

## 黄杨宁片及原料中环维黄杨星 D 含量测定的 3 种 HPLC 方法评价

郭青<sup>1,2</sup>, 吕霞<sup>1</sup>, 伍乃英<sup>2</sup>, 狄留庆<sup>3</sup>, 余伯阳<sup>1</sup> (1.中国药科大学, 南京 210009; 2.江苏省食品药品检验所, 南京 210008; 3.南京中医药大学, 南京 210046)

**摘要:** 目的 通过比较环维黄杨星 D 的 3 种高效液相色谱测定方法, 对方法准确性、中间精密度和实用性作出评价, 以筛选出适合作为药典标准的方法。方法 分别采用 SiO<sub>2</sub> 柱正相高效液相色谱 ELSD 检测法、NH<sub>2</sub> 柱正相高效液相色谱末端检测法、C<sub>18</sub> 柱反相离子对高效液相色谱末端检测法分别对黄杨宁片及原料进行测定, 比较其色谱行为、含量、灵敏度、中间精密度和准确性, 并给出评价。结果 3 种方法使原料分离出的最多峰数分别为 8, 10, 14 个; 回收率( $n=9$ )分别为 96.38% (RSD=2.6%)、75.24% (RSD=3.2%)、97.97% (RSD=1.1%); 不同仪器上的含量中间精密度 RSD( $n=3$ )片剂分别为 3.9%, 7.1%, 4.0%, 原料分别为 3.5%, 4.3%, 4.7%。结论 3 种方法中, 综合准确性、中间精密度、实用性等方面因素, C<sub>18</sub> 柱反相离子对色谱末端检测法为最佳, 适合作为药典方法。

**关键词:** 黄杨宁片; 环维黄杨星 D; 高效液相色谱法; 药典

中图分类号: R917.101; R927.2 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2009)11-0929-05

### Evaluation on Three HPLC Methods on the Determination of Cyclovirobuxium D in Huangyangning Tablets and Raw Materials

GUO Qing<sup>1,2</sup>, LÜ Xia<sup>1</sup>, WU Naiying<sup>2</sup>, DI Liuqing<sup>3</sup>, YU Boyang<sup>1</sup> (1.China Pharmaceutical University, Nanjing 210009; 2.Jiangsu Institute for Food and Drug Control, Nanjing 210008; 3.Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210046 China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To screen out the most reliable and accurate method for Ch.P by comparison on three HPLC methods on the determination of cyclovirobuxium D and evaluation on the method's accuracy, intermediate precision and practicability. **METHODS** NP-HPLC method with SiO<sub>2</sub> column and ELSD detection, NP-HPLC method with NH<sub>2</sub> column and end-wavelength detection, and ion-pair RP-HPLC method with C<sub>18</sub> column and end-wavelength detection were employed to determine cyclovirobuxium D in huangyangning tablets and raw materials, the method evaluation was given following the chromatographic features, content results, method sensitivities, accuracy and intermediate precision which were compared. **RESULTS** The raw materials separated by 3 methods could substantially occur 8, 10 and 14 peaks respectively, the recoveries ( $n=9$ ) were 96.38% (RSD=2.6%), 75.24% (RSD=3.2%) and 97.97% (RSD=1.1%), and the intermediate precision of instruments expressed as RSD ( $n=3$ ) were 3.9%, 7.1%, 4.0% for tablets and 3.5%, 4.3%, 4.7% for raw materials. **CONCLUSION** Among 3 methods, in terms of accuracy, intermediate precision and practicability, the ion-pair RP-HPLC method performed best. Therefore it could be adopted as a pharmacopoeia method.

**KEY WORDS:** Huangyangning tablets; cyclovirobuxium D; HPLC; pharmacopoeia

环维黄杨星 D 是从黄杨科植物小叶黄杨 (*Buxus microphylla* Sieb. et Zucc. Var. *sinica* Rehd. et Wils.) 及其同属植物中提取精制的生物碱, 黄杨宁片是以环维黄杨星 D 为原料由我国自主研发开发的用于心血管疾病的药物, 疗效优良, 十分受市场青睐。黄杨宁和环维黄杨星 D 分别被 2000 年和 2005 年版中国药典收载<sup>[1-2]</sup>。近年来发现药典标准所采用的滴定法和酸性染料比色法所测定的是总生物碱含量, 而市售原料的环维黄杨星 D 纯度只有 55%~

