

野菊花滴眼液的质量控制

姚向超, 王延东, 黄楚龙(中山大学中山眼科中心, 广东 广州 510060)

摘要: **目的** 研制单剂量包装不含防腐剂的野菊花滴眼液, 并拟定该制剂的质量控制方法。**方法** 采用羟丙甲纤维素为增稠剂, 按处方制备单剂量包装不含防腐剂的野菊花滴眼液, 用高效液相色谱法测定野菊花中有效成分绿原酸和 3, 5- O -双咖啡酰基奎宁酸的含量。**结果** 该制剂制备工艺简单, 可以过滤除菌, 并无菌分装至每支 0.4 mL 单剂量包装的聚丙烯药用滴眼剂瓶中; 绿原酸在 20.020~45.045 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($r=0.9986$) 浓度范围内、3, 5- O -双咖啡酰基奎宁酸在 50.0~100.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($r=0.9990$) 浓度范围内线性关系良好, 平均回收率分别为 100.37 % 和 99.92 %, RSD 分别为 0.72 % 和 0.69 %, 该色谱方法精密度高, 耐用性好, 对照品溶液和供试品溶液可以在 24 h 内保持稳定。**结论** 该制剂含量测定方法简便、准确, 质量稳定, 是一种较理想的眼用制剂, 可用于干眼等眼部疾病的治疗。

关键词: 野菊花; 滴眼液; 制备; 质量控制

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2014)02-0205-05

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2014.02.023

Quality Control of Flos Chrysanthemi Indici Eye Drops

YAO Xiangchao, WANG Yandong, HUANG Chulong (Zhongshan Ophthalmic Center, Sun Yat-sen University, Guangdong 510060 Guangzhou, China)

Abstract: **Objective** To prepare single-dose container for Flos Chrysanthemi Indici eye drops without preservative, and to establish the quality control method. **Methods** Preservative-free Flos Chrysanthemi Indici eye drops in single-dose container were prepared following the formula and with hypromellose as thickening agent and. Chlorogenic acid and 3, 5-dicaffeoylquinic acid contents of Flos Chrysanthemi Indici eye drops were determined by HPLC. **Results** The preparation was simple, and could be sterilized by filtration and could be filled into the 0.4mL single-dose container of polypropylene medical eye drops bottles. The calibration curve of chlorogenic acid showed good linearity relationship in the range of 20.020 ~ 45.045 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $r = 0.9986$, and that of 3, 5-Dicaffeoylquinic acid in the range of 50.0 ~ 100.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $r=0.9990$. The average recovery of chlorogenic acid and 3, 5-Dicaffeoylquinic acid were 100.37 % and 99.92 %, and RSD was 0.72% and 0.69 %, respectively. The established HPLC has high precision and good durability, and the reference solution and testing solution were kept steady with 24h. **Conclusion** The prepared Flos Chrysanthemi Indici eye drops has steady quality, and its content determination is convenient and accurate. It is an ideal ophthalmic preparation for curing dry eyes.

Keywords: Flos Chrysanthemi Indici; Eye drops; Preparation; Quality control

干眼是最常见的眼表疾病之一, 随着人口老龄化, 干眼发病率越来越高。严重干眼可以导致角膜混浊和视力丧失, 明显损害健康和影响患者的生存质量, 长期以来无特效疗法, 对干眼的治疗已成为目前临床亟待解决的问题, 开发治疗干眼的眼局部

新制剂将使许多患者受益^[1-2]。野菊花作为一种益肝明目的中药, 应用其配伍的中医经验方剂治疗干眼疗效显著, 增加基础泪液分泌效果明显, 推测治疗干眼的功效与其含有多种黄酮类成分有着密切的关系^[3]。国内目前尚没有将野菊花制成滴眼液的开发研

收稿日期: 2013-10-11

作者简介: 姚向超, 男, 主管药师, 研究方向: 眼科药学。Email: yxc129@163.com。通讯作者: 王延东, 副主任药师, 研究方向: 眼科药学。Email: wangdysj@163.com。

