

HPLC 测定乙肝解毒口服液中柯里拉京和没食子酸的含量

窦志华^{1*}, 施忠¹, 吴陈军²

(1. 南通大学附属南通第三医院, 江苏 南通 226006; 2. 南通药品检验所, 江苏 南通 226006)

[摘要] 目的: 建立乙肝解毒口服液中柯里拉京和没食子酸含量测定方法。方法: 采用高效液相色谱法, Diamonsil C₁₈ (4.6 mm × 150 mm, 5 μm) 色谱柱, 乙腈-0.1% 磷酸(12:88) 为流动相, 流速 1.0 mL · min⁻¹, 柱温 30 ℃, 检测波长 274 nm。结果: 柯里拉京线性范围 0.274 ~ 1.918 μg (r=0.999 9), 平均回收率 96.55% (n=6); 没食子酸线性范围 0.196 ~ 1.372 μg (r=0.999 9), 平均回收率 97.91% (n=6)。结论: 该法快速、简便、准确、专属性强, 可用于乙肝解毒口服液中柯里拉京和没食子酸的含量测定。

[关键词] 乙肝解毒口服液; 柯里拉京; 没食子酸; 含量测定; 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)10-0071-03

Determination of Corilagin and Gallic Acid in Yiganjiedu Oral Liquid by HPLC

DOU Zhi-hua^{1*}, SHI Zhong¹, WU Chen-jun²

(1. Nantong Third Affiliated Hospital, Nantong University, Jiangsu Province Nantong 226006, China;

2. Nantong Institute for Drug Control, Jiangsu Province Nantong 226006, China)

[Abstract] Objective: To establish a method for the determination of corilagin and gallic acid in Yiganjiedu oral liquid. **Method:** A HPLC method was developed. A Diamonsil C₁₈ column (4.6 mm × 150 mm, 5 μm) was used, with the mobile phase of acetonitrile-0.1% phosphonic acid (12:88), and flow rate of 1.0 mL · min⁻¹. The column temperature was at 30 ℃ and the detection wavelength was at 274 nm. **Result:** The linear range of corilagin was 0.274-1.918 μg (r=0.999 9), the mean recovery was 96.55% (n=6); that of gallic acid was 0.196-1.372 μg (r=0.999 9), the mean recovery was 97.91% (n=6). **Conclusion:** This method is quick, simple, accurate and specific, and can be used for determination of corilagin and gallic acid in Yiganjiedu oral liquid.

[Key words] Yiganjiedu oral liquid; corilagin; gallic acid; content determination; HPLC

乙肝解毒口服液是治疗慢性乙型肝炎的科研制剂, 处方由叶下珠、重楼、黄芪、柴胡、丹参、甘草组成。该制剂原质量标准中仅有柴胡和重楼皂苷类成分及丹参水溶性酚类成分的鉴别, 对君药叶下珠没有有效的质量控制内容。叶下珠为大戟科叶下珠属 (*Phyllanthus*) 植物, 是乙肝解毒口服液的主药, 主要含黄酮类、木脂素类、生物碱类、鞣质等多种成分^[1], 有文献报道柯里拉京(鞣料云实精) 为主要活性成

分, 具抗乙肝病毒活性^[2], 而没食子酸为其主要指标性成分^[3]。因此, 以柯里拉京和没食子酸为指标建立 HPLC 测定制剂中含量的方法对完善该制剂质量标准具有重要意义。

1 材料

1.1 仪器 Agilent 1100 Series 高效液相色谱仪 (配四元泵、脱气装置、自动进样器、DAD 检测器), HP ChemStation 工作站 (美国 Agilent 公司); BOLONG-USC502 超声清洗器 (上海波龙电子设备有限公司); Milli-Q 超纯水系统 (法国 Millipore 公司); Sartorius BP211D 型电子天平 (德国赛多利斯公司)。

1.2 试剂与药品 没食子酸 (中国药品生物制品检

[收稿日期] 2009-12-21

[通讯作者] * 窦志华, 主任中药师, 硕士生导师, 主要从事中药药效物质基础研究; Tel: 0513-85116018, E-mail: zhihuadou@163.com

定所,批号 0831-9501),柯里拉京(购自北京中日友好医院,HPLC 测定其含量为 98.53%);乙肝解毒口服液及其叶下珠阴性制剂由本院制剂室制备;乙腈(色谱纯,德国 Merck 公司),其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件及系统适用性试验 Diamonsil

