

HPLC法测定养阴合剂中黄芩苷的含量^Δ

车珂科^{1*}, 杨帆^{2,3}, 邓开英^{2,3#} (1.重庆市第三人民医院药学部, 重庆 400014; 2.重庆市食品药品检验检测研究院, 重庆 401121; 3.重庆市药物过程与质量控制工程技术研究中心, 重庆 401121)

中图分类号 R284.1; R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)24-3410-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.24.30

摘要 目的: 建立测定养阴合剂中黄芩苷含量的方法。方法: 采用高效液相色谱法。色谱柱为 SunFire C₁₈, 流动相为甲醇-水-磷酸(43:57:0.2, V/V/V), 流速为 1.0 ml/min, 检测波长为 280 nm, 柱温为 30 ℃, 进样量为 10 μl。结果: 黄芩苷的检测进样量线性范围为 0.055 75~1.115 μg ($r=0.999\ 9$); 精密性、稳定性、重复性试验的 RSD < 2%; 加样回收率为 95.39%~98.44% (RSD=1.19%, $n=6$)。结论: 该方法简便、快速, 结果准确, 适用于养阴合剂中黄芩苷的含量测定。

关键词 养阴合剂; 黄芩苷; 高效液相色谱法; 含量测定

Content Determination of Baicalin in Yangyin Mixture by HPLC

CHE Keke¹, YANG Fan^{2,3}, DENG Kaiying^{2,3} (1. Dept. of Pharmacy, Chongqing Third People's Hospital, Chongqing 400014, China; 2. Chongqing Institute for Food and Drug Control, Chongqing 401121, China; 3. Chongqing Engineering Center for Pharmaceutical Process and Quality Control, Chongqing 401121, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the content determination of baicalin in Yangyin mixture. METHODS: HPLC was performed on the column of SunFire C₁₈ with mobile phase of methanol-water-phosphoric acid (43:57:0.2, V/V/V) at a flow rate of 1.0 ml/min, the detection wavelength was 280 nm, column temperature was 30 ℃, and the volume injection was 10 μl. RESULTS: The linear range of baicalin was 0.055 75-1.115 μg ($r=0.999\ 9$); RSDs of precision, stability and reproducibility test were lower than 2%; recovery was 95.39%-98.44% (RSD=1.19%, $n=6$). CONCLUSIONS: The method is simple, rapid and accurate, and suitable for the content determination of baicalin in Yangyin mixture.

KEYWORDS Yangyin mixture; Baicalin; HPLC; Determination

3.2 溶剂的选择

单磷酸阿糖腺苷在水中极微溶解, 待测溶剂二氯甲烷也不溶于水。经考察, 单磷酸阿糖腺苷经过 100 ℃ 顶空平衡后, 在二甲基亚砷中溶解。二甲基亚砷在待测成分之后出峰, 对乙醇、乙腈、二氯甲烷、乙酸乙酯与吡啶均无干扰, 故选择二甲基亚砷作为溶剂。

3.3 柱温的考察

待测成分沸点相差较大, 初始柱温为 100 ℃ 时, 样品对待测溶剂乙腈有干扰。优化程序升温条件, 将初始柱温设定为 80 ℃, 保持 5 min, 再以 30 ℃/min 升至 230 ℃, 保持 3 min, 氮气流速为 3.0 ml/min, 5 种溶剂的色谱峰均有良好的分离度。

3.4 顶空瓶平衡温度的考察

本研究比较了不同顶空瓶温度(90、100、110 ℃)的影响, 结果发现 100 ℃ 时各溶剂峰的灵敏度与重复性最佳, 且样品完全溶解, 故选择 100 ℃ 作为平衡温度。

综上所述, 本研究考察了目前生产单磷酸阿糖腺苷的 5 家企业的多批样品, 建立的方法具有适用性。方法学研究结果表明, 本方法简单、准确、重复性好、专属性强, 可用于单磷酸阿糖腺苷原料药 5 种残留溶剂的检测^[8-9]。

Δ 基金项目: 重庆市卫生计生委医学科研项目(No. 2015MSX-M067)

