

# 高效液相色谱法测定复方南板蓝根片中秦皮乙素的溶出度

李兵兰 王娟 施力部 何奕熹

红河哈尼族彝族自治州检验检测院,云南蒙自 661199

**[摘要]** 目的 建立复方南板蓝根片中秦皮乙素溶出度的测定方法。方法 色谱柱为 Agilent 5 TC-C<sub>18</sub> (2) (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-0.1% 磷酸溶液 (14 : 86), 流速为 1 ml/min, 检测波长为 344 nm; 柱温为 35℃, 进样量为 20 μl。溶出条件采用小杯法, 以 0.1 mol/L 盐酸溶液为溶出介质, 体积为 150 ml, 转速为 150 r/min, 100 min 取样, 高效液相色谱法测定, 绘制溶出度曲线。结果 秦皮乙素在 0.2788 ~ 39.032 μg/ml 范围内与其峰面积的线性关系良好, 回归方程  $y=1.1909x+1.1909$  ( $r>0.999$ ); 平均回收率为 99% (RSD=1.81%,  $n=9$ ); 秦皮乙素精密度的 RSD 为 0.29%。不同厂家复方南板蓝根片秦皮乙素的溶出度曲线不相似。结论 本实验采用 HPLC 法测定复方南板蓝根片中秦皮乙素的溶出度, 方法简便、具有复现性, 可用于复方南板蓝根片秦皮乙素的溶出度测定。

**[关键词]** 复方南板蓝根片; 秦皮乙素; 高效液相色谱法; 溶出度

**[中图分类号]** R914 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2095-0616 (2025) 05-0045-04

DOI:10.20116/j.issn2095-0616.2025.05.11

## Determination of dissolution of aesculetin in compound isatis root tablets by high-performance liquid chromatography

LI Binglan WANG Juan SHI Ligao HE Yixi

Honghe Hani and Yi Autonomous Prefecture Research Institute of Inspection and Testing, Yunnan, Mengzi 661199, China

**[Abstract]** **Objective** To establish a method for determining the dissolution of aesculetin in compound isatis root tablets. **Methods** The chromatographic column was Agilent 5 TC-C<sub>18</sub>(2) (250 mm × 4.6 mm, 5 μm). The mobile phase was acetonitrile-0.1% phosphoric acid solution (14 : 86), the flow rate was 1ml/min and the detection wavelength was 344 nm. The column temperature was 35℃, and the sample volume was 20 μl. The dissolution conditions were determined by small cup method, with 0.1 mol/L hydrochloric acid solution as dissolution medium, volume of 150 ml, rotation speed of 150 r/min, sampling for 100 min, and high-performance liquid chromatography, and the dissolution curve was drawn. **Results** Aesculetin had a good linear relationship with its peak area in the range of 0.2788 - 39.032 μg/ml, and the regression equation was  $y=1.1909x+1.1909$  ( $r>0.999$ ). The average recovery rate was 99% (RSD=1.81%,  $n=9$ ). The RSD of aesculetin precision test was 0.29%. The dissolution curves of aesculetin in compound isatis root tablets from different manufacturers were not similar. **Conclusion** In this experiment, the dissolution of aesculetin in compound isatis root tablets was determined by HPLC method. The method is simple and reproducible, and can be used for the dissolution determination of aesculetin in compound isatis root tablets.

**[Key words]** Compound isatis root tablets; Aesculetin; High-performance liquid chromatography; Dissolution

复方南板蓝根片具有消炎解毒功效,用于咽炎、疮疖肿痛,制备方法为南板蓝根、蒲公英、紫花地丁加水煎煮两次后浓缩成稠膏,加入部分紫花地丁细粉及相关辅料,压片即得<sup>[1]</sup>。南板蓝根中含有靛蓝、靛玉红、色胺酮等化学物质,但水提取物中未检出相应峰<sup>[2]</sup>,紫花地丁含有秦皮乙素<sup>[3]</sup>,秦皮乙素属于香豆素类成分,秦皮乙素具有抗菌、抗炎、抗肿瘤和抗氧化的作用<sup>[4]</sup>。复方南板蓝根片现行标准中仅设置

