

· 研究报告 ·

## 苦黄注射液多组分成分测定及成品的输液稳定性研究

何 远, 石建丽, 严榴芽 (余姚市人民医院药剂科, 浙江 余姚, 315400)

**[摘要]** **目的** 建立测定苦黄注射液中4个组分6种有效成分含量的方法, 并比较3种溶媒配制的苦黄成品的输液稳定性, 为苦黄注射液的质量控制和临床合理用药提供参考依据。**方法** ①采用超高效液相色谱-质谱法(UPLC-MS/MS)测定苦参、大黄、茵陈蒿、柴胡4组分中苦参碱、槐国碱、大黄素、大黄酸、芦荟大黄素、柴胡皂苷a的含量; ②苦黄注射液采用最大剂量、最小剂量, 以5%葡萄糖溶液、10%葡萄糖溶液、果糖注射液为溶媒, 配制成品输液, 并测定其在室温下放置36h的稳定性。**结果** ①15 min内苦黄注射液中6种有效成分完全分离, 峰面积与各个成分浓度呈线性关系; 24 h内溶液的稳定性好, 平均加样回收率在99.86%~99.92%之间; ②各个成品输液在36 h均澄清, 无混浊、沉淀产生, 颜色无变化。最小剂量室内光照组10%葡萄糖注射液的成品输液pH值在8 h显著升高, 遮光组比光照组稳定性更好; 最大剂量组中果糖注射液的成品输液24 h后微粒值不符合规定, 其余均在36 h内符合规定。**结论** UPLC-MS/MS法测定苦黄注射液中有效成分的含量, 是一种操作简单、结果准确可靠的方法; 苦黄成品输液在储存和输注过程中应予以遮光, 以保持成品输液质量的稳定; 果糖注射液可能降低苦黄成品输液的质量, 不宜作为苦黄注射液的溶媒。

**[关键词]** 苦黄注射液; 超高效液相色谱-质谱; 稳定性

**[中图分类号]** R943

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1006-0111(2019)02-0173-04

**[DOI]** 10.3969/j.issn.1006-0111.2019.02.015

## The multi-component assay of Kuhuang injection and stability study on its infusion

HE Yuan, SHI Jianli, YAN Liuya (Department of Pharmacy, Yuyao People's Hospital, Zhejiang Yuyao 315400, China)

**[Abstract]** **Objective** To establish a method for the assay of six active ingredients in Kuhuang injection and study the infusion stability prepared with three different solvents. **Methods** ①UPLC-MS/MS was used to determine the contents of matrine, dioscin, emodin, rhein, aloe emodin, and saikosaponin A from *Sophora flavescens*, *Rhubarb*, *Artemisia oleracea*, and *Radix Bupleuri* in Kuhuang injection. ②36 hour stability study at room temperature was conducted on the infusions prepared with 5% glucose solution, 10% glucose solution and fructose injection. **Results** ①6 active ingredients in Kuhuang injection were completely separated in 15 minutes and the peak area was linear with the concentration for each component. The stability of the solution was good within 24 hours and the average recovery rate was between 99.86% and 99.92%. ②All three infusion was clear after 36 hours, no turbidity, sedimentation or color change. The pH value of 10% glucose infusion in the minimal dose group with indoor illumination was significantly increased after 8 h. The stability for shading group was better than illumination group. In the maximum dose group, the infusion made with fructose had micro particles after 24 hours and did not meet the requirements. All the rests met the requirements after 36 hours. **Conclusion** UPLC-MS/MS method is simple, accurate and reliable. It can be used for the determination of active ingredients in Kuhuang injection. Specifically, fructose injection is not a suitable solvent for Kuhuang injection. The infusion should be kept shaded to improve the stability.