基金项目: 广东省科技计划项目(2012B031800373)。

究, 因此, 我们通过优化处方、改进制剂工艺, 将野菊花制备成单剂量包装不含防腐剂的滴眼液, 拟定其质量控制方法, 为该药的进一步研发奠定基础。

1 仪器与试药

Agilent 1100 高效液相色谱仪, 美国 Agilent 公司, 包括 G1314A 紫外检测器, G1311A 四元泵, G1316A 柱温箱, G1322A 真空脱气机, G1329A 带温控自动进样器, Agilent 化学工作站。

绿原酸对照品和 3, 5- O -双咖啡酰基奎宁酸对照品, 均由中国药品生物制品检定所提供, 批号分别为: 110753-200413 和 111782-200801; 羟丙甲纤维素, 美国陶氏化学公司, 批号: UL31012N03; 乙腈和甲醇为色谱纯, 其他试剂均为市售分析纯, 水为注射用水。

2 方法与结果

2.1 处方与制备工艺

2.1.1 处方 野菊花 10 g, 羟丙甲纤维素 0.2 g, 氯化钠 0.74 g, 聚山梨酯 80 为 0.1 mL, 氢化蓖麻油 0.1 mL, 加灭菌注射用水至 100 mL。

2.1.2 制备工艺 在无菌条件下, 用热注射用水约 80 mL 分散溶解羟丙甲纤维素, 放冷; 加入氯化钠、聚山梨酯 80 和氢化蓖麻油, 搅拌溶解, 再加入野菊花, 搅拌溶解, 加灭菌注射用水至全量, 搅匀, 0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌, 无菌分装至每支 0.4 mL 单剂量包装的聚丙烯药滴瓶, 即得。

2.2 质量控制 本品含绿原酸($\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{O}_9$)不得少于 0.020 %, 含 3, 5- O -双咖啡酰基奎宁酸($\text{C}_{25}\text{H}_{24}\text{O}_{12}$)不得少于 0.070 %。

2.2.1 性状 本品为淡黄色至黄色的澄明液体。

2.2.2 鉴别 取本品 2 mL, 作为供试品溶液。取菊花对照药材 0.2 g, 加石油醚(30 $^{\circ}\text{C}$ ~60 $^{\circ}\text{C}$)20 mL, 超声处理 10 min, 弃去石油醚, 药渣挥干, 加稀盐酸 1 mL 与乙酸乙酯 50 mL, 超声处理 30 min, 滤过, 滤液蒸干, 残渣加甲醇 2 mL 使溶解, 作为对照药材溶液。另取绿原酸对照品, 加乙醇制成每 1 mL 含 0.5 mg 的溶液, 作为对照品溶液。按照薄层色谱法(《中国药典》2010 年版二部附录 VI B)试验, 吸取上述 3 种溶液各 0.5~1 μL , 分别点于同一聚酰胺薄膜上, 以甲苯-乙酸乙酯-甲酸-冰醋酸-水(1:15:1:1:2)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, 在与对照药材色谱和对照品色谱相应的位置上, 显

相同颜色的荧光斑点。

2.3 检查

2.3.1 pH 值 应为 6.0~7.0 (《中国药典》2010 年版二部附录 VI H)。

2.3.2 渗透压摩尔浓度 取本品, 参照渗透压摩尔浓度测定法(《中国药典》2010 年版二部附录 IX G)测定, 渗透压摩尔浓度比应为 0.90~1.10。

2.3.3 溶液的澄清度与颜色 取本品 5 支, 溶液应澄清, 如显浑浊, 与 1 号浊度标准溶液(中国药典 2010 年版二部附录 IX B)比较, 均不能更浓; 如显色, 与黄色 6 号标准比色液(《中国药典》2010 年版二部附录 IX A 第一法)比较, 均不得更深。

2.3.4 黏度 本品的运动黏度参照《中国药典》2010 年版二部附录 VI G 第一法测定, 在 20 $^{\circ}\text{C}$ 时(毛细管内径 1.0 mm)不得低于 3.0 mm^2/s 。

2.3.5 无菌检查 参照无菌检查法(《中国药典》2010 年版二部附录 XI H)项下的薄膜过滤法进行检查, 冲洗液为 0.1 %蛋白胨水溶液, 冲洗量为 300 mL/膜, 采用金黄色葡萄球菌为阳性对照菌。结果应符合规定。

