

HPLC 法测定无糖型灯盏细辛合剂中野黄芩苷含量*

蔡丽珠¹, 冯 春¹, 罗珊珊¹, 李 俊^{1,2,△}, 饶高雄²

(1. 昆明振华制药厂有限公司, 云南昆明 650034; 2. 云南中医学院, 云南昆明 650500)

摘要: **目的** 研究建立测定灯盏细辛合剂(无糖型)中野黄芩苷含量的药物分析方法。**方法** 使用高效液相色谱(HPLC)法确定最优的含量测定方法。**结果** 用十八烷基键合硅胶色谱柱,流动相为甲醇-四氢呋喃-0.1%磷酸溶液(14:14:72),流速为 1.0 mL/min,检测波长为 335 nm,野黄芩苷进样量在 0.05244~0.8391 μg 范围内与峰面积呈良好线性关系($r=0.9998, n=5$),最低检出限为 3.648 μg ,平均回收率 98.2%,RSD=1.71($n=6$)。**结论** 该方法准确度高,重现性好,操作流程简明,能用于测定灯盏细辛合剂(无糖型)中野黄芩苷的含量,有效检测药品质量。

关键词: 灯盏细辛合剂(无糖型); 野黄芩苷; 含量

中图分类号: R284

文献标志码: A

文章编号: 1000-2723(2014)06-0005-04

灯盏细辛是我省著名道地药材,其植物基源为菊科植物短茎飞蓬(*Erigeron breviscapus* (Vant.) Hand.-Mazz.),全草入药。具活血通络止痛、祛风散寒之功效,用于中风偏瘫、胸痹心痛、风湿痹病等^[1-5]。其主要化学成分包括黄酮类、咖啡酸酯类等酚性成分,具有抑制血小板聚集、清除自由基、改善微循环等作用,临床常用于治疗心脏血管病、糖尿病肾病、视网膜病变、青光眼等疾病^[6-14]。目前药材的检测方法主要为高效液相色谱法,制剂产品的检测方法包括紫外分光光度法及高效液相色谱法^[15-16]。

云南省在 20 世纪 70 年代从苗医药经验中挖掘出灯盏细辛具有很强的活血化瘀作用,治疗偏瘫疗效显著。省内各医药机构在此基础上开发了灯盏细辛注射液、益脉康片、灯盏细辛合剂等系列制剂,还有缓释包衣微丸等新剂型也在研究中^[17]。其中,我公司开发生产的“灯盏细辛合剂”(批准文号 Z20040026)上市后在临床使用中受到一线医生和广大患者肯定。灯盏细辛合剂是由灯盏细辛经提取、制备而得的口服液体制剂,具有活血化瘀的功效,用于瘀血证脑梗塞所致偏瘫、风湿痛、冠心病心绞痛,眼底视网膜静脉阻塞,血管炎性皮肤病。

“灯盏细辛合剂”在生产过程中需加入蔗糖作为矫味剂,属于含糖较高的中成药制剂。近年来,随

着生活方式改变,我国人群糖尿病患病率不断上升,心脑血管疾病患者伴发(并发)糖尿病的患者群体显著增多,临床对于无糖型制剂的需求明显增加。为适应临床医疗的需求,有必要对“灯盏细辛合剂”进行技术提升,开发“灯盏细辛合剂(无糖型)”产品。

基于开发时的技术要求和条件,我公司含糖型“灯盏细辛合剂”的质量标准仅对其总黄酮含量进行测定,未建立主要活性成分野黄芩苷的含量控制指标。在开发“灯盏细辛合剂(无糖型)”产品的技术提升工作中,根据现行药品注册相关规定,研究并建立了测定“灯盏细辛合剂(无糖型)”中野黄芩苷测定的 HPLC 方法。该方法测定准确,重现性好,能严格控制药品质量。

1 仪器与材料

岛津 2010A 液相色谱仪和 LC Solution 色谱工作站 5.3(日本),岛津 10A 液相色谱仪(日本)和威玛龙色谱工作站(国产);十八烷基键合硅胶色谱柱;电子分析天平(十万分之一,德国),超声波清洗器(国产)。野黄芩苷对照品购自中国食品药品检定研究院(编号 110842)。流动相用甲醇、四氢呋喃均为色谱纯,水为反渗透纯化水,其余试剂均为分析纯。灯盏细辛合剂(无糖型)药品为昆明振华制药厂

* 基金项目: 昆明市科技计划项目(昆科计字 11S010606 号)