**[Key words]** Kuhuang injection; UPLC-MS/MS; stability

近几年来,临床上应用中药注射液造成的不良事件时有发生,因此,中药注射液的成品输液稳定性已经逐渐成为研究的热点<sup>[1]</sup>。为了探讨中药注射液从配制到输液过程中质量的变化,以及室内光照对中药注射液成品输液稳定性的影响,本研究考察了

苦黄注射液的质量及成品输液的稳定性,以期为临床安全用药提供参考,减少不良事件的发生。苦黄注射液是由苦参、大黄、茵陈蒿、柴胡和大青叶经过加工制成的纯中药复方静脉注射液,临床上具有清热利湿、疏肝退黄的效果<sup>[2-3]</sup>,主要用于因湿热内蕴引起的黄疸型病毒性肝炎的治疗。本研究采用UPLC-MS/MS技术对苦黄注射液的有效成分进行质量控制,并模拟临床用药对其成品输液进行稳定

性考察。

## 1 材料与方 法

### 1.1 仪器与试药

UPLC 色谱仪(配有 30 型二元高压梯度泵、1100 型柱温箱、1100 型自动进样器,日本岛津),STQ5500 型串联四级杆线性离子阱质谱仪(电喷雾离子化源和三重四级杆线性离子阱串联质量分析器,美国 AB 公司),电子分析天平(精密度 0.000 1 g,美国梅特勒公司),KQ2700 型 120 W 超声波清洗仪(昆山市超声仪器有限公司)。

苦参碱(批号:20161214)、槐国碱(批号:20170223)、大黄素(批号:20170412)、大黄酸(批号:20161223)、芦荟大黄素(批号:20170212)、柴胡皂苷 a(批号:20170126)均购自国家食品药品检定研究院。苦黄注射液(批号:1610231、1702281、1706141,常熟雷允上制药有限公司),甲醇、甲酸为色谱纯,水为重蒸馏水,其他试剂均为分析纯。

### 1.2 方 法

#### 1.2.1 液相色谱条件

色谱柱为 Diamonsil-C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5.0 μm),柱温为 26 °C,流动相为甲醇(A)-0.1%甲酸缓冲溶液(B),梯度洗脱(0~3.5 min, 22%~51%A; 3.5~5.0 min, 51%~74%A; 5.0~8.0 min, 74%~94%A; 8.0~11.0 min, 94%~94%A),流速为 1.0 ml/min,进样量为 10 μl。

#### 1.2.2 质谱条件

ESI 源,源喷射电压为 4 500~5 500 V;离子源温度为 600 °C,雾化气压力为 4.15 × 10<sup>5</sup> Pa,加热气压力为 4.50 × 10<sup>5</sup> Pa,工作模式为多反应监测模式(MRM)。正负离子同时进行检测监测。苦参碱、槐国碱、芦荟大黄素采用 ESI<sup>+</sup> 监测,大黄酸、大黄素、柴胡皂苷 a 采用 ESI<sup>-</sup> 监测。

#### 1.2.3 混合对照品溶液的配制<sup>[4]</sup>

分别精密称取苦参碱、槐国碱、大黄素、大黄酸、芦荟大黄素、柴胡皂苷 a 对照品适量,分别置于 5 ml 容量瓶中,甲醇溶液溶解,定容至刻度,摇匀,即得各组单一对照品溶液。精密量取上述单一对照品溶液各适量,置于同一 5 ml 容量瓶中,甲醇溶液稀释,定容至刻度,摇匀,即可得到苦参碱 80 ng/ml、槐国碱 70 ng/ml、大黄素 10 ng/ml、大黄酸 168 ng/ml、芦荟大黄素 391 ng/ml、柴胡皂苷 a 95 ng/ml 的混合对照品溶液,采用流动相逐级进行稀释为不同质

量浓度的混合对照品溶液,置于冰箱中(2~8 °C)储存备用。

#### 1.2.4 供试品溶液的配制<sup>[5]</sup>

分别精密量取不同批号的苦黄注射液 1 ml 置于 10 ml 容量瓶中,加入甲醇-水(1:1, V/V)溶液稀释定容,过 0.45 μm 微孔滤膜,即可得到稀释 10 倍的苦黄注射液,用于芦荟大黄素和柴胡皂苷 a 的测定。将前述稀释 10 倍的苦黄注射液继续用甲醇-水(1:1, V/V)溶液稀释,得到稀释 4 000 倍的苦黄注射液供试品,用于苦参碱、槐国碱、大黄素和大黄酸的测定。