**[基金项目]** 红河州科学技术局项目。

性状、理化鉴别及薄层色谱法鉴别等检验项目,对溶出度未作出规定,不能对制剂进行全面有效的质量控制,不能保证临床用药的安全有效,标准简单亟需提升。基于药物在体内溶解和吸收是药物疗效的关键,溶出度试验作为模拟药物体外溶出的检验方法,已广泛应用于固体口服制剂的研发、生产和监督检验<sup>[5-7]</sup>。目前尚无复方南板蓝根片溶出度实验的文献报道,本研究建立 HPLC 法测定秦皮乙素溶出度的方法,可为药品质量控制提供数据支持。

## 1 仪器与试剂

### 1.1 仪器

赛默飞 UltiMate 3000 高效液相色谱仪, sartorius BS210S 电子天平, sartorius BP211D 电子天平, SK5210HP 型超声波清洗器, 天天发 RCZ-8M 溶出试验仪。

### 1.2 试剂

乙腈(色谱纯), 甲醇(分析纯), 盐酸(分析纯), 磷酸(分析纯), 水为超纯水。秦皮乙素对照品(中国食品药品检定研究院, 批号: 110741-202310), 对照药材南板蓝根(批号: 120971-201507, 供薄层鉴别用)、紫花地丁(批号: 121429-202106, 供薄层鉴别用)均由中国食品药品检定研究院提供; 蒲公英(宁坤生物科技有限公司, 批号: 190801), 复方南板蓝根片共 5 个厂家 24 个批次, 均为样品来源为省级评价性抽样, 见表 1。

表1 24批复方南板蓝根片样品信息

厂家	批号	规格
A	20221201、20230106、20230211、20230104、20230203、20230102、20230103、20230110、20221105、20230113、20230207、20230210、20221207	每片重 0.3 g, 薄膜衣片
B	2212030、2301002	糖衣片
C	ZAB2305、ZCA2303、ZCB2304、ZAB2304	每片重 0.42 g, 素片
D	230208、221259、230316、230102	每片重 0.28 g, 素片
E	230601	每片重 0.3 g, 薄膜衣片

注 A: 云南金柯制药有限公司; B: 广东省罗浮山白鹤制药厂; C: 云南白药集团股份有限公司; D: 云南通大生物药业有限公司; E: 云南省曲靖药业有限公司

## 2 色谱条件与溶液制备

### 2.1 色谱的条件

色谱柱为 Agilent 5 TC-C<sub>18</sub> (2) (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-0.1% 磷酸溶液(14 : 86); 流速为 1 ml/min; 检测波长为 344 nm; 柱温为 35℃; 进样量为 20 μl。

### 2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液 精密称取秦皮乙素对照品 0.013 94 g 至 100 ml 容量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 作为秦皮乙素对照品贮备液, 精密量取秦皮乙素对照品贮备液 7 ml 至 50 ml 容量瓶中, 加 70% 甲醇溶液溶解并稀释至刻度, 摇匀, 制成秦皮乙素对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 按照溶出度与释放度测定法(《中华人民共和国药典》2020 年版通则 0931 第三法小杯法)<sup>[8]</sup>, 以 0.1 mol/L 盐酸 150 ml 为溶出介质, 温度 37℃, 每个溶出杯中加入 1 片样品进行实验,

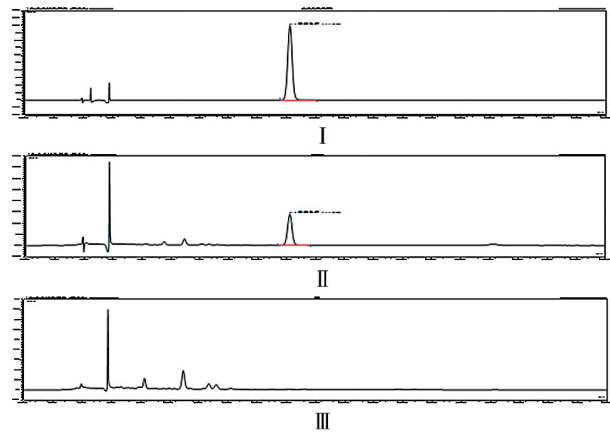
样品转速为 150 r/min, 100 min 后取样 5 ml, 过滤, 取续滤液, 作为供试品溶液。

