

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2021.13.022

梔黄消瘀止痛膏中梔子苷含量测定*

鲁明明¹, 林新艳¹, 郭学群², 莫文², 许金海², 范赵翔², 龚丽¹, 殷书梅^{1△}

(1. 江苏康缘阳光药业有限公司, 江苏 南京 210046; 2. 上海中医药大学附属龙华医院, 上海 200032)

摘要:目的 建立测定梔黄消瘀止痛膏中梔子苷含量的高效液相色谱法。方法 色谱柱为岛津 Wondasil C₁₈-WR 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-水(10:90, V/V), 流速为 1.0 mL/min, 检测波长为 238 nm, 柱温为 35 ℃, 进样量为 10 μL。结果 梔子苷质量浓度在 7.55~151.00 μg/mL 范围内与峰面积线性关系良好($R^2=0.9994$, $n=10$); 精密度、重复性、稳定性试验结果的 RSD 均小于 2% ($n=6$); 梔子苷的平均加样回收率为 99.18%, RSD 为 0.83% ($n=9$)。结论 该方法简便灵敏, 重复性好, 准确度高, 可用于梔黄消瘀止痛膏中梔子苷的含量测定。

关键词: 梔黄消瘀止痛膏; 梔子苷; 高效液相色谱法; 含量测定

中图分类号: R932; R284.1; R286.0

文献标志码: A

文章编号: 1006-4931(2021)13-0079-03

Content Determination of Geniposide in Zhihuang Xiaoyu Zhitong Ointment by HPLC

LU Mingming¹, LIN Xinyan¹, WU Xuequn², MO Wen², XU Jinhai², FAN Zhaoxiang², GONG Li¹, YIN Shumei¹

(1. Jiangsu Kanion Sunshine Pharmaceutical Co., Ltd., Nanjing, Jiangsu, China 210046; 2. Longhua Hospital Affiliated to Shanghai University of TCM, Shanghai, China 200032)

Abstract: Objective To establish a high-performance liquid chromatography(HPLC) method for the content determination of geniposide in the Zhihuang Xiaoyu Zhitong Ointment. **Methods** The chromatographic column was Wondasil C₁₈ WR column(250 mm×4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was acetonitrile-water(10:90, V/V), the flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelength was 238 nm, the column temperature was 35 ℃, and the injection volume was 10 μL. **Results** Geniposide showed good linearity in the range of 7.55~151.00 μg/mL($R^2=0.9994$, $n=10$). The RSDs of precision, repeatability and stability tests were less than 2% ($n=6$). The average recovery of geniposide was 99.18% with RSD of 0.83% ($n=9$). **Conclusion** The method is simple, sensitive, reproducible and accurate, which can be used for the content determination of geniposide in the Zhihuang Xiaoyu Zhitong Ointment.

Key words: Zhihuang Xiaoyu Zhitong Ointment; geniposide; HPLC; content determination

梔黄消瘀止痛膏由梔子、大黄、木瓜等多味中药组方,配以饴糖搅拌赋型而成,具有活血化瘀、消肿止痛功效,临床用于治疗踝、膝、肘、腕等关节的跌打损伤、急性软组织损伤,疗效较好^[1-2]。原剂型采用传统工艺制成,难以满足清洁性及低过敏性等要求,不便于携带保存,使应用受到限制,工艺改良后制成了橡胶膏。梔子味苦、性寒,为方中君药,功效见于《神农本草》、后续本草及历版《中国药典》^[3-4],能泻火除烦、清热利湿、凉血解毒,且对金黄色葡萄球菌、绿脓杆菌及皮肤致病癣菌均有广谱抗菌作用^[5]。其有效成分是以梔子苷(别名京尼平苷)为代表的环烯醚萜苷类及有机酸酯类成分^[3],具有解热、镇痛、利胆、抗炎、缓泻、治疗软组织损伤等作用^[6-12]。本研究中建立了测定新型梔黄消瘀止痛膏中梔子苷含量的方法,以确保产品质量、临床应用的安全性及有效性。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Agilent 1200 型高效液相色谱仪(配有四元泵、可变

波长扫描紫外检测器,日本安捷伦科技有限公司); Mettler AG135 型电子天平、Mettler AB135S 型电子天平(梅特勒-托利多<上海>有限公司,精度均为十万分之一); HH-2 型恒温水浴锅(金坛市杰瑞尔电器有限公司); KQ-500DE 型超声波清洗器(昆山禾创超声仪器有限公司,功率为 500 W,频率为 40 kHz)。

1.2 试剂

梔子苷对照品(中国食品药品检定研究院,批号为 110749-201919,纯度为 97.1%); 梔黄消瘀止痛膏(江苏康缘阳光药业有限公司,批号分别为 200501, 200502, 200503); 甲醇(批号为 200106022H), 乙醇(分析纯,批号为 200211160H), 均购自南京化学试剂股份有限公司; 乙腈(色谱纯,美国天地有限公司,批号为 19025118)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件及系统适用性试验^[13-14]

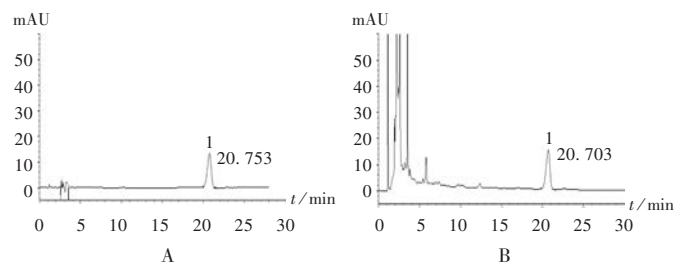
色谱柱:岛津 Wondasil C₁₈-WR 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相:乙腈-水(10:90, V/V); 流速:1.0 mL/min;

