

柑柏止痒浴液的质量标准研究

余晓霞^{1*}, 伍俊妍¹, 刘春霞^{1#}, 温预关²(1.中山大学孙逸仙纪念医院药学部, 广州 510120; 2.广州市脑科医院药剂科/国家药品临床研究基地, 广州 510370)

中图分类号 R283.61;R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)31-2939-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.31.22

摘要 目的:建立柑柏止痒浴液的质量标准。方法:采用薄层色谱(TLC)法对方中薄荷脑和黄柏进行定性鉴别;采用高效液相色谱法测定黄柏中盐酸小檗碱的含量;色谱柱为Agilent Eclipse Plus C₁₈(100 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为甲醇-0.03 mol/ml 乙酸铵溶液(45:55, V/V),检测波长为346 nm。结果:TLC图专属性强,阴性对照无干扰。盐酸小檗碱的质量浓度在1~200 μg/ml范围内与峰面积积分值呈良好的线性关系($r=0.9998$);精密度、稳定性、重复性试验的RSD<2%;平均加样回收率为100.28%, RSD=1.58%($n=6$)。结论:所建标准可用于柑柏止痒浴液的质量控制。

关键词 柑柏止痒浴液;质量标准;薄层色谱法;高效液相色谱法;盐酸小檗碱

Study on Quality Standard of Ganbai Zhiyang Lotion

YU Xiao-xia¹, WU Jun-yan¹, LIU Chun-xia¹, WEN Yu-guan²(1.Dept. of Pharmacy, Sun Yat-sen Memorial Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510120, China; 2.Dept. of Pharmacy, Guangzhou Brain Hospital/State Clinical Drug Research Base, Guangzhou 510370, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the quality standard of Ganbai zhiyang lotion. METHODS: Menthol and *Phellodendron chinense* were identified by TLC. The content of berberine hydrochloride in *P. chinense* was determined by HPLC. The determination was performed on Agilent Eclipse Plus C₁₈ (100 mm×4.6 mm, 5 μm) column with mobile phase consisted of methanol-0.03 mol/ml ammonium acetate(45:55, V/V). The detection wavelength was set at 346 nm. RESULTS: TLC identification method exhibited good specificities without interference from negative samples. The linear range berberine hydrochloride were 1-200 μg/ml($r=0.9998$); RSDs of precision, stability and reproducibility tests were all lower than 2%; average recovery was 100.28% (RSD=1.58%, $n=6$). CONCLUSIONS: The established standard can be used for the quality control of Ganbai zhiyang lotion.

KEYWORDS Ganbai zhiyang lotion; Quality standard; TLC; HPLC; Berberine hydrochloride

表2 大黄素回收率试验结果($n=6$)

Tab 2 Results of recovery test of emodin($n=6$)

编号	样品含量,mg	加入量,mg	测得量,mg	回收率,%	\bar{x} ,%	RSD,%
1	0.306	0.314	0.628	102.55		
2	0.312	0.314	0.614	96.18		
3	0.310	0.314	0.622	99.36	99.04	2.71
4	0.305	0.314	0.625	101.91		
5	0.314	0.314	0.619	97.13		
6	0.315	0.314	0.620	97.13		

决明子中蒽醌类成分有游离型和结合型两种形式,前期试验对供试品溶液的制备方法进行了探索,当样品直接用甲醇提取时,在相应位置处色谱峰不明显;而采用甲醇提取后再经盐酸水解的方法制备供试品溶液,在相应位置处色谱峰明显,故采用后种方法。在相应的色谱条件下,大黄酚和大黄素可同时出峰,分离度较好,因此选择同时测定样品中大黄素和大黄酚的含量,方法简便,结果可靠。

本试验针对菊明提取物中的决明子,建立了对降压有效

* 主管药师,硕士。研究方向:医院制剂、药物分析。电话:020-81332427。E-mail:xiaoxiao1979@21cn.com

通信作者:副主任药师。研究方向:医院制剂、药物分析。电话:020-81332427。E-mail:lcxgz@163.com

成分蒽醌类的TLC鉴别和含量测定方法。在前期已对方君药野菊花中的黄酮类成分建立质量控制方法的基础上,本研究从定性到定量、从总含量到多个有效成分含量进行全面控制,对于菊明降压丸的二次开发及提高传统中药复方的质量标准水平具有较重要的意义。