2.2.3 阴性对照溶液 依据复方南板蓝根片的处方比例制备阴性样品, 称取适量, 按供试品溶液的制备方法制备阴性对照溶液。

## 3 溶出度测定的方法建立与考察

### 3.1 专属性考察

分别精密量取“2.2”项下的对照品溶液、供试品溶液、阴性对照溶液各 20 μl 进行测定, 结果表明其他成分对秦皮乙素的测定无干扰, 见图 1。



注 I: 秦皮乙素对照品溶液; II: 供试品溶液; III: 阴性样品溶液

图1 液相色谱图

### 3.2 线性关系与范围

分别精密量取“2.2.1”中秦皮乙素对照品贮备液制成系列线性考察对照品溶液分别进样, 以秦皮乙素的质量浓度(μg/ml)为横坐标(x), 峰面积为纵坐标(y), 得到回归方程  $y=1.1909x+1.1909$  ( $n=7$ ), 秦皮乙素在 0.2788 ~ 39.032 μg/ml 范围内线性关系良好。

### 3.3 精密度试验

取“2.2.1”中的秦皮乙素对照品溶液, 连续进样 6 次, 计算秦皮乙素峰面积的 RSD 值为 0.29%。

### 3.4 稳定性试验

取 A 厂批号为 20221201 的供试品溶液分别在 0.2、4、6、8、12、16、20、24、28、32、36 h 后进行测定, 秦皮乙素峰 RSD 值为 1.05% ( $n=12$ ), 结果表明供试品溶液在 36 h 内稳定。

### 3.5 重复性试验

精密称取 A 厂批号为 20221201 样品平行制备 6 份, 结果 6 份供试品溶液秦皮乙素的平均含量为 1.3661 μg/mg, RSD 值为 1.4% ( $n=6$ ), 证明方法重复性良好。

### 3.6 回收率试验

精密称取上述 A 厂同一批样品的供试品 9 份加标回收, 9 组样品秦皮乙素的平均回收率为 99%, RSD 值为 1.81%, 见表 2。

表2 回收率试验结果 (n=9)

试验号	取样量 (g)	秦皮乙素加入量 (mg)	秦皮乙素测得量 (mg)	秦皮乙素回收率 (%)
1	0.1215	0.2508	0.2558	102
2	0.1254	0.2508	0.2532	101
3	0.1247	0.2508	0.2491	99
4	0.1521	0.2091	0.2062	98
5	0.1553	0.2091	0.2065	99
6	0.1546	0.2091	0.2035	97
7	0.2113	0.1394	0.1412	101
8	0.2018	0.1394	0.1376	99
9	0.2165	0.1394	0.1348	97

#### 4 溶出度实验方法的选择与溶出度曲线

##### 4.1 溶出实验条件的选择

样品中秦皮乙素含量低,实验首选小杯法。按照溶出度与释放度测定法<sup>[8]</sup>,以 150 ml 的 0.1 mol/L 盐酸、pH6.8 磷酸盐缓冲液为溶出介质,温度 37℃,转速分别为 100、150 r/min 进行预实验,在 0.1 mol/L 盐酸的溶出介质中,A、B 厂样品在 150 r/min、45 min 的累计溶出量高,C、D、E 厂样品在 150 r/min、100 min 累计溶出量高,故拟定溶出介质为 0.1 mol/L 盐酸,溶出度实验转速为 150 r/min、取样时间为 100 min。

##### 4.2 溶出度曲线测定

按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,分别在 10、20、30、45、50、60、70、80、90、100、110 min 取样 5 ml (并同时立即补充 5 ml 的溶出介质),对 5 家生产企业各 1 批样品进行秦皮乙素溶出量测定,计算秦皮乙素的累计溶出度,绘制溶出度曲线。A、B、C、D、E 厂家样品秦皮乙素的溶出度曲线不相似,见图 2。A、B、C、D、E 厂样品在 50 min 时累计溶出速率分别为 2.04、2.3、0.6、0.58、0.7 %/min, A、B 厂样品在 50 min 时累计溶出量接近 100%。

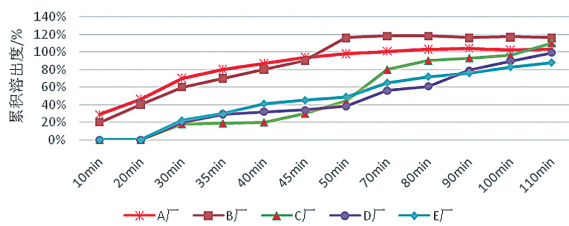


图2 样品溶出度曲线图

#### 5 样品溶出度测定结果

取 24 批样品,每批样品取样 6 片,按“2.2.2”项下的方法制备供试品溶液。按照“2.1”项下的色谱条件测定,在本实验的方法学实验条件下,测定计算 24 批样品中每片样品的秦皮乙素标示含量,采用自身对照法并按外标法峰面积定量分别计算每片样品中秦