* 主管药师, 博士研究生。研究方向: 医院制剂、药物新剂型与新技术。电话: 023-63501082。E-mail: beayerchoe@163.com

通信作者: 主任药师。研究方向: 药品质量检测与质量控制。电话: 023-86072717。E-mail: dengkaiying6811@sina.com

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 四部[S]. 2015年版. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 105.
- [2] ICH 指导委员会. 药品注册的国际技术要求: 质量部分[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 79.
- [3] 李眉, 马玉楠. 简介 ICH 关于药品中溶剂残留的指导原则[J]. 中国药师, 1998, 1(3): 119.
- [4] 崇小萌, 胡昌勤. 利用中等极性气相色谱系统分析药物残留溶剂[J]. 药物分析杂志, 2014, 34(11): 2 048.
- [5] 陈汝红, 杨春巧, 张轶华. 顶空气相色谱法检测苯星青霉素原料药中的 5 种残留溶剂[J]. 中国药房, 2012, 23(45): 4 287.
- [6] 祁彩霞, 杨发胜. 气相色谱法测定盐酸左氧氟沙星原料药中有机溶剂三氯甲烷残留[J]. 中国药业, 2014, 23(12): 73.
- [7] 高文超, 李启艳, 咸瑞卿, 等. 气相色谱法测定破壁灵芝孢子粉类保健食品中 8 种残留溶剂[J]. 药学研究, 2014, 33(11): 642.
- [8] 宁伟志, 吴秀荣, 林焕泽, 等. 顶空气相色谱法测定盐酸伐昔洛韦中的残留溶剂[J]. 中国药房, 2012, 23(9): 832.
- [9] 温耀明, 李国琴, 范建辉, 等. 顶空气相色谱法测定盐酸普拉克索中残留溶剂[J]. 中国药事, 2014, 28(9): 1 001.

(收稿日期: 2015-07-16 修回日期: 2016-05-18)

(编辑: 申琳琳)

养阴合剂是重庆市第三人民医院耳鼻喉科与药学部共同研制的中药制剂,由黄芩、玄参、地黄、大青叶等7味中药材组合而成,近40年的临床使用证明该药具有滋阴凉血、清热解毒等功效,对咽喉肿痛、急性慢性咽炎等疾病具有良好的治疗效果。目前,《重庆市医疗机构制剂规范》(2008年版)对养阴合剂进行了收载,但由于该药组分复杂,现有的质量标准仅对其相对密度、沉淀物、微生物限度等指标进行了检测,而对有效成分黄芩苷也仅用了薄层色谱进行定性,未制定含量测定标准。因此,本课题组参考相关文献^[1-3],采用高效液相色谱法(HPLC)测定养阴合剂中黄芩的活性成分黄芩苷的含量,旨在为完善养阴合剂的质量控制标准提供参考。

1 材料

1.1 仪器

2695型HPLC仪,包括2998二极管阵列检测器、EMPOWER色谱工作站(美国Waters公司);BP211S型电子天平(德国Sartorius公司);Simplicity-185型超纯水机(美国Millipore公司)。

1.2 药品与试剂

养阴合剂(重庆市第三人民医院自制,编号:S1、S2、S3,规格:250 ml/瓶);黄芩苷对照品(中国食品药品检定研究院,批号:110715-201117,纯度:91.7%);甲醇为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:SunFire C₁₈(150 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:甲醇-水-磷酸(43:57:0.2,V/V/V);流速:1.0 ml/min;检测波长:280 nm;柱温:30 ℃;进样量:10 μl。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液 精密称取黄芩苷对照品0.012 16 g,置于100 ml量瓶中,加50%乙醇溶解并定容,作为对照品贮备液;精密量取上述对照品贮备液5 ml,置于10 ml量瓶中,加50%乙醇定容,摇匀,作为对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 精密量取样品1 ml,置于25 ml量瓶中,加50%乙醇定容,摇匀,静置1 h,精密量取上清液1 ml,置于10 ml量瓶中,加50%乙醇定容,摇匀,经0.45 μm微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.2.3 阴性对照溶液 按样品的处方比例和制备工艺制备黄芩的阴性样品,再按“2.2.2”项下方法制备阴性对照溶液。

