

眼明熏洗液的质量标准研究

张海英, 贾芸, 薛洁*

(新疆医科大学附属中医医院, 乌鲁木齐 830000)

[摘要] 目的:建立眼明熏洗液(金银花、川芎、一枝蒿)的质量控制方法。方法:采用薄层色谱法对金银花、川芎进行定性鉴别,采用高效液相色谱法测定眼明熏洗液中绿原酸、阿魏酸含量,采用紫外分光光度法测定眼明熏洗液中总黄酮的含量。结果:薄层色谱斑点清晰,阴性对照无干扰。绿原酸在 0.089~0.799 g·L⁻¹线性关系良好, $r=0.999\ 5\ (n=5)$,平均回收率为 100.21%,RSD 1.06% ($n=6$);阿魏酸在 7.434~37.17 mg·L⁻¹线性关系良好, $r=0.999\ 9\ (n=5)$,平均回收率为 99.91%,RSD 1.19% ($n=6$);芦丁在 0.008~0.048 g·L⁻¹线性关系良好, $r=0.998\ 9\ (n=5)$,平均回收率为 99.50%,RSD 0.87% ($n=6$)。结论:建立的 TLC,HPLC,UV 方法专属性强、重复性好,可用于眼明熏洗液的质量控制。

[关键词] 眼明熏洗液;质量标准;薄层色谱鉴别;高效液相色谱法;紫外分光光度法

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2012)23-0123-05

Quality Standards of Yanmingxunxi Lotion

ZHANG Hai-ying, JIA Yun, XUE Jie*

(Affiliated Traditional Medical Hospital, Xinjiang Medical University, Urumqi 830000, China)

[Abstract] **Objective:** To establish the methods for quality control of Yanmingxunxi Lotion (Lonicerae Japonicae Flos, Chuanxiong Rhizoma, Herba Artemisiae rupestris). **Method:** Lonicerae Japonicae Flos, Chuanxiong Rhizoma were identified by TLC. HPLC methods for the determination of chlorogenic acid, ferulic acid in Yanmingxunxi Lotion were established. UV method for the determination of total flavones was established. **Result:** The spots on the TLC plate were clear. The negative control sample didn't disturb. Chlorogenic acid showed good linearity in the range of 0.089-0.799 g·L⁻¹, $r=0.999\ 5\ (n=5)$. The average recovery was 100.21%, RSD was 1.06% ($n=6$). Ferulic acid showed good linearity in the range of 7.434-37.17 mg·L⁻¹, $r=0.999\ 9\ (n=5)$. The average recovery was 99.91%, RSD was 1.19% ($n=6$). Rutin showed good linearity in the range of 0.008-0.048 mg·mL⁻¹, $r=0.998\ 9\ (n=5)$. The average recovery was 99.50%, RSD was 0.87% ($n=6$). **Conclusion:** The methods are simple, rapid, accurate and can be used for the quality control of Yanmingxunxi Lotion.

[Key words] Yanmingxunxi Lotion; quality standards; TLC; HPLC; UV

眼明熏洗液由金银花、川芎、一枝蒿、桑叶、菊花等药组成,是新疆医科大学附属中医医院李全智主任医师的经验方,具有祛风清热、消肿止痛、敛泪止痒、祛翳明目的功效。临床用于治疗结膜炎、卡他性

结膜炎、视疲劳以及病毒性角膜炎、外伤性角膜炎等眼科疾病。原质量标准仅包括川芎的薄层色谱鉴别,无含量测定项,标准要求相对较低,无法全面评价其内在的质量。本试验在原标准的基础上结合实际情况,修订了川芎的薄层色谱鉴别,增加了金银花的薄层色谱鉴别,根据绿原酸、阿魏酸是金银花、川芎主要的活性成分,黄酮类成分是一枝蒿、菊花的主要有效成分,增加了制剂中绿原酸、阿魏酸、总黄酮的含量测定,使其质量标准在原基础上进一步提高,更有效地控制了眼明熏洗液的质量。

[收稿日期] 20120720(001)