85%<sup>[3-4]</sup>, 因而采用药典方法测得的数据不能真实反映原料和片剂中的环维黄杨星 D 含量。自错误发现以来, 针对片剂和原料以及药材中环维黄杨星 D 的各种分析测定方法相继被报道<sup>[5-10]</sup>。但由于原料中导致纯度不高的组分在结构上与环维黄杨星 D 极其相似, 且环维黄杨星 D 只具末端吸收, 从而给可行而准确的测定方法建立带来了一定难度。笔者在筛选药典方法过程中, 新建立了反相离子对高效液相色谱法, 并选择了包括新建方法在内的 3 种较成熟

基金项目: 国家药典委员会 2010 版中国药典修订项目(ZH-048,TS-25)

作者简介: 郭青, 女, 博士, 主任药师 Tel: (025)86632807 E-mail: guoqing850@yahoo.cn

的高效液相色谱法,对片剂和原料的色谱行为、环维黄杨星 D 的含量结果、方法的灵敏度、准确性和重现性等进行了细致比较,并作出综合评价,为 2010 年版药典中环维黄杨星 D 的有关生物碱检查及含量测定,黄杨宁片的含量和含量均匀度测定方法的修订奠定了基础。

## 1 仪器与试剂

Waters 2996(DAD)高效液相色谱仪(美国), Agilent 1200 高效液相色谱仪(美国), Shimadzu LC 10AD 高效液相色谱仪(日本), Alltech2000 蒸发光散射检测器(瑞士), JL-720DT 超声波清洗仪(上海杰理超声仪器有限公司,功率 250 W,频率 40 kHz), Precisa 92SM-202A 电子天平(瑞士 Precisa 仪器有限公司)、Satorius BS21S 电子天平(北京赛多利斯天平有限公司)。色谱柱: Phenomenex luna C<sub>18</sub>(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 庚烷磺酸钠为分析纯,由日本东京化学工业株式会社出品,磷酸二氢钾为分析纯,由南京化学试剂一厂出品,四氢呋喃、乙腈和甲醇均为色谱纯,水为超纯水,其余试剂均为分析纯。规格为 0.5 mg·片<sup>-1</sup>和 1 mg·片<sup>-1</sup>的黄杨宁片和原料分别由 6 家制药公司提供;环维黄杨星 D 对照品(中国药品生物制品检定所,批号: 888-200001, 888-200202,纯度: 97.6%),环维黄杨星 D 对照品(南京小营制药厂,纯度: 99.6%,批号: 003)。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

方法一: SiO<sub>2</sub>柱分离,柱温 30 ℃,流动相为四氢呋喃-甲醇-乙腈-氨水(47:32:19:2); ELSD 检测,飘移管温度 90 ℃,雾化气(空气)流速 1.7 L·min<sup>-1</sup>。方法二: NH<sub>2</sub>柱分离,柱温 30 ℃,流动相为 0.05%磷酸氢二钾溶液-乙腈(10:90),检测波长 206 nm。方法三: C<sub>18</sub>柱分离,柱温 30 ℃,流动相为 0.01 mol·L<sup>-1</sup>庚烷磺酸钠与 0.01 mol·L<sup>-1</sup>磷酸二氢钾等量混合溶液(含 0.2%三乙胺,用磷酸调 pH 3.5)-乙腈(77:23),检测波长 206 nm。上述 3 种方法的流速为 1.0 mL·min<sup>-1</sup>,进样 20 μL,理论板数按环维黄杨星 D 峰计算,分别不低于 3 000、5 000 和 7 000。

### 2.2 供试品溶液制备

原料含量:取适量,精密称定,置量瓶中,加流动相适量,超声 10 min 使溶解,用流动相稀释使成浓度为 0.5 mg·mL<sup>-1</sup>的溶液,摇匀。

片剂含量:取 20 片,精密称定,研细,取粉末

适量(约相当于环维黄杨星 D 1 mg),精密称定,置 10 mL 量瓶中,加流动相适量,超声 10 min,取出,用流动相稀释至刻度,摇匀,离心(4 000 r·min<sup>-1</sup>) 10 min,取上清液。

