

HPLC法同时测定清开灵注射液中黄芩苷和千层纸素A-7-O-β-d-葡萄糖醛酸苷的含量

沈 蒙*, 段天璇, 孙毅坤, 黄建梅, 马长华[#](北京中医药大学中药学院, 北京 100102)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)08-0757-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.08.28

摘要 目的: 建立同时测定清开灵注射液中黄芩苷和千层纸素A-7-O-β-d-葡萄糖醛酸苷含量的方法, 并比较不同厂家、批号产品中黄芩苷和千层纸素A-7-O-β-d-葡萄糖醛酸苷的含量差异。方法: 采用高效液相色谱法。色谱柱为Agilent ZORBAX SB-C₁₈, 流动相为甲醇-0.1%磷酸溶液(梯度洗脱), 流速为1.0 ml/min, 检测波长为274 nm, 柱温为30 ℃, 进样量为10 μl。结果: 黄芩苷、千层纸素A-7-O-β-d-葡萄糖醛酸苷检测质量浓度分别在10.1~252.0、1.0~6.0 μg/ml范围内与各自峰面积积分值呈良好的线性关系($r=0.999\ 9$); 精密性、稳定性、重复性试验的RSD≤1.6%; 平均加样回收率分别为99.64%、99.03%, RSD分别为2.7%、0.9% ($n=6$)。不同厂家、批号产品中黄芩苷、千层纸素A-7-O-β-d-葡萄糖醛酸苷的质量浓度范围分别为4.151~4.849、0.097~0.157 mg/ml。结论: 该方法简单、准确、可靠, 适用于清开灵注射液的质量控制; 不同厂家、批号清开灵注射液中黄芩苷和千层纸素A-7-O-β-d-葡萄糖醛酸苷的含量存在较大差异。

关键词 高效液相色谱法; 清开灵注射液; 黄芩苷; 千层纸素A-7-O-β-d-葡萄糖醛酸苷

Simultaneous Content Determination of Baicalin and Oroxylin A-7-O-β-d-glucuronide in Qingkailing Injections by HPLC

SHEN Meng, DUAN Tian-xuan, SUN Yi-kun, HUANG Jian-mei, MA Chang-hua (School of TCM, Beijing University of TCM, Beijing 100102, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the method for simultaneous determination of baicalin and oroxylin A-7-O-β-d-glucuronide in Qingkailing injections, and to compare the content difference of samples from different manufacturers and different batches. METHODS: HPLC method was adopted. Agilent ZORBAX SB-C₁₈ was used with mobile phase consisted of methanol-0.1% phosphoric acid (gradient elution) at the flow rate of 1.0 ml/min. The detection wavelength was set at 274 nm, and column temperature was 30 ℃. The injection volume was 10 μl. RESULTS: The linear range were 10.1-252.0 μg/ml for baicalin ($r=0.999\ 9$) and 1.0-6.0 μg/ml for oroxylin A-7-O-β-d-glucuronide ($r=0.999\ 9$). RSDs of precision, stability and reproducibility tests were all lower than 1.6%. The average recoveries of them were 99.64% and 99.03%, and RSDs were 2.7% and 0.9% respectively ($n=6$). The concentration ranges of baicalin and oroxylin A-7-O-β-d-glucuronide in Qingkailing injections from different manufacturers and different batches were 4.151-4.849 mg/ml and 0.097-0.157 mg/ml separately. CONCLUSIONS: The method is simple, accurate, rapid and suitable for quality control of Qingkailing injections. There are great difference on the contents of baicalin and oroxylin A-7-O-β-d-glucuronide in Qingkailing injections from different manufacturers and different batches.

KEYWORDS HPLC; Qingkailing injections; Baicalin; Oroxylin A-7-O-β-d-glucuronide

清开灵注射液是由胆酸、珍珠母、猪去氧胆酸、栀子、水牛角、板蓝根、黄芩苷、金银花等制成的中药复方制剂^[1], 被列入我国2009、2012年版《国家基本药物目录》和2009、2010、2011、2012年《国家医保药品目录》, 具有起效快、适应证广等特点, 主要用于治疗中风、肺炎、肝炎、高热、上呼吸道感染等疾病^[2]。该药被广泛应用于临床的同时, 有关其不良反应(Adverse drug reaction, ADR)的报告也日渐增多^[3-5]。清开灵注射液致ADR的多发性、普遍性、不可预知性及临床症状多样性等特点也愈发突出, 轻者出现一般过敏反应, 重者引起过敏性休克甚至死亡, 严重威胁患者的健康和生命安全。因此, 有必要对其成分进行更深入的系统研究。