[第一作者] 张海英,硕士,副主任中药师,从事中药复方新制剂研发工作, Tel: 0991-5814127, E-mail: zzhhy2583@126.com

[通讯作者] * 薛洁,教授,博士,博士生导师,从事中药复方新制剂研发工作, Tel: 0991-4365256

1 仪器与试药

Waters 2695 高效液相色谱仪(美国 Waters 公司),紫外-可见光光度计 Cintra-20(澳大利亚 GBC),AG-135 电子天平 0.01 mg(瑞士),SK3300LH 型超声清洗器(上海科导超声仪器有限公司),Direct-QTM5 型超纯水仪(MilliPore)。

眼明熏洗液(批号 20100127,20100609,20110112,由新疆医科大学附属中医医院制剂室提供),金银花对照药材(批号 121060-200906),川芎对照药材(批号 120918-200406),绿原酸对照品(批号 110753-200413),阿魏酸对照品(批号 110773-200611),芦丁对照品(批号 100080-200707)均购自中国药品生物制品检定所;水为超纯水;甲醇为色谱纯;醋酸、三乙胺、醋酸丁酯、甲酸、甲苯、醋酸乙酯等均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 薄层色谱鉴别

2.1.1 金银花的薄层鉴别^[1] 取本品 15 mL,加甲醇 30 mL,超声处理 30 min,滤过,滤液浓缩至干,残渣加甲醇 2 mL 使溶解,作为供试品溶液。另取金银花对照药材 1 g,同法制成对照药材溶液。再取除金银花外的其余药材按制备工艺制成缺金银花的阴性对照溶液。另取绿原酸对照品,加甲醇制成每 1 mL 含 1 mg 的溶液,作为对照品溶液。照薄层色谱法(《中国药典》2010 年版一部附录 VI B)试验,吸取供试品、对照药材、对照品、阴性对照溶液各 10 μ L,分别点于同一以羧甲基纤维素钠为黏合剂的硅胶 G 薄层板上,以醋酸丁酯-甲酸-水(6.5:3.5:2.5)的上层溶液为展开剂,展开,取出,晾干,置紫外光灯(365 nm)下检视。供试品色谱中,在与对照品、对照药材色谱相应的位置上,显相同颜色的荧光斑点,阴性对照溶液无干扰。

2.1.2 川芎的薄层鉴别^[2] 取本品 20 mL,用乙醚萃取 2 次,每次 10 mL,分取乙醚液,蒸干,残渣加醋酸乙酯 1 mL 溶解,作为供试品溶液。取阿魏酸对照品,加甲醇制成每 1 mL 含 0.5 mg 溶液,作为对照品溶液。另取川芎对照药材 1 g,加乙醚 20 mL,加热回流 1 h,滤过,滤液挥干,残渣加醋酸乙酯 2 mL 使溶解,作为对照药材溶液。再取除川芎外的其余药材按制备工艺制成缺川芎的阴性对照溶液。照薄层色谱法(《中国药典》2010 年版一部附录 VI B)试验,吸取供试品溶液、对照药材、对照品、阴性对照溶液各 10 μ L,分别点于同一以羧甲基纤维素钠为黏合剂的硅胶 G 薄层板上,以甲苯-醋酸乙酯-甲酸(12:5:0.5)

为展开剂,展开,取出,晾干,置紫外灯(365 nm)下检视。供试品色谱中,在与对照药材色谱相应的位置上,显相同颜色的荧光斑点,阴性对照溶液无干扰。

2.2 绿原酸含量测定^[3-5]

2.2.1 色谱条件 column Symmetry shield Rp C₁₈(3.9 mm $\times$ 150 mm,5 μ m),柱温 25 $^{\circ}$ C,流动相甲醇-水-醋酸-三乙胺(20:80:1:0.1),流速 1.0 mL $\cdot$ min⁻¹,检测波长 327 nm,进样量 10 μ L,理论板数按绿原酸峰计算不低于 1 000。

2.2.2 对照品溶液 精密称取绿原酸对照品适量,置棕色量瓶中,加 50% 甲醇制成每 1 mL 含 0.888 mg 的溶液,即得(10 $^{\circ}$ C 以下保存)。

2.2.3 供试品溶液 精密量取本品 5 mL,置具塞锥形瓶中,精密加入 50% 甲醇 5 mL,称定质量,超声处理(功率 250 W,频率 35 kHz)30 min,放冷,再称定质量,用 50% 甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,即得。

