

HPLC法测定伤科贴膏中栀子苷的含量及其稳定性研究^Δ

李怀国*,何宝凝,李子鸿,刘东文,陈淑映,黄健(佛山市中医院制剂中心,广东佛山 528000)

中图分类号 R283.621;R927.11 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)27-2544-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.27.16

摘要 目的:建立伤科贴膏中栀子苷的含量测定方法,并考察其稳定性。方法:采用高效液相色谱法测定栀子苷含量;色谱柱为XTerra[®]RP18(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为乙腈-水(8:92, V/V),流速为1.0 ml/min,检测波长为238 nm;再采用光照试验和高温加速试验考察其稳定性。结果:栀子苷进样量在0.24~1.20 μg范围内与峰面积积分值呈良好线性关系($r=0.9999$),平均加样回收率为97.36%(RSD=1.29%, $n=6$);伤科贴膏在光照(4 000 lx)下30 d内,栀子苷含量无明显变化;采用高温加速试验法预测该制剂的有效期为1.54年。结论:伤科贴膏在光照及高温条件下稳定性良好。该方法的建立可为制剂的临床应用和贮藏提供动力学数据。

关键词 伤科贴膏;栀子苷;高效液相色谱法;含量测定;稳定性

Study on the Content and Stability of Geniposide in Shangke Plaster by HPLC

LI Huai-guo, HE Bao-ning, LI Zi-hong, LIU Dong-wen, CHEN Shu-ying, HUANG Jian (Preparation Center, Foshan Hospital of TCM, Guangdong Foshan 528000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the method for the content determination of geniposide in Shangke plaster, and to investigate its stability. METHODS: The content of geniposide was determined by HPLC. The determination was performed on XTerra[®]RP18 (250 mm×4.6 mm, 5 μm) column with mobile phase consisted of acetonitrile-water (8:92, V/V) at the flow rate of 1.0 ml/min. The detection wavelength was set at 238 nm. And the stability of geniposide was observed by illumination test and high temperature accelerated test. RESULTS: The linger range of geniposide were 0.24-1.20 μg($r=0.9999$) with an average recovery of 97.36% (RSD=1.29%, $n=6$). There was no obvious change in the content of geniposide in Shangke plaster under light (4 000 lx) for 30 days. High temperature accelerated test was adopted to forecast that expiration date was 1.54 years. CONCLUSIONS: Shangke plaster is stable under light and at high temperature. The established method provides kinetic data for clinical application and storage.

KEYWORDS Shangke plaster; Geniposide; HPLC; Content determination; Stability

伤科贴膏是对我院制剂“渭良伤科散”进行剂型改革而研制的新型贴膏剂,由我省名中医陈渭良主任中医师组方。“渭良伤科散”在我院临床应用近50年,主要由栀子、大黄、黄连等药味组成,具有解毒消炎、散瘀消肿的功效,临床用于治疗跌打扭挫伤、瘀血及无名肿毒等。但是,由于使用时需加入水及蜜糖等煮成糊状再敷于患处,患者用药十分不便,因此我院制剂中心对“渭良伤科散”进行剂型改革。先尝试采用水溶性的基质制成巴布剂“渭良伤科贴膏”,但是,在使用时因患者出汗令水溶性基质溶出玷污衣物,而且不能反复粘贴,造成该剂型不能在临床上推广。后采用脂溶性的新型热熔压敏胶为基质制成“伤科贴膏”,这种基质不溶于水、载药量大、能反复粘贴,在临床使用中取得了满意效果。为考察该制剂的内在质量,本试验采用高效液相色谱(HPLC)法对伤科贴膏中的栀子苷进行含量测定,考察光照、高温条件下栀子苷的稳定性,并以栀子苷的含量为指标用加速试验法预测其有效期。

1 材料

1.1 仪器

1100型HPLC仪,含1525泵、717进样阀、2996紫外检测

Δ 基金项目:佛山市医学类科技攻关项目(No.201108003)