参考文献

- [1] 中华人民共和国卫生部药典委员会.中华人民共和国卫生部药品标准中药成方制剂:第三册[S].1991:64.
- [2] 李续娥,郭宝江,曾志,等.决明子蛋白质、低聚糖及蒽醌苷降压作用的实验研究[J].中草药,2003,34(9):842.
- [3] 郝延军,桑育黎,赵余庆.决明子蒽醌类化学成分研究[J].中草药,2003,34(1):18.
- [4] 陈建真,叶磊,陈建明.大孔吸附树脂分离纯化菊明降压有效部位总黄酮[J].中国医院药学杂志,2010,31(8):660.
- [5] 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,2010:135、附录34.
- [6] 雷宁,张颖,马萍.复方决明子胶囊的质量标准研究[J].中国药房,2011,22(3):255.

(收稿日期:2013-08-05 修回日期:2013-09-13)

柑柏止痒溶液是中山大学孙逸仙纪念医院自制制剂,由五指柑、大风艾、黄柏、地肤子、薄荷脑等药味组成,具有杀菌、止痒、洁体除垢的作用,一般用于治疗皮肤瘙痒症、荨麻疹。黄柏为方中君药,盐酸小檗碱为其主要有效成分,具有较好的杀菌、止痒作用^[1]。由于到目前为止尚未建立柑柏止痒溶液质量控制的相关方法,因此,为有效控制该制剂的质量,笔者采用薄层色谱(TLC)法对方中黄柏和薄荷脑进行了定性鉴别,并采用高效液相色谱(HPLC)法^[2-5]对黄柏中的药效成分盐酸小檗碱进行了定量分析。

1 材料

1.1 仪器

1100型HPLC仪(美国Agilent公司);MIKR012-24型高速离心机(河北省安新县白洋离心机厂);XW-80A型旋涡混合器(上海医科大学仪器厂);BP110S型电子分析天平[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司];过滤器(隔膜真空泵,天津市津腾实验设备有限公司);HWS28型电热恒温水浴锅(上海一恒科学仪器有限公司);KQ-500DB型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司,功率:250 W,频率:40 kHz)。

1.2 药品与试剂

柑柏止痒溶液(批号:201211131、201205238、201212048,规格:300 ml/瓶)及相应阴性样品均由中山大学孙逸仙纪念医院配制;薄荷脑、盐酸小檗碱对照品和黄柏对照药材(中国食品药品检定研究院,批号分别为0728-9304、110713-200208、121510-201105);甲醇(色谱纯,德国Merck公司);醋酸铵(色谱纯,北京迪马科技有限公司);硅胶G(化学纯,青岛海洋化工有限公司分厂,批号:0130116);水为纯化水,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 定性鉴别

2.1.1 薄荷脑的TLC鉴别 取本品20 ml,用石油醚(30~60℃)振摇提取2次,每次20 ml,合并提取液,低温挥干,残渣加乙酸乙酯1 ml使溶解,作为供试品溶液。另取薄荷脑对照品,加乙酸乙酯制成每1 ml含1 mg的溶液,作为对照品溶液。照TLC法^[2]试验,吸取供试品溶液4 μl、对照品溶液15 μl,分别点于同一硅胶G薄层板上,以石油醚(30~60℃)-乙酸乙酯(10:1, V/V)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以2%香草醛硫酸溶液,于105℃加热至斑点显色清晰,日光下检视。结果显示,供试品色谱中,在与对照品色谱相应的位置上,显相同颜色的斑点;阴性对照无干扰。薄荷脑的TLC图见图1。

2.1.2 黄柏的TLC鉴别 取本品10 ml,加甲醇10 ml,超声处理20 min,滤过,滤液加于中性氧化铝柱(100~120目,5 g,内径为15 mm)上,收集洗脱液,蒸干,残渣加水15 ml使溶解,用水饱和的正丁醇振摇提取2次,每次15 ml,合并正丁醇液,蒸干,残渣加甲醇1 ml使溶解,作为供试品溶液。另取黄柏对照药材0.1 g,加水50 ml,煮沸30 min,滤过,滤液浓缩至10 ml,加甲醇10 ml,混匀,滤过,自“滤液加于中性氧化铝柱(100~120目,5 g,内径为15 mm)上”起,同法制成对照药材溶液。照TLC法^[2]试验,吸取供试品溶液、对照药材溶液各2 μl,分别点于同一硅胶G薄层板上,以三氯甲烷-甲醇-水(16:5:1, V/V/V)的下层溶液为展开剂,展开,取出,晾干,置紫外光灯(365 nm)下检视。结果,供试品色谱中,在与对照药材色谱相应的位置上,显相同颜色的荧光斑点;阴性对照无干扰。黄柏的TLC图见图2。