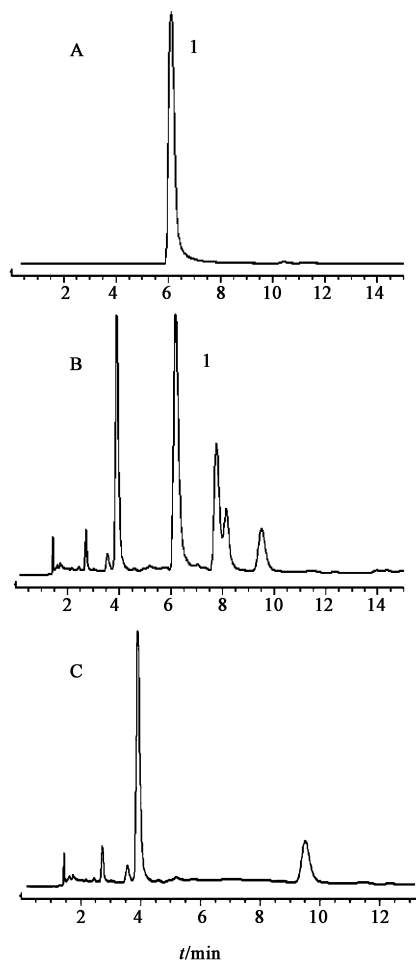
2.2.4 空白试验 按处方要求制备不含金银花的阴性样品,同供试品溶液的制备方法制成缺金银花的阴性对照溶液。精密吸取对照品、供试品及阴性对照溶液各 10 μ L,注入高效液相色谱仪,按上述色谱条件测定。结果阴性对照溶液在绿原酸对照品色谱峰保留时间相应处无干扰,且绿原酸峰与其他组分可达到基线分离(图 1)。

2.2.5 线性关系考察 精密吸取 0.888 g $\cdot$ L⁻¹ 的绿原酸对照品储备液 1,3,5,7,9 mL,置于 10 mL 量瓶中,用甲醇稀释至刻度,摇匀,测定峰面积。以对照品质量浓度为横坐标,测得的色谱峰面积为纵坐标进行线性回归,得绿原酸线性回归方程为: $Y = 2.39 \times 10^4 X + 3.82 \times 10^4$, $r = 0.999\ 5$ ($n = 5$),实验结果表明绿原酸在 0.089 ~ 0.799 g $\cdot$ L⁻¹ 具有良好的线性关系。

2.2.6 稳定性试验 取同一份供试品溶液,按上述色谱条件分别于 0,2,4,6,8,10 h 进样 10 μ L,结果绿原酸峰面积的 RSD 1.64% ($n = 6$),表明供试品溶液在 10 h 内稳定性良好。

2.2.7 重复性试验 精密称取同一批(批号 20100127)样品,按 2.2.3 项下分别制备 5 份供试品溶液,每份供试品进样 10 μ L,用标准曲线法测得绿原酸的平均含量为(0.524 $\pm$ 0.009) g $\cdot$ L⁻¹,RSD 1.72%,表明本方法重复性良好。

2.2.8 精密度试验 按上述色谱条件,用同一批供试品溶液连续进样 6 次,每次 10 μ L,分别测得各峰面积。绿原酸峰面积的 RSD 1.28%,结果表明精密



A. 对照品;B. 供试品;C. 阴性对照;1. 绿原酸
图 1 金银花高效液相色谱

度良好。

2.2.9 加样回收试验 取批号为 20100127 样品 6 份,每份约 3 mL,精密加入一定量的绿原酸对照品,按供试品溶液制备项下操作并测定,计算加样回收率。结果见表 1。

表 1 绿原酸加样回收率试验 (n=6)

样品中量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均 回收率 /%	RSD /%
1.521	1.776	3.290	99.61	100.21	1.06
1.521	1.776	3.294	99.83		
1.521	1.776	3.318	101.18		
1.521	1.776	3.299	100.11		
1.521	1.776	3.276	98.82		
1.521	1.776	3.327	101.69		

2.3 阿魏酸含量测定^[6-8]

2.3.1 色谱条件 Symmetry shield Rp C₁₈ 色谱柱

(3.9 mm×150 mm,5 μm),柱温 25℃,流动相 甲醇-1% 醋酸溶液(35:65),流速 1.0 mL·min⁻¹,检测波长 321 nm,进样量 10 μL,理论板数按阿魏酸峰计算不低于 4 000。