* 副主任药师。研究方向:新药研发。电话:0757-81092312。

E-mail: fscolor@163.com

器、800工作站(美国Waters公司);AE200型电子天平(瑞士Mettler Toledo公司);KQ-300DE型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司,功率:300 W,频率:40 kHz);光照培养箱(广东省医疗器械厂)。

1.2 药品与试剂

伤科贴膏(佛山市中医院制剂中心,规格:9 cm×13 cm×3贴/袋,批号:12813001、12813002、12813003、12813004);栀子苷对照品(中国食品药品检定研究院,批号:110749-201115);乙腈、甲醇为色谱纯,水为重蒸馏水,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 栀子苷的含量测定

2.1.1 对照品溶液的制备 精密称取已干燥至恒质量的栀子苷对照品15 mg,置25 ml量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,制成质量浓度为0.60 mg/ml的溶液,作为对照品溶液。

2.1.2 供试品溶液的制备 取本品,除去盖封,刮取含药基质约5 g,精密称定,用适量硅藻土分散均匀,置于具塞锥形瓶中,精密加入甲醇50 ml,密塞,称定质量,超声处理30 min,取出,放冷,再称定质量,用甲醇补足减少的质量,摇匀,滤过,精密量取续滤液10 ml,置25 ml量瓶中,加入磷酸溶液(1→3)3 ml,用流动相稀释至刻度,摇匀,置冰箱中放置6 h,取出,放至室温,滤过,取续滤液,用微孔滤膜(0.45 μm)滤过,作为供试品

溶液。

2.1.3 阴性对照溶液的制备 按处方比例制成不含梔子苷的阴性样品,再按“2.1.2”项下方法制备阴性对照溶液。

2.1.4 色谱条件 色谱柱:XTerra®RP18(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:乙腈-水(8:92, V/V);流速:1.0 ml/min;检测波长:238 nm;柱温:室温;进样量:10 μl。

2.1.5 系统适用性试验 精密吸取供试品溶液、对照品溶液、阴性对照溶液各10 μl分别进样,按上述色谱条件进行测定。结果,供试品色谱中,在与对照品色谱相应的位置上,有一相同的色谱峰,梔子苷峰与杂质峰分离良好;理论板数以梔子苷峰计算应不低于3 000。色谱见图1。

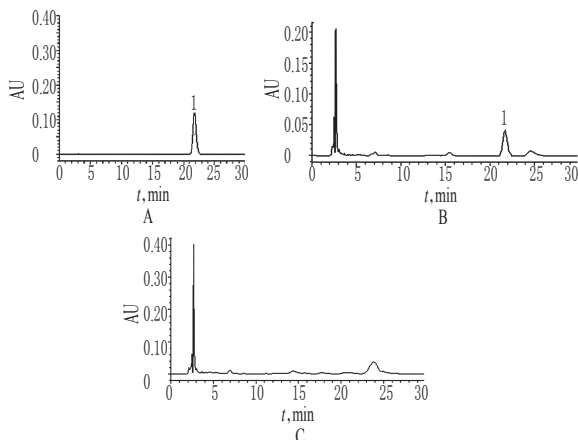


图1 高效液相色谱图

A. 梔子苷对照品; B. 供试品; C. 阴性对照; 1. 梔子苷

Fig 1 HPLC chromatograms

A. geniposide control; B. test sample; C. negative control; 1. geniposide

2.1.6 线性关系考察 精密吸取对照品溶液2.0、4.0、6.0、8.0、10.0 ml,分别置50 ml量瓶中,加水稀释至刻度,摇匀,分别精密吸取10 μl,按上述色谱条件进样测定,记录峰面积。以梔子苷的进样量(x, μg)为横坐标,峰面积积分值(y)为纵坐标,制备标准曲线,得回归方程为 $y=1.81 \times 10^6 x + 7.29 \times 10^4$ ($r=0.999 9, n=5$)。结果表明,梔子苷进样量在0.24~1.20 μg范围内与峰面积积分值呈良好的线性关系。

