论著

文章编号:1000-5404(2011)16-1740-03

高效液相色谱法测定止喘合剂中黄芩苷的含量

林晓珊,李国成,刘春霞,汪锦飘 (510120 广州,中山大学孙逸仙纪念医院药学部)

[摘要] **目的** 建立止喘合剂中黄芩苷含量的测定方法。**方法** 色谱柱为 Diamonsil C_{18}(250 mm×4.6 mm,5 μm),流动相为甲醇-5.0%磷酸(60∶40),流速为1.0 ml/min,检测波长为280 nm,柱温为25 ℃。**结果** 黄芩苷的线性范围为0.952~6.664 μg/ml,回归方程为 $y=48.13647x-9.74570$($r=0.999\ 98$),平均回收率为96.21%,相对标准偏差(RSD)为0.373 7%($n=6$)。**结论** 所建立方法简单、专属性强、重现性好,可用于止喘合剂中黄芩苷的测定。

[关键词] 止喘合剂;黄芩苷;高效液相法
[中图法分类号] R282.71;R289.5;R927.2 [文献标志码] A

Determination of baicalin content in Zhichuan mixture by HPLC

Lin Xiaoshan, Li Guocheng, Liu Chunxia, Wang Jinpiao (Department of Pharmacy, The Sun Yat-sen University, Guangzhou, Guangdong Province, 510210, China)

[**Abstract**] Objective To establish an accurate method for determining the baicalin content of Zhichuan mixture. Methods HPLC was performed using a Diamonsil C_{18} column (250 mm×4.6 mm, 5 μm) and a mobile phase consisting of methanol and 0.5% phosphoric acid (60∶40) at a column temperature of 25 ℃, a mobile phase flow speed of 1.0 ml/min, and a UV detection wavelength of 280 nm. Results Baicalin showed a good linear relationship in the concentration range of 0.952 to 6.664 μg/ml, with a linear regression equation of $y=48.13647x-9.74570$ ($r=0.999\ 98$). The average recovery rate was 96.21%. The relative standard deviation (RSD) was 0.3737% ($n=6$). Conclusion Above HPLC method is easy to perform and has high specificity and high repeatability. This method can be used in the determination of baicalin in Zhichuan mixture.

[**Key words**] Zhichuan mixture; baicalin; HPLC

Corresponding author Li Guocheng, Tel:86-20-81332451, E-mail:lgcw@163.com

止喘合剂是我院制剂,其主要由银杏叶、法半夏、黄芩、瓜蒌皮、天花粉、诃子等多味中药组成的中药复方制剂,是我院儿科教授多年经验方,具有止咳平喘功效,临床上用于支气管哮喘,慢性气管炎咳嗽等。经多年的临床应用观察,其疗效显著,深受患者喜爱。黄芩为该方的君药,具有清热燥湿、泻火解毒、止血、安胎等功效,其主要有效成分为黄芩苷[1]。高效液相色谱法适用范围广、效率高、速度快、灵敏度高,广泛应用于药物活性成分的分析研究[2]。原质量标准只做定性鉴别,为了有效控制该制剂的内在质量,本研究选择处方中黄芩所含黄芩苷作为定量指标,建立了止喘合剂中黄芩苷含量测定方法,旨在为止喘合剂的质量控制提供一个定量测定依据。

1 材料与方法

1.1 材料

Agilent 1100 高效液相色谱仪(G1315A 二极阵列紫外检测器,G1313 自动进样器,G1311A 自动调配泵),电子天平(瑞士 SARTORIUS),RE2000 型旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器),KQ52OODE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司),TC-15 恒温电热套(海宁市华星仪器厂)。

止喘合剂(批号分别为0100310、0100315、0100318,中山大学孙逸仙纪念医院提供);黄芩苷对照品(批号为110715-200815,中国药品生物制品检定所);甲醇为色谱纯;水为纯净水,其余试剂均为分析纯。

1.2 色谱条件

色谱柱:Diamonsil C_{18}(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相:甲醇-0.5%磷酸(60∶40),流速为1.0 mg/ml,进样量10 μl,检测波长为280 nm,柱温25 ℃。

1.3 试验溶液的制备

对照溶液的制备:精密称取黄芩苷对照品适量,加甲醇溶解并配成9.52 μg/ml的溶液,摇匀后经0.45 μm的微孔滤膜过滤,取续滤液作为对照品溶液。

供试品溶液的制备:精密量取供试品1.9 ml,蒸干,精密称定,精密加入70%乙醇50 ml,超声提取30 min,放冷,滤过,滤液置100 ml量瓶中,加甲醇分次洗涤容器和残渣,洗液滤入同一量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀后经0.45 μm的微孔滤膜过滤,