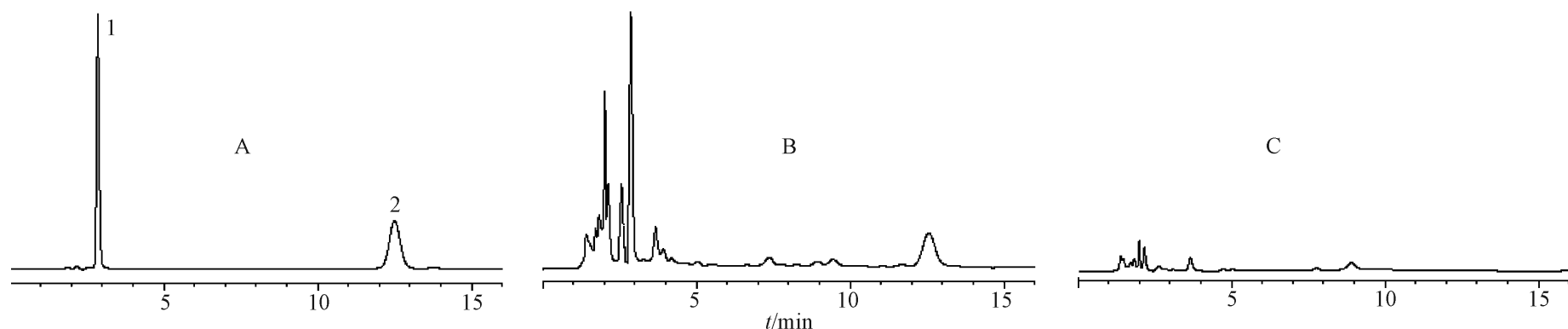


图 1 对照品(A)、样品(B)、阴性样品(C) 色谱图

1. 没食子酸; 2. 柯里拉京

2.2 溶液的制备

2.2.1 供试品溶液的制备 精密量取乙肝解毒口服液 3.0 mL, 置 10 mL 量瓶中, 加无水乙醇至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.2.2 对照品溶液的制备 分别精密称取没食子酸对照品 19.6 mg 置 50 mL 量瓶中、柯里拉京对照品 13.7 mg 置 25 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 作为对照品贮备液。分别取贮备液各 2.0 mL 混匀即得对照品溶液。

2.2.3 阴性样品溶液的制备 原处方去除叶下珠制备叶下珠阴性口服液, 同“供试品溶液的制备”方法制备阴性供试品溶液。

2.3 方法学考察

2.3.1 线性关系考察 分别精密吸取对照品溶液 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 μ L 进样, 测定峰面积, 以峰面积 Y 对进样量 X (μ g) 求得线性回归方程。没食子酸 $Y = 7.57 \times 10^3 X + 73.45$, $r = 0.9999$, 线性范围 0.196 ~ 1.372 μ g; 柯里拉京 $Y = 4.24 \times 10^3 X + 57.61$, $r = 0.9999$, 线性范围 0.274 ~ 1.918 μ g。

2.3.2 精密度试验 精密吸取对照品溶液 4 μ L, 重复进样 6 次, 测定没食子酸和柯里拉京峰面积积分值, 其 RSD 分别为 1.62% 和 0.55%。

2.3.3 稳定性试验 精密吸取同一份供试品溶液 5 μ L, 分别于 0, 1, 3, 6, 12 h 进样, 测定没食子酸和柯里拉京峰面积积分值, 其 RSD 分别为 0.20% 和 2.86%。

2.3.4 重复性试验 取乙肝解毒口服液(080318), 按 2.3 项下方法制备溶液 5 份, 分别进样 5 μ L, 测定没食子酸和柯里拉京峰面积积分值, 其 RSD 分别为

TMC₁₈ 色谱柱(4.6 mm \times 150 mm, 5 μ m), 乙腈-0.1% 磷酸(12 : 88) 为流动相, 流速 1.0 mL \cdot min⁻¹, 检测波长 274 nm, 柱温 30 $^{\circ}$ C。在选定条件下, 没食子酸、柯里拉京和样品中其他组分色谱峰可达基线分离, 且与其他相邻色谱峰分离度大于 1.5, 按没食子酸、柯里拉京计算, 理论板数均不低于 5 000。见图 1。

0.95%, 1.29%。

2.3.5 加样回收率试验 精密吸取已测定含量的乙肝解毒口服液(061212) 1.5 mL 6 份, 分别精密添加没食子酸对照品贮备液 2.2, 2.8, 3.0 mL, 柯里拉京对照品贮备液 0.5, 0.6, 0.7 mL, 每量级 2 份, 置 10 mL 量瓶中, 按 2.2.1 项下方法制成溶液, 进样 5 μ L 进行测定, 计算回收率见表 1, 2。

表 1 没食子酸加样回收率试验

No.	样品中量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
1	1.119 8	0.862 4	1.974 7	99.13	97.91	0.91
2	1.119 8	0.862 4	1.962 8	97.76		
3	1.119 8	1.097 6	2.180 1	96.61		
4	1.119 8	1.097 6	2.195 7	98.03		
5	1.119 8	1.332 8	2.417 2	97.35		
6	1.119 8	1.332 8	2.433 6	98.58		

表 2 柯里拉京加样回收率试验

No.	样品中量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
1	0.335 6	0.274 0	0.595 4	94.84	96.55	2.89
2	0.335 6	0.274 0	0.607 7	99.32		
3	0.335 6	0.328 8	0.648 8	95.26		
4	0.335 6	0.328 8	0.645 4	94.25		
5	0.335 6	0.383 6	0.722 4	100.84		
6	0.335 6	0.383 6	0.699 3	94.81		