2.1.7 精密度的试验 取梔子苷对照品溶液,按上述色谱条件重复进样5次,每次10 μl,测定峰面积。结果, RSD=1.44% ($n=5$),表明仪器精密密度良好。

2.1.8 稳定性试验 取同一供试品溶液适量,分别于配制后0、2、4、6、8、10 h按上述色谱条件进样,测定峰面积。结果, RSD=1.31% ($n=6$),表明供试品溶液在10 h内基本稳定。

2.1.9 重复性试验 取同一批样品(批号:12813001)适量,按“2.1.2”项下方法平行制备6份供试品溶液,再按上述色谱条件分别进样10 μl,测定峰面积。结果,样品中梔子苷的平均含量为1.033 mg/g, RSD=1.64% ($n=6$),表明本方法重复性良好。

2.1.10 加样回收率试验 精密称取已测定梔子苷含量的同一批样品(批号:12813001,平均含量:1.033 mg/g)2 g,用适量硅藻土分散均匀,置于具塞锥形瓶中,精密加入梔子苷对照品溶液(0.04 mg/ml)50 ml,按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,

再按上述色谱条件进样10 μl,测定峰面积,计算加样回收率,结果见表1。

表1 加样回收率试验结果($n=6$)

Tab 1 Results of recovery tests($n=6$)

样品含量,mg	加入量,mg	测得量,mg	回收率,%	\bar{x} ,%	RSD,%
2.074 1	2.0	4.012 9	96.94		
2.070 9	2.0	3.987 2	95.82		
2.076 7	2.0	4.022 1	97.27	97.36	1.29
2.067 2	2.0	3.996 1	96.44		
2.078 3	2.0	4.049 7	98.57		
2.072 5	2.0	4.054 3	99.09		

2.1.11 样品含量测定 取3批样品各适量,分别按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,再按上述色谱条件进样测定,记录峰面积,以峰面积计算样品中梔子苷的含量,结果见表2。

表2 样品含量测定结果($n=3$)

Tab 2 Content determination of samples($n=3$)

批号	梔子苷含量,mg/g	RSD,%
12813002	1.179	1.97
12813003	1.027	1.44
12813004	1.254	1.75

2.2 强光照试验^[1]

将伤科贴膏置于光照培养箱(4 000 lx)中,温度为(28 ± 2)℃,相对湿度(Rh)为(60 ± 5)%,放置30 d,按一定时间间隔取样,照上述方法对梔子苷含量进行测定。结果,梔子苷含量无明显变化,表明该制剂中梔子苷在上述条件下光稳定性良好。光照试验结果见表3。

表3 光照试验结果

Tab 3 Results of light tests

取样时间,d	梔子苷含量,mg/g	取样时间,d	梔子苷含量,mg/g
0	1.155	20	1.124
5	1.147	25	1.127
10	1.128	30	1.040
15	1.098		

2.3 高温加速试验

2.3.1 高温加速试验结果 取样品适量,分别置60、70、80、90℃恒温干燥箱中存放,定时取样,照上述方法测定梔子苷的含量,结果见表4。

2.3.2 K值计算 将梔子苷含量的对数lgc对时间t进行直线回归,得各温度下的直线方程,见表4。符合方程:lgc = -K/2.303t + lgC₀。可见,在该试验条件下,梔子苷的变化反应是典型的一级反应。根据直线方程的斜率可求得各试验温度下的反应速度常数K值^[2],结果见表4。

2.3.3 室温(25℃)下的有效期预测 取表4中各反应温度下的K值,用lgK对1/T作图,得直线方程:lgK = -1 975.6/T + 1.522 3 ($r=0.991 4$)。外推可求得室温(25℃)下的K值为 $7.812 1 \times 10^{-6}$,进一步求得室温(25℃)下有效成分减少10%所需的时间,即有效期: $t_{0.9} = 0.105 4 / K_{25^\circ\text{C}} = 13 491.8 \text{ h} = 1.54 \text{ 年}$ 。