2.3 系统适用性试验与专属性试验

精密量取“2.2”项下对照品溶液、供试品溶液、阴性对照溶液各10 μl,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱,详见图1。由图1可知,黄芩苷与其他杂质峰均能达到基线分离,分离度>1.5,理论板数以黄芩苷峰计>6 000,保留时间为11.12 min。结果表明,其他成分对测定无干扰。

2.4 线性关系考察

分别精密吸取“2.2.1”项下对照品溶液1、5、10、15、20 μl,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以进样量(x, μg)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程

为 $y=310\ 713x-3\ 294(r=0.999\ 9)$ 。结果表明,黄芩苷的检测进样量线性范围为0.055 75~1.115 μg。

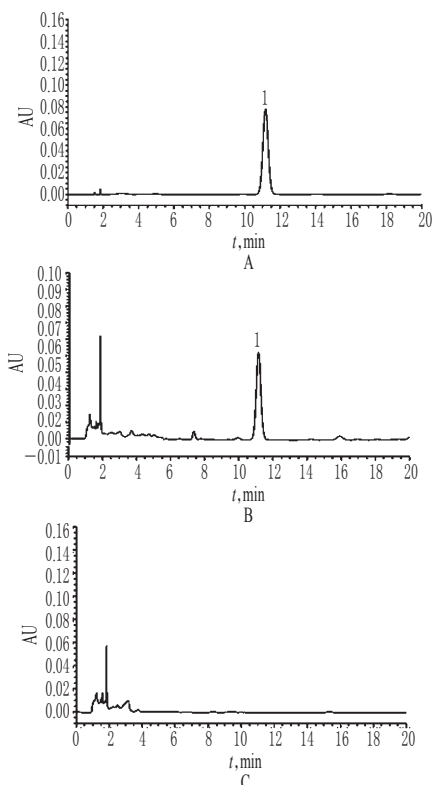


图1 高效液相色谱图

A.对照品;B.供试品;C.阴性对照;1.黄芩苷

Fig 1 HPLC chromatograms

A.reference substance; B.test sample; C.negative control; 1.baicalin

2.5 精密度试验

精密吸取“2.2.1”项下对照品溶液10 μl,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积,详见表1。由表1可知,黄芩苷峰面积的RSD=0.24%(n=6),表明仪器精密度良好。

表1 精密度试验结果(n=6)

Tab 1 Results of stability test(n=6)

进样次数	峰面积	平均峰面积	RSD, %
1	1 680 254		
2	1 675 677		
3	1 685 155		
4	1 685 770	1 680 815	0.24
5	1 676 871		
6	1 681 165		

2.6 稳定性试验

取同一供试品溶液(编号:S1)适量,分别于室温下放置0、2、4、8、12 h时按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积,详见表2。由表2可知,黄芩苷峰面积的RSD=0.81%(n=5),表明供试品溶液在室温下12 h内稳定性良好。

2.7 重复性试验

取同一批样品(编号:S1)适量,混匀,分别按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,共6份,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积,详见表3。由表3可知,黄芩苷的平均含量为8.74 mg/ml,RSD=1.74%(n=6),表明本方法重复性良好。

2.8 加样回收率试验

表2 稳定性试验结果($n=5$)Tab 2 Results of stability test($n=5$)

放置时间, h	峰面积	平均峰面积	RSD, %
0	1 063 374		
2	1 063 157		
4	1 061 796	1 058 674	0.81
8	1 061 557		
12	1 043 486		

表3 重复性试验结果

Tab 3 Results of reproducibility test

测定次数	含量, mg/ml	平均含量, mg/ml	RSD, %
1	8.87		
2	8.86		
3	8.84	8.74	1.74
4	8.66		
5	8.72		
6	8.48		

精密量取已知含量的同一批样品(编号: S1) 0.5 ml, 共6份, 分别置于25 ml量瓶中, 分别加入一定质量黄芩苷对照品, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 再按“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积并计算加样回收率, 结果见表4。

表4 加样回收率试验结果($n=6$)Tab 4 Results of recovery test($n=6$)

取样量, ml	样品含量, mg	加入量, mg	测得量, mg	加样回收率, %	平均加样回收率, %	RSD, %
0.5	4.370	4.103	8.409	98.44		
0.5	4.370	4.103	8.396	98.12		
0.5	4.370	4.103	8.407	98.39	97.60	1.19
0.5	4.370	4.103	8.361	97.27		
0.5	4.370	4.103	8.284	95.39		
0.5	4.370	4.103	8.390	97.98		