2.3.6 其他 应符合眼用制剂项下有关的各项规定(《中国药典》2010 年版二部附录 I G)^[4]。

2.4 含量测定

2.4.1 色谱条件与系统适用性试验 以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂; 以乙腈-0.1 %磷酸溶液(20:80)为流动相, 检测波长为 348 nm, 流速 1.0 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$ 。理论板数按 3, 5- O -双咖啡酰基奎宁酸计算应不低于 8000。分别精密量取对照品溶液与供试品溶液各 5 μL , 注入液相色谱仪, 测定, 即得。

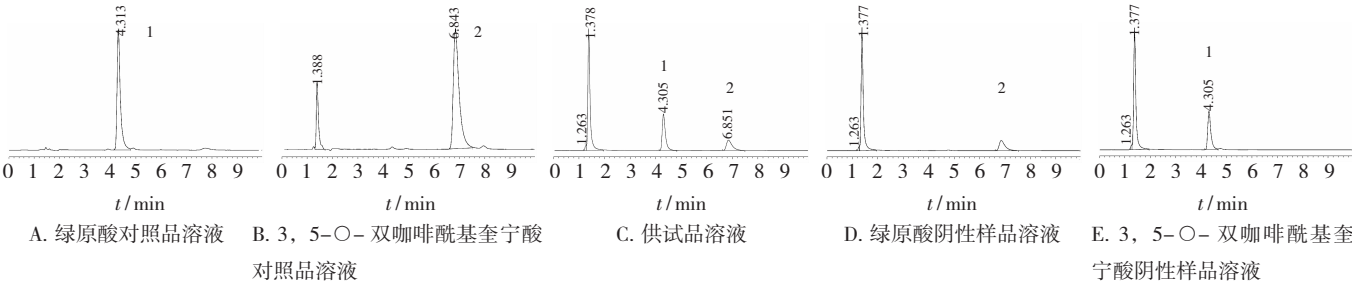
2.4.2 对照品溶液的制备 取绿原酸对照品和 3, 5- O -双咖啡酰基奎宁酸对照品适量, 精密称定, 置棕色量瓶中, 加 70 %甲醇分别制成每 1 mL 含绿原酸 35 μg 和 3, 5- O -双咖啡酰基奎宁酸 80 μg 的对照品溶液, 10 $^{\circ}\text{C}$ 以下保存。

2.4.3 供试品溶液的制备 精密量取本品 5 mL, 置 25 mL 容量瓶中, 加入 70 %甲醇定容至刻度, 作为供试品溶液。

2.5 专属性试验 在该色谱条件下, 精密吸取含量测定项下绿原酸对照品溶液、3, 5- O -双咖啡酰基奎宁酸对照品溶液、供试品溶液以及阴性样品溶液各 5 μL 注入液相色谱仪, 记录色谱图。结果表明, 对照品溶液色谱图中, 绿原酸和 3, 5- O -双咖啡酰基奎宁酸出峰时间适中, 峰形对称, 无相邻杂质峰。

供试品溶液色谱图中，与对照品溶液中绿原酸和 3，5- O -双咖啡酰基奎宁酸峰相同保留时间处，有相同的峰，且峰形对称，均无相邻杂质峰。阴性样

品溶液色谱图中无与绿原酸和 3，5- O -双咖啡酰基奎宁酸对照品峰相同保留时间的峰出现，即其他辅料无干扰，见图 1。



1.绿原酸；2. 3，5- O -双咖啡酰基奎宁酸

图 1 野菊花滴眼液色谱图

Figure 1 HPLC chromatogram of flos chrysanthemi indicis eye drops

2.6 线性关系考察

2.6.1 绿原酸 精密称取绿原酸对照品 10.01 mg，置 10 mL 容量瓶中，用 70 %甲醇稀释至刻度，摇匀，得到浓度为 0.1001 mg/mL 的绿原酸储备液，用 70 %甲醇继续稀释，配制浓度为 20.020，25.025，30.030，35.035，40.040，45.045 $\mu\text{g/mL}$ 的对照品溶液，分别精密量取各溶液 5 μL 注入色谱仪，在上述色谱条件下记录色谱图，量取峰面积。将绿原酸峰面积(A)与浓度(C)做线性回归并计算回归方程。结果见表 1。