提取溶剂的选择:对于原料,3 种方法的流动相均能全部溶解所称取的样品,且在色谱图上不易出溶剂峰,易于按面积归一化法计算原料含量。其它能全部溶解原料的溶剂还有 0.5%磷酸溶液,甲醇,氯仿。但甲醇和氯仿使片剂中辅料的溶出比流动相更多,导致待测主成分不出峰或出现很小峰;而 0.5%磷酸溶液虽然对片剂中辅料溶出少,但在氨基柱和硅胶柱分析系统中导致主峰峰形更差。因此只有流动相能兼顾原料和片剂的主成分峰形和溶出。

### 2.3 对照品溶液制备

取环维黄杨星 D 对照品,精密称定,加流动相溶解并制成每 1 mL 含 0.5 mg(原料)和 0.1 mg(片剂)的对照品溶液。

### 2.4 色谱行为比较

取片剂和原料分别按“2.2”项下方法制备,分别按 3 种方法进样得高效液相色谱图,见图 1。结果:片剂的 3 种方法色谱图中环维黄杨星 D 均最后出峰,前面的 2 号峰在方法一和二中勉强能与主峰彻底分离,但在方法三中则分离度能达 9 以上,峰形也以方法三为最佳。辅料的溶出,对色谱行为产生了影响,但并不干扰主峰的分离,而辅料溶出量受方法中流动相的影响,流动相还影响片剂中环维黄杨星 D 的溶出量,这已由含量测定结果反映出来,见“2.5”。

原料在方法一中可分出 8 个峰,峰形展宽拖尾;在方法二中可分出 10 个峰,峰形拖尾;在方法三中可分出 14 个峰,尤其在主峰前可分出 4 个小峰,主峰后的 6 号峰也达基线分离,峰形尖锐对称。因此,综合片剂和原料色谱行为,方法三长于环维黄杨星 D 峰的精细分离,能分离出更多的色谱峰,且峰对称性和主峰分离度均好于方法一和二。

### 2.5 方法中间精密度比较

分别取原料(小营 20070401)和片剂(小营 20051006),按“1.2”项下方法制备成供试品溶液,分别在 3 台仪器上测定,结果:方法二片剂相差最大,方法三片剂和原料相差均最小,见表 1。

### 2.6 方法准确性比较

取已测知含量的片剂(小营 20051006)20 片,

研细,取粉末适量(约相当于环维黄杨星 D 0.5 mg),精密称定,分别按 3 个水平精密加入浓度为 0.811 5 mg·mL<sup>-1</sup>的对照品溶液 0.87, 1.09, 1.31 mL,