收稿日期: 2014-09-15

作者简介: 蔡丽珠(1966-),女,福建惠安人,助理工程师,主要从事药品研发及注册。

△通信作者: 李俊, E-mail: ynkmljun000@126.com

有限公司产品。

2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适用性试验

2.1.1 色谱条件

检测波长:以流动相为溶剂配制的对照品溶液(浓度 $21.6 \mu\text{g/mL}$),以 HPLC 系统的二极管阵列(DAD)检测器扫描其紫外吸收光谱,最大吸收波长为 335 nm 波长(图 1),故确定其 HPLC 分析的检测波长为 335 nm 。

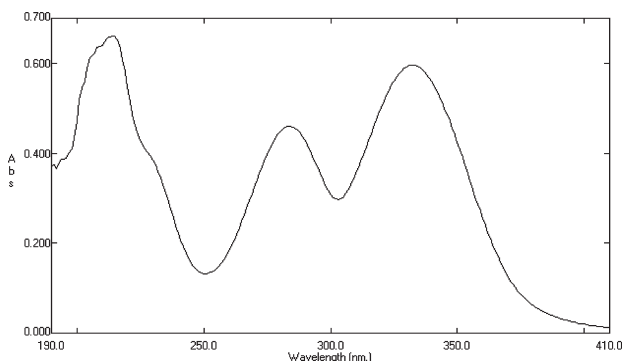


图 1 野黄芩苷的紫外吸收光谱

色谱柱选择:选择常规的十八烷基键合硅胶色谱柱。在研究过程中,采用过迪马、安捷伦、岛津、菲罗门等公司生产的市场常见主流色谱柱,均能使样品中野黄芩苷峰与其它吸收峰达到基线分离,符合技术要求规定的分离效果。

流动相筛选:经过系统的筛选比较,流动相以甲醇-四氢呋喃-0.1%磷酸溶液(14:14:72)的配比有最佳的分离效果,野黄芩苷峰拖尾因子 1.02,理论板数按野黄芩苷峰计算不小于 2 500。

柱温确定:结果筛选比较,柱温在 40°C 时,均有较好的分离效果。

2.1.2 系统适应性试验

按照筛选确定的色谱条件,分别进行流动相(空白对照)、对照品溶液、供试品溶液,以及不含灯盏细辛药材样品(阴性对照)检测(图 2、图 3、图 4、

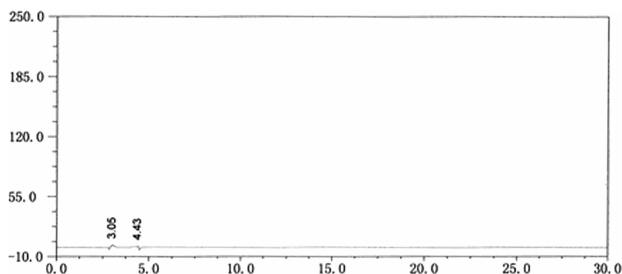


图 2 溶剂空白图谱

图 5)。结果表明,分离效果均符合《中国药典》附录 VID 高效液相色谱法的要求,辅料对于测定无干扰,表明该方法测定“灯盏细辛合剂(无糖型)”制剂中野黄芩苷含量具有专属性。

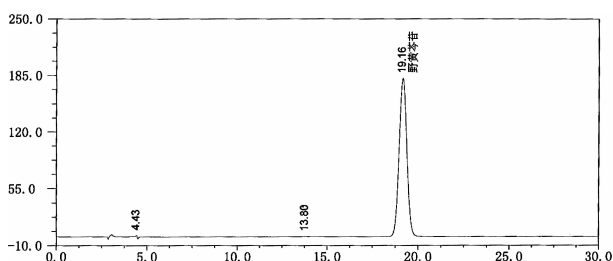


图 3 野黄芩苷对照品图谱

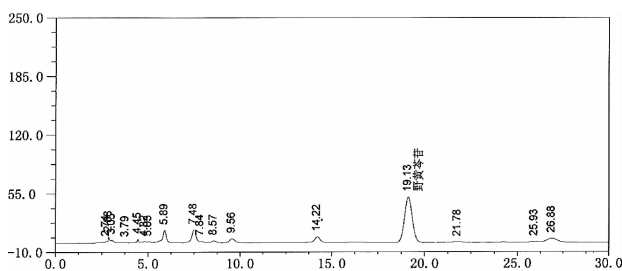


图 4 灯盏细辛合剂(无糖型)样品图谱

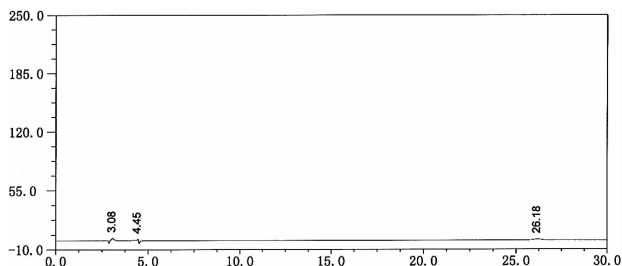


图 5 阴性对照图谱

2.2 对照品和供试品溶液制备

对照品溶液:精密称取野黄芩苷对照品适量,加甲醇溶解制成每 1 mL 含 $20 \mu\text{g}$ 野黄芩苷的溶液,即得。

供试品溶液:精密量取“灯盏细辛合剂(无糖型)” 2 mL ,置 100 mL 量瓶中,加甲醇 50 mL ,超声处理 10 min (250 W , 30 kHz),静置,放冷后加甲醇至刻度,摇匀,用微孔滤膜($0.45 \mu\text{m}$)滤过,取续滤液,即得。