## 2 结 果

### 2.1 含量测定

#### 2.1.1 线性关系考察

将“1.2.3”项下的混合对照品溶液按照“1.2”项下的 UPLC-MS/MS 条件进样分析,以对照品进样质量浓度为横坐标(X)、峰面积积分为纵坐标(Y)进行线性回归,得回归方程:

$$\text{苦参碱: } Y = 3.75 \times 10^5 X + 6.94 \times 10^4, \\ r = 0.9997;$$

$$\text{槐国碱: } Y = 2.14 \times 10^5 X + 1.85 \times 10^4, \\ r = 0.9994;$$

$$\text{大黄素: } Y = 1.09 \times 10^6 X + 4.32 \times 10^4, \\ r = 0.9996;$$

$$\text{大黄酸: } Y = 4.39 \times 10^4 X + 2.24 \times 10^5, \\ r = 0.9991;$$

$$\text{芦荟大黄素: } Y = 1.87 \times 10^4 X + 2.61 \times 10^4, \\ r = 0.9994;$$

$$\text{柴胡皂苷 a: } Y = 4.37 \times 10^5 X + 1.14 \times 10^4, \\ r = 0.9994.$$

结果表明,苦参碱、槐国碱、大黄素、大黄酸、芦荟大黄素、柴胡皂苷 a 分别在 1.25~80.21、1.12~71.23、0.15~10.45、2.54~168.74、6.12~392.56、1.49~95.02 ng/ml 范围内线性关系良好。

#### 2.1.2 精密度试验

取同一批次苦黄注射液按照“1.2.4”项下制备得到稀释 10 倍的供试品溶液和稀释 4 000 倍的供试品溶液各 6 份,按照“1.2.1”项下的色谱条件进样分析,记录 6 种成分的色谱峰面积,计算 RSD 值,分别为 1.02%、0.98%、1.01%、1.10%、0.99%、1.08%,表明仪器的精密度较好。

### 2.1.3 重复性试验

取同批次苦黄注射液,按照“1.2.4”项下的制备方法配制稀释10倍和稀释4000倍的供试品溶液各6份,分别按照“1.2.1”项下的色谱条件进样分析,记录6种成分的色谱峰面积,计算含量。苦参碱、槐国碱、大黄素、大黄酸、芦荟大黄素、柴胡皂苷a的平均含量分别为198.74、114.12、2.44、100.37、2.21、0.021 μg/ml, RSD分别为2.14%、1.98%、2.02%、2.14%、2.17%、1.99%,表明该方法重复性良好。

### 2.1.4 加样回收率试验

取同一批次的苦黄注射液,分别加入6种有效成分的2种不同浓度,按照“1.2.4”项下的供试品溶液制备稀释10倍的溶液后,按照“1.2.1”项下的色谱条件进样分析,记录峰面积并计算平均加样回收率,结果如表1所示。

表1 苦黄注射液加样回收率试验结果(n=4)

名称	样品含量(m/μg)	加入量(m/μg)	测得量(m/μg)	加样回收率(%)	平均加样回收率(%)	RSD(%)
苦参碱	112.45	74.45	186.84	99.92	99.92	1.02
	113.02	74.45	187.41	99.92		
	112.54	89.65	202.10	99.90		
	113.10	89.65	202.69	99.93		
槐国碱	102.31	65.23	167.51	99.95	99.90	1.10
	104.23	65.23	169.37	99.86		
	103.26	79.41	182.60	99.91		
	103.25	79.41	182.57	99.89		
大黄素	123.69	84.62	208.24	99.92	99.90	1.10
	122.95	84.62	207.42	99.82		
	123.05	101.23	224.20	99.92		
	123.14	101.23	224.31	99.94		
大黄酸	136.96	98.56	235.42	99.90	99.89	1.21
	134.57	98.56	233.04	99.91		
	135.26	110.23	245.35	99.87		
	134.52	110.23	244.62	99.88		
芦荟大黄素	41.23	23.62	64.80	99.79	99.86	1.32
	41.32	23.62	64.90	99.83		
	41.56	37.95	79.49	99.95		
	42.01	37.95	79.91	99.87		
柴胡皂苷a	112.32	74.56	186.80	99.89	99.89	1.27
	111.41	74.56	185.90	99.91		
	112.02	98.01	209.94	99.91		
	111.32	98.01	209.17	99.84		