按“2.2”项下方法制备溶液,每个水平制备 3 份,共制备 9 份,进样测定,计算回收率,结果见表 2,方法一和三均能基本全部回收,方法二则不能。

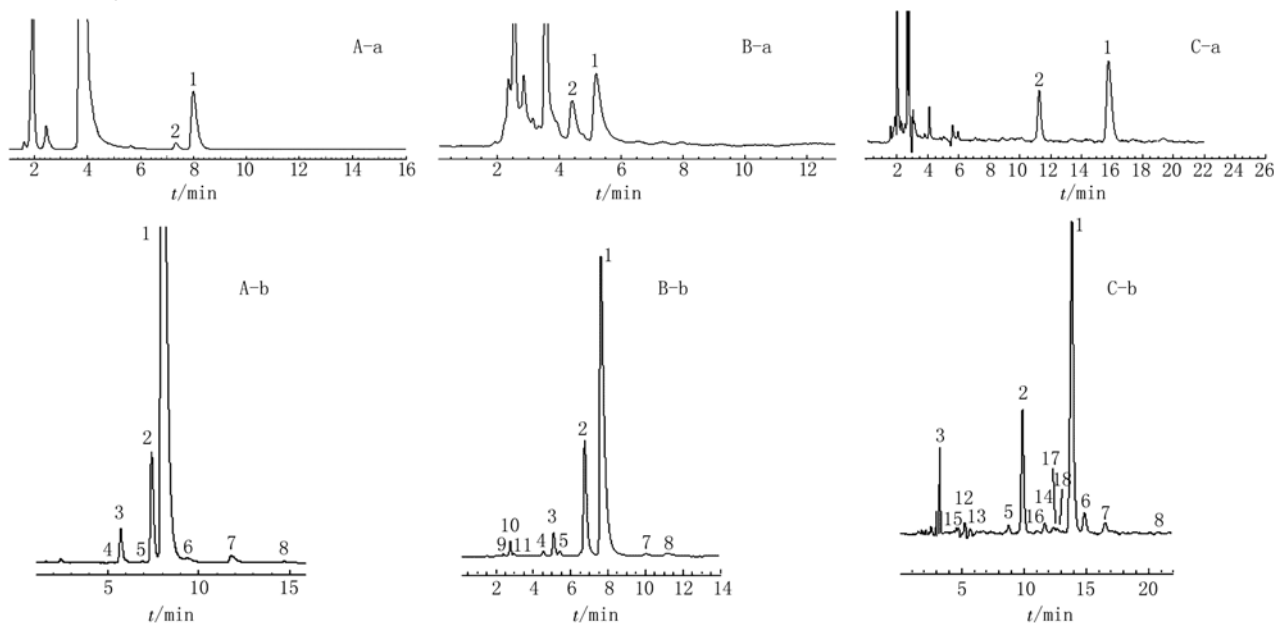


图 1 黄杨宁片和原料高效液相色谱图

A-方法一; B-方法二; C-方法三; a-片剂; b-原料; 1-环维黄杨星 D

Fig 1 HPLC chromatographies of Huangyangning tablets and raw materials

A-method 1; B-method 2; C-method 3; a-tablets; b-raw materials; 1-cyclovirobuxin D

表 1 中间精密度试验结果(n=3)

Tab 1 Results of intermediate precision (n=3)

仪器	方法一		方法二		方法三	
	原料/%	片剂/mg·g <sup>-1</sup>	原料/%	片剂/mg·g <sup>-1</sup>	原料/%	片剂/mg·g <sup>-1</sup>
Waters 2996			84.77	4.408 0	79.29	5.312 4
Agilent 1200	91.90	5.272 9	89.64	4.623 5	82.92	5.383 5
Shimadzu LC10AD(1)	89.92	5.042 0	82.41	4.012 7	86.84	5.722 6
Shimadzu LC10AD(2)	96.23	4.876 9				
平均	94.68	5.063 9	85.61	4.348 1	81.11	5.348 0
RSD/%	3.48	3.93	4.31	7.12	4.66	4.01

表 2 回收率试验结果(n=9)

Tab 2 Results of recoveries (n=9)

方法	回收率/%	RSD/%
方法一	96.38	2.6
方法二	75.24	3.2
方法三	97.97	1.1

## 2.7 方法灵敏度比较

黄杨宁片在药典中需检查含量均匀度,小规格的片剂一片只有 0.5 mg 环维黄杨星 D,而各厂家的片重又各不相同,在 0.07~0.21 g·片<sup>-1</sup>之间。由于提取溶剂需控制一定的比例才能确保提取完全,因而对于较重的片,溶剂加入的体积也需较多,这就使得溶液中环维黄杨星 D 浓度也较稀。方法的灵敏度是否能保证这种稀浓度下的准确定量,浓度稀到何种程度既能满足回收率又能满足方法灵敏度,均

须通过定量限实验来验证。取对照品溶液加流动相稀释至 S/N 约等于 3 和 10,连续进样 5 次,检测限(LOD)和定量限(LOQ)分别以 S/N=3 和 10 时的进样量(ng)表示。结果见表 3,3 种方法均可满足片剂的含量均匀度测定,方法一灵敏度最高,方法二比方法三灵敏度稍低。当浓度为 0.1 mg·mL<sup>-1</sup>的溶液进样 20 μL 时,方法三的分析量可达定量限的 10 倍。

表 3 检测限和定量限结果(n=5)

Tab 3 Results of LODs and LOQs (n=5)

结果	方法一		方法二		方法三	
	ng	RSD/%	ng	RSD/%	ng	RSD/%
LOD	10.20	2.4	67.36	6.9	51.90	6.6
LOQ	34.10	2.7	221.54	7.5	200.20	3.4