2.3.2 对照品溶液 精密称取阿魏酸对照品适量,置棕色量瓶中,加 70% 甲醇制成每 1 mL 含 0.037 17 mg 的溶液,即得。

2.3.3 供试品溶液 精密量取本品 5 mL,置具塞锥形瓶中,精密加入 70% 甲醇 5 mL,称定质量,超声处理(功率 250 W,频率 35 kHz)30 min,放冷,再称定质量,用 70% 甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,即得。

2.3.4 空白试验 按处方要求制备不含川芎的阴性样品,同供试品溶液的制备方法制成缺川芎的阴性对照溶液。精密吸取对照品、供试品及阴性对照溶液各 10 μL,注入高效液相色谱仪,按上述色谱条件测定。结果阴性对照溶液在阿魏酸对照品色谱峰保留时间相应处无干扰,且阿魏酸峰与其他组分可达到基线分离(图 2)。

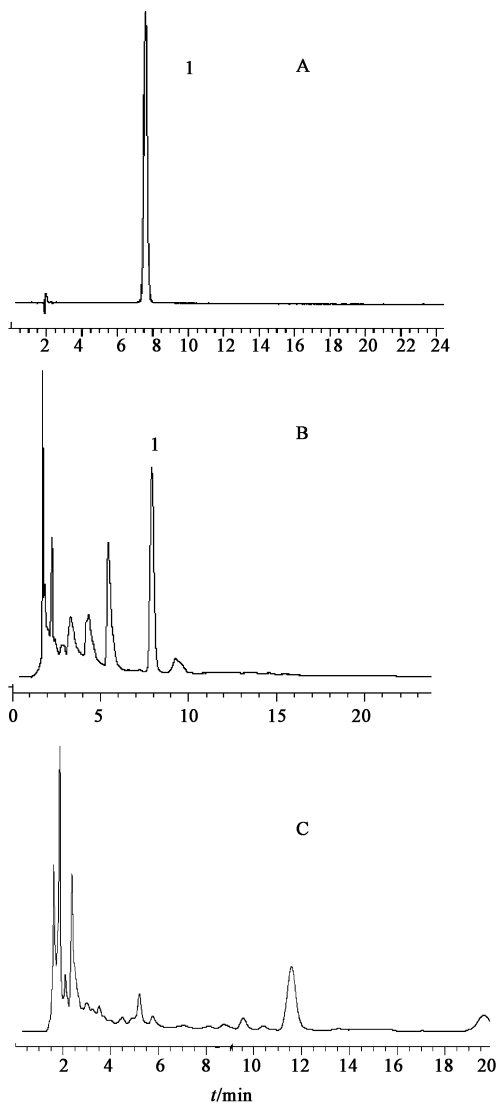
2.3.5 线性关系考察 精密吸取 0.037 17 g·L⁻¹ 的阿魏酸对照品储备液 1,2,3,4,5 mL,置于 5 mL 量瓶中,用甲醇稀释至刻度,摇匀,测定峰面积。以对照品浓度为横坐标,测得的色谱峰面积为纵坐标进行线性回归。得阿魏酸的线性回归方程为 $Y = 5.69 \times 10^4 X + 4.93 \times 10^4$, $r = 0.999\ 9$ ($n = 5$),表明阿魏酸在 7.434 ~ 37.17 mg·L⁻¹ 具良好的线性关系。

2.3.6 稳定性试验 取同一份供试品溶液,按上述色谱条件分别于 0,2,4,6,8,10 h 进样 10 μL,结果阿魏酸峰面积的 RSD 1.24% ($n = 6$),表明供试品溶液在 10 h 内稳定性良好。

2.3.7 重复性试验 精密称取同一批(批号 20100127)样品,按 2.3.3 项下分别制备 5 份供试品溶液,每份供试品进样 10 μL,用标准曲线法测得阿魏酸的平均含量为 (0.278 ± 0.004) g·L⁻¹,RSD 1.44%,表明本方法重复性良好。

2.3.8 精密度试验 按上述色谱条件,用同一批供试品溶液连续进样 6 次,每次 10 μL,分别测得各峰面积。阿魏酸峰面积的 RSD 1.37%,结果表明精密度良好。