2.3 方法学考察

2.3.1 线性关系考察

精密称取野黄芩苷对照品 2.40 mg ,以甲醇溶解制成每 1 mL 含 0.24 mg 的溶液。分别精密吸取上述溶液适量,稀释为 $43.2, 21.6, 10.8, 5.4 \mu\text{g/mL}$ 的对照品溶液,依次注入液相色谱仪测定,以进样量(μg)为横坐标(X),峰面积积分值为纵坐标(Y)进

行线性回归处理,回归方程为 $Y(\text{野黄芩苷峰面积})=22955X(\text{野黄芩苷峰浓度})-25929, r=0.9998 (n=5)$ 。结果表明:野黄芩苷进样量在0.05244~0.8391 μg 时进样量和峰面积呈良好线性关系。

2.3.2 精密度试验

取线性关系考察项下浓度为21.6 $\mu\text{g/mL}$ 对照品溶液,连续进样6次,每次10 μL ,分别测定记录峰面积,结果表明:连续6次测定的峰面积值的RSD=0.78%,仪器设备的精密度良好,符合分析要求。

2.3.3 样品稳定性试验

精密量取“灯盏细辛合剂(无糖型)”2 mL(批号20110402),置100 mL量瓶中,加甲醇50 mL,超声处理10 min(250 W, 30 KHz),静置放冷,加甲醇至刻度,摇匀,用微孔滤膜(0.45 μm)滤过,取续滤液备用。分别于0 h、1 h、2 h、4 h、6 h、8 h、12 h、24 h精密吸取续滤液10 μL 注入色谱仪测定。结果表明:在24 h内8次测定的野黄芩苷峰面积的RSD=1.08%,供试品溶液至少在24 h内是稳定的。

2.3.4 重复性试验

取“灯盏细辛合剂(无糖型)”(批号20110402),按“样品含量测定方法”制备供试品溶液,平行制备6份,测定野黄芩苷含量。结果表明:野黄芩苷含量测定值的RSD=0.60%,测定方法的重复性良好。

2.3.5 加样回收率试验

取“灯盏细辛合剂(无糖型)”(批号20110402,野黄芩苷含量1.1206 mg/mL),分别精密量取6份(每份1 mL)置100 mL量瓶中,分别加入野黄芩苷对照品溶液(浓度为0.5036 mg/mL)2.4 mL,按“样品含量测定”项下方法测定(表1)。结果表明:野黄芩苷回收率在96.81%至100.08%之间,平均回收率98.21%,回收率的RSD=1.71%。该测定方法准确度高,符合含量测定要求。

表1 野黄芩苷的加样回收试验

序号	供试品含量 /mg	对照品加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%
1	1.1206	1.20864	2.3059	98.07
2	1.1206	1.20864	2.2778	97.40
3	1.1206	1.20864	2.2907	96.81
4	1.1206	1.20864	2.3242	99.58
5	1.1206	1.20864	2.3303	100.08
6	1.1206	1.20864	2.3170	98.99

2.4 样品中野黄芩苷的含量测定

取“灯盏细辛合剂(无糖型)”8批按照上述研究建立的测试方法,制备对照品溶液和各批号样品供试溶液,并分别进样检测,按外标法测定制剂中野黄芩苷的含量(表2),结果如下:

表2 共8批样品中野黄芩苷的含量测定

批号	野黄芩苷含量/ $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$
20110301	1.16
20110302	1.22
20110303	1.18
20110401	1.17
20110402	1.17
20110403	1.18
20110501	1.21
20110502	1.19

通过对8个批次的含量测定结果表明,制剂3批中野黄芩苷平均含量为1.18 mg/mL。

3 讨论

灯盏细辛合剂用于心血管和脑血管疾病维持治疗具有显著疗效,且具有携带方便、吸收快、生物利用度高的特点,受到临床医生和患者的高度认可,但因其含糖量高又限制了其临床使用。无糖型灯盏细辛合剂的研制,增加糖尿病患者的用药选择,是以临床用药所需为导向的二次开发。

