

HPLC 法测定祖师麻凝胶膏剂中瑞香苷、瑞香素-8-*O*- β -D-葡萄糖苷、祖师麻甲素和 7-羟基香豆素

徐 明, 赖文燕, 李孟琼, 刘楚红, 韩 锋*

广州市力鑫药业有限公司, 广东 广州 510535

摘要: 目的 建立 HPLC 法同时测定祖师麻凝胶膏剂中瑞香苷、瑞香素-8-*O*- β -D-葡萄糖苷、祖师麻甲素和 7-羟基香豆素。方法 采用 HPLC 法, Prodigy ODS(3) 色谱柱 (250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m); 流动相为甲醇-0.05% 磷酸溶液 (18:82); 检测波长 327 nm; 柱温 35 $^{\circ}$ C; 体积流量 1.0 mL/min; 进样量 10 μ L。结果 瑞香苷、瑞香素-8-*O*- β -D-葡萄糖苷、祖师麻甲素和 7-羟基香豆素的线性范围分别为 0.105 7~1.268 4、0.092 2~1.106 4、0.060 5~0.726 0、0.050 5~0.606 0 μ g, *r* 值均大于 0.999 9; 各成分的平均回收率分别为 97.22%、99.27%、98.78%、99.45%, RSD 值分别为 1.01%、1.10%、1.40%、1.67%。结论 建立的方法简便、准确、灵敏度高、重复性好, 为建立可靠的祖师麻凝胶膏剂质量标准、更好更全面地控制制剂质量提供了数据支撑。

关键词: 祖师麻凝胶膏剂; 瑞香苷; 瑞香素-8-*O*- β -D-葡萄糖苷; 祖师麻甲素; 7-羟基香豆素; 高效液相色谱

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2021)02-0236-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2021.02.005

Determination of daphne glycoside, daphnetin-8-*O*- β -D-glucoside, daphnetin, and 7-hydroxycoumarin in Zushima Gel Ointment by HPLC

XU Ming, LAI Wen-yan, LI Meng-qiong, LIU Chu-hong, HAN Feng

Guangzhou Lixin Pharmaceutical Co., Ltd., Guangzhou 510535, China

Abstract: Objective To develop an HPLC method for simultaneous determination of daphne glycoside, daphnetin-8-*O*- β -D-glucoside, daphnetin, and 7-hydroxycoumarin in Zushima Gel Ointment. **Methods** The HPLC method was used on Prodigy ODS(3) column (250 mm \times 4.60 mm, 5 μ m). The mobile phase was consisted of methanol - 0.05% phosphoric acid (18:82). The detection wavelength was set at 327 nm. The temperature of column was set at 35 $^{\circ}$ C, the flow rate was 1.0 mL/min, and the volume of injection was 10 μ L. **Results** The linear ranges of daphne glycoside, daphnetin-8-*O*- β -D-glucoside, daphnetin, and 7-hydroxycoumarin were 0.105 7—1.268 4 μ g, 0.092 2—1.106 4 μ g, 0.060 5—0.726 0 μ g, and 0.050 5—0.606 0 μ g, respectively, with *r* values above 0.999 9. The average recoveries were 97.22%, 99.27%, 98.78%, and 99.45% with RSD values of 1.01%, 1.10%, 1.40%, and 1.67%, respectively. **Conclusion** The method is simple, accurate, sensitive, and reproducible, and at the same time, it provided data support for establishing a reliable quality standard of Zushima Gel Ointment, and controlling the quality of the preparations better and more comprehensively.

Key words: Zushima Gel Ointment; daphne glycoside; daphnetin-8-*O*- β -D-glucoside; daphnetin; 7-hydroxycoumarin; HPLC

祖师麻凝胶膏剂是以祖师麻总香豆素为原料制成的外用制剂, 可以祛风除湿、活血止痛, 用于骨关节炎引起的肿痛^[1-3]。祖师麻中含有多种化学成分, 目前从祖师麻中分离鉴定的化合物主要有香豆素类、黄酮类、木脂素类、二萜类、三萜类成分,

其中总香豆素具有显著的镇痛、抗炎活性^[4-7]。祖师麻药材^[8-9]、祖师麻提取物^[10]、祖师麻片^[11]、祖师麻注射液^[12]、祖师麻凝胶膏剂和其他制剂^[13-14], 就含量测定项而言, 基本仅对祖师麻甲素进行控制, 缺少全面的活性成分控制方法。本实验建立 HPLC

