

· 专题 ·

HPLC 测定蒙药尼安嘎日那格-10 中梔子苷的含量

韩志广¹, 雷露静², 李旻辉^{2,3,4,5*}

(1. 内蒙古自治区赤峰市药品检验所, 内蒙古 赤峰 024000;

2. 内蒙古自治区中医药研究所, 内蒙古 呼和浩特 010110;

3. 包头医学院, 内蒙古 包头 014060;

4. 内蒙古自治区特色药用植物培育与保护工程技术研究中心, 内蒙古 包头 014060;

5. 内蒙古自治区特色道地药材资源保护与利用重点实验室, 内蒙古 包头 014060)

[摘要] 目的: 建立蒙药尼安嘎日那格-10 中梔子苷的含量测定方法。方法: 采用高效液相色谱法(HPLC), 色谱柱为 Dikma Technologies C₁₈ 色谱柱(250mm×4.6mm, 5μm); 流动相为乙腈-水(11:89); 流速 1.0 mL·min⁻¹; 检测波长为 238 nm。结果: 梔子苷在 6.00~60.00 μg·mL⁻¹ 浓度范围内与峰面积呈良好的线性关系, $r=0.999\ 9$, 平均加样回收率 97.85%, RSD 为 1.26%。结论: 本方法简便准确, 重复性好, 可用于测定蒙药尼安嘎日那格-10 中梔子苷的含量测定。

[关键词] 尼安嘎日那格-10; 梔子; 梔子苷; HPLC

Determination of Geniposide in Mongolian Medicine Ni-Angarinage-10 by HPLC

HAN Zhiguang¹, LEI Lujing², LI Minhui^{2,3,4,5*}

(1. Chifeng Institute of Drug Inspection, Chifeng 024000, China;

2. Inner Mongolia Autonomous Region Academy of Chinese Medicine, Hohhot 010110, China;

3. Baotou Medical College, Baotou 014060, China;

4. Inner Mongolia Research Center of Characteristic Medicinal Plants Cultivation and

Protection Engineering Technology, Baotou 014060, China;

5. Inner Mongolia Key Laboratory of Characteristic Traditional Chinese Medicinal Resources

Protection and utilize, Baotou 014060, China)

[Abstract] **Objective:** To establish an HPLC method for the determination of geniposide in Mongolian medicine Ni-Angarinage-10. **Methods:** The stationary phase was Diamonsil C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) and the mobile phase was Acetonitrile-Water (11:89), the flow rate was 1.0 mL·min⁻¹ and the detection wave length was 238 nm. **Results:** The linear range of geniposide was 6.00~60.00 μg·mL⁻¹, $r=0.999\ 9$. The average recovery was 97.85% RSD = 1.26%. **Conclusion:** The HPLC method for the determination of geniposide is a simple, fast, accurate and good reproducible.

[Keywords] Ni-Angarinage-10; Fructus Gardeniae; geniposide; HPLC

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.2017.7.006

近年来,随着民族医药的快速崛起,蒙医药现代化步伐也随之加快。蒙医药是蒙古族人民在与自然和疾病长期的斗争实践中创造、积累、精选出的具有独特风格的经验结晶,是蒙古族文化的重要组成部分,在长期的临床实践中,蒙医药积累了丰富的理论经验^[1]。蒙药属于天然药物,在治疗一些疾

病方面,疗效确切,毒副作用低,得到全国市场的广泛认可^[2],但由于其质量控制一直处于低水平状态,导致蒙药产业与苗药、藏药等民族医药产业相比处于低水平发展状态,因此应该大力开展蒙药的标准化完善工作,不断推动蒙药产业的现代化发展。

蒙药尼安嘎日那格-10 来源于《蒙医传统验

* [通信作者] 李旻辉,教授,研究方向:中蒙药资源保护与开发利用、分子生药学;Tel:(0471)6262232, E-mail:li_minhui@aliyun.com

方》，由栀子、木香、黑冰片、白礞砂、蔓荆子、可瓜子、荜茇、川乌(制)、诃子等10味药组成，具有止吐，解痉等作用，用于呕吐，胃痉挛等症的治疗。栀子为方中君药，具有泻火除烦，清热利尿，凉血解毒的功效；栀子是我国常用中药材，在蒙医药里使用也十分普遍，近些年国内外研究证明栀子中的有效成分环烯醚萜类物质具有解热镇痛、抗炎、镇静催眠、保肝利胆、防止动脉粥样硬化等药理活性。因此以栀子苷作为尼安嘎日那格-10的质量评价指标具有很好的代表性。本文为了更好地控制药品质量，采用高效液相色谱法测定尼安嘎日那格-10中栀子苷的含量，为进一步完善尼安嘎日那格-10质量标准奠定基础。

