

· 化学与分析 ·

宣痹凝胶贴膏剂中龙胆苦苷、柚皮苷、原苏木素 B 含量测定

刘月环,杜守颖*,陆洋,白洁,王玥,李慧云
(北京中医药大学中药学院,北京 100102)

[摘要] 目的:建立宣痹凝胶贴膏剂中龙胆苦苷、柚皮苷、原苏木素 B 含量测定方法。方法:采用高效液相色谱法,Merck RP-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈-0.1% 磷酸梯度洗脱(0 ~ 33 min,11% 乙腈;33 ~ 36 min,11% 乙腈 ~ 20% 乙腈;36 ~ 67 min,20% 乙腈),柱温 20 ℃,流速 0.6 mL·min⁻¹,检测波长 283 nm,进样量 10 μL。结果:龙胆苦苷、柚皮苷、原苏木素 B 分别在 0.014 9 ~ 0.745 0 μg,0.007 1 ~ 0.355 0 μg,0.002 2 ~ 0.107 5 μg 呈良好的线性关系,平均回收率分别为 98.87% (RSD 2.19%),103.51% (RSD 0.94%),99.58% (RSD 2.49%)。结论:方法操作简便,准确,重复性好,可作为宣痹凝胶贴膏剂的质量控制。

[关键词] 宣痹凝胶贴膏剂;龙胆苦苷;柚皮苷;原苏木素 B;高效液相色谱
[中图分类号] R283.6 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2012)09-0072-03

Determination for Content of Gentiopicroside, Naringin
and Protosappanin B from Xuanbi Gel Plaster

LIU Yue-huan, DU Shou-ying*, LU Yang, BAI Jie, WANG Yue, LI Hui-yun
(School of Chinese Pharmacy, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China)

[Abstract] **Objective:** To establish content determination method for gentiopicroside, naringin and protosappanin B from Xuanbi gel plaster. **Method:** HPLC was used with Merck RP-C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), gradient eluted with mobile phase of 0.1% phosphoric acid-acetonitrile (0-33 min, 11% acetonitrile; 33-36 min, 11% acetonitrile - 20% acetonitrile; 36-67 min, 20% acetonitrile), column temperature was 20 ℃, flow rate was 0.6 mL · min⁻¹, detection wavelength 283 nm, injection volume was 10 μL. **Result:** The linear range of gentiopicroside, naringin and protosappanin B were 0.014 9-0.745 μg, 0.007 1-0.355 μg, 0.002 2-0.107 5 μg, respectively. Average recovery of these ingredients were 98.87% (RSD 2.19%), 103.51% (RSD 0.94%), 99.58% (RSD 2.49%), respectively. **Conclusion:** This established method was simple, accurate and repeatable, it could be used as quality control method for Xuanbi gel plaster.

[Key words] Xuanbi gel plaster; gentiopicroside; naringin; protosappaninB; HPLC

宣痹凝胶贴膏剂处方来源于北京望京医院朱立国教授的临床经验方,由秦艽、骨碎补、苏木等 15 味药组成,具有驱风除湿、活血化瘀之功效,主要用于治疗关节痹痛、骨性关节炎等症。和传统的中药外用制剂相比,凝胶贴膏剂中的高分子基质材料能更好地吸收和承载富含水溶性和脂溶性成分的中药提取物并“凝胶化”成型,能快速、持久地透皮释放基质中所包含的有效成分。为更好地控制宣痹凝胶贴膏剂质量,本研究以方中有效成分龙胆苦苷、柚皮苷、原苏木素 B 为指标,采用 HPLC 同时测定 3 种指标成分。

[收稿日期] 20111227(019)
[基金项目] 国家“重大新药创制”科技重大专项(2009ZX09502-008,2009ZX09308-003);国家自然科学基金面上项目(81073057);北京中医药大学复方中药制剂研究创新团队发展计划(2011JYB22XS-052)
[第一作者] 刘月环,在读硕士,从事中药凝胶贴膏剂的研究, Tel:010-84739402, E-mail:rita_liu009@163.com
[通讯作者] * 杜守颖,博士,教授,博士生导师,从事中药新剂型与制剂关键技术研究, Tel:010-84738615, E-mail:dushouying@263.net

该方法简便,易于操作,不仅满足测定要求,且大大减少工作量^[1]。

1 材料

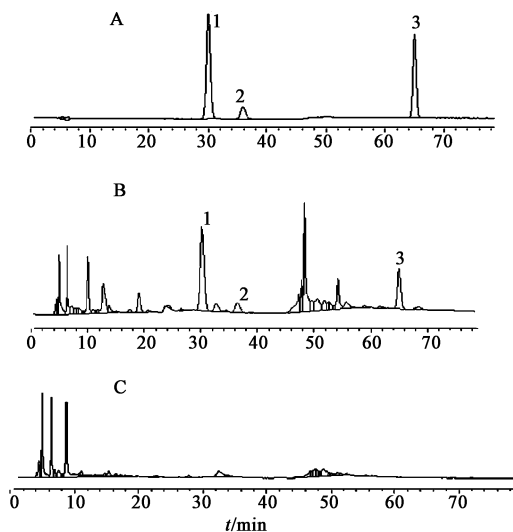
LC-20AT 型高效液相色谱仪 (SPD-20A VWD 检测器, LCSolution 色谱工作站, 日本岛津公司), BT125D、BSA224S 型电子分析天平 (北京赛多利斯科学仪器有限公司)。

