (4.6 mm × 150 mm, 5 μm). Acetonitrile - water (30/70) was used as the mobile phase. The flow rate was 1.0 mL · min<sup>-1</sup> and the detective wavelength was set at 210 nm. The column temperature was at 35 ℃. **Result:** The linear range of toosendanin was 0.5-5.0 μg ( $r = 0.9999$ ) and the average recovery was 97.11% (RSD 1.91%,  $n = 6$ ). **Conclusion:** The method is accurate, reliable and reproducible. It may well be used for the quality control of this product.

**[ Key words ]** Yiganning Granules; toosendanin; HPLC

乙肝宁颗粒属于国家中药保护品种, 由黄芪、丹参、茵陈、川楝子等 13 味中药组成, 具有补气健脾、活血化瘀、清热解毒等功效, 临床用于治疗急慢性肝炎, 以 3 个月为一个疗程<sup>[1]</sup>。方中川楝子具有疏肝理气的功效, 是中医治疗肝炎的主要药物之一, 其主要有效成分是川楝素, 同时又是毒性成分, 并为强积累物质, 毒性主要在肝脏<sup>[2-3]</sup>。质量标准中含量测定项已有黄芪的黄芪甲苷和白芍的芍药苷<sup>[4]</sup>, 而无川楝子的有效成分川楝素。为此, 本研究采用 HPLC 法测定乙肝宁颗粒中川楝素的含量, 对保证其临床用药安全, 减少或杜绝药源性肝病具有积极的意义,

同时为该药的全面质量控制提供参考依据。

### 1 仪器与试剂

1100 LC 高效液相色谱仪 (美国 Agilent 公司, 真空在线脱气机, 四元泵, 自动进样器, 柱温箱, DAD 检测器, Agilent chemstation 化学工作站); KQ-250B 型超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司)。

乙肝宁颗粒 (九芝堂股份有限公司, 批号 20090103, 20090106, 20090201); 川楝素对照品 (成都曼斯特生物科技有限公司, 批号 A0187, 经 HPLC 检测含量 98%)。乙腈为色谱醇 (美国 Tedia 试剂公司), 水为超纯水, 其他试剂均为国产分析纯。

### 2 方法与结果

**2.1 色谱条件与系统适用性试验** 色谱柱 Agilent zorbax SB-C<sub>18</sub> 柱 (4.6 mm × 150 mm, 5 μm); 流动相 乙腈-水 (30/70); 检测波长 210 nm; 柱温 35 ℃; 流速

[收稿日期] 20100329(005)

[通讯作者] \* 张秋蓉, Tel: 0872-2205309, E-mail: zqr688990@163.com

1.0 mL · min<sup>-1</sup>; 进样量 10 μL。理论塔板数按川楝素峰计算不低于 8 000, 与其他峰的分离度均大于 1.5。

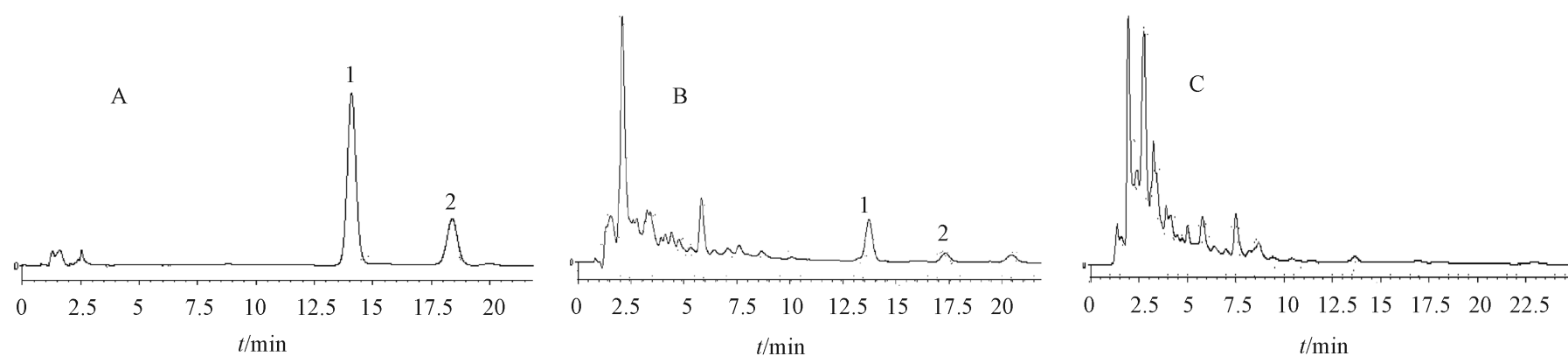
### 2.2 溶液的配制

**2.2.1 对照品溶液的制备** 精密称取川楝素对照品适量, 加甲醇制成每 1 mL 含川楝素 0.500 mg 的溶液, 即得。

**2.2.2 供试品溶液的制备** 取装量差异项下的本品, 研细, 取约 10 g, 精密称定, 加 300 mL 甲醇于 80 水浴中回流提取 2 h, 过滤, 于 500 mL 分液漏斗中用

水分散, 加 50 mL 石油醚脱脂, 重复 3 次, 脱脂后的水提液用 50 mL 三氯甲烷萃取, 重复 5 次。合并萃取液, 经过装有无水氯化钠漏斗过滤并脱水, 减压浓缩滤液至干, 用甲醇转入量瓶, 定容至 10 mL, 即得。