1 仪器与试药

1.1 仪器

岛津高效液相色谱仪(LC10-ATVP型泵、SCL-10AVP型控制器、SPD-10AVP型检测器、SLASS-VP色谱工作站)；HR-200型万分之一天平、Presia型十万分之一天平、MAS3.6P-OCE-DM百万分之一电子天平(德国赛多利斯)。

1.2 试剂与试药

栀子苷对照品(中国食品药品检定研究院，批号：110749-200714)；尼安嘎日那格-10对照品(内蒙古巴林右旗蒙医院，批号：070416、080614、090325)；阴性样品及模拟样品由赤峰市药品检验所制备。乙腈为色谱纯，水为超纯水，其它试剂为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Dikma Technologies C_{18} 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μ m)；流动相：乙腈-水(11:89)；柱温 25 $^{\circ}$ C；流速 1.0 mL·min⁻¹；进样量 20 μ L；检测波长 238 nm。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 取栀子苷对照品适量，精密称定，加甲醇制成每1 mL含30 μ g栀子苷的溶液。

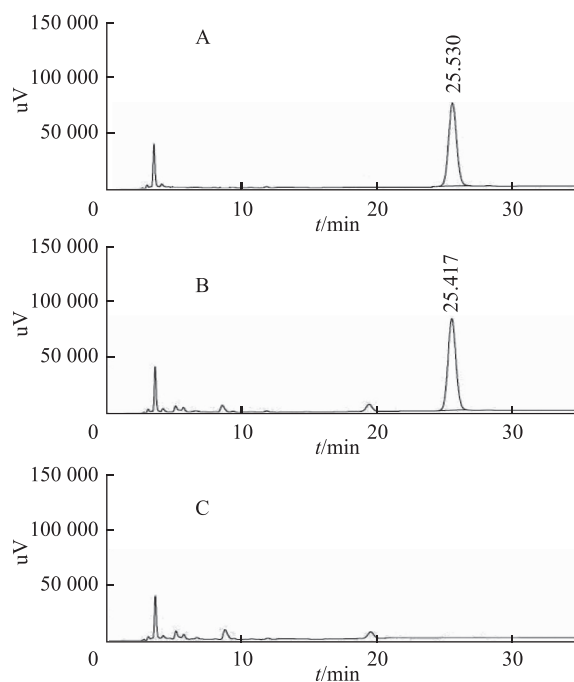
2.2.2 供试品溶液的制备 取本品细粉约1 g，精密称定，置具塞锥形瓶中，精密加入甲醇25 mL，密塞，称定重量，超声处理(功率300 W，频率50 Hz)

30 min，放冷，再称定重量，用甲醇补足减失的重量，摇匀，滤过，精密量取续滤液10 mL，置25 mL量瓶中，加甲醇至刻度，摇匀，滤过，取续滤液，即得。

2.2.3 阴性对照溶液的制备 按处方配制不含栀子药材的样品，按2.2.2项下方法制备阴性对照溶液。

2.3 系统适用性试验

在2.1项色谱条件下，分别精密吸取对照品溶液、供试品溶液、阴性对照溶液各20 μ L，注入液相色谱仪，理论板数按栀子苷峰计应大于2000；阴性对照色谱图中，在与栀子苷对照品以及供试品色谱相应的保留时间处无色谱峰出现，表明该方法专属性好，成方制剂中其它组分对栀子苷的测定无干扰，见图1。



注：A. 栀子苷对照品；B. 供试品；C. 阴性对照品

图1 栀子苷 HPLC 图

2.4 线性关系考察

精密称取栀子苷对照品15.0 mg，置100 mL量瓶中，加甲醇使溶解，并稀释至刻度，摇匀，分别精密吸取上述对照品溶液1.0、3.0、5.0、7.0、10.0 mL，置25 mL量瓶中，加甲醇至刻度，摇匀，按2.1项下色谱条件测定，以浓度对峰面积进行回归分析，结果栀子苷在6.00~60.00 μ g·mL⁻¹范围内呈良好的线性关系。回归方程为 $Y = 179\,027.6X - 34\,141$ ， $r = 0.999\,9$ 。