龙胆苦苷、柚皮苷对照品 (中国药品生物制品检定所, 批号分别为 110770-200409, 110722-200610), 原苏木素 B 对照品 (北京伊普瑞斯科技有限公司, 批号 A0365), 乙腈、磷酸为色谱纯, 水娃哈哈纯净水, 硅藻土 (天津市光复精细化工研究所), 宣痹凝胶贴膏剂 (自制), 其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

本试验以龙胆苦苷、柚皮苷、原苏木素 B 3 种成分作为宣痹凝胶贴膏剂指标成分, 建立了同时测定复方中多种成分的 HPLC 快速检验方法^[2-5]。

2.1 色谱条件 Merck RP-C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈-0.1% 磷酸梯度洗脱 (0 ~ 33 min, 11% 乙腈; 33 ~ 36 min, 11% 乙腈 ~ 20% 乙腈; 36 ~ 67 min, 20% 乙腈), 流速 0.6 mL · min⁻¹, 柱温 20 °C, 检测波长 283 nm。色谱图见图 1。



A. 对照品; B. 供试品; C. 阴性样品; 1. 龙胆苦苷;
2. 原苏木素 B; 3. 柚皮苷

图 1 宣痹凝胶贴膏剂 HPLC

2.2 对照品溶液的制备 取龙胆苦苷、柚皮苷、原苏木素 B 对照品适量, 精密称定, 加甲醇制成每 1 mL 含龙胆苦苷 0.029 8 mg, 含柚皮苷 0.014 2 mg, 含原苏木素 B 0.004 3 mg 的对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备 精密称取 1 g 膏药, 精密

加入 3 倍量硅藻土研磨均匀, 放入 50 mL 锥形瓶中, 精密加入 80% 甲醇 40 mL, 称重, 超声处理 15 min, 冷却到室温, 称定质量, 用 80% 甲醇补足减失的质量, 摇匀, 从中精密吸取上清液 2 mL 至 10 mL 量瓶中, 80% 甲醇稀释至刻度, 用 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 作为供试品溶液。

2.4 线性关系的考察 取龙胆苦苷、柚皮苷、原苏木素 B 的混标液 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25 μL 进样, 按上述色谱条件进行测定, 以峰面积为纵坐标, 进样量为横坐标, 计算回归方程。分别得龙胆苦苷、柚皮苷、原苏木素 B 的回归方程为 $Y = 2\,196\,812X + 632.97$ ($r = 0.999\,9$), $Y = 2\,969\,737X + 20.84$ ($r = 0.999\,9$), $Y = 2\,133\,206X + 461.81$ ($r = 0.999\,9$)。结果表明龙胆苦苷、柚皮苷、原苏木素 B 分别在 0.014 9 ~ 0.745 0, 0.007 1 ~ 0.355 0, 0.002 2 ~ 0.107 5 μg 呈良好线性关系。

2.5 精密度试验 精密吸取同一供试品溶液, 注入高效液相色谱仪, 重复进样 6 次, 测定龙胆苦苷、柚皮苷、原苏木素 B 的峰面积, RSD 分别为 0.29%, 0.31%, 1.29%, 表明本法精密度良好。

2.6 稳定性试验 精密吸取新制备的供试品溶液, 分别于配制后 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 h 进样, 测得龙胆苦苷、柚皮苷、原苏木素 B 峰面积 RSD 分别为 0.32%, 0.54%, 1.38%, 表明样品在 12 h 内稳定。

2.7 重复性试验 取同一批供试品 (批号 110807), 按供试品溶液制备方法制备 6 份供试品溶液, 按上述色谱条件测定龙胆苦苷、柚皮苷、原苏木素 B 含量。结果龙胆苦苷平均质量分数为 4.574 mg · g⁻¹, RSD 0.82%, 柚皮苷平均质量分数为 1.365 mg · g⁻¹, RSD 1.09%, 原苏木素 B 平均质量分数为 0.669 mg · g⁻¹, RSD 0.94%。

2.8 加样回收率试验

2.8.1 溶剂的配制 精密称取龙胆苦苷、柚皮苷、原苏木素 B 对照品各 2.37, 7.18, 15.68 mg 至 100 mL 量瓶中, 甲醇稀释至刻度。从中精密移取 88 mL 至锥形瓶中, 精密加入甲醇 168 mL 和水 64 mL, 摇匀, 即得 80% 甲醇标准液。