## 2.8 含量测定结果比较

取片剂和原料分别按“2.2”项下方法制备,每

批制备 2 份, 每份测定 2 次, 原料分别按外标一点法和面积归一化(未按成分的不同吸收系数折算)法计算, 片剂按外标一点法计算。结果见表 4、5, 3 个厂家的 5 批原料以及 6 个厂家的共 12 批片剂用 3 种方法测定的环维黄杨星 D 含量结果彼此均不一

致, 原料中方法三数据最低, 但片剂中方法一数据最低。

## 2.9 方法评价

对 3 种方法的准确性、中间精密度和实用性方面作出评价, 见表 6。

表 4 原料含量测定结果(n=4)

Tab 4 Determination results of raw materials (n=4)

厂家	批号	外标校正因子法/%			面积归一化法/%		
		方法一	方法二	方法三	方法一	方法二	方法三
通化金马药业	*	86.67	86.32	82.06	90.36	77.32	67.31
河南龙都药业	040312	86.87	88.35	81.94	91.00	77.60	68.59
南京小营制药	20070401	91.90	84.77	79.23	88.57	72.65	62.00
	20070402	88.69	85.32	78.11	88.93	72.74	62.19
	20050801	92.03	85.97	79.95	88.63	71.60	63.20

表 5 片剂含量测定结果(n=4)

Tab 5 Determination results of tablets (n=4)

厂家	批号	规格 /mg·片 <sup>-1</sup>	含量/mg·片 <sup>-1</sup>			按标示量计/%		
			方法一	方法二	方法三	方法一	方法二	方法三
开封白云制药	20050903	0.5	0.253 6	0.062 4	0.322 0	50.72	12.47	64.40
	20070610	0.5	0.263 8	0.074 5	0.355 4	52.76	14.90	71.07
通化金马药业	20080202	0.5	0.395 4	0.250 6	0.430 0	79.08	50.12	85.99
	20080204	0.5	0.402 1	0.260 4	0.451 0	80.42	52.08	90.19
陕西雪龙海姆普得药业	0707003	1.0	0.770 6	0.546 2	0.693 7	77.06	54.62	69.37
	0801001	0.5	0.379 3	0.210 2	0.323 1	75.86	42.05	64.61
河南龙都药业	050601	0.5	0.372 3	0.144 7	0.393 5	74.46	28.94	78.70
	080302	0.5	0.383 9	0.132 1	0.418 9	76.78	26.41	83.77
南京小营制药	20051006	1.0	0.732 2	0.612 1	0.766 6	73.22	61.21	76.66
	20080101	0.5	0.366 0	0.321 4	0.387 3	73.20	64.27	77.45
浙江天一堂药业	071014	1.0	0.732 5	0.612 1	0.796 4	73.25	61.21	79.64
	080115	1.0	0.740 4	0.628 8	0.802 4	74.04	62.88	80.24

表 6 方法评价结果

Tab 6 Evaluation results on the methods

评价项目	方法一	方法二	方法三
样品前处理	流动相不适合提取片剂	流动相不适合提取片剂	流动相适合提取片剂
色谱分离	原料可分出最多 8 个峰	原料可分出最多 10 个峰	原料可分出最多 14 个峰
主峰与前一峰分离度	>0.9	>2.2	>9.0
主峰与后一峰分离度	未完全分开, >1.1	未分开	完全分开, >1.7
峰对称性	1.6~2.6	2.0~2.7	0.8~1.4
柱效要求	≥3 000	≥5 000	≥5 000
含量结果	原料最高, 片剂偏低	原料偏高, 片剂最低	原料最低, 片剂最高
中间精密度	原料和片剂均一般	原料一般, 片剂较差	原料和片剂均一般
准确性	回收率高, 但含量数据受片剂辅料影响	回收率较低, 含量数据非常受片剂辅料影响	回收率高, 含量数据几乎不受片剂辅料影响
灵敏度	最高, 能满足含量均匀度测定	最低, 能满足含量均匀度测定	适中, 能满足含量均匀度测定
实用性	欲实现重现性良好, 流动相比例及仪器参数需不断调整。含碱使柱冲洗不方便, 柱效寿命有限。	流动相中水相比比例太低, 自动吸取的准确性达极限。含盐使柱冲洗不方便, 柱效下降快。分离对柱效要求较高。	离子对流动相使柱平衡和柱冲洗均延长时间, 但可用 100%水相冲洗, 只要冲洗彻底, 柱效可保持长寿命。分离对柱效要求并不高。