**2.2.3 阴性样品溶液的制备** 按处方组成, 取除川楝子外的其余药味, 按工艺要求制成缺川楝子的颗粒剂。按“2.2.2”项下同法操作, 得阴性样品溶液。依“2.1”项下色谱条件测定, 结果在川楝素峰出现的位置上无对应峰出现, 表明其他组分对测定无干扰, 见图 1。



A. 川楝素对照品; B. 乙肝宁颗粒供试品; C. 缺川楝子阴性对照; 1, 2. 川楝素

图 1 对照品与样品 HPLC 图

**2.3 线性关系考察** 分别精密吸取对照品溶液(含川楝素 0.500 g · L<sup>-1</sup>) 1, 2, 4, 6, 8, 10 μL, 注入液相色谱仪, 得进样量 C(μg) 与峰面积 A 的线性方程。结果表明, 川楝素进样量在 0.5 ~5.0 μg 与峰面积成良好的线性关系, 回归方程为 A = 240.53 C + 17.356, r = 0.999 9 (n = 6)。

**2.4 精密度试验** 取川楝素对照品溶液(0.500 g · L<sup>-1</sup>), 每次进样量为 10 μL, 连续测定, 共进样 6 次, 测定川楝素对照品峰面积的 RSD 为 0.86% (n = 6), 表明仪器精密度良好。

**2.5 重复性试验** 取同一批号乙肝宁颗粒样品 6 份(批号 20090106), 按 2.2.2 项下供试品溶液的制备方法制备及 2.1 项下色谱条件测定, 测得川楝素的平均含量为 152.968 μg · g<sup>-1</sup>, RSD 为 1.51% (n = 6), 表明本方法重复性良好。

**2.6 稳定性试验** 取同一批号乙肝宁颗粒样品溶液(批号 20090106), 室温密闭放置, 分别在制备后 0, 2, 4, 6, 8, 10 h 进样, 测定川楝素峰面积, RSD 为 1.38% (n = 6), 表明样品溶液在 10 h 内稳定。

**2.7 加样回收率试验** 精密称取已知含量的乙肝宁颗粒约 10 g (20090106), 共 6 份, 分别精密加入一定量的川楝素对照品, 按 2.2.2 项下供试品溶液的制备方法制备及 2.1 项下色谱条件测定, 结果见表 1。结

果表明, 其平均回收率为 97.11%, RSD 为 1.91%。

表 1 乙肝宁颗粒中川楝素的加样回收率试验 (n = 6)

样品含量 /mg	对照品含量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
1.5104	1.2000	2.6896	98.62	97.11	1.91
1.5326	1.2000	2.6732	96.12		
1.5068	1.5000	2.9231	94.45		
1.5293	1.5000	3.0126	98.91		
1.5194	1.8000	3.2810	97.47		
1.5082	1.8000	3.2132	93.70		

**2.8 样品含量测定** 分别按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液, 按 2.1 项下色谱条件测定, 以峰面积代入回归方程中计算川楝素的含量。结果表明, 3 批样品川楝素含量分别为 152.968, 150.312, 156.240 μg · g<sup>-1</sup>, RSD 分别为 1.51%, 2.06%, 1.21%。

### 3 讨论

试验中分别考察了超声提取、加热回流、索氏提取等方法的提取效果, 以回流提取法的提取效率最高。而回流提取法中, 又分别比较了不同的溶剂(水、甲醇、乙醇、乙酸乙酯等)、不同的提取时间、溶剂的不同体积倍量、石油醚脱脂的次数、氯仿的萃取次数等的提取效果, 试验表明以 30 倍量的甲醇为提

(下转第 82 页)

# 老年咳喘片的质量标准研究

陈洪英\*, 刘显锋

(河南省宛西制药股份有限公司, 河南 南阳 473000)