黄芩苷是清开灵注射液的主要成分之一, 药品制备工艺中要求以黄芩苷原料的形式加入^[1]。有文献报道, 黄芩苷与中药注射剂不良反应的发生存在密切联系^[6-7]。2010年版《中国药典》规定每1 ml清开灵注射液中应含有黄芩苷(C₂₁H₁₈O₁₁) 3.5~5.5 mg^[1], 此含量范围较宽, 而且未对黄芩苷原料中除黄芩苷以外其他成分进行测定和限定。由相关研究可了解到, 黄芩苷原料中除黄芩苷主成分以外, 通常还含有少量千层纸素A-7-O-β-d-葡萄糖醛酸苷等成分^[8], 这些成分直接影响到清开灵注射液的产品质量; 并且其是否与清开灵注射液致不良反应有关还有待进一步研究证实。本研究建立了以高效液相色谱(HPLC)法同时测定清开灵注射液中黄芩苷和千层纸素A-7-O-β-d-葡萄糖醛酸苷含量的方法, 并对12个不同厂家、批号的清开灵注射液中以上两种成分进行了定性和定量分析, 以为制订更严格的清开灵注射液质量标准提供依据。

* 硕士研究生。研究方向: 中药分析。E-mail: shme44@sohu.com

[#] 通信作者: 教授, 硕士研究生导师, 硕士。研究方向: 中药分析。电话: 010-84738603。E-mail: machanghua2002@sina.com

1 材料

LC-20A HPLC 仪,包括 LC-20A 泵、DGU-20A5 脱气机、SIL-20A 自动进样器、SPD-20A 检测器、CTO-10ASvp 柱温箱、LC solution 色谱工作站(日本岛津公司);AE240S 电子分析天平(瑞士梅特勒-托利多公司)。

清开灵注射液[亚宝北中大(北京)制药有限公司,批号:111103A、113901A、115001A、115101A、115102A、115202A、115203A、210204A;吉林省集安益盛药业股份有限公司,批号:11010113;河北神威药业有限公司,批号:12101063;广州白云山明兴制药有限公司,批号:120803;吉林金麦通制药有限公司,批号:1205183];黄芩苷对照品(中国食品药品检定研究院,批号:110715-201016,质量分数>94%);千层纸素 *A-7-O-β-d*-葡萄糖醛酸苷对照品(上海永恒生物科技有限公司,质量分数>98%);阴性样品[亚宝北中大(北京)制药有限公司];甲醇为色谱纯,磷酸为分析纯,水为去离子水。

2 方法与结果^[9-10]

2.1 色谱条件

色谱柱:Agilent ZORBAX SB-C₁₈(150 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:甲醇(A)-0.1%磷酸溶液(B),梯度洗脱(0~20 min,43%→46% A;>20~40 min,46%→80% A;>40~45 min,80%→100% A;>45~50 min,100%→43% A;>50~60 min,43% A);流速:1.0 ml/min;柱温:30℃;检测波长:274 nm;进样量:10 μl。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 分别精密称取黄芩苷和千层纸素 *A-7-O-β-d*-葡萄糖醛酸苷对照品适量,用70%甲醇配制成100.8 μg/ml 的黄芩苷对照品溶液和100.0 μg/ml 的千层纸素 *A-7-O-β-d*-葡萄糖醛酸苷对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备 精密吸取样品1 ml,置于50 ml 量瓶中,加50%甲醇适量,摇匀,定容至刻度,即得。

2.2.3 阴性对照溶液的制备 精密吸取阴性样品(即按处方比例称取除黄芩苷以外的其余原料,按制备工艺制成缺黄芩苷的阴性样品)1 ml,置于50 ml 量瓶中,加50%甲醇适量,摇匀,定容至刻度,即得。

2.3 系统适用性和专属性试验

按“2.1”项下色谱条件,精密吸取黄芩苷对照品溶液、千层纸素 *A-7-O-β-d*-葡萄糖醛酸苷对照品溶液、供试品溶液、阴性对照溶液各10 μl,注入HPLC 仪,记录色谱,详见图1。结果显示,供试品色谱中黄芩苷和千层纸素 *A-7-O-β-d*-葡萄糖醛酸苷成分的保留时间与相应对照品色谱一致,且两种成分均得到良好分离。同时,在黄芩苷和千层纸素 *A-7-O-β-d*-葡萄糖醛酸苷成分的色谱峰位置,阴性对照无干扰。

2.4 线性关系考察

分别精密吸取黄芩苷对照品溶液1、5、10、15、20、25 μl;取千层纸素 *A-7-O-β-d*-葡萄糖醛酸苷对照品溶液1 ml,用50%甲醇稀释和定容至50 ml,分别精密吸取5、10、15、20、25、30 μl,按“2.1”项下色谱条件注入HPLC 仪,记录峰面积。以峰面积(*y*)对检测质量浓度(*x*,μg/ml)进行线性回归,得黄芩苷千层纸素 *A-7-O-β-d*-葡萄糖醛酸苷的回归方程分别为 $y=34\ 810x-19\ 658$