皮乙素的溶出量,溶出度测定结果见表 3。根据相关文献<sup>[9-10]</sup>,本实验将取样时间 100 min 时溶出量不得低于标示量的 70% 作为判定依据。从表 3 溶出结果中,相同溶出度实验条件下,A、B 厂样品易溶出,C、D、E 厂的样品较难溶出,C、D 厂各有一批样品溶出量低,溶出度结果不达标。通过辅料分析,A、B 厂样品中加入了辅料玉米淀粉,玉米淀粉是可作为药物片剂的填充剂和崩解剂;C、D 厂样品中未加入任何辅料,仅为中药饮片提取后的浸膏直接制片,浸膏黏性大,崩解时限延长,不易释放有效成分以致溶出缓慢或有效成分溶出速率差异大<sup>[11]</sup>;E 厂家加入硬脂酸镁。因此,辅料对药物的溶出时间和溶出量有一定影响。

表3 24批样品中秦皮乙素的标示含量和溶出度测定结果

编号	厂家	批号	标示含量 (mg/片)	溶出度 (%)					
				1	2	3	4	5	6
1	A	20221201	0.4121	98	103	113	101	103	110
2		20230106	0.4850	102	105	99	97	112	97
3		20230211	0.4595	97	102	104	99	106	99
4		20230104	0.4334	96	99	107	98	110	103
5		20230203	0.4546	103	102	96	97	95	105
6		20230102	0.4613	103	95	94	103	104	95
7		20230103	0.4246	101	95	93	98	102	98
8		20230110	0.5238	89	94	96	99	98	101
9		20221105	0.4674	99	98	101	95	96	102
10		20230113	0.4620	103	96	94	101	100	97
11		20230207	0.4701	102	105	103	97	93	108
12		20230210	0.4471	97	115	112	98	96	95
13		20221207	0.4775	93	92	97	101	96	102
14	B	2212030	0.2558	98	112	115	104	102	103
15		2301002	0.3047	104	112	97	95	93	99
16	C	ZAB2305	2.5304	94	81	44	90	81	87
17		ZCA2303	2.2127	99	95	112	83	93	109
18		ZCB2304	2.4006	98	82	87	107	84	96
19		ZAB2304	2.4363	49	86	83	87	93	82
20	D	230208	0.4926	104	103	60	59	59	101
21		221259	0.4982	117	64	103	110	112	61
22		230316	0.5085	61	69	85	82	59	98
23		230102	0.4586	101	112	106	106	109	102
24	E	230601	0.5204	73	75	84	75	74	79

#### 6 讨论

以 0.1 mol/L 盐酸为溶出介质,转速为 150 r/min,对第二法(浆法)、第三法(小杯法)<sup>[12]</sup>溶出量进行考察,样品在浆法以 500、900、1000 ml 为溶出介质体积和小杯法以 150、200 ml 为溶出介质体积时,溶出量差异不大,但小杯法更适用于小规格口服制剂的溶出度测定<sup>[8]</sup>,故本研究选择了小杯法进行溶出度测定。



南板蓝根抗菌、消炎的主要成分是靛蓝、靛玉红,靛蓝、靛玉红为脂溶性成分<sup>[13]</sup>复方南板蓝根片的处方生产工艺为水煎煮,水提取物中未检出相应峰,用高效液相色谱法测定南板蓝根水溶性成分的含量测定尚未见报道;因此本实验选择秦皮乙素作为有效成分进行研究。

中成药口服固体制剂不进行溶出度检查有多种原因,如入药原料来源的复杂性和特殊性,其有效成分不明或成分多,有效成分含量低,对其标准化研究以及物化特征研究与化学药相比,不具规律性,不易量化评价<sup>[14-15]</sup>。通过溶出度检查,部分厂家的溶出量低于限值70%。溶出度试验可以模拟有效成分在人体内吸收程度,本实验对复方南板蓝根片中秦皮乙素的溶出度研究具有重要意义,可为药品质量控制提供数据支持。