### 2.1.5 样品含量测定

取批号161023、170228、170614的3批次苦黄注射液,按照“1.2.4”项下的供试品制备的步骤进行稀释配制后,按照“1.2.1”项下的色谱条件进行含量测定,结果如表2所示。

表2 样品有效成分含量测定结果(ρ<sub>B</sub>/μg·ml<sup>-1</sup>, n=3)

批号	苦参碱	槐国碱	大黄素	大黄酸	芦荟大黄素	柴胡皂苷a
161023	219.84	117.52	2.89	102.34	2.54	0.03
170228	220.45	122.65	2.12	129.84	2.02	0.02
170614	227.12	115.98	2.68	112.41	2.59	0.02

## 2.2 苦黄注射液成品输液稳定性考察

模拟临床用药的浓度以及输液条件,于静脉用药配制中心由专业的药学人员在水平层流型洁净工作台上取苦黄注射液3支(每支10ml),分别加入5%葡萄糖注射液250ml、10%葡萄糖注射液250ml、果糖注射液250ml中,即可得到高浓度苦黄注射液成品输液;再取苦黄注射液3支(每支5ml),分别加入5%葡萄糖注射液250ml、10%葡萄糖注射液250ml、果糖注射液250ml即可得到低浓度苦黄注射液成品输液。对于最大剂量、最小剂量的苦黄成品输液按照2015年版《中华人民共和国药典》中的规定和相关检测方法<sup>[4]</sup>,分别在室内光照(照度4500lx)下、遮光条件下室温放置36h,并在0、1、2、3、4、6、8、10、12、14、20、24、30、36h对其进行外观、可见异物、含量、pH值以及不溶性微粒的检测。结果:①各个成品输液在36h均澄清,无明显的混浊和沉淀产生,颜色无明显的变化,为深黄色的澄清溶液。②低浓度室内光照的10%葡萄糖注射液的成品输液pH在6h后显著升高;高浓度组5%葡萄糖注射液与10%葡萄糖注射液的成品输液pH值呈下降的趋势,低浓度组5%葡萄糖注射液的pH值则略微升高,遮光条件下保存的成品溶液稳定性比光照条件下的好;果糖注射液的成品输液呈中性。③除高浓度时,果糖注射液的成品输液24h后的微粒值不符合规定,其余各个浓度组的微粒值在36h内均符合规定,结果如表3所示。

## 3 讨论

### 3.1 样品的处理方式以及离子化模式的确定

在对苦黄注射液多组分成分进行测定时,其中的苦参碱、槐国碱、芦荟大黄素在正离子模式下的响

表3 3种苦黄成品输液的稳定性

检测项目	高浓度苦黄注射液			低浓度苦黄注射液		
	5%葡萄糖	10%葡萄糖	5%果糖	5%葡萄糖	10%葡萄糖	5%果糖
外观	深黄色澄清溶液			深黄色澄清溶液		
可见物	无明显混浊和沉淀			无明显混浊和沉淀		
遮光下 pH 值	4.6~4.7	3.5~4.0	6.7~6.8	4.7~4.8	4.0~4.2	6.5~6.6
光照下 pH 值	4.7~5.4	3.5~4.5	6.7~6.9	4.7~5.3	4.0~5.8	6.5~6.8
微粒(>10 μm, 个)	11.0~13.2	14.2~18.4	23.5~26.9	5.1~9.7	8.3~12.8	12.5~19.6

应值较好,大黄酸、大黄素、柴胡皂苷 a 在负离子模式下的响应值最好<sup>[5-7]</sup>。在离子扫描结果中,苦参碱、槐国碱为苦参型生物碱逐步开环裂解,分别产生子离子。

因此,采用正负离子同时监测的模式,可以在同一分析周期内对苦黄注射液中的 6 种有效成分进行 LC-MS/MS 检测,为中药苦黄注射液的质量控制提供有效的实验参考数据<sup>[8-9]</sup>,大大缩短了分析的时间,提高了分析检测的效率。