*基金项目:上海市科学技术委员会科研计划项目[17401901400]。

第一作者:鲁明明,男,大学本科,工程师,执业中药师,研究方向为中药质量标准,(电子信箱)qc1039@163.com。

△通信作者:殷书梅,女,大学本科,主任中药师,研究方向为新药研究与开发,(电子信箱)yin-shumei@163.com。

检测波长:238 nm;柱温:35℃;进样量:10 μL。理论板数按栀子苷峰计不低于1 500。在此色谱条件下的色谱图见图1。由于栀子苷为样品栀子中的独有成分,故未进行阴性对照试验。



1. 栀子苷
A. 对照品溶液 B. 供试品溶液

图1 高效液相色谱图
1. geniposide
A. Reference solution B. Test solution

Fig. 1 HPLC chromatograms

2.2 溶液制备^[15]

取样品贴膏2片,除去盖衬,将药膏刮下,混合均匀,取1 g,精密称定,加入50 mL甲醇,称定质量,超声提取50 min,冷却后称定质量,用甲醇补足减失的质量,将溶液摇匀,滤过,取续滤液,即得供试品溶液。取栀子苷对照品适量,精密称定,加甲醇制成每1 mL含30 μg的溶液,即得对照品溶液。

2.3 方法学考察

线性关系考察:取栀子苷对照品适量,精密称定,置100 mL容量瓶中,用甲醇溶解并定容至刻度,摇匀,配制成每1 mL含15.1 mg的对照品贮备液;精密吸取对照品贮备液适量,以甲醇稀释,配制成质量浓度为7.55, 15.10, 30.20, 75.50, 151.00 μg/mL的系列对照品溶液。按2.1项下色谱条件各进样10 μL,重复2次,测定峰面积,以对照品溶液进样质量浓度(X , μg/mL)为横坐标、峰面积为纵坐标(Y)进行线性回归,得栀子苷的回归方程 $Y = 15.708X - 26.668$ ($R^2 = 0.9994$, $n = 10$)。结果栀子苷的质量浓度在7.55~151.00 μg/mL范围内与峰面积线性关系良好。

精密度试验:精密吸取同一栀子苷对照品溶液(质量浓度为30.20 μg/mL)6份,按2.1项下色谱条件进样10 μL,测定峰面积。结果峰面积的平均值为451.10, RSD 为1.52% ($n = 6$),表明仪器精密度良好。

重复性试验:取样品1 g,精密称定,平行6份,依法制备供试品溶液,并进样测定含量。结果栀子苷含量的平均值为1.59 mg/g, RSD 为0.92% ($n = 6$),表明方法重复性良好。

稳定性试验:取重复性试验项下供试品溶液适量,分别于0, 2, 4, 8, 12, 24 h时进样10 μL测定。结果栀子

苷峰面积的平均值为494.98, RSD 为1.53% ($n = 6$),表明供试品溶液在24 h内稳定。

加样回收试验:取样品(栀子苷含量为1.59 mg/g)1 g,精密称定,平行9份,每3份为1组,分别按含栀子苷0.5, 1.0, 1.5 mg/g准确加入栀子苷对照品溶液,制备供试品溶液,进样测定,记录峰面积,并计算加样回收率。结果见表1。

表1 栀子苷加样回收试验结果($n = 9$)

Tab. 1 Results of the recovery test of geniposide($n = 9$)

取样量(g)	样品含量(mg)	加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	$\bar{X}$ (%)	RSD (%)
1.035 1	1.645 8	0.78	2.421	99.38		
1.052 5	1.673 5	0.78	2.441	98.40		
1.034 6	1.645 0	0.78	2.426	100.13		
1.029 2	1.636 4	1.56	3.174	98.56		
1.024 3	1.628 6	1.56	3.189	100.03	99.18	0.83
1.033 8	1.643 7	1.56	3.200	99.76		
1.027 2	1.633 2	2.34	3.923	97.85		
1.023 1	1.626 7	2.34	3.963	99.84		
1.024 9	1.629 6	2.34	3.938	98.65		

2.4 样品含量测定

取3批(批号分别为200501, 200502, 200503)样品各1 g,精密称定,依法制备供试品溶液,进样测定,并计算栀子苷的含量。结果3批样品中栀子苷的含量分别为1.61, 1.61, 1.62 mg/g。中药材质量受产地、季节、采收期等诸多因素影响,故栀子药材的栀子苷含量存在偏差,结合以上3批样品含量测定结果,拟暂定栀子黄消瘀止痛膏所含栀子苷的含量不低于1.45 mg/g。

3 讨论

3.1 超声提取溶剂和提取时间选择

考察了2种超声提取溶剂(甲醇和乙醇)对提取结果的影响。结果,采用甲醇超声处理的供试品溶液的色谱峰可完全分离,乙醇制备的供试品溶液的色谱图中,栀子苷色谱峰与其他成分无法有效分离,且峰形较差,故选择提取溶剂为甲醇。考察了不同超声提取时间(30, 40, 50, 60 min)对提取结果的影响。结果,50 min和60 min时栀子苷的提取率和提取效率基本一致,且均高于30 min和40 min,从节约能源、提高工作效率方面考虑,故最终选择超声提取时间为50 min。

3.2 色谱条件选择

考察了不同流速(0.8, 0.9, 1.0, 1.1 mL/min)对提取结果的影响,结果供试品溶液中栀子苷峰在上述4种流速下均能较好分离,表明不同流速条件下的耐用性均较好。考察了不同柱温(30, 35, 40℃)对提取结果的影响,结果供试品溶液中栀子苷色谱峰在上述3种柱温下均能较好分离,表明不同温度条件下的耐用性均较好。