利益冲突:所有作者声明不存在利益冲突。

#### [参考文献]

- [1] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中华人民共和国卫生部药品标准(中药成方制剂第五册)[S]. 北京:人民卫生出版社, 1992: 108.
- [2] 孙媛, 田秀秀, 丁江生. 南板蓝根不同提取物中靛蓝、靛玉红和色胺酮含量及其抑菌活性的研究[J]. 中医药通报, 2021, 20(3): 63-67.
- [3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(2020年版)[S]. 一部. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 352.
- [4] 储正达, 蔡彬. 秦皮甲素和秦皮乙素的药理研究进展[J]. 中药新药与临床药理, 2024, 35(2): 291-298.
- [5] 张雅琦, 屠露萍, 饶泽鹏, 等. 评价口服药物动态溶出的体外模型[J]. 药物分析杂志, 2023, 43(3): 366-374.
- [6] 郭怀忠, 庞晓敏, 王进文, 等. 高效液相色谱法测定维C银翘片溶出度的研究[J]. 中成药, 2011, 33(7): 1178-1182.
- [7] 黄照博, 王龙, 康瑶, 等. 桂枝茯苓胶囊的溶出度测试及评价研究[J]. 中国中药杂志, 2022, 47(19): 5256-5263.
- [8] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(2020年版)[S]. 四部. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 132-137.
- [9] 杨坤, 解瑞辉, 张海娜, 等. UPLC法测定乙酰乌头碱片含量及溶出度[J]. 中国医药导刊, 2023, 25(11): 1112-1116.
- [10] 屈晓萍, 屠相土, 李俊. 复方芦丁片溶出度测定方法的建立及应用[J]. 中国药业, 2023, 32(18): 81-84.
- [11] 刘华钢. 中药片剂有效成分溶出速率存在的问题分析及对策思路[J]. 中成药, 2000, 22(6): 443-445.
- [12] 金建平. 溶出度试验在药品质量控制中的应用[J]. 安徽医药, 2006, 10(9): 699-702.
- [13] 黄远, 董福越, 李楚源. 板蓝根中主要化学成分含量测定方法研究进展[J]. 中国药业, 2020, 29(7): 150-156.
- [14] 白政忠, 刘利群, 张丁丁, 等. 中成药口服固体制剂的系统分类与溶出度方法建立浅析[J]. 中国药品标准, 2015, 16(3): 163-166.
- [15] 侯世祥, 孙毅毅. 中药制剂学发展方向与前景之管见[J]. 中成药, 2001, 23(2): 131-135.

(收稿日期: 2024-06-26)

(上接第12页)

- [5] 刘梦姣, 付伟, 胡永恒, 等. 中西医治疗失眠的研究进展[J]. 医药导报, 2022, 41(5): 684-686.
- [6] Ren R, Zhang J, Zhang T, et al. Auriculotherapy for sleep quality in people with primary insomnia: A protocol for a systematic review and meta-analysis[J]. *Medicine (Baltimore)*, 2019, 98(8): e14621.
- [7] 国务院印发《卫生事业发展“十二五”规划》——积极发展中医药事业列入重点[J]. 中国药房, 2012, 23(47): 4448.
- [8] 国家卫生和计划生育委员会. 全国护理事业发展规划(2016-2020年)[J]. 中国护理管理, 2017, 17(1): 1-5.
- [9] 卢文. 耳压磁珠、王不留行治疗失眠108例疗效比较[J]. 中国针灸, 2000(12): 18-20.
- [10] 焦玥, 韩颖, 周劲草, 等. 耳针疗法治疗失眠的系统评价和Meta分析[J]. 中国针灸, 2022, 42(10): 1184-1194.
- [11] 黄瑞盈, 马小琴, 颜新凌. 穴位按摩治疗失眠的辩证选穴规律分析[J]. 中华护理杂志, 2021, 56(3): 404-408.
- [12] 朱杏茹, 林芯宇, 黄海超, 等. 耳穴贴压相关疗法干预脑卒中后失眠效果的网状Meta分析[J]. 循证护理, 2023, 9(12): 2103-2112.
- [13] 刘静远. 针灸治疗抑郁性失眠有效性及安全性的系统评价与网状Meta分析[D]. 长春: 长春中医药大学, 2024: 8-47.
- [14] 王梦娜, 刘倩汝, 邓新茹, 等. 医养结合模式下老年人中医护理服务需求研究进展[J]. 护理学杂志, 2022, 37(21): 102-105.
- [15] 陈茜茜, 周芷晴, 赵敬军, 等. 耳迷走神经刺激的作用机制与脑疾病临床应用研究进展[J]. 中国康复医学杂志, 2023, 38(10): 1474-1479.

(收稿日期: 2024-06-02)