## 3 讨论

片剂辅料在方法一和方法二的流动相中有较强溶解, 而在方法三的流动相中溶解很弱。实验发现, 流动相的脂溶性和碱性越强, 辅料溶解性越强, 表现在 4 min 左右出现很强的辅料色谱峰。而且辅

料的溶解影响环维黄杨星 D 的溶出, 不同厂家所使用的不同辅料在同一种流动相中表现出不同的溶解性, 环维黄杨星 D 的测定结果也偏离不同, 表现为辅料峰越大, 环维黄杨星 D 测定结果越低。表 7 中所显示的开封白云的片剂含量结果在方法一和

二中比其他厂家低很多,而方法二又比方法一低很多,这表明开封白云所使用的辅料大大不同于其他厂家,在方法二的流动相中溶解性非常大(出现非常大的辅料色谱峰),使得环维黄杨星 D 的溶出非常低(峰非常小)。因此,由于辅料的存在,方法一和二流动相并不适合片剂中环维黄杨星 D 的提取。这种情况下,如果改为酸性水溶液提取,辅料溶解的问题得以解决,但峰形展宽拖尾更为严重而影响分离。辅料在流动相对环维黄杨星 D 溶出的影响还表现在表 2 中偏低的回收率,如果采用开封白云的片剂进行实验,则数据更低。

原料在方法一和二流动相中均溶解良好,在方法二流动相中需降低乙腈比例至 70%方可通过超声而全部溶解。但方法一和二在原料分离上仍不彻底,最关键的在于主峰前面的 14 号峰及后面的 6 号峰均未分离出来。

总之,方法一和二对片剂的提取存在问题,对原料的分离不彻底。此外, SiO<sub>2</sub> 柱和 NH<sub>2</sub> 柱对盐碱等改性剂的冲洗也不如 C<sub>18</sub> 柱方便。其他不足还在于主峰的严重不对称,与前一峰的分度度欲保证在 1.5 以上,对柱效要求较高。相比较,方法三在这些方面均表现优良,并能满足片剂的含量均匀度测定。

**致谢:**中国药科大学药物分析教研室杭太俊教授提供方法二具体内容。

## REFERENCES

- [1] Ch.P(2005)Vol I (中国药典 2005 年版.一部)[S]. 2005: 276, 591.
- [2] Ch.P(2000)Vol I (中国药典 2000 年版.一部)[S]. 2000: 153, 575.
- [3] XU X J, ZHANG Z X, AN D G, et al. Establishment of the control of cyclovirobuxine D [J]. Tradit Chin Drug Res Clin Pharm (中药新药与临床药理), 2004, 15(2): 110-112.
- [4] HU G Q, XU Q T, ZHANG B G, et al. An improved separation method of cyclovirobuxine D from the total alkaloids of Buxus [J]. Chin J Nat Med (中国天然药物), 2004, (3): 155-156.
- [5] XU X J, ZHANG Z X, SHENG L S, et al. Determination of cyclovirobuxine D by RP-HPLC with precolumn fluorescent derivatization [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2002, 37(5): 359-361.
- [6] XIE J, YU Z G, XU X S, et al. Determination of cyclovirobuxine D by ion pair RP-HPLC [J]. Chin J Pharm Anal (药物分析杂志), 2006, 26(7): 888-890.
- [7] XIE J, YU Z G, XU X S, et al. Determination of cyclovirobuxine D in Lignum Buxus by ion pair RP-HPLC[J]. Chin Tradit Herbal Drugs (中草药), 2005, 36(11): 1726-1727.
- [8] CHEN Y, FAN X J, GONG Q. Determination of cyclovirobuxine-D in Huangyangning tablets by RP-HPLC with gradient elution [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2006, 31(14): 1155-1157.
- [9] LIU J, HANG T J, ZHANG Z X. Isolation and identification of two related alkaloids in Huangyangning [J]. Chin Tradit Herbal Drugs (中草药), 2006, 37(11): 1614-1618.
- [10] YU P, ZOU L M, LIU W Y, et al. High performance liquid chromatography-tandem mass spectrometric determination of cyclovirobuxine D in human plasma [J]. J Pharm Biomed Anal, 2007, 42(4): 488-493.

收稿日期: 2009-02-16