[摘要] 目的: 建立老年咳喘片(薄膜衣片)薄层鉴别及含量测定方法。方法: 采用 TLC 对补骨脂中补骨脂素、异补骨脂素, 淫羊藿中淫羊藿苷进行定性鉴别; 采用 HPLC-ELSD 测定了黄芪中黄芪甲苷的含量。结果: 在 0.966 9 ~6.446  $\mu\text{g}$ , 黄芪甲苷峰面积常用对数值与进样量常用对数值呈良好的线性关系,  $r=0.999 8$ , 平均回收率为 96.5%, RSD 为 1.05%。结论: 薄层色谱法呈现斑点清晰, 专属性强; HPLC-ELSD 简便准确, 重复性好, 可有效控制老年咳喘片(薄膜衣片)的质量。

[关键词] 补骨脂素; 异补骨脂素; 淫羊藿苷; 黄芪甲苷

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)10-0080-03

老年咳喘片收载在中华人民共和国卫生部药品标准中药成方制剂第九册<sup>[1]</sup>上, 为糖衣片。由黄芪、淫羊藿、补骨脂、防风等中药组成。为了减少无效成分的服用量便于患者服用, 增加了薄膜衣规格。由于原标准下收载了简单的理化鉴别, 不能有效地控制药品质量, 故对其质量标准进行了修订, 增加了补骨脂、淫羊藿的薄层鉴别, 并增加了黄芪甲苷的含量测定, 经方法学考察, 方法简便, 重现性好, 精密度高, 可有效控制老年咳喘片(薄膜衣片)的质量。

## 1 材料

**1.1 仪器** Agilent 1100 高效液相色谱仪及其化学工作站, ELSD2000ES 蒸发光散射检测器(Alltech 公司), YOKO-ZS 紫外线分析投影仪(武汉药科新技术开发有限公司) 德国 BP211D Satorius1/10 万电子天平。

**1.2 试药** 老年咳喘片(薄膜衣片)与缺补骨脂、淫羊藿、黄芪阴性样品, 由本公司提供。补骨脂素对照品(110739-200814 含量测定用)、异补骨脂素对照品(1107038-200309 含量测定用), 黄芪甲苷对照品(110781-200613 含量测定用)均购于中国药品生物制品检定所。硅胶 G, H 由青岛海洋化工厂生产。乙腈为色谱纯, 水为纯化水, 其他试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

### 2.1 薄层鉴别

**2.1.1 补骨脂的鉴别**<sup>[2]</sup> 取本品 10 片, 除去薄膜

衣, 研细, 加乙酸乙酯 20 mL, 超声处理 15 min, 滤过, 滤液蒸干, 残渣加乙酸乙酯 1 mL 使溶解, 作为供试品溶液。另取补骨脂素、异补骨脂素对照品, 加乙酸乙酯制成每 1 mL 各含 2 mg 的混合溶液, 作为对照品溶液。再取不含补骨脂的阴性样品, 制成阴性对照样品溶液。吸取上述 3 种溶液各 5  $\mu\text{L}$ , 分别点于同一以羧甲基纤维素钠为黏合剂的硅胶 G 薄层板上, 以正己烷-乙酸乙酯(4:1)为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 喷以 10% 氢氧化钾甲醇溶液, 置紫外灯(365 nm)下检视。供试品色谱中, 在与对照品色谱相应的位置上, 显 2 个相同颜色的荧光斑点, 阴性对照样品溶液不显斑点。

**2.1.2 淫羊藿的鉴别**<sup>[2]</sup> 取本品 10 片, 除去薄膜衣, 研细, 加乙醇 20 mL, 温浸 30 min, 滤过, 滤液蒸干, 残渣加少量甲醇润湿, 加水 2 mL 使溶解, 通过 D101 型大孔吸附树脂(内径 1.5 cm, 柱高 10 cm)上, 以 3 mL  $\cdot$  min<sup>-1</sup> 的流速, 分别用水、30% 乙醇各 50 mL 洗脱, 再用 70% 乙醇洗脱, 收集 70% 乙醇洗脱液 50 mL, 蒸干, 残渣加 1 mL 甲醇使溶解, 作为供试品溶液, 另取淫羊藿苷对照品, 加甲醇制成每 1 mL 含 0.2 mg 的溶液, 作为对照品溶液。再取不含淫羊藿的阴性样品, 制备阴性对照溶液。吸取上述 3 种溶液各 10  $\mu\text{L}$ , 分别点于同一以羧甲基纤维素钠为黏合剂的硅胶 H 薄层板上, 以乙酸乙酯-丁酮-甲酸-水(10:1:1:1)为展开剂, 展开, 取出, 晾干。喷以  $\text{AlCl}_3$  试液, 置紫外灯(365 nm)下检视, 供试品色谱中, 在与对照品色谱中相应位置上, 显相同颜色的荧光斑点, 阴性对照样品溶液不显斑点。

### 2.2 含量测定

[收稿日期] 2010-05-04

[通讯作者] \* 陈洪英, 主管药师, 从事新药开发及质量标准的研究, Tel: 0377-63536961, E-mail: yfbwanxi@163.com