收稿日期: 2020-12-09

基金项目: 广州市科技计划项目 (201902010012)

作者简介: 徐 明 (1987—), 男, 硕士, 主要从事中药、天然药物工艺开发及质量控制等相关研究工作。E-mail: xum@lxpharma.cn

*通信作者: 韩 锋, 男, 副研究员, 从事中药新药研究开发。E-mail: hanf@lxpharma.cn

法同时测定祖师麻凝胶膏剂中瑞香苷、瑞香素-8-*O*- β -*D*-葡萄糖苷、祖师麻甲素和7-羟基香豆素,期望通过多指标成分定量控制的方法提高和完善祖师麻凝胶膏剂的质量标准。

1 仪器与试剂

Agilent 1100 高效液相色谱仪,在线真空脱气机, G1310 高压四元梯度泵, HP1100 色谱工作站, G1310A 泵, G1313A 自动进样器, CO201 柱温箱, G1314A 紫外检测器(美国安捷伦科技有限公司); KQ-800DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); EP225SM-DR 双量程分析天平(普利塞斯公司), HH6 数显恒温水浴锅(金坛市盛威实验仪器厂)。

瑞香苷(批号 200801, 质量分数 98.0%)、瑞香素-8-*O*- β -*D*-葡萄糖苷(批号 200802, 质量分数 98.3%)对照品均为自制,祖师麻甲素(批号 110900-201607, 质量分数 98.8%)、7-羟基香豆素(批号 111739-200501, 质量分数 100.0%)对照品均购自中国食品药品检定研究院;甲醇、甲酸为色谱级,其他试剂均为分析纯;祖师麻凝胶膏剂为自制,委托四川厚生天佐药业有限公司生产,规格 1 片/袋, 120 mg 总香豆素/片,批号分别为 200901、200902、200903。

2 方法与结果

2.1 色谱条件和系统适用性

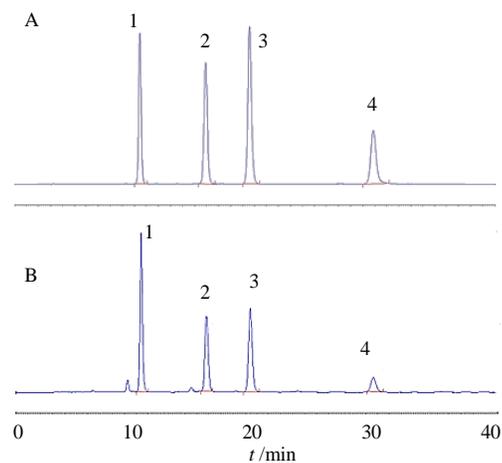
Prodigy ODS(3)色谱柱(250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m);流动相为甲醇-0.05%磷酸溶液(18:82);检测波长 327 nm;柱温 35 $^{\circ}$ C;体积流量 1.0 mL/min;进样量 10 μ L。理论板数按瑞香苷色谱峰计算应不低于 9 000,见图 1。

2.2 对照品溶液的制备

精密称取瑞香苷、瑞香素-8-*O*- β -*D*-葡萄糖苷、祖师麻甲素和 7-羟基香豆素对照品适量,加甲醇制成分别含各成分 40、35、25、20 μ g/mL 的混合溶液,摇匀,即得。

2.3 供试品溶液的制备

取本品除去盖衬,剪碎,取约 1.0 g,精密称定,置具塞圆底瓶中,精密加入 80%乙醇 100 mL,密塞,称定质量,加热回流 2 h,放冷,再称定质量,用 80%乙醇补足缺失的质量,摇匀,精密量取 10 mL,蒸干,残渣加 50%甲醇溶解,转移至 10 mL 量瓶中,加 50%甲醇至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,即得。



1-瑞香苷 2-瑞香素-8-*O*- β -*D*-葡萄糖苷 3-祖师麻甲素 4-7-羟基香豆素

1-daphne glycoside 2-daphnetin-8-*O*- β -*D*-glucoside 3-daphnetin
4-7-hydroxycoumarin

图 1 混合对照品(A)和祖师麻凝胶膏剂(B)的 HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC chromatograms of mixed reference substances (A) and Zushima Gel Ointment (B)