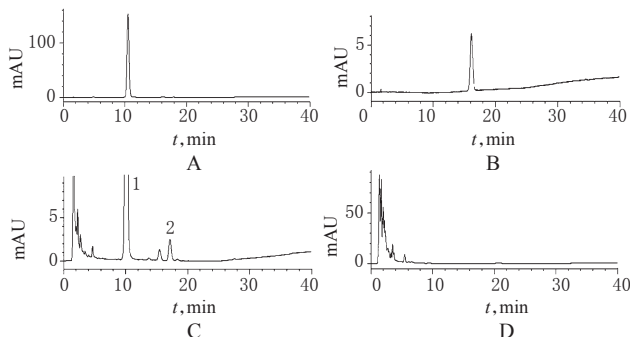


图1 高效液相色谱图

A.千层纸素 *A-7-O-β-d*-葡萄糖醛酸苷对照品;B.黄芩苷对照品;C.阴性对照;D.供试品;1.黄芩苷;2.千层纸素 *A-7-O-β-d*-葡萄糖醛酸苷

Fig 1 HPLC chromatograms

A.oroxylin *A-7-O-β-d*-glucuronide substance control;B.baicalin control;C.negative control;D.test sample; 1.baicalin; 2.oroxylin *A-7-O-β-d*-glucuronide

($r=0.999\ 9$)、 $y=34\ 994x-915$ ($r=0.999\ 9$)。结果表明,黄芩苷和千层纸素 *A-7-O-β-d*-葡萄糖醛酸苷检测质量浓度分别在10.1~252.0、1.0~6.0 μg/ml 范围内与各自峰面积积分值呈良好的线性关系。

2.5 精密度试验

分别取“2.2.1”项下黄芩苷对照品溶液和千层纸素 *A-7-O-β-d*-葡萄糖醛酸苷对照品溶液10 μl,按照“2.1”项下色谱条件连续进样测定6次。结果,黄芩苷和千层纸素 *A-7-O-β-d*-葡萄糖醛酸苷精密度的RSD分别为0.7%、0.6%,表明仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验

取样品[亚宝北中大(北京)制药有限公司,批号:111103A]适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,并按“2.1”项下色谱条件分别放置0、2、4、8、12、24 h时进样测定。结果,黄芩苷和千层纸素 *A-7-O-β-d*-葡萄糖醛酸苷的RSD分别为0.8%、1.6%,表明供试品溶液在24 h内质量稳定。

2.7 重复性试验

取样品[亚宝北中大(北京)制药有限公司,批号:111103A]适量,共6份,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,并按“2.1”项下色谱条件进样测定。结果,黄芩苷和千层纸素 *A-7-O-β-d*-葡萄糖醛酸苷的RSD分别为0.4%、1.5%,表明本方法重复性良好。

2.8 加样回收率试验

精密吸取样品[亚宝北中大(北京)制药有限公司,批号:111103A]1 ml,置于50 ml 量瓶中,加入适量的黄芩苷和千层纸素 *A-7-O-β-d*-葡萄糖醛酸苷对照品溶液,按“2.2.2”项下方法平行制备6份供试品溶液,并按“2.1”项下色谱条件进样测定峰面积,计算加样回收率,结果见表1。

2.9 样品含量测定

取不同厂家、批号清开灵注射液样品各适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,并按“2.1”项下色谱条件进样,测定峰面积并计算含量。每批样品平行操作3次,结果取平均值,详见表2。

表1 加样回收率试验结果($n=6$)Tab 1 Results of recovery tests ($n=6$)

待测成分	所含量, mg	加入量, mg	测得量, mg	加样回收率, %	平均加样回收率, %	RSD, %
黄芩苷	4.669 0	1.015 0	5.683 0	99.92	99.64	2.7
	4.669 0	1.015 0	5.650 0	96.59		
	4.669 0	1.015 0	5.685 0	100.10		
	4.669 0	1.015 0	5.650 0	96.67		
	4.669 0	1.015 0	5.719 0	103.40		
	4.669 0	1.015 0	5.696 0	101.20		
千层纸素 A-7-O- β -d-葡萄糖醛酸苷	0.105 7	0.100 0	0.204 4	98.70	99.03	0.9
	0.105 7	0.100 0	0.204 4	98.70		
	0.105 7	0.100 0	0.206 2	100.50		
	0.105 7	0.100 0	0.203 8	98.12		
	0.105 7	0.100 0	0.204 3	98.59		
	0.105 7	0.100 0	0.205 3	99.54		

表2 样品含量测定结果(mg/ml, $n=3$)Tab 2 Results of content determination of samples (mg/ml, $n=3$)