表 1 绿原酸含量测定范围

Table 1 Measuring range of chlorogenic acid content

溶液号	浓度 / $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	峰面积(A)
1	20.020	181.132
2	25.025	241.568
3	30.030	306.488
4	35.035	378.928
5	40.040	447.070
6	45.045	493.458

线性回归方程： $A = 32.119C - 12.221$ ，相关系数： $r = 0.9986$ 。

试验结果表明，在本色谱条件下，20.020 ~ 45.045 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 浓度范围内，绿原酸的浓度和绿原酸峰面积呈良好的线性关系。

2.6.2 3，5- O -双咖啡酰基奎宁酸 精密称取 3，5- O -双咖啡酰基奎宁酸对照品 20.00 mg，置于 100 mL 的容量瓶中，加 70 %甲醇溶解定容至刻度，摇匀，即得 0.20 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的溶液，用 70 %甲醇继续稀释，配制浓度为 50.0，60.0，70.0，80.0，90.0，100.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液。分别精密量取 20 μL

注入色谱仪，在上述色谱条件下记录色谱图，量取峰面积。将 3，5- O -双咖啡酰基奎宁酸峰面积(A)与浓度(C)做线性回归并计算回归方程，结果见表 2。

表 2 3，5- O -双咖啡酰基奎宁酸含量测定范围

Table 2 Measuring range of 3，5-Dicaffeoylquinic acid content

溶液号	浓度 / $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	峰面积(A)
1	50.0	87.212
2	60.0	117.895
3	70.0	156.198
4	80.0	182.808
5	90.0	212.798
6	100.0	243.348

线性回归方程： $A = 1.5581C - 4.89$ ，相关系数： $r = 0.9990$ 。

结果表明，在本色谱条件下，50.0 ~ 100.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 浓度范围内，3，5- O -双咖啡酰基奎宁酸的浓度和峰面积呈良好的线性关系。

2.6.3 准确度试验 分别精密称取绿原酸和 3，5- O -双咖啡酰基奎宁酸对照品适量，加入已知浓度的供试品溶液中，分别配制约为规定量 80 %、100 %、120 %的回收率测定溶液各 3 份，共 9 份，按照处方比例加入辅料，依照含量测定项下方法，制备供试品溶液并测定含量，计算回收率，考察相对标准偏差，结果见表 3 和表 4。

结果表明，绿原酸和 3，5- O -双咖啡酰基奎宁酸各浓度下的平均回收率均在 98.0 % ~ 102.0 %之间，9 个回收率数据的 RSD 均小于 2.0 %。本法准确度良好。

2.6.4 精密度试验 取含量测定项下对照品溶液和供

表 3 绿原酸含量测定准确度试验结果

Table3 Measuring recovery of chlorogenic acid content							
比例	份数	已知量/g	加入量/g	测得量/g	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
80 %	1	0.0351	0.0278	0.0634	101.80	100.37	0.72
	2	0.0351	0.0282	0.0632	99.65		
	3	0.0351	0.0279	0.063	100.00		
	4	0.0351	0.035	0.0703	100.57		
100 %	5	0.0351	0.0348	0.0699	100.00	100.37	0.72
	6	0.0351	0.0351	0.0705	100.85		
	7	0.0351	0.0421	0.0776	100.95		
120 %	8	0.0351	0.0422	0.0772	99.76	100.37	0.72
	9	0.0351	0.042	0.077	99.76		

表 5 含量测定精密度试验结果

	对照品溶液		供试品溶液	
	绿原酸	3, 5-〇- 双咖啡酰基奎宁酸 RSD/%	绿原酸	3, 5-〇- 双咖啡酰基奎宁酸 RSD/%
	RSD/%	基奎宁酸 RSD/%	RSD/%	酰基奎宁酸 RSD/%
日内精密度	0.11	0.40	0.74	0.34
日间精密度	0.56	0.52	1.11	0.98
重现性试验	1.06	0.96	0.89	1.03