2.3.9 加样回收试验 取批号为 20100127 样品 6 份,每份约 3 mL,精密加入一定量的阿魏酸对照品,按供试品溶液制备项下操作并测定,计算加样回收率。结果见表 2,阿魏酸平均回收率为 99.91%,



A. 对照品; B. 供试品溶液; C. 阴性对照; 1. 阿魏酸
图2 川芎高效液相色谱

RSD 1.19%, 结果表明本方法准确可靠。

表2 阿魏酸加样回收率试验 (n=6)

样品中量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均 回收率 /%	RSD /%
0.834	0.743	1.591	101.88	99.91	1.19
0.834	0.743	1.571	99.19		
0.834	0.743	1.568	98.79		
0.834	0.743	1.569	98.92		
0.834	0.743	1.579	100.27		
0.834	0.743	1.580	100.40		

2.4 总黄酮含量测定^[9-10]

2.4.1 对照品溶液 精密量取在 120 ℃ 干燥至恒重的芦丁对照品适量,加乙醇超声 30 min 使溶解,

配制成 0.2 g·L⁻¹ 的对照品溶液^[3]。

2.4.2 最大吸收波长的选择 精密量取对照品、供试品溶液各 1 mL,分别置 25 mL 量瓶中,其余操作均同标准曲线制备项下。在紫外-可见分光光度计下 400 ~ 700 nm 扫描。对照品最大吸收波长为 502.02 nm,供试品液最大吸收波长为 499.46 nm,综合上述实验拟定 (500 ± 2) nm 为检测波长。

2.4.3 芦丁标准曲线的制备 精密量取对照品溶液 1,2,3,4,5,6 mL,分别置 25 mL 量瓶中,各加水使至 6 mL,加 5% 亚硝酸钠溶液 1 mL,摇匀,放置 6 min,加 10% 硝酸铝溶液 1 mL,摇匀,放置 6 min,加氢氧化钠试液 10 mL,再加水至刻度,摇匀,放置 15 min,以相应试剂为空白,照紫外-可见分光光度法(《中国药典》2010 年版一部附录 V A),在 (500 ± 2) nm 波长处测定吸光度^[4],以吸光度 (A) 和浓度 (C) 进行回归,得线性回归方程为 $C = 0.093\ 6A + 0.001\ 2$, $r = 0.998\ 9$ ($n = 5$),结果表明芦丁在 0.008 ~ 0.048 g·L⁻¹ 具良好的线性关系。

2.4.4 稳定性考察 精密量取供试品溶液置 25 mL 量瓶中,其余操作均同标准曲线制备项下。每隔 15 min 测定吸光度,测定至 2 h。结果显色稳定性良好,RSD 0.62%。本试验选择加氢氧化钠试液后放置 15 min 测定。

2.4.5 重复性试验 精密称取同一批 (批号 20100127) 样品,按 2.4.3 项下分别制备 5 份供试品溶液,用标准曲线法测得总黄酮的平均含量为 (6.35 ± 0.11) g·L⁻¹,RSD 1.73%,表明本方法重复性良好。

2.4.6 精密度试验 按上述色谱条件,用同一批供试品溶液连续测定 6 次,分别测得各吸光度。总黄酮吸光度的 RSD 1.28%,结果表明精密度良好。

2.4.7 加样回收试验 取批号为 20100127 样品 6 份,精密量取本品溶液 1 mL,置 50 mL 量瓶中,加水至刻度,摇匀。精密量取 3 mL,置 25 mL 量瓶中,加入一定量的芦丁对照品,按供试品溶液制备项下操作并测定,计算加样回收率。结果见表 3。

2.5 样品含量的测定 按照上述色谱条件,对眼明熏洗液 3 个批号进行含量测定,计算绿原酸、阿魏酸、总黄酮含量,结果见表 4。考虑到药材的来源,以及制剂生产、储藏等因素,故暂定本品每 1 mL 含金银花以绿原酸 (C₁₆H₁₈O₉) 计,不得少于 0.42 mg;每 1 mL 含川芎以阿魏酸 (C₁₀H₁₀O₄) 计,不得少于 0.22 mg;每 1 mL 含总黄酮以芦丁 (C₂₇H₃₀O₁₆) 计,不得少于 5.16 mg。

表 3 芦丁加样回收率试验 (n=6)