2.5 精密度试验

取批号为 070416 的样品制成的供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件连续进样 6 次,记录栀子苷峰面积,计算 RSD 值。结果显示栀子苷峰面积的 RSD 为 1.23%,表明仪器的精密度良好。

2.6 稳定性试验

取批号为 070416 的样品制成的供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件分别于 0、2、4、8、12、24 h 进行测定,记录栀子苷峰面积,RSD 为 1.43%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.7 重复性试验

取批号为 070416 的样品 5 份,约 1 g,精密称

定,按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液,测定供试品中栀子苷含量,测得栀子苷含量分别为 3.539 5、3.516 5、3.490 1、3.501 4、3.542 2 mg·g⁻¹,RSD 为 0.65%,表明方法重复性良好。

2.8 加样回收试验

取已知栀子苷含量的样品(批号:070416,栀子苷含量 3.528 0 mg·g⁻¹)9 份,各约 0.5 g,精密称定,置 9 个锥形瓶中,分别按已知栀子苷含量的 80%、100%、120% 3 个水平精密加入栀子苷对照品 1.44 mg、1.80 mg、2.32 mg,按 2.2.2 项下方法制备,测定每份样品中栀子苷的含量,计算回收率和 RSD,结果见表 1。

表 1 加样回收试验结果(n=3)

序号	称样量/g	样品中含量/mg	对照品加入量/mg	测得总量/mg	回收率(%)	平均回收率(%)	RSD(%)
1	0.521 1	1.833 2	1.441	3.232 0	97.07	97.85	1.26
2	0.513 2	1.805 4	1.439	3.189 6	96.19		
3	0.517 2	1.819 5	1.436	3.228 2	98.10		
4	0.503 2	1.770 2	1.801	3.524 4	97.40		
5	0.507 1	1.783 9	1.795	3.571 9	99.61		
6	0.512 2	1.801 9	1.791	3.554 0	97.83		
7	0.542 3	1.907 8	2.316	4.213 8	99.57		
8	0.550 5	1.936 6	2.323	4.175 5	96.38		
9	0.553 7	1.947 9	2.318	4.230 2	98.46		

2.9 样品的含量测定

取三个批次的尼安嘎日那格-10 样品,按 2.2.2 项下方法处理并进样,记录栀子苷峰面积,按外标法测定并计算样品中栀子苷含量;为了验证生产工艺对栀子苷含量有无影响,按处方制备模拟样品,同法计算栀子苷含量。测定结果见表 2。

表 2 样品、模拟样中栀子苷量测定结果
(样品 n=2,模拟样品 n=3)

批号	取样量/g	测得峰面积值	含量/mg·g ⁻¹	平均含量/mg·g ⁻¹	RSD(%)
070416	1.100 2	937 819	3.539 5		
	1.102 7	933 836	3.516 5	3.528	0.33
080614	1.103 2	945 243	3.557 8		
	1.185 2	1 002 166	3.511 1	3.535	0.66
090325	1.053 2	889 198	3.505 8		
	1.062 5	908 291	3.549 7	3.528	0.62
模拟样	1.199 5	1 001 575	3.467 2		
	1.192 1	1 000 891	3.486 3		
	1.162 1	971 949	3.472 9	3.476	0.28

从表中三批样品测定的数据可见,模拟样中栀子苷的含量为 3.476 mg·g⁻¹,实验中用相同的方法对上述模拟样生产用栀子药材进行了含量测定,测得栀子苷含量为 35.665 mg·g⁻¹,测定结果见表 3。

表 3 栀子药材中栀子苷含量测定结果(n=3)

取样量/g	测得峰面积值	含量/mg·g ⁻¹	平均含量/mg·g ⁻¹	RSD(%)
0.100 5	1717742	35.486 1	35.665	0.45
0.100 2	1723283	35.707 2		
0.101 0	1737532	35.800 6		

3 结果与讨论

3.1 质量评价指标的选择

参照文献,对尼安嘎日那格-10 方剂中各单味药进行对比分析,以确定最佳质量评价指标。方中木香的药用部位为其干燥根,主要含萜内酯类挥发油成分,其中含量最高的萜内酯为木香烃内酯、去氢