2.4 线性关系考察

分别精密称取瑞香苷、瑞香素-8-*O*- β -*D*-葡萄糖苷、祖师麻甲素、7-羟基香豆素对照品 10.57、9.22、6.05、5.05 mg,置同一 50 mL 量瓶中,加甲醇超声溶解并稀释至刻度,摇匀,配制含各成分 0.211 4、0.184 4、0.121 0、0.101 0 mg/mL 的对照品储备液。分别吸取 0.5、1、2、3、4、5、6 mL 置 10 mL 量瓶中,加 50%甲醇稀释至刻度,配制不同质量浓度的对照品溶液,分别吸取上述溶液,进样 10 μ L,测定峰面积。以进样量为横坐标,峰面积为纵坐标作图,绘制标准曲线,进行线性回归,得标准曲线方程,结果见表 1。

2.5 精密度试验

精密吸取混合对照品溶液,连续进样 6 次,记录各成分峰面积,计算得瑞香苷、瑞香素-8-*O*- β -*D*-葡萄糖苷、祖师麻甲素、7-羟基香豆素峰面积的 RSD 值分别为 0.85%、0.83%、0.67%、1.22%。

2.6 稳定性试验

精密称取批号 200901 祖师麻凝胶膏剂 1 份,制备供试品溶液,分别在 0、2、4、8、16、24 h 取样依法测定,记录各成分峰面积,计算得瑞香苷、瑞香素-8-*O*- β -*D*-葡萄糖苷、祖师麻甲素、7-羟基香豆素峰面积的 RSD 值分别为 0.30%、0.70%、1.65%、0.49%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

表 1 各成分的线性关系和线性范围

Table 1 Linear relationship and range of major components

成分	回归方程	<i>r</i>	线性范围/ μg
瑞香苷	$Y=5 \times 10^{-4} X + 2.4 \times 10^{-3}$	0.999 9	0.105 7~1.268 4
瑞香素-8- <i>O</i> - β - <i>D</i> -葡萄糖苷	$Y=4 \times 10^{-4} X + 5.0 \times 10^{-3}$	1.000 0	0.092 2~1.106 4
祖师麻甲素	$Y=2 \times 10^{-4} X + 2.8 \times 10^{-3}$	0.999 9	0.060 5~0.726 0
7-羟基香豆素	$Y=3 \times 10^{-4} X + 1.6 \times 10^{-3}$	0.999 9	0.050 5~0.606 0

2.7 重复性试验

精密称取批号 200901 祖师麻凝胶膏剂 6 份, 制备供试品溶液, 依法进样测定, 记录峰面积, 计算各成分的质量分数, 结果所测瑞香苷、瑞香素-8-*O*- β -*D*-葡萄糖苷、祖师麻甲素、7-羟基香豆素质量分数的 RSD 值分别为 1.19%、1.19%、1.47%、1.03%。

2.8 回收率试验

精密称取批号 200901 祖师麻凝胶膏剂 9 份, 每份约 0.5 g, 分别加入混合对照品溶液(含瑞香苷、瑞香素-8-*O*- β -*D*-葡萄糖苷、祖师麻甲素、7-羟基香

豆素 0.362 1、0.274 5、0.155 6、0.125 5 mg/mL) 4、5、6 mL, 制备供试品溶液, 进样测定, 记录峰面积, 计算得各成分的平均回收率分别为 97.22%、99.27%、98.78%、99.45%, RSD 值分别为 1.01%、1.10%、1.40%、1.67%。

2.9 样品测定

取 3 批祖师麻凝胶膏剂(批号 200901、200902、200903), 各 3 份, 制备供试品溶液, 依法进样测定, 记录瑞香苷、瑞香素-8-*O*- β -*D*-葡萄糖苷、祖师麻甲素和 7-羟基香豆素的峰面积, 采用外标法计算各成分的质量分数, 结果见表 2。

表 2 祖师麻凝胶膏剂中瑞香苷、瑞香素-8-*O*- β -*D*-葡萄糖苷、祖师麻甲素和 7-羟基香豆素的测定结果 ($n=3$)Table 2 Determination of daphne glycoside, daphnetin-8-*O*- β -*D*-glucoside, daphnetin, and 7-hydroxycoumarin in Zushima Gel Ointment ($n=3$)