2.4 样品测定 取 3 个批号的样品, 制备供试品溶液, 注入液相色谱仪, 测定没食子酸和柯里拉京峰面积并计算含量, 结果见表 3。

(下转第 75 页)

芪归合剂质量标准

邢桂荣*, 潘晖

(河北省唐山市第二医院, 河北 唐山 063000)

[摘要] 目的: 建立芪归合剂的质量标准。方法: 采用薄层色谱法对芪归合剂中黄芪、当归进行定性鉴别, 采用高效液相色谱法测定阿魏酸的含量。色谱条件 Thermo ODS 柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 柱温为 30°C; 流动相为乙腈-0.085% 磷酸溶液(17:83); 流速为 1.0 mL·min⁻¹; 检测波长为 320 nm; 进样量为 20 μL。结果: 黄芪、当归的定性鉴别重复性好, 专属性强, 方法简便。阿魏酸在 0.03~0.484 μg 线性关系良好($r=0.9964$); 回收率 99.10%, RSD 1.3% ($n=5$)。结论: 该方法简便, 结果准确, 重复性好, 可用于芪归合剂的质量控制。

[关键词] 芪归合剂; 薄层色谱法; 高效液相色谱法; 阿魏酸

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)10-0073-03

芪归合剂由《证治全生集》“十宝散”加减而成, 由黄芪、当归、赤芍、西红花等 13 味中药材经加工而成。具有养血活络, 强筋壮骨之功效, 临床上用于跌打损伤、筋络挛痛, 四肢损伤中期的治疗。为建立其质量控制方法, 保证临床疗效。本实验采用薄层色谱法对方中君药黄芪、当归进行定性鉴别, 采用高效液相色谱法测定当归的有效成分阿魏酸的含量。结果表明, 采用的定性定量检验方法能够有效控制芪归合剂的质量。

1 仪器与试药

ZF-2 型三用紫外仪, 硅胶 G(青岛海洋化工厂), Tsp-100 高效液相色谱仪, UV100 检测器, N2000 工作站, ZJ18-1 日本岛津电子分析天平。阿魏酸对照品(含量测定用, 批号 110773-200611)、黄芪对照药材(批号 120974-200407)、当归对照药材(批号 120927-200411)均购自中国药品生物制品检定所, 芪归合剂(本院自制), 甲醇、乙腈为色谱纯, 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 薄层色谱定性鉴别

2.1.1 黄芪的薄层鉴别 取本品 30 mL 加乙醇 60 mL 静置过滤, 滤液挥干乙醇, 浓缩至稠膏状, 残渣加 0.3% NaOH 溶液 15 mL 溶解, 滤过, 滤液用稀盐酸调 pH 至 5~6, 用乙酸乙酯 15 mL 提取, 分取乙酸乙

酯液, 用铺有适量无水硫酸钠的滤纸滤过, 滤液蒸干。残渣加乙酸乙酯 1 mL 使溶解, 作为供试品溶液。另取黄芪对照药材 2 g, 加乙醇 30 mL, 超声处理 40 min, 滤过, 滤液蒸干, 残渣加 0.3% NaOH 15 mL 溶解, 滤过。滤液用稀盐酸调 pH 至 5~6, 用乙酸乙酯 15 mL 提取, 分取乙酸乙酯液, 用铺有适量无水硫酸钠的滤纸滤过, 滤液蒸干。残渣加乙酸乙酯 1 mL 使溶解, 作为对照药材溶液。取缺黄芪的阴性样品溶液, 同供试品溶液的制备方法, 制成阴性对照溶液。按照薄层色谱法^[1], 分别吸取上述溶液各 10 μL, 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 以三氯甲烷-甲醇(10:1)为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 置氨蒸气中熏后置紫外光灯(365 nm)下检视, 供试品色谱中, 在与对照药材色谱相应的位置上, 显相同颜色的荧光主斑点, 阴性对照色谱无相应斑点。

2.1.2 当归的薄层鉴别^[1] 取本品 70 mL, 用乙醚振摇提取 3 次, 每次 40, 30, 20 mL, 合并乙醚液, 乙醚液低温挥干, 残渣加无水乙醇 1 mL 溶解作为供试液。取当归对照药材 0.5 g, 加乙醚 20 mL, 超声 10 min, 过滤, 滤液挥干乙醚, 残渣加无水乙醇 1 mL 溶解, 作为当归的对照药材溶液。取缺当归的阴性样品溶液, 同供试品溶液的制备方法, 制成阴性对照溶液。按照薄层色谱法^[1], 分别吸取上述溶液各 10 μL, 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 以正己烷-醋酸乙酯(4:1)为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 置紫外光灯(365 nm)下观察。供试品色谱中, 在与对照药材色谱相应的位置上, 显相同颜色的荧光斑点, 阴性对照色谱无相应斑点。

[收稿日期] 2010-01-04

[通讯作者] * 邢桂荣, 主任药师, 从事医院药学工作, Tel: 0315-2058105, E-mail: yjs601026@163.com