3 讨论

梔子为本处方中的主药,主要含梔子苷等环烯醚萜类成分^[3],因而本试验选取梔子苷作为稳定性考察指标。本品的基

表4 高温加速试验结果

Tab 4 Results of high temperature accelerated test

温度, °C	时间, h	栀子苷含量, mg/g	logc	回归方程
60	0	1.012 0	5.18×10^{-3}	$\lg c = -1.75 \times 10^{-3}t + 5.03 \times 10^{-3}$
	24	1.010 8	4.67×10^{-3}	$r = 0.994 6$
	48	1.009 3	4.02×10^{-3}	$K = 4.021 2 \times 10^{-5}$
	96	1.007 5	3.25×10^{-3}	
	192	1.004 1	1.78×10^{-3}	
70	0	1.012 0	5.18×10^{-3}	$\lg c = -2.49 \times 10^{-3}t + 5.00 \times 10^{-3}$
	24	1.010 4	4.49×10^{-3}	$r = 0.995 0$
	48	1.008 2	3.55×10^{-3}	$K = 5.726 4 \times 10^{-5}$
	96	1.005 7	2.47×10^{-3}	
	192	1.000 8	3.47×10^{-4}	
80	0	1.012 0	5.18×10^{-3}	$\lg c = -3.36 \times 10^{-3}t + 4.78 \times 10^{-3}$
	24	1.009 3	4.02×10^{-3}	$r = 0.991 2$
	48	1.006 4	2.77×10^{-3}	$K = 7.742 1 \times 10^{-5}$
	96	1.002 9	1.26×10^{-3}	
	192	0.996 7	-1.44×10^{-3}	
90	0	1.012 0	5.18×10^{-3}	$\lg c = -5.55 \times 10^{-3}t + 4.89 \times 10^{-3}$
	24	1.008 9	3.85×10^{-3}	$r = 0.994 3$
	48	1.004 4	1.91×10^{-3}	$K = 1.279 3 \times 10^{-4}$
	96	0.997 5	-1.09×10^{-3}	
	192	0.987 6	-5.42×10^{-3}	

质为新型的热熔压敏胶,笔者曾采用甲苯先对该基质进行超声溶解^[4],但因膏体黏性很强,基质溶解后容易黏壁,因而改用甲醇超声,但膏体分散性差,直接用甲醇超声容易集结卷缩,因此在超声前先加入硅藻土使膏体分散均匀,不仅操作简便,还可以使栀子苷更最大限度地溶出^[5]。栀子苷易溶于水、甲醇等溶剂,向样品中加入3 ml磷酸溶液(1→3),可以将样品中的有机酸类成分析出,有利于提纯样品,从而使栀子苷峰与其他杂质峰较好地分离。笔者曾采用不同比例的乙腈-水流动相系统(15:85、13:87、10:90、8:92, V/V)进行试验,结果发现以乙腈-水(8:92, V/V)作为流动相的分离效果和峰形均较好^[6]。

热熔压敏胶是继溶剂型和乳液型压敏胶之后的第三代压敏胶产品,在中药贴膏剂新剂型的研发中越来越受到重视。其结构简单、药物穿透量大、工艺操作简便、成本低廉、易于贴用^[7],并具有良好的生物相容性,对皮肤无刺激性,不引起过敏反应,有较强的黏附力,化学性质稳定^[8],故已成为贴膏剂型的主导方向。我院采用热熔压敏胶作为“伤科贴膏”的基质代