### 3.2 成品输液中溶媒的确定以及稳定性

中药注射剂在给患者输液过程中常常会出现不良反应事件<sup>[10]</sup>,临床一般按照说明书选择 5%葡萄糖注射液或者 10%葡萄糖注射液作为苦黄注射液的溶媒,但不宜使用 0.9%氯化钠注射液作为溶媒,主要原因是苦黄注射液一旦加入电解质会发生盐析作用,产生微粒或沉淀,因此,本研究不选择 0.9%氯化钠注射液,而选择 5%葡萄糖注射液和 10%葡萄糖注射液<sup>[11-12]</sup>,并对两者进行外观、可见异物、含量、pH 值以及不溶性微粒的检测,结果表明,除光照条件下 pH 值有不同程度的增加之外,其余质量指标均符合合格标准。

本研究还选择了果糖注射液为溶媒进行配伍稳定性研究,考察糖尿病患者是否可以用果糖注射液代替葡萄糖注射液作为溶媒,以便为糖尿病患者的合理用药提供有价值的技术支持<sup>[13-15]</sup>。苦黄注射液及其成品输液在储存过程中对光照稳定性差,并且在最大剂量组中果糖注射液的成品输液 24 h 后微粒值不符合规定,在临床使用时,应注意上述引起质量变化的不稳定因素,以达到最大程度的安全治疗。

### 【参考文献】

- [1] 梁晓美,汤晟凌,张国勇. 24 份中药注射液说明书静脉滴注输液配伍调查与分析[J]. 海峡药学,2013,24(3):233-235.
- [2] 白万军,孙晓利,宋浩静,等. 复方苦参注射液在两种输液中的稳定性考察[J]. 中国药师,2017,20(4): 740-742.
- [3] 赵亮,韩利文,欧扬,等. 离子对 RP-HPLC 同时测定复方苦参注射液中氧化苦参碱、槐国碱和苦参碱的含量[J]. 药物分析杂志,2014,32(7):1231-1234.
- [4] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(四部)[S]. 北京:中国医药科技出版社,2015: 111-116.
- [5] 王嘉林,王斯坦. HPLC-MS/MS 测定小柴胡颗粒中柴胡皂苷 a 与柴胡皂苷 d[J]. 安徽医药,2015,19(3): 453-456.
- [6] 姜丽,余兰彬,张启云,等. 基于 UPLC-MS/MS 大承气汤多种活性成分大鼠体内药动学研究[J]. 中草药,2015,46(19): 2908-2915.
- [7] 靳淑敏,王宏侠,田玉路,等. 三黄糖敏汤中 9 种化学成分的 LC-MS/MS 法测定[J]. 中国医药工业杂志,2014,45(9): 876-879.
- [8] 吴茵,穆华,刘勇,等. UPLC-MS/MS 法同时测定玄麦甘桔颗粒中 8 种有效成分[J]. 中草药,2015,46(20): 3034-3038.
- [9] 吴茵,王蕊,任炳楠,等. UPLC-MS/MS 法同时测定沙参麦冬汤中 9 种成分的含量[J]. 中国药房,2016,27(9): 1240-1244.
- [10] 石浩强,许倍铭,葛谭. 从溶媒的选择谈安全使用中药注射剂[J]. 中国药房,2012,23(43): 4125-4126.
- [11] 林欢,黄迎春. 我院中药注射剂溶媒合理使用的探讨[J]. 海峡药学,2014,26(11): 237-239.
- [12] 李克剑,刘洋. 几种中药注射剂与溶媒配伍稳定性的研究进展[J]. 当代医学,2013,19(26): 19-20.
- [13] 陈慧芝,包海鹰,诺敏,等. 苦参的化学成分和药理作用及临床研究概况[J]. 辽宁中医杂志,2014,41(6): 1294-1297.
- [14] 李克剑,刘洋. 几种中药注射剂与溶媒配伍稳定性的研究进展[J]. 当代医学,2013,19(26): 19-20.
- [15] 郭锦辉,高卫芳,贾素杰. 苦黄注射液致不良反应文献分析[J]. 中国医院用药评价与分析,2014,14(1): 72-73.

【收稿日期】 2018-05-17 【修回日期】 2018-10-23

【本文编辑】 陈盛新