[通信作者] 李国成,电话:(020)81332451,E-mail:lgcw@163.com

取续滤液作为供试品溶液。

阴性对照溶液的制备:按本品相同工艺制备缺黄芩的阴性对照溶液,按供试品溶液制备方法制备阴性对照品溶液。

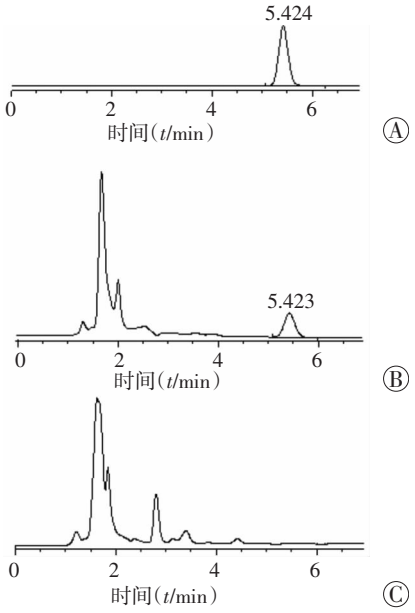
2 结果

2.1 线性考察

取黄芩苷对照品溶液,分别精密吸取浓度为 0.952、1.904、2.856、3.808、4.760、5.712、6.664 μg/ml 的黄芩苷对照品溶液各 10 μl,在"1.2 色谱条件"下测定峰面积。以峰面积积分值为纵坐标,黄芩苷的含量为横坐标绘制标准曲线,计算其回归方程为 $y = 48.136\,47x - 9.745\,70$($r = 0.999\,98$, $n = 6$)。结果表明黄芩苷在 0.952 ~ 6.664 μg/ml 范围内具有良好的线性关系。

2.2 专属性实验

取对照品溶液、供试品溶液和阴性对照溶液在"1.2 色谱条件下"各进样 10 μl,见图 1。可见,阴性对照溶液试品溶液中黄芩苷出峰的相应位置无干扰。



A:黄芩苷对照品;B:供试品;C:阴性供试品

图 1 专属性试验的高效液相色谱分析

2.3 重复性实验

取同一供试品(批号 0100315)平行试验 6 次,取 10 μl 进样,结果平均含量为 0.107 9 mg/ml,相对标准偏差(RSD)为 0.89%。

2.4 稳定性实验

取同一供试品(批号 0100315),每隔 1 小时进样 10μl,测定黄芩苷 12 h 内的峰面积值,RSD 为 1.80%,结果表明供试品溶液在 12 h 内稳定。

2.5 加样回收率实验

精密量取黄芩苷对照品溶液 7.0 ml,再精密吸取供试品溶液(批号 0100315)2.5 ml,按供试品制备方法平行试验 6 份,在上述色谱条件下各进样 10 μl,测定峰面积,计算加样回收率。见表 1。

表 1 加样回收率实验结果($n = 6$)

序号	样品含量(mg)	加入量(mg)	测得值(mg)	回收率(%)	平均回收率(%)	RSD(%)
1	0.858 6	0.863	0.165 0	95.87	96.21	0.3737
2	0.858 6	0.863	0.165 2	95.99		
3	0.858 6	0.863	0.166 5	96.75		
4	0.858 6	0.863	0.164 9	95.82		
5	0.858 6	0.863	0.165 9	96.40		
6	0.858 6	0.863	0.166 0	96.46		

2.6 样品含量测定

精密吸取供试品溶液 10 μl,按上述色谱条件测定峰面积,分别测定 3 批样品(批号:0100310、0100315、0100318),按外标法计算黄芩苷的含量。见表 2。

表 2 样品含量测定结果($n = 5$)

批号	黄芩苷含量(mg/ml)	黄芩苷平均含量(mg/ml)	RSD(%)
0100310	0.107 9		
0100315	0.107 1	0.107 5	0.982
0100318	0.107 5		

3 讨论

黄芩具有清热、燥湿、解毒、止血功效,是处方中清热解毒的主要药味,黄芩中主要成分为黄芩苷,为此选择黄芩中的黄芩苷为含量测定指标,建立质量控制标准,结果该方法重现性好,可作为该制剂质控的方法。

