

· 检验检测 ·

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2018.22.011

高效液相色谱法测定大黄滴眼液中黄芩苷含量*

林梦¹, 蒋斌¹, 张华峰², 王玳珠^{1△}, 吴庆瑜³

(1. 南京中医药大学苏州附属医院·苏州市中医医院, 江苏 苏州 215000; 2. 江苏省苏州市药品检验检测研究中心, 江苏 苏州 215000; 3. 江苏省苏州市体育运动学校, 江苏 苏州 215000)

摘要:目的 建立测定大黄滴眼液中黄芩苷含量的高效液相色谱(HPLC)法。方法 色谱柱为 Waters Symmetry C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-水-冰醋酸(45:55:1), 流速为 1.0 mL/min, 检测波长为 315 nm, 进样量为 10 μL。结果 黄芩苷质量浓度在 21.787 9~435.758 4 μg/mL 范围内与峰面积线性关系良好($r^2=0.999\ 9$), 平均回收率为 103.65%, RSD 为 1.89% ($n=9$)。结论 该方法操作简便、灵敏度高、结果准确稳定, 分离效果好, 可用于大黄滴眼液中黄芩苷的含量测定。

关键词: 大黄滴眼液; 黄芩苷; 高效液相色谱法; 含量测定

中图分类号: R927.2; R917

文献标识码: A

文章编号: 1006-4931(2018)22-0037-03

Content Determination of Baicalin in Dahuang Eye Drops by HPLC

Lin Meng¹, Jiang Bin¹, Zhang Huafeng², Wang Daizhu¹, Wu Qinyu³

(1. The Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Suzhou Hospital of Traditional Chinese Medicine, Suzhou, Jiangsu, China 215000;

2. Suzhou Institute for Drug Control, Suzhou, Jiangsu, China 215000; 3. Suzhou Sport School, Suzhou, Jiangsu, China 215000)

Abstract: **Objective** To establish an HPLC method for the content determination of baicalin in Dahuang Eye Drops. **Methods** Waters Symmetry C₁₈ column(250 mm×4.6 mm, 5 μm) was adopted, the mobile phase was acetonitrile-water-acetic acid(45:55:1), the flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelength was 315 nm, and the sample size was 10 μL. **Results** The baicalin showed a good linear relationship with the peak area in the range of 21.787 9~435.758 4 μg/mL($r^2=0.999\ 9$), the average recovery rate was 103.65%, RSD was 1.89% ($n=9$). **Conclusion** The method is simple, sensitive, accurate and stable, which can be used for the content determination of baicalin in Dahuang Eye Drops.

Key words: Dahuang Eye Drops; baicalin; HPLC; content determination

*基金项目: 2014年度江苏省苏州市中医医院院级青年课题项目[YQN2014012]。

第一作者: 林梦, 女, 硕士研究生, 主管中药师, 研究方向为医院制剂质量标准, (电话)0512-67872594(电子信箱)305235450@qq.com。

△通信作者: 王玳珠, 女, 大学本科, 主任中药师, 研究方向为医院药学, (电话)0512-67872591(电子信箱)wangdz60@sina.com。

试液(即 1 mL)进行试验, 过滤效果较理想, 菌落计数也能顺利进行。取样量减少虽能提高实际操作的可行性, 但影响了计量的准确性。对于抑菌作用较强的样品, 2015 版《中国药典》只给出薄膜过滤法。当然也有离心沉淀法^[13]或采用无菌滤纸、纱布、脱脂棉进行预处理^[14]等非标准处理方法, 这些方法存在准确度、重复性差, 影响因素多, 难以标准化等问题。对于具有抗菌活性的中药固体制剂微生物限度检查计数方法的研究, 还需进一步探索。

参考文献:

- [1] Li YQ. Talking about the problems existing in the sterility test and microbial limit test[J]. Chin Pharm Aff, 2007, 21(12):1011.
- [2] 王曙东, 乔立业, 方李, 等. 保肾片的质量标准研究[J]. 中国药师, 2014, 17(8):1300-1302.
- [3] 乔立业, 方李, 曹燕丽, 等. 高效液相色谱法测定新保肾片中芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚的含量[J]. 药学实践杂志, 2015, 33(5):438-430.
- [4] 钱文慧, 廖欣, 汪玥, 等. 炎黄保肾胶囊的质量控制研究[J]. 解放军药学报, 2015, 31(1):46-48.
- [5] 王曙东, 钱文慧, 黄鲁, 等. 高效液相色谱法测定新肾炎胶囊

中蒽醌类化合物的含量[J]. 医药导报, 2015, 34(4):509-511.