表 6 含量测定溶液稳定性试验结果

时间/h	对照品溶液主峰面积				供试品溶液主峰面积			
	绿原酸峰面积	RSD/%	3, 5-〇- 双咖啡酰基奎宁酸峰面积	RSD/%	绿原酸峰面积	RSD/%	3, 5-〇- 双咖啡酰基奎宁酸峰面积	RSD/%
0	292.871	0.54	158.939	1.01	290.948	0.29	151.677	1.22
2	295.865		158.298		289.118		151.239	
4	296.236		158.771		289.841		150.744	
6	296.68		158.553		289.792		151.479	
8	296.481		158.201		288.773		150.812	
12	297.676		158.926		289.637		151.139	
24	297.586		162.785		290.951		156.018	

含量测定项下对照品溶液和供试品溶液在室温下放置 24 h 内基本稳定。

2.6.6 耐用性试验 在试验中对色谱柱、柱温、流速等条件进行小的变化，以考察色谱条件发生细微变化时，测定结果是否满足系统适用性的要求，测定结果是否准确。

2.6.6.1 不同色谱柱对测定结果的影响 分别选用 Waters Symmetry C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 和 Diamonsil(2)C₁₈ 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 进行试验，测定结果见表 7。

结果表明，选用上述两种型号的色谱柱对含量测定结果影响较小。

2.6.6.2 柱温对测定结果的影响 分别在 35 ℃、30 ℃、25 ℃ 条件下进行试验，测定结果见表 8。

表 4 3, 5-〇-双咖啡酰基奎宁酸含量测定准确度试验结果

Table 4 Measuring recovery of 3, 5-Dicaffeoylquinic acid content							
比例	份数	已知量/g	加入量/g	测得量/g	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
80 %	1	0.0805	0.065	0.1456	100.15	99.92	0.69
	2	0.0805	0.0636	0.1446	100.79		
	3	0.0805	0.0638	0.1439	99.37		
	4	0.0805	0.0811	0.161	99.26		
100 %	5	0.0805	0.08	0.1611	100.75	99.92	0.69
	6	0.0805	0.0809	0.1615	100.12		
	7	0.0805	0.0965	0.1775	100.52		
120 %	8	0.0805	0.0961	0.1756	98.96	99.92	0.69
	9	0.0805	0.0954	0.1753	99.37		

试品溶液，分别做日内和日间精密度以及重现性试验，结果如表 5。

在该色谱条件下，测量样品中绿原酸和 3, 5-〇- 双咖啡酰基奎宁酸的含量，精密度良好。

2.6.5 稳定性试验 取含量测定项下对照品溶液和供试品溶液，置室温环境下放置，分别于 0, 2, 4, 6, 8, 12, 24 h 测定峰面积，结果见表 6。

表 7 不同色谱柱的测定结果

Table 7 Measuring result of different liquid chromatographic column		
色谱柱	绿原酸含量/%	3, 5-〇- 双咖啡酰基奎宁酸含量/%
Symmetry C ₈	0.023	0.076
Diamonsil(2) C ₈	0.023	0.076

表 8 不同柱温的测定结果

Table 8 Measuring result of different column temperature				
柱温/℃	绿原酸保留时间/T	绿原酸含量/%	3, 5-〇- 双咖啡酰基奎宁酸保留时间/T	3, 5-〇- 双咖啡酰基奎宁酸含量/%
35	4.3	0.022	6.9	0.076
30	4.3	0.022	6.8	0.075
25	4.4	0.023	6.8	0.076

结果表明，柱温对含量测定结果影响较小。

2.6.6.3 流速对测定结果的影响 分别在 1.2, 1.0,

0.8 mL·min⁻¹ 条件下进行试验, 测定结果见表 9。

表 9 不同流速的测定结果

Table 9 Measuring result of different flow velocity				
流速 /mL·min ⁻¹	绿原酸保留 时间 /T	绿原酸 含量 /%	3,5- O - 双咖啡酰基 奎宁酸保留时间 /T	3,5- O - 双咖啡酰 基奎宁酸含量 /%
1.2	3.6	0.022	5.8	0.076
1.0	4.3	0.023	6.8	0.077
0.8	5.4	0.022	8.5	0.076