生产厂家	批号	黄芩苷	千层纸素 A-7-O- β -d-葡萄糖醛酸苷
北京亚宝	111103A	4.405	0.104
北京亚宝	113901A	4.246	0.104
北京亚宝	115001A	4.397	0.102
北京亚宝	115101A	4.611	0.107
北京亚宝	115102A	4.376	0.102
北京亚宝	115202A	4.393	0.104
北京亚宝	115203A	4.673	0.106
北京亚宝	210204A	4.622	0.129
吉林集安益盛	11010113	4.397	0.129
河北神威	12101063	4.386	0.157
广州白云山明兴	120803	4.849	0.097
吉林金麦通	1205183	4.151	0.142

3 讨论

本试验建立了以 HPLC 法同时测定清开灵注射液中黄芩苷和千层纸素 A-7-O- β -d-葡萄糖醛酸苷含量的方法, 该法精密度高、重复性好。黄芩苷是清开灵注射液中的主要成分之一, 是药典规定的该制剂的质量控制成分。在清开灵注射液的生产工艺中, 黄芩苷成分以黄芩苷原料的形式加入, 也将千层纸素 A-7-O- β -d-葡萄糖醛酸苷等一些其他杂质带入到清开灵注射液中。而本研究首次建立了清开灵注射液中千层纸素 A-7-O- β -d-葡萄糖醛酸苷的质量测定方法, 药品标准中目前还没有关于该成分的质量要求。

本试验对 12 个不同厂家、批号的清开灵注射液中黄芩苷和千层纸素 A-7-O- β -d-葡萄糖醛酸苷质量浓度进行了测定, 结果表明, 不同厂家及同一厂家不同批号的清开灵注射液中以上两种成分的含量存在较大差异, 黄芩苷的质量浓度范围为

4.151~4.849 mg/ml, 千层纸素 A-7-O- β -d-葡萄糖醛酸苷的质量浓度范围为 0.097~0.157 mg/ml。广州白云山明兴制药有限公司生产的清开灵注射液中黄芩苷的质量浓度最高, 吉林金麦通制药有限公司生产的黄芩苷质量浓度最低, 但都符合 2010 年版《中国药典》中规定的每 1 ml 清开灵注射液中含有黄芩苷 3.5~5.5 mg 的质量要求。河北神威药业有限公司生产的清开灵注射液中千层纸素 A-7-O- β -d-葡萄糖醛酸苷的质量浓度最高, 广州白云山明兴制药有限公司生产的千层纸素 A-7-O- β -d-葡萄糖醛酸苷质量浓度最低。清开灵注射液中黄芩苷与千层纸素 A-7-O- β -d-葡萄糖醛酸苷的质量浓度之间无明显线性关系。

清开灵注射液组成的药味较多, 成分庞杂, 制造过程复杂, 对质量要求较高。其含有的主成分黄芩苷和非质量控制成分千层纸素 A-7-O- β -d-葡萄糖醛酸苷的质量浓度差异有可能导致药品临床疗效的不同, 影响清开灵注射液的安全使用。因此, 有必要建立更严格的成分含量限定标准, 以保证药品质量。

综上所述, 本方法简单、准确、可靠, 适用于清开灵注射液的质量控制。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部[S]. 2010 年版. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 1 110.
- [2] 孙姝. 清开灵注射液的临床应用[J]. 中国中医药现代远程教育, 2009, 7(7): 25.
- [3] 唐春燕, 曾立威, 董静, 等. 301 例清开灵注射液不良反应/事件分析[J]. 中国药物警戒, 2009, 6(8): 478.
- [4] 王志国, 王丹巧, 魏峰. 清开灵注射液不良反应分析[J]. 中国中医基础医学杂志, 2010, 16(1): 82.
- [5] 王芬. 清开灵注射液在临床应用中的不良反应[J]. 中国药物警戒, 2011, 8(8): 495.
- [6] 田锋奇. 黄芩苷的致过敏作用机制[D]. 郑州: 郑州大学, 2007.
- [7] 任慧霞, 王厚全, 张建国. 黄芩苷的热原反应研究[J]. 食品与药品, 2006, 8(2): 39.
- [8] 沈蒙, 段天璇, 林宏英, 等. 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): 3 694.
- [9] 朵睿, 刘玉红, 王明奎, 等. HPLC 同时测定苍耳子中 6 个化学成分的含量[J]. 药物分析杂志, 2013, 33(1): 78.
- [10] 杨世艳, 何兵, 张燕. HPLC 同时测定银黄颗粒中 7 种有机酸及 4 种黄酮成分[J]. 中草药, 2013, 44(3): 301.

(收稿日期: 2013-09-17 修回日期: 2014-01-02)

《中国药房》杂志——《文摘杂志》(AJ) 收录期刊, 欢迎投稿、订阅