原含糖型灯盏细辛合剂在质量标准中仅采用分光光度法测定总黄酮的含量来体现和控制药品质量,已不适应现代中药发展要求,在无糖型灯盏细辛合剂研制过程中采用高效液相色谱法(HPLC)对其所含有效成分野黄芩苷进行检测,实现对有效成分的定量检测,对产品有直接的质量控制意义。

通过上述系统研究,建立了测定灯盏细辛合剂(无糖型)中主要有效成分的野黄芩苷含量的HPLC方法:用十八烷基键合硅胶色谱柱,以甲醇-四氢呋喃-0.1%磷酸溶液(14:14:72)为流动相,检测波长335 nm。该方法准确度高,重现性好,操作流程简明,能用于测定灯盏细辛合剂(无糖型)的质量控制。该方法已成为我公司灯盏细辛合剂(无糖型)质量标准方法。

参考文献:

- [1] 江苏新医学院《中药大辞典》编写组. 中药大辞典(上册)[M]. 上海:上海人民出版社,1997:948-949.

- [2] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草(第二十一卷)[M]. 上海:上海科学技术出版社,1999:827-830.
- [3] 滇南本草整理组. 滇南本草[M]. 昆明:云南科技出版社,2004:499-500.
- [4] 全国中草药汇编编写组. 全国中草药汇编(下册)[M]. 2 版. 北京:人民卫生出版社,1996:214-215.
- [5] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京:化学工业出版社,2010:138.
- [6] 李菁,于德泉. 灯盏花化学成分研究[J]. 中国中药杂志,2011,36(11):1458-1462.
- [7] 任琦,王义明,罗国安. 灯盏细辛研究进展[J]. 江西中医学院学报,2012,24(4):97-100.
- [8] 李丽,唐和蔚,全武军. 灯盏花的研究进展及临床应用[J]. 中国疗养医学,2011,20(9):817-818.
- [9] 石美娜,杨为民,刘璇,等. 灯盏花乙素药理作用研究进展[J]. 昆明医科大学学报,2013,(9):151-154.
- [10] 王永发,王丽娜,王黎芸,等. 灯盏细辛口服液治疗脑血管方面的药效学研究[J]. 云南中医中药杂志,2001,22(3):24-26.
- [11] 张泽欣. 灯盏花素注射液治疗糖尿病缺血性心脏病的疗效观察[J]. 实用中西医结合临床,2005,5(5):46.
- [12] 缪晓,潘祥龙. 灯盏细辛口服液治疗色素性紫癜性皮肤病的临床研究[J]. 辽宁中医杂志,2006,33(8):970-971.
- [13] 张静,王毓杰,盛艳梅,等. 灯盏细辛保护脑神经活性成分的研究[J]. 华西药学杂志,2011,26(3):208-211.
- [14] 赵红霞. 灯盏细辛治疗眼压已控制的青光眼的临床研究[J]. 云南中医学院学报,2010,33(6):14-17,20.
- [15] 谭钦刚,杨允辉,唐丽萍,等. 云南不同产地灯盏细辛药材中灯盏乙素的 HPLC 测定[J]. 云南中医学院学报,2005,28(4):18.
- [16] 张晓丽,吴晶晶,刘媛媛,等. 益脉康软胶囊中野黄芩苷的含量测定[J]. 辽宁中医杂志,2012,39(7):1360-1362.
- [17] 孙敏,刘红斌,刘波,等. 灯盏花素缓释包衣微丸的制备工艺研究[J]. 云南中医学院学报,2011,34(4):14-18.

(编辑:杨阳)

Determination of Scutellarin in Dengzhanxixin Mixture(sugar-free) by HPLC

CAI Li-zhu¹, FENG Chun¹, LUO Shan-shan¹, LI Jun^{1,2}, RAO Gao-xiong²

(1. Kunming Zhenhua Pharmaceutical Factory Limited Company, Kunming 650034, China;

2. Yunnan University of Traditional Chinese Medicine, Kunming 650500, China)

ABSTRACT: **Objective** Study to establish a pharmaceutical analysis method for determination of Scutellarin content in Dengzhanxixin mixture(sugar-free). **Methods** Using HPLC to determine the optimal method for content determination. **Results** Use of C18 column and a mobile phase of methanol-tetrahydrofuran-0.1% phosphoric acid (14:14:72). The flow rate was 1.0 mL·min⁻¹. The detection wavelength was 335nm. There was a good linear range of 0.005244 to 0.8391 μg ($r=0.9998$, $n=5$) for Scutellarin. The minimum detection limit was 3.648 μg. The average recoveries were 98.2%, RSD=1.71 ($n=6$). **Conclusion** The method is convenient, rapid and accurate with good reproducibility and could be used for the quality control of Dengzhanxixin (sugar-free) mixture, effective content of drug quality.

KEY WORDS: Dengzhanxixin mixture(sugar-free); scutellarin; content