木香内酯等^[3]，文献^[4-6]多以上述两种成分为指标物对木香进行质量控制，但挥发油类成分在生产过程中易损失，影响测量结果的准确性，故此类成分并非本方质量评价指标的最佳选择。方中其他单味药如黑冰片主要成分为 Fe、Ca、Zn、Cu、Mg 等、白礞砂化学成分为 NH_4Cl ，可瓜子主要成分为内酯类及脂肪酸类化合物，上述成分均不具有代表性，不宜作为质量评价指标。除此之外，方中诃子含有大量的水溶性鞣酸，而川乌(制)、荜茇主要成分为生物碱类，两者易发生沉淀反应，影响实验结果；另外荜茇的主要成分胡椒碱见光可分解，也不宜作为指标物进行定量分析。梔子是我国常用中药材，在蒙医药里使用也十分普遍，具有解痉等作用，用于呕吐，胃痉挛等症的治疗，其主要成分梔子苷具有降血糖、降血脂、保肝利胆、镇静催眠、抗肿瘤、抗氧化等作用。梔子在方中为君药，且梔子苷化学性质稳定，以梔子苷作为尼安嘎日那格-10 的质量评价指标具有很好的代表性。

3.2 供试品提取条件考察

梔子苷为环烯醚萜苷类化合物，易溶于甲醇等有机溶剂，《中华人民共和国药典》^[7]多以甲醇、70% 甲醇、50% 甲醇为溶剂提取供试品中的梔子苷，提取方式多为超声提取。本文在提取过程中，考察了甲醇、70% 甲醇、50% 甲醇为提取溶剂，并考察了超声(功率 300 W，频率 50 Hz)提取时间(10 min、20 min、30 min、40 min)对提取效率的影响。

实验结果表明：以甲醇为溶剂对梔子苷进行提取，效果最佳；对超声时间的考察表明超声提取 30 min，梔子苷的提取效率较高，且和超声提取 40 min 相比梔子苷含量基本一致，为提高效率，将超声提取时间定为 30 min。

3.3 色谱条件的选择

采用高效液相色谱法测定蒙药尼安嘎日那格-10 中梔子苷的含量，文献报道^[8-11]梔子苷含量测定流动相体系为甲醇-水或乙腈-水，参照文献，经反复尝试，最终选用乙腈-水(11:89)为流动相，分离效果好；在 200 ~ 400 nm 波长范围内进行全波长扫描，结果梔子苷在 238 nm 处有最大吸收，故选择检测波长为 238 nm；实验柱温采用 25 ℃，在此色谱条件

下，梔子苷与其他成分达到较好的分离度，并具有较好的保留时间。

3.4 测定结果分析

目前有关中成药中梔子苷的含量测定方法已有较多报道，但关于蒙药方剂中梔子苷含量测定的报道还很少，且尼安嘎日那格-10 中梔子苷含量测定未见文献报道，因此本文采用高效液相色谱法测定蒙药尼安嘎日那格-10 中梔子苷含量。在供试品提取条件考察等方面，文献报道^[12-14]中成药中梔子苷含量测定多用 70% 甲醇或 50% 甲醇为提取溶剂，但鉴于本方中各成分的特殊性，含水甲醇容易将方中黑冰片、白礞砂中的无机盐以及诃子中大量的水溶性鞣酸提取出来，导致杂质峰较多，干扰测量结果，且盐类对色谱柱和高效液相系统均有不同程度损坏，影响色谱柱及仪器寿命，而选用纯甲醇做提取溶剂，杂质峰较少，对测定结果无干扰，且方法更简便、快捷，实验的重复性和稳定性更好。另外，相比文献报道中成药的质量控制方法，本文新增了对模拟样品、供试样品、梔子药材中梔子苷含量的对比研究，考察了制剂的均一性及工艺的稳定性。试验结果表明，模拟样品和样品中梔子苷含量相差不大，说明生产工艺对尼安嘎日那格-10 中梔子苷含量无影响；对梔子单味药材中梔子苷的含量进行测定，结果与模拟样品及样品中梔子苷含量相差不大，表明样品均一性良好，制剂工艺稳定。

蒙医药是经实践考验的具有民族特色的医药体系，有着很高的医疗价值，蒙医药和传统中医药相比，其用药特点与地理环境及蒙古族特有的生活方式有着密切联系，用药方法、用药时间与传统中医药不同，并且有特殊的炮制方法^[15]，蒙药在质量控制方面与中药相比还处于低水平阶段，有待进一步提高。本文建立的方法在进一步完善尼安嘎日那格-10 质量标准的同时，对建立民族特色蒙药的质量控制方法提出了新的探索，具有一定的示范作用，并将传统蒙医药理论与现代药理学新理论、新技术有机的结合起来，加强传统蒙药的现代化研究，建立了科学的质量控制方法，为更好地开发利用蒙药资源奠定了基础，对促进蒙医药产业现代化、可持续发展具有重要意义。