- [6] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015:23.
- [7] 江苏新医学院. 中医学[M]. 南京: 江苏人民出版社, 1972:148.
- [8] 岳云升, 李仲兴, 王秀华, 等. 用新方法进行大黄对 308 株临床菌株抗菌活性研究[J]. 航空航天医药, 2004, 15(1):16-18.
- [9] Huang XM, Huang H, Ou LM, et al. Antimicrobial activity study of Rhubarb in vitro on the anaerobic bacteria without spores[J]. Chin J Inf Tradit Chin Med, 2001, 8(1):41.
- [10] 徐采凤. 大黄的临床应用[J]. 内蒙古中医, 2014, 33(8):56.
- [11] 穆廷杰, 杨芬兰, 金海红, 等. 连翘等中草药对肺炎克雷伯菌作用的实验研究及临床应用[J]. 西部中医药, 2015, 28(9):19-21.
- [12] 李建红, 黄敏, 薛耀华, 等. 大黄及黄柏提取物体外抗沙眼衣原体活性研究[J]. 中华中医药杂志, 2015, 30(8):2935-2938.
- [13] 周建, 李霞. 药品微生物限度检查法中几种样品前处理方法的可行性研究[J]. 中国药房, 2012, 23(33):3136-3137.
- [14] 苑思坤, 李玉芝, 王红云. 微生物限度检查薄膜过滤法供试液预处理方法探讨[J]. 中国药业, 2010, 19(18):42-43.

(收稿日期: 2018-06-18)

大黄滴眼液由苏州市中医医院眼科自制,集中药理法、西药使用方法于一身,功效为清热解毒,主要用于治疗各种类型的结膜炎,特别是慢性结膜炎,临床研究显示,该药疗效比西药抗生素滴眼液佳。该药主要中药成分为大黄和黄芩,其中黄芩具有抗菌、抗病毒作用,其抑菌的有效成分为黄芩苷^[1-2]。现行大黄滴眼液质量标准中未对黄芩苷进行测定^[3],为提高该制剂质量标准,本研究中结合 2015 年版《中国药典(四部)》^[4]和文献^[5-15],采用高效液相色谱法测定其黄芩苷含量。现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

e2695 型高效液相色谱仪,包括 2998 二极管阵列检测器, Waters Symmetry C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm)(美国 Waters 公司); Milli-Q 型纯水机(美国密理博公司); AG285 型电子分析天平(上海梅特勒-托利多公司); KQ-100VDE 型双频数控超声波清洗机(昆山市超声仪器公司)。

1.2 试药

大黄滴眼液(苏州市中医医院自制,批号分别为 140312, 140324, 140331, 规格为每支 8 mL); 黄芩苷对照品(中国食品药品检定研究院,批号为 110715-201117); 冰醋酸(优级纯,国药集团化学试剂有限公司); 甲醇(色谱纯, Sigma-Aldrich 公司); 水为超纯水; 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

色谱柱: Waters Symmetry C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-水-冰醋酸(45:55:1); 检测波长: 315 nm; 流速: 1.0 mL/min; 进样量: 10 μL。理论板数按黄芩苷峰计应不低于 2 000。

2.2 溶液制备

对照品溶液: 取黄芩苷对照品 12 mg, 精密称定, 置 50 mL 容量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 作为对照品贮备溶液。