批号	质量分数/(mg·片 ⁻¹)			
	瑞香苷	瑞香素-8- <i>O</i> - β - <i>D</i> -葡萄糖苷	祖师麻甲素	7-羟基香豆素
200901	35.80	27.61	15.66	12.58
200902	28.99	24.85	17.86	11.53
200903	31.15	24.48	15.85	11.97

3 讨论

实验过程中, 对比考察了流动相甲醇-0.05%磷酸不同配比(17:83、18:82、19:81)对所测各成分瑞香苷、瑞香素-8-*O*- β -*D*-葡萄糖苷、祖师麻甲素和 7-羟基香豆素的质量分数、色谱峰峰形、分离效果和色谱峰出峰时间的影响, 结果表明不同流动相配比对出峰时间影响较大, 对质量分数、色谱峰峰形、分离效果影响不大, 最终选定流动相比例为甲醇-0.05%磷酸(18:82), 分离度高, 保留时间适中。

祖师麻凝胶膏剂是以祖师麻总香豆素为原料制备的制剂, 查阅文献资料发现, 祖师麻药材、提取物及其制剂等大多数标准中只采用祖师麻甲素进行含量测定, 目前在中药新药研发的过程中, 大

多数以某一指标成分含量作为评价指标, 质量控制方法简单且单一。本实验采用 HPLC 法同时测定祖师麻凝胶膏剂中瑞香苷、瑞香素-8-*O*- β -*D*-葡萄糖苷、祖师麻甲素和 7-羟基香豆素, 方法简便、准确、灵敏度高、重复性好, 为建立可靠的祖师麻凝胶膏剂质量标准、更好更全面控制制剂质量提供了数据支撑。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 白 玮, 张 娇, 叶 潇, 等. 祖师麻的研究进展 [J]. 现代中医药, 2017, 37(5): 113-116.
- [2] 蔺 莉, 吴红彦, 石晓峰, 等. 祖师麻凝胶膏剂的镇痛抗炎药效学评价 [J]. 西部中医药, 2016, 29(12): 20-22.
- [3] 杨鹤华, 王丽丽, 封 玲, 等. 祖师麻总香豆素的抗炎

- 镇痛药效作用评价 [J]. 中华中医药学刊, 2015, 33(5): 1183-1185.
- [4] 康阿龙, 李 伟, 孙成荣, 等. 祖师麻的化学成分及制剂学研究进展 [J]. 西北药学杂志, 2011, 26(6): 479-482.
- [5] 王 鹏, 刘金平, 詹 妮, 等. 祖师麻化学成分和药理活性研究新进展 [J]. 特产研究, 2011, 33(4): 73-76.
- [6] 王 丹, 聂作明, 吕正兵, 等. 祖师麻甲素的抗炎及免疫抑制作用研究进展 [J]. 浙江理工大学学报: 自然科学版, 2018, 39(6): 752-758.
- [7] 胡伊力格其, 张玲玲, 林龙飞, 等. 祖师麻主要成分抗炎活性的体外研究 [J]. 国际中医中药杂志, 2017, 39(4): 343-346.
- [8] 王二兵. 不同产地祖师麻药材中祖师麻甲素的含量测定 [J]. 山西医科大学学报, 2014, 45(3): 190-192.
- [9] 刘晓强. 祖师麻药材质量标准研究 [D]. 太原: 山西医科大学, 2013.
- [10] 智万发, 严玉梅, 何富春, 等. 祖师麻干膏粉质量标准研究 [J]. 中兽医医药杂志, 2017, 36(5): 24-26.
- [11] 王晓云, 邸立杰, 刘静洁. HPLC 法测定祖师麻片中祖师麻甲素的含量 [J]. 中国药事, 2003(04): 32-33.
- [12] 孙 岩, 吴晨光, 韩 群, 等. HPLC 指纹图谱结合化学模式识别评价祖师麻注射液的整体质量 [J]. 中草药, 2020, 51(8): 2170-2176.
- [13] 李希珍, 张庆贺, 董 刚, 等. 祖师麻凝胶膏剂的制备工艺及含量测定 [J]. 特产研究, 2015, 37(2): 18-22.
- [14] 谢雪虎, 赵正保. 祖师麻巴布剂的质量标准研究 [J]. 中国药物与临床, 2011, 11(1): 20-22.

[责任编辑 解学星]