2.9 样品含量测定

取各编号样品适量, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 再按“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积并计算样品中黄芩苷的含量, 结果见表5。

表5 样品含量测定结果($n=3$)Tab 5 Results of content determination of samples($n=3$)

编号	黄芩苷, mg/ml	RSD, %
S1	8.26	1.12
S2	8.74	1.74
S3	8.59	1.23

3 讨论

3.1 流动相的选择

HPLC法测定中药复方制剂中黄芩苷含量的流动相系统有甲醇-水-磷酸^[1-3]、甲醇-0.2 mol/L磷酸二氢钠(用磷酸调pH至2.7)^[3]、甲醇-0.1%磷酸^[3-5]、乙腈-0.2%磷酸^[6-7]、甲醇-1.5%醋酸^[8]、乙腈-1%甲酸^[9]、乙腈-0.1 mol/L磷酸二氢钾^[10]、乙腈-0.1 mol/L磷酸^[11]、甲醇-0.5%磷酸^[12]、甲醇-0.2%磷酸^[13]等。本试验参照2015年版《中国药典》(一部)黄芩药材项下的含量测定方法, 并结合上述相关文献, 最终选择甲醇-水-磷酸(43:57:0.2,

V/V/V)为流动相。

3.2 检测波长的选择

本试验参考2015年版《中国药典》(一部)黄芩药材项下的含量测定条件, 选取黄芩苷最大吸收波长280 nm进行预试验。结果, 在此波长下, 对样品中黄芩苷的检测较灵敏, 阴性对照无干扰。因此, 本试验选择280 nm为测定波长。

综上所述, 本方法简便、快速, 结果准确, 适用于养阴合剂中黄芩苷的含量测定。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部[S]. 2015年版. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 301、427、428、598、758.
- [2] 安静, 董占军, 孙源. HPLC测定茵栀黄口服液中的黄芩苷[J]. 华西药学杂志, 2015, 30(2): 236.
- [3] 魏世超, 陈国平, 黄锐. 百咳静糖浆质量标准的研究[J]. 中国药师, 2013, 16(10): 1524.
- [4] 刘颖, 胡琴, 陶志国. 龙胆泻肝颗粒质量标准研究[J]. 中成药, 2013, 35(12): 2661.
- [5] 沈蒙, 段天璇, 林宏英. HPLC法测定注射用黄芩苷原料中黄芩苷及其有关物质的含量[J]. 中国药房, 2013, 24(39): 3694.
- [6] 彭明丽, 赵冠人, 温筱煦. HPLC法同时测定茵栀黄颗粒中黄芩苷、木犀草素和绿原酸的含量[J]. 中国药房, 2015, 26(6): 837.
- [7] 李想, 卢静华. HPLC法同时测定加味香连丸中芍药苷、柚皮苷、橙皮苷和黄芩苷[J]. 中成药, 2015, 37(9): 1955.
- [8] 赵佳丽, 肖国栋, 徐宏祥, 等. HPLC测定咽炎片中的黄芩苷、芍药苷和丹皮酚[J]. 华西药学杂志, 2014, 29(4): 476.
- [9] 李云霞, 郭艳玲, 段树卿, 等. 新健胃片质量控制方法的研究[J]. 药物分析杂志, 2014, 34(1): 163.
- [10] 李珂, 余哲, 杨铭. HPLC法测定清胃合剂中盐酸小檗碱和黄芩苷的含量[J]. 中国临床药学杂志, 2015, 24(3): 181.
- [11] 文怀宇, 郑爽, 郎轶咏, 等. 三黄颗粒质量标准研究[J]. 解放军药学报, 2015, 31(4): 317.
- [12] 陈巍然. 芩贝止咳颗粒质量标准研究[J]. 辽宁中医药大学学报, 2015, 17(8): 54.
- [13] 王笑笑, 方一超, 周勇, 等. RP-HPLC法测定肾炎四味片中黄芩苷、木犀草素和山柰素的含量[J]. 药物分析杂志, 2015, 35(10): 157.

(收稿日期: 2015-11-11 修回日期: 2016-06-03)

(编辑: 刘柳)