结果表明, 流速主要影响峰的保留时间, 对含量测定结果影响较小。

综上所述, 本方法确定的色谱方法较好, 当色谱柱、柱温和流速发生细微变化时, 能满足系统适用性的要求, 对测定结果影响较小。

3 讨论

干眼的发病机制尚不明确, 目前普遍认为是非感染性的免疫相关性炎症, 因此, 对于有眼表面炎症的中、重度干眼, 抗炎和免疫抑制治疗十分必要, 可应用糖皮质激素滴眼, 但激素可引起眼压升高、视网膜病变等并发症而限制了它的使用^[1-2]。文献^[5]报道, 中药治疗本病取得了较好的临床效果, 因此, 深入开展中医中药防治干眼的研究十分必要。野菊花作为一种益肝明目的中药, 应用其配伍的中医经验方剂治疗干眼疗效显著, 增加基础泪液分泌效果明显, 推测治疗干眼的功效与其含有多种黄酮类成分有着密切的关系。将野菊花研制成单剂量包装不含防腐剂的滴眼液, 减少了全身用药引起的副作用, 提高了眼局部组织的药物浓度, 增强了药物疗效, 同时避免了防腐剂对眼部的损害, 该药应用于干眼患者会取得较好的临床效果。

由于野菊花难溶于水, 因此在处方中加入了增溶剂聚山梨酯 80 促进其溶解, 并增加其稳定性; 采用氯化钠作为渗透压调节剂将其调成等渗; 同时选用羟丙甲纤维素作为增稠剂, 能够增加药液的黏稠度, 使野菊花在眼部的滞留时间延长, 从而促进野菊花在眼内的吸收。

因干眼症患者的泪膜和泪道系统通常处于非正常状态, 泪液动态交换速率较正常人慢。因此, 患者不能在短时间内通过分泌泪液稀释药物中的抑菌剂, 从而延长了抑菌剂在眼表的停留时间, 在频繁、长期使用时会造成眼表损害^[6]。因此, 本制剂采用单剂量包装, 未添加任何抑菌剂, 从而避免了抑菌剂对眼表的损害。

采用该色谱条件测定野菊花的含量, 峰形较好, 主成分峰分离较好, 具有良好的专一性, 测定结果稳定, 回收完全, 方法耐用性较好。而且该制剂制备工艺简单, 质量稳定, 是一种较理想的眼用制剂, 可用于干眼等眼部疾病的治疗。

参考文献:

[1] 刘祖国. 干眼的治疗[J]. 中华眼科杂志, 2006, 42(1): 71-74.
[2] Pflugfelder SC. Anti-inflammatory therapy of dry eye[J]. Ocul Surf, 2003, 1(1): 31-36.
[3] 吴钉红, 杨立伟, 苏薇薇. 野菊花化学成分及药理研究进展[J]. 中药材, 2007, 2(27): 142-144.
[4] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 附录 9.
[5] 陆燕, 高卫萍. 干眼症的中医经验方治疗研究[J]. 中医学报, 2010, 3(25): 597-598.
[6] 宁黎丽. 眼用制剂研发过程中应关注抑菌剂的合理使用和质量控制[J]. 中国药学杂志, 2007, 42(23): 1836-1838.

(编辑: 宋威)

HPLC 法同时测定冠心 V 号颗粒中丹参素和丹参酮 II A 的含量

周芙琼, 高运军, 夏崇才, 顾 宁(南京市中医院, 江苏 南京 210001)

摘要: 目的 建立同时测定冠心 V 号颗粒中丹参素和丹参酮 II A 含量的 HPLC 方法。方法 采用高效液相色谱法, 以甲醇-0.5 %醋酸水溶液梯度洗脱, 色谱柱为 Kromasil C₁₈ 柱(4.6×250 mm, 5 μm), 流速为 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长为 281 nm, 柱温为 35 ℃。结果 丹参素和丹参酮 II A 分别在 0.1~0.8 μg 和 0.02~0.16 μg 范围内呈良好

收稿日期: 2013-11-22
作者简介: 周芙琼, 女, 中药师, 研究方向: 中药制剂及质量标准研究。Email: qiong860612@163.com。通讯作者: 顾宁, 主任医师, 研究方向: 中西医结合心血管疾病的研究。Email: guning@medmail.com.cn。
基金项目: 南京市卫生局科技发展项目(201108005)。