替之前的水溶性巴布剂基质,并参照2010年版《中国药典》(一部)方法^[9]制定了其初黏力、内聚力等^[10]的离体评价标准;而药物的稳定性评价也是热熔压敏胶贴膏剂的重点考察对象,故笔者尝试采用高温加速试验测定栀子苷的含量来预测伤科贴膏的有效期^[11-12],并结合留样观察数据对该制剂进行稳定性评价。目前,国内对热熔压敏胶贴膏剂的质量评价标准的相关文献相对较少,因此本试验对伤科贴膏中栀子苷含量测定方法的建立,可为伤科贴膏质量标准的制定提供参考;本方法的建立也可作为制剂的临床应用和贮藏提供动力学数据。

参考文献

- [1] 刘东文,蔡丽云,李子鸿,等.新伤去瘀口服冻干颗粒中丹酚酸B稳定性研究[J].中药材,2009,32(4):613.
- [2] 张兆旺.中药药剂学[M].北京:中国中医药出版社,2003:1523.
- [3] 常新全,丁丽霞.中药活性成分分析手册[M].北京:学苑出版社,2002:1528.
- [4] 王石健,俞振伟.HPLC测定热熔压敏胶贴剂中 α -细辛醚的含量[J].中国现代应用药学,2013,30(2):191.
- [5] 叶立新,陈刚梅,张树平,等.乳癖宁贴膏质量控制方法研究[J].中国药房,2006,17(10):778.
- [6] 刘东文,陈淑映,李子鸿,等.巴布剂胃良伤科贴膏的质量标准研究[J].中药材,2008,31(6):923.
- [7] 王承潇,汤秀珍,沈平孃,等.热熔压敏胶应用于中药贴剂的研究进展[J].中草药,2010,41(3):496.
- [8] 闫小平,郑蕊,官仕杰,等.热熔压敏胶在中药透皮吸收剂中的研究进展[J].中国中药杂志,2009,34(12):1612.
- [9] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2010年版.北京:中国医药科技出版社,2010:附录9.
- [10] 俞振伟,梁漪,梁文权.经皮给药用热熔压敏胶的制备及其体外评价[J].中国药学杂志,2013,48(6):450.
- [11] 董文燊,瞿发林,徐波.经典恒温加速试验法预测芍甘胶囊的有效期[J].药学与临床研究,2011,19(1):87.
- [12] 李志雄,熊富良,陶君彦,等.梦宁片中栀子苷的稳定性研究[J].中药新药与临床药理,2003,14(5):329.

(收稿日期:2014-04-02 修回日期:2014-05-16)

国家卫生和计划生育委员会印发《关于做好常用低价药品采购管理工作的通知》

本刊讯 日前,为贯彻落实《关于做好常用低价药品供应保障工作的意见》(国卫药政发〔2014〕14号),国家卫生计生委办公厅印发了《关于做好常用低价药品采购管理工作的通知》(国卫办药政发〔2014〕36号)(以下简称《通知》),指导地方积极稳妥开展低价药品采购工作。

《通知》要求各地统一思想、提高认识,坚持以省(区、市)为单位的药品集中采购,遵循质量优先、价格合理的原则,发挥集中批量采购优势,增强医疗机构在药品采购中的参与度,引导和调动企业生产供应常用低价药品的积极性,进一步减轻群众医药费用负担。

《通知》要求各地加强统筹协调,做好与现行采购政策的

衔接,对政府办基层医疗卫生机构和公立医院使用的常用低价药品实行分类采购管理:政府办基层医疗卫生机构使用的常用低价药品,由省级药品采购机构汇总基层医疗卫生机构药品采购需求,实行集中采购、受基层委托签订购销合同、集中支付货款;公立医院使用的常用低价药品,由医院直接与挂网生产企业议定成交、及时结算。

《通知》要求各地要推动省级药品集中采购平台规范化建设,拓展平台功能,提升采购服务水平;强化采购供应综合监管,实现阳光采购,严格执行诚信记录和市场清退制度,抵制和反对商业贿赂,纠正医药购销领域不正之风,强化医疗机构使用常用低价药品管理。