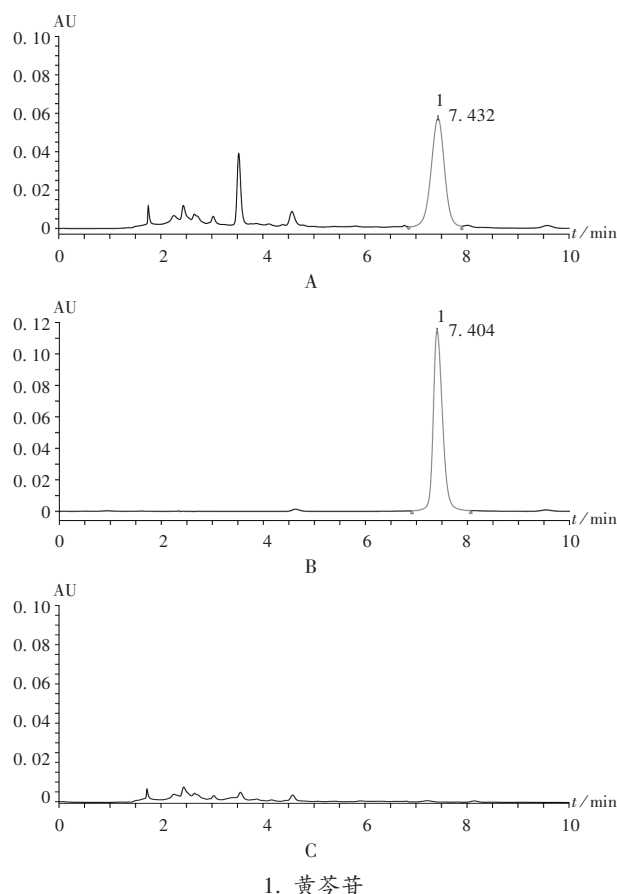
供试品溶液: 精密量取本品 5 mL, 置 25 mL 容量瓶中, 加 70% 甲醇稀释至刻度, 作为供试品溶液。

阴性对照品溶液: 取不含黄芩的阴性样品, 按供试品溶液制备方法制备阴性对照品溶液。

2.3 方法学考察

专属性试验: 取 2.2 项下 3 种溶液, 按 2.1 项下色谱条件进样, 结果供试品溶液色谱与对照品溶液色谱在相应保留时间处均出现黄芩苷峰, 且峰形良好, 无杂质干扰, 保留时间约为 7.5 min。阴性对照无干扰。色谱图见图 1。

线性关系考察: 精密吸取黄芩苷对照品贮备溶液



1. 黄芩苷
A. 供试品溶液 B. 对照品溶液 C. 阴性对照品溶液
图 1 高效液相色谱图

10 mL, 置 20 mL 容量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 即得对照品溶液。取对照品溶液, 分别进样 2, 4, 6, 8, 10 μL, 取对照品贮备溶液分别进样 10 μL 和 20 μL。记录峰面积, 以质量浓度(X , μg/mL)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标绘制标准曲线, 得黄芩苷回归方程 $Y = 23\,118X - 79\,768$, $r^2 = 0.999\,9$ ($n = 7$)。结果表明, 黄芩苷溶液质量浓度在 21.787 9 ~ 435.758 4 μg/mL 范围内与峰面积线性关系良好。

精密度试验: 精密吸取黄芩苷对照品溶液 10 μL, 按拟订色谱条件连续进样 6 次, 记录黄芩苷峰面积。结果的 RSD 为 0.20% ($n = 6$), 表明仪器精密密度良好。

重复性试验: 取同一批供试品 6 份, 依法制备供试品溶液, 按拟订色谱条件测定, 记录峰面积。结果的 RSD 为 0.95% ($n = 6$), 表明方法重复性良好。

最低检出限和最低定量限确定: 经检测, 黄芩苷最低定量限为 0.174 μg/mL ($S/N = 10$); 最低检出限为 0.087 μg/mL ($S/N = 3$)。

稳定性试验: 取同一供试品溶液, 分别在 0, 2, 4, 6, 8, 12 h 时进样 10 μL, 按拟订色谱条件测定, 记录峰面积。结果的 RSD 为 1.23% ($n = 6$), 表明供试品溶液在

12 h 内稳定。

加样回收试验:取同一批样品,精密量取 2 mL,取 6 份,分别精密加入黄芩苷对照品贮备液 2.0, 2.5, 3.0 mL。依法制备供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件测定,计算回收率。结果见表 1。

表 1 黄芩苷加样回收试验结果 ($n=9$)

样品含量 (μg)	加入量 (μg)	测得量 (μg)	回收率 (%)	$\bar{X}$ (%)	RSD (%)
479.966	435.758 4	913.232 1	99.43		
479.966	435.758 4	928.869 3	103.02		
479.966	435.758 4	939.450 0	103.15		
479.966	544.698 0	1 050.498 5	104.74		
479.966	544.698 0	1 065.048 9	105.76	103.65	1.89
479.966	544.698 0	1 056.914 5	105.92		
479.966	653.637 6	1 162.759 5	104.46		
479.966	653.637 6	1 152.145 5	102.84		
479.966	653.637 6	1 156.612 8	103.52		

2.4 样品含量测定

取 3 批样品,依法制备供试品溶液,按拟定色谱条件测定黄芩苷的色谱峰面积。结果 3 批(批号分别为 140312, 140324, 140331)样品中黄芩苷的含量分别为 0.24, 0.22, 0.25 g/L。