对于黄芩苷的含量测定方法报道较多,大部分多采用选择色谱条件时,流动相为乙腈- 水- 磷酸(30∶70∶0.04)[3]、甲醇-水-磷酸(43∶57∶0.2)[1]及甲醇-0.2% 磷酸(42∶58)[4],实验曾参照文献[1]选用甲醇-水-磷酸(43∶57∶0.2)作为流动相,其结果但其分离度不好;将流动相改变为甲醇-0.5% 磷酸(60∶40),其分离度达到理想的效果。

本实验中供试品经超声提取 30 min 黄芩苷含量测定结果,与文献[1,5]报道的黄芩提取方法为 70% 乙醇加热回流 3 h 黄芩苷含量测定结果接近。且对超声提取时间 20、30、40 min 进行比较,结果表明,超声提取 30 min 即可提取完全[6-8]。

用文中建立的方法测定,黄芩苷和制剂中的其他成分可完全分离[9-11],样品制备方法简单,测定结果准确,回收率、线性关系、精密度均符合中药分析要求,且方法重现性、稳定性好[12-13],为止喘合剂质量标准的提高提供了可靠的参考依据。

参考文献:

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 2010 版(一部)[M]. 北京: 化学工业出版社, 2010: 282 - 283.

[2] 车仁宇, 赵晶, 王圣燕. 高效液相法测定水杨柳提取物中水柳皂苷的含量[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(22): 2275 - 2277.

[3] 邱洪, 王宝佳, 陈德友, 等. 高效液相色谱法测定健儿消食口服液中黄芩苷含量[J]. 中国药业, 2005, 14(9): 52-53.
[4] 胡泽华,王爱民,兰燕宇, 等. 反相高效液相色谱法测定菊黄上清含片中黄芩苷的含量[J]. 中国药业, 2005, 14(9): 38-39.
[5] 狄留庆, 徐枢. HPLC法测定止喘雾化液中黄芩苷的含量[J]. 中国现代应用药学杂志, 2000, 17(1): 41-43.
[6] 张岭莉, 彭燕, 涂毅. 高效液相色谱法测定黄芩口服液中黄芩苷的含量[J]. 中国药师, 2005, 8(5): 388-389.
[7] 刘晓玲, 赵娟, 张裕民. HPLC法测定抗癌口服液中野黄芩苷的含量[J]. 中医药导报, 2005, 11(9): 56.
[8] 何瑞荣, 李容茂, 丁少波, 等. 高效液相色谱法测定乙肝解毒胶囊中黄芩苷的含量[J]. 广东药学院学报, 2008, 24(5): 478-479, 489.
[9] 翟卿娜. 不同制剂中的黄芩苷含量测定方法与应用[J]. 长春中医药大学学报, 2008, 24(6): 664.
[10] 申去非, 张莉, 朱铁梁, 等. 黄芩苷含量测定方法研究进展[J]. 中医药信息, 2009, 26(4): 14-16.
[11] 雷泞菲, 彭书明, 周嘉峪, 等. 黄芩中黄芩苷提取工艺的研究[J]. 时珍国医国药, 2007, 18(11): 2664-2666.
[12] 苟小军, 杜明华. HPLC法测定平肝降压片中黄芩苷的含量[J]. 吉林中医药, 2005, 25(12): 55.
[13] 孙益林, 徐兵. 黄芩中黄芩苷的提取工艺研究[J]. 杏林中医药, 2009, 29(5): 427-428.

(**收稿**:2011-03-01;**修回**:2011-03-31)
(编辑 王小寒)

(上接1739页)

升而下降,这些直接导致其免疫功能下降;老年患者往往合并糖尿病、原发性高血压、慢性阻塞性支气管炎等面性疾病,且发病后饮食不佳,营养不良,机体防御功能减弱,这些使老年人在开颅术后更易发生颅内感染[3]。患者年龄与医院感染率成正比,本组172例颅内感染患者,70岁以上患者的颅内感染发生率达到7.1%,而45岁以下患者的颅内感染发生率为1.6%。

开颅手术时间越长,颅内感染发生的几率越大。重型、特重型颅脑伤手术随着手术时间的延长,污染机会越多,越容易增加感染几率[4],手术时间超过4 h者,感染率明显增高,本组感染患者中711例患者手术时间超过8 h,发生颅内感染53例,感染率为7.5%。