样品中量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均 回收率 /%	RSD /%
0.381	0.400	0.782	100.25	99.50	0.87
0.381	0.400	0.776	98.75		
0.381	0.400	0.774	98.25		
0.381	0.400	0.780	99.75		
0.381	0.400	0.779	99.50		
0.381	0.400	0.783	100.50		

表 4 眼明熏洗液中绿原酸、阿魏酸、总黄酮含量测定 (n=3)

g·L ⁻¹			
批号	绿原酸	阿魏酸	总黄酮
20100127	0.524	0.278	6.35
20100609	0.531	0.284	6.47
20110112	0.528	0.280	6.52

3 讨论

川芎的定性鉴别中,曾比较了加乙醚萃取 1 次、2 次和 3 次的提取效果,结果表明乙醚萃取 1 次的供试品溶液薄层色谱鉴别时斑点重叠,分离效果不好。萃取 2 次和 3 次的薄层色谱鉴别分离效果均较好,为操作简便最后确定为加乙醚萃取 2 次,每次 10 mL。

绿原酸含量测定中,分别以 0.4% 磷酸溶液-乙腈 (88:12),0.4% 磷酸溶液-乙腈 (11.5:88.5),甲醇-水-醋酸-三乙胺 (15:85:1:0.2) 作为流动相^[3-5],但样品峰拖尾,影响分离度,通过调节流动相比比例 (20:80:1:0.1),绿原酸出峰时间较为适中,主峰与其他峰的分度、主峰的理论板数、对称性等色谱参数均符合要求,阴性样品无干扰,最后确定流动相为甲醇-水-醋酸-三乙胺 (20:80:1:0.1)。

阿魏酸含量测定中,供试品溶液的制备主要参考《中国药典》2010 年版 (一部) 中“川芎”药材含量测定项下方法,对加热回流和超声提取进行了比较,结果表明两种方法含量测定结果基本相同,考虑到超声提取操作简便,重复性好,故选择对样品以

70% 甲醇进行超声处理。并对超声时间进行考察,结果表明超声提取 30 min 后,样品含量保持恒定,且峰对称性、塔板数、柱效都较高,故确定超声时间为 30 min。

方中金银花、桑叶、菊花、一枝蒿均含有黄酮类成分,黄酮类成分有抑制和杀灭细菌的作用,多与浓度有关,低浓度能抑菌,高浓度能杀菌,为处方中的有效成分,因此拟定总黄酮为含量测定指标。金银花、桑叶、菊花、一枝蒿所含黄酮类成分有芸香苷、木犀草素、槲皮素等,在碱性条件下均能与 Al³⁺ 形成络合物而显色。紫外扫描结果表明样品、芦丁均在 500 nm 波长处有最大吸收,故以此为测定条件。

[参考文献]

[1] 马艳,袁慧星,岳莉,等. 咽炎丸质量标准研究[J]. 中国药房,2009,20(33):2610.

[2] 程耀堂,马燕. 鼻敏通胶囊质量标准研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(5):70.

[3] 宋英,徐度,宋崎,等. HPLC 测定排毒祛湿颗粒中绿原酸含量的方法研究[J]. 中成药,2008,30(2):289.

[4] 陈晓颖,郭文婷,宋粉云. HPLC 法测定菌毒清颗粒中绿原酸的含量[J]. 中成药,2008,31(4):613.

[5] 郑佰平. HPLC 测定清热解毒口服液液中绿原酸含量[J]. 黑龙江科技信息,2011,30:30.

[6] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部. [S]. 北京中国医药科技出版社,2010:38.

[7] 李婉晴,范俊婷,刘勇,等. HPLC 法同时测定抗眩晕颗粒中盐酸川芎嗪和阿魏酸[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(6):59.

[8] 薛改进,赵云丽,郝杰,等. HPLC 法同时测定抗敏颗粒中芍药苷、毛蕊异黄酮苷和阿魏酸的含量[J]. 中国药房,2010,21(23):2168.

[9] 王隶书,王海生,高军,等. 山刺玫不同药用部位中总黄酮的含量测定[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(10):56.

[10] 朱开梅,刘建楠,顾生玖,等. 构树叶中总黄酮微波提取工艺优化[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(17):51.

[责任编辑 顾雪竹]