3 讨论

3.1 测定波长选择

经在线全波长紫外吸收光谱扫描分析,黄芩苷在 315 nm 波长处有良好的紫外吸收强度。本研究中,采用 315 nm 作为检测波长时,黄芩苷为主要吸收峰,分离度好,峰形良好,且其他物质对测定无干扰。

3.2 流动相和柱型选择

本研究中比较了甲醇-水、乙腈-水、甲醇-水-冰醋酸系统测定黄芩苷的差异,采用甲醇-水、乙腈-水系统测定黄芩苷内有干扰色谱峰,而甲醇-水-冰醋酸系统能去除干扰,明显改善黄芩苷色谱峰的分离。由于其他药味中的化学成分干扰黄芩苷的测定,故选择了多型号的反相硅胶色谱柱进行比较,最后采用 Waters Symmetry C₁₈ 柱,取得了良好的分析效果。

3.3 提取方法选择

在样品提取中,考察了甲醇、水、70% 甲醇对大黄滴眼液中黄芩苷提取率的影响,结果 70% 甲醇的提取效率高于甲醇和水,最终采用

70% 甲醇提取黄芩苷。

3.4 灭菌方法选择

眼用制剂属无菌制剂^[4],大黄滴眼液中的黄芩苷具有热不稳定性^[1],试验中考察了过滤和辐照 2 种灭菌方法对大黄滴眼液中的黄芩苷含量的影响,结果发现,过滤灭菌法对大黄滴眼液中黄芩苷的含量无影响,而辐照灭菌后难以测出其含量。

综上所述,本研究中建立的高效液相色谱法,操作简单,分析快速,精密度高,稳定性好,空白无干扰,可为提高大黄滴眼液的质量标准提供依据。

参考文献:

- [1] 郑勇凤,王佳婧,傅超美,等. 黄芩的化学成分与药理作用研究进展[J]. 中成药,2016,38(1):141-147.
- [2] 雷 芳. 黄芩苷药理作用研究进展[J]. 中国药业,2010,19(15):87-90.
- [3] 汪映宇. 大黄滴眼液质量标准研究[J]. 西北药学杂志,2015,30(3):241-244.
- [4] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(四部)[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:8.
- [5] 邱天宝,郝 哲. HPLC 法测定麻黄鱼腥草散中黄芩苷的含量[J]. 中兽医医药杂志,2017,36(1):36-38.
- [6] 王 敏,贺 蕊,樊慕辛,等. HPLC 法测定银黄片中黄芩苷和绿原酸的溶出度[J]. 世界中医药,2017,12(2):408-410.
- [7] 李玟蔚,罗思婧,江伟鹏. 高效液相色谱法测定复方金银花颗粒中黄芩苷的含量[J]. 海峡药学,2017,29(1):54-56.
- [8] 金伟华,于波涛,陈 华,等. 医院制剂感冒颗粒质量标准研究[J]. 药学实践杂志,2016,34(6):534-536.
- [9] 赵 磊,于 丹,赵 宾. HPLC 法测定复方杜仲丸中盐酸水苏碱与黄芩苷的含量[J]. 中国药物评价,2017,34(2):86-88.
- [10] 郝 福,李 东,胡向青,等. 变波长 HPLC 法同时测定金柴胶囊中绿原酸和黄芩苷含量[J]. 亚太传统医药,2017,13(8):55-57.
- [11] 王东超,魏 颖,高佳琪,等. HPLC 同时测定糖痹康颗粒中黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素的含量[J]. 吉林中医药,2017,37(5):513-517.
- [12] 鲁寅生,梁 艳. RP-HPLC 法测定小儿柴桂退热颗粒中芍药苷和黄芩苷的含量[J]. 西北药学杂志,2017,32(3):313-315.
- [13] 吴一凡. 高效液相色谱法测定蒲地蓝口服液中的黄芩苷的含量[J]. 湖北中医杂志,2017,39(5):61-62.
- [14] 鄢长余,姜范成,于远洋. HPLC 法测定炎可宁片中黄芩苷的含量[J]. 世界最新医学信息文摘,2017,17(27):96-97.
- [15] 何选林,王群英. RP-HPLC 法同时测定三黄片中 7 种成分[J]. 中成药,2017,39(7):1522-1524.

(收稿日期:2018-05-27)

本栏目由

国药控股云南有限公司

协办