参考文献

- [1] 刘斌斌,蔡立群.论我国蒙医药的知识产权保护[J].甘肃医药,2011,30(4):193-196.
- [2] 乌兰.蒙医药产业发展研究[J].中国民族医药杂志,2015,(12):59-62.
- [3] 陈晓颢,徐玲,聂晶,等.香连制剂中木香的质量分析评价[J].中国药师,2016,19(7):1273-1275.
- [4] 王绪颖,贾晓斌,陈彦.木香类药材的研究进展[J].中药材,2010,33(1):153-157.
- [5] 韩亚南,孙洋,汪娟,等.RP-HPLC法测定沉香丸中木香有效成分的含量[J].临床医药文献杂志,2016,3(8):1408-1410.
- [6] 玉华.如达七味散质量标准的研究[J].中成药,2016,38(6):1285-1288.
- [7] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].北京:中国医药科技出版社,2015.
- [8] 徐国钧.中国药材学:下册[M].北京:中国医药科技出版社,1996.
- [9] 孙文基,谢世昌.天然药物成分定量分析[M].北京:中国医药科技出版社,2002.
- [10] 南京中医药大学.中药大辞典(2版)[Z].上海:上海科学技术出版社,2006.
- [11] 冯宁,卢成淑,南国,等.栀子花的化学成分研究[J].中草药,2016,47(2):200-203.
- [12] 费曜,段恒,王刚,等.不同产地栀子种质资源和药材品质的比较[J].华西药理学杂志,2016,31(1):48-51.
- [13] 张小琴,汤晟凌,吕伟旗.10种含栀子中药制剂中栀子苷与西红花苷-I的同时测定[J].中成药,2016,38(3):569-574.
- [14] 吴亚超,杨文静,张磊,等.栀子中栀子苷等7个化学成分测定及质量评价[J].中国药理学杂志,2016,51(10):841-847.
- [15] 刘振国.蒙古民族用药特点概述[J].中国民族民间医药,1995(4):4-6.

(收稿日期 2017-01-08)

(上接第916页)

- [100] Symington S B, Zhang A, Karstens W, et al. Characterization of Pyrethroid Action on Ciliary Calcium Channels in *Paramecium tetraurelia*, [J]. Pesticide Biochemistry & Physiology, 1999, 65(3):181-193.
- [101] 李军,孔志英,袁素琴,等.7%狼毒乌头碱白僵菌素悬浮剂及其生产方法:中国,CN1264541[P].2000-08-30.
- [102] Ruberto G, Baratta M T, Deans S G, et al. Antioxidant and antimicrobial activity of *Foeniculum vulgare* and *Crithmum maritimum* essential oils. [J]. Planta Medica, 2000, 66(6):687-693.
- [103] 李端,周立刚,姜微波,等.伞形科植物抗菌成分的研究进展[J].西北农林科技大学学报自然科学版,2005,33(S1):161-166.
- [104] 何其明,唐齐,严寒,等.含牛心朴子和苦豆子提取物的农药组合物及制备方法和应用:中国,CN105284914A[P].2016-02-03.
- [105] 吴传万,刘凤淮,杜小凤,等.一种防治线虫和地下害虫之生态药肥的研发[J].中国农学通报,2008,24(6):358-361.
- [106] 曾少兰.苦参碱杀虫水剂及其制备方法:中国,CN104365687A[P].2015-02-25.
- [107] 马金友,刘东,王振亮.稻米专用植物源杀虫剂和制备方法:中国,CN105076260A[P].2015-11-25.
- [108] 张兴,马志卿,冯俊涛,等.植物源农药研究进展[J].中国生物防治学报,2015,31(5):685-698.
- [109] 曾德芳,唐宏泉,严欢,等.蛇床子素生物杀虫剂:中国,CN103651359A[P].2014-03-26.
- [110] 张兴,冯俊涛,陈安良,等.砂地柏杀虫作用研究概况[J].西北农林科技大学学报自然科学版,2002,30(4):130-134.

(收稿日期 2017-05-04)