颅内感染脑脊液标本细菌培养阳性68例,培养阳性率低(39.5%),致病菌以G^+球菌为主要致病菌,以葡萄球菌多见(69.2%)。临床上抗生素选择多为经验性用药,早期合理有效的使用抗生素预防治疗尤为重要[5]。护士除了在早期密切观察病情,还应了解各种抗生素的药理作用与半衰期等,合理安排抗生素的使用时间和方法,并观察有无高热、恶心呕吐、颈项强直等颅内感染征象,一旦发现应及时与医生进行沟通行CSF培养及生化检验,合理调整抗生素。长期大量使用抗生素易使机体肠道菌群失调易引起腹泻症状,应做好相关并发症的预防及护理。

另外术后采取术区引流或脑室外引流等亦可增加颅内感染发生[3],本组51例,占30.0%。应加强侵入性操作患者的管理,严格无菌操作、及时更换引流袋,每日消毒伤口和各连接口、及时更换敷料等方法能有效减少医院感染的发生。

对于易感患者,尤其外伤伴脑脊液漏者(本组占66%),应早期做好护理干预,防止逆行感染。做好基础护理,颅内感染患者长期大剂量使用抗生素,易造成口腔霉菌感染,因此此类患者尤其要重点加强口腔护理,保持口腔清洁卫生。长期反复高热的患者高消耗,加上大量使用抗生素,应保证充分的营养摄入,增强抗病能力。

目前颅内感染较被认可的一种治疗方案即腰椎穿刺放出炎性脑脊液并联合鞘内注射抗生素[6]。操作器械必须保持无菌,躁动患者可适当镇静药物处理,并采取保护性约束,避免因患者躁动污染无菌区域。操作完毕以无菌敷料覆盖穿刺针眼处,并随时观察敷料有无潮湿脱落,防止病原菌从针眼处逆行感染。腰椎穿刺前后及腰穿过程中均要有完整的生命体征测量,并前后进行对比,观察腰穿治疗的影响。本组有1例使用镇静药物患者由躁动转变为安静,误认为镇静药物所致,实际是脑脊液释放过快引起低颅压所致,后经积极治疗,预后良好。

神经外科患者住院时间长,恢复慢,且大多伴有意识障碍、吞咽困难等,是发生院内感染的直接因素[7]。护理人员要从多方面来预防和减少颅内感染的发生,保持病室安静整洁,温度20~22 ℃,湿度40%~60%。每日空气消毒2次,每日以0.5%消毒灵液擦拭墙壁及病床1次,地面2次,各种仪器定期清洁消毒。严格控制NICU入住指征及平均住院时间,对于CSF培养阳性及诊断颅内感染,应立即建立隔离病房,避免交叉感染。NICU建立消毒隔离制度,重点突出,有效监控。

颅内感染多为医院获得感染,发病凶险,不仅增加了患者、家庭、集体和社会的经济负担,而且严重影响患者的预后。文献[8]报道,医院感染只要减低0.3%,所节约的费用就可支付医院感染监控所需的经费。护士与患者的接触最密切,几乎所有的操作都是围绕患者进行,在预防医院感染的预防控制中护士是主力,护士只有充分认识院内感染给患者、医院和社会甚至是护士自身造成的危害,才能自觉树立预防医院感染的意识。

参考文献:

[1] Reichert M C, Medeiros E A, Ferraz F A. Hospital-acquired meningitis in patients undergoing craniotomy: incidence, evolution, and risk factors[J]. Am J Infect Control, 2002, 30(3): 158-164.
[2] 赵岗, 魏新亭. 28例开颅术后颅内感染病原学分析和临床治疗[J]. 第三军医大学学报, 2011, 33(2): 208-209.
[3] 杨强. 颅脑手术后颅内感染的易感因素及耐药性分析[J]. 中外医疗, 2010, 29(31): 77.
[4] 朱士广, 杨树源, 张建宁. 神经外科术后颅内感染及其治疗[J]. 中国神经精神疾病杂志, 1998, 24(4): 215-217.
[5] 周建新, 王强, 唐明忠, 等. 神经外科患者脑脊液细菌流行病学和耐药性监测[J]. 中华医院感染学杂志, 2006, 16(2): 154-157.
[6] 时忠华, 蔡学见, 陈铮立, 等. 鞘内给药治疗颅内细菌感染[J]. 江苏医药, 2006, 32(2): 170-172.
[7] 蔡敏, 谢懿, 历群. 脑出血患者医院感染的相关因素分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2004, 14(5): 527-529.
[8] 张小容. 脑出血颅脑术后医院感染经济损失病例对照研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2003, 13(7): 622-623.

(**收稿**:2011-02-25;**修回**:2011-03-31)
(编辑 王小寒)