2.8.2 供试品的制备 精密称取已知含量同批样品 6 份 (批号 110807), 每份约 0.5 g, 精密加入 3 倍量硅藻土研磨均匀, 放入 50 mL 锥形瓶中, 精密加入上述配制的 80% 甲醇标准液, 按供试品溶液制备法制成供试品溶液, 按 2.1 方法测定, 计算回收率, 结果见表 1。

2.9 样品测定 分别制备 3 批 (110807, 110810,

110815)样品,按上述含量测定方法测定,3 批样品中龙胆苦苷、柚皮苷、原苏木素 B 的平均质量分数分别为 4.629,1.409,0.654 mg·g⁻¹。根据测定数

据,限度暂定为本品含龙胆苦苷不低于 3.74 mg·g⁻¹、柚皮苷不低于 1.15 mg·g⁻¹、原苏木素 B 不低于 0.526 mg·g⁻¹。

表 1 龙胆苦苷、柚皮苷、原苏木素 B 加样回收率试验

指标成分	No.	样品取样量/g	样品含量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
龙胆苦苷	1	0.500 2	2.288	1.724 8	3.959	96.91	98.87	2.19
	2	0.500 6	2.290	1.724 8	4.002	99.28		
	3	0.500 9	2.291	1.724 8	4.028	100.69		
	4	0.500 6	2.290	1.724 8	3.947	96.06		
	5	0.500 3	2.288	1.724 8	3.989	98.59		
	6	0.500 8	2.291	1.724 8	4.045	101.72		
柚皮苷	1	0.500 2	0.683	0.789 8	1.504	103.96	103.51	0.94
	2	0.500 6	0.683	0.789 8	1.498	103.18		
	3	0.500 9	0.684	0.789 8	1.509	104.50		
	4	0.500 6	0.683	0.789 8	1.487	101.74		
	5	0.500 3	0.683	0.789 8	1.502	103.65		
	6	0.500 8	0.684	0.789 8	1.505	104.05		
原苏木素 B	1	0.500 2	0.335	0.260 7	0.599	101.30	99.58	2.49
	2	0.500 6	0.335	0.260 7	0.586	96.17		
	3	0.500 9	0.335	0.260 7	0.601	101.84		
	4	0.500 6	0.335	0.260 7	0.589	97.48		
	5	0.500 3	0.335	0.260 7	0.601	102.02		
	6	0.500 8	0.335	0.260 7	0.593	98.68		

3 讨论

HPLC 测定龙胆苦苷、柚皮苷、原苏木素 B 成分,通过探索不同洗脱体系,不同梯度洗脱程序,最终发现采用乙腈-0.1% 磷酸溶液为流动相时,3 种成分分离度好。由于样品中成份较多,所以采用梯度洗脱测定,以缩短样品的保留时间。

采用紫外检测器,进行 190~400 nm 全波长紫外扫描,结果龙胆苦苷、柚皮苷和原苏木素 B 的最大吸收波长分别为 248,276 nm;284 nm;256,287 nm。现行《中国药典》收载的龙胆苦苷、柚皮苷、原苏木素 B 的测定波长分别为 254,283,285 nm。兼顾 3 种成分的最大吸收,故试验将检测波长定为 283 nm。

本试验考察甲醇、乙醇 2 种提取溶剂,结果甲醇提取率要高于乙醇。进而考察 60%,70%,80%,100% 4 种不同体积分数甲醇的提取率,结果表明 80% 甲醇提取率最高。

考察 1 g 宣痹凝胶贴膏分别加 20,40,60 mL 溶剂,结果表明加 40 mL 溶剂时,指标成分均能提取完全。

考察加硅藻土和不加硅藻土的区别,结果表明加硅藻土的提取率要远远大于不加硅藻土。进而考

察了 1 g 宣痹凝胶贴膏分别用 1,2,3,4 g 不同量硅藻土研磨,结果表明当硅藻土用量为膏量 3 倍时,提取率最高。

考察不同超声时间(15,30,45 min)对指标成分提取率的影响。结果表明,超声 15 min 和超声 30,45 min 没有明显差异,所以最终超声时间定为 15 min。

[参考文献]

[1] 周斌,李雁霞,朱才庆,等. 抗平喘滴丸质量标准研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(1):43.
[2] 杜茂波,刘淑芝,李曼玲,等. 黄连巴布剂体外释放和透皮行为的研究[J]. 中国中药杂志,2009,34(8):969.
[3] 刘恩荔,张美玉,梁泰刚,等. 麝香牛黄丸质量标准研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(7):55.
[4] 马潇,朱俊儒,何禄仁,等. 甘肃产秦艽不同部位中龙胆苦苷的含量测定[J]. 中国实验方剂学杂志,2009,15(8):10.
[5] 尚远宏,刘圆,石圣洪,等. 高效液相法测定人参健脾片中柚皮苷的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2006,12(10):12.

[责任编辑 仝燕]