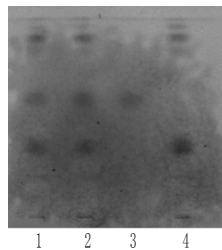


图1 薄荷脑的TLC图

1、2. 供试品; 3. 薄荷脑对照品; 4. 阴性对照(缺薄荷脑)

Fig 1 TLC of menthol

1, 2. test samples; 3. menthol control; 4. negative control (without menthol)

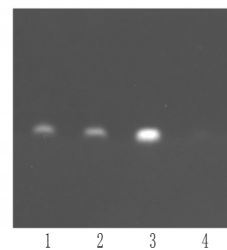


图2 黄柏的TLC图

1、2. 供试品; 3. 黄柏对照药材; 4. 阴性对照(缺黄柏)

Fig 2 TLC of *Phellodendron chinense*

1, 2. test samples; 3. *Phellodendron chinensis* Cortex reference substance; 4. negative control (without *P. chinense*)

2.2 盐酸小檗碱的含量测定

2.2.1 对照品溶液的制备 精密称取盐酸小檗碱对照品适量,加甲醇溶解并稀释,制成每1 ml含1 mg的盐酸小檗碱对照品贮备液,临用时稀释成所需质量浓度。

2.2.2 供试品溶液的制备 精密量取样品2 ml,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇2 ml,称定质量,超声处理40 min,放冷,再称定质量,用甲醇补足减失的质量,滤过,取续滤液,即得。

2.2.3 阴性对照溶液的制备 取缺黄柏的阴性样品适量,按“2.2.2”项下方法制成阴性对照溶液,即得。

2.2.4 色谱条件与系统适用性试验 色谱柱:Agilent Eclipse Plus C₁₈(100 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:甲醇-0.03 mol/ml乙酸铵溶液(45:55, V/V);流速:1.0 ml/min;检测波长:346 nm;柱温:30℃;进样量:5 μl。取阴性对照溶液、对照品溶液与供试品溶液,按上述色谱条件进样测定,记录色谱图(见图3)。结果,供试品中盐酸小檗碱与其他组分峰明显分离,阴性对照无干扰。理论板数按盐酸小檗碱峰计算应不低于3 000,分离度>1.5。

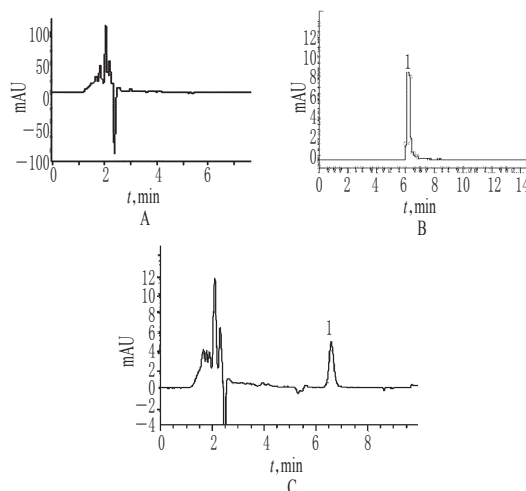


图3 高效液相色谱图

A. 阴性对照; B. 盐酸小檗碱对照品; C. 供试品; 1. 盐酸小檗碱

Fig 3 HPLC chromatograms

A. negative control; B. berberine hydrochloride control; C. test sample; 1. berberine hydrochloride

2.2.5 线性关系考察 分别精密量取对照品贮备液2.00、

1.00、0.50、0.20、0.10、0.05、0.01 ml,置10 ml量瓶中,加甲醇稀释至刻度,制备成不同质量浓度的对照品溶液,按上述色谱条件进样测定,记录峰面积。以峰面积积分值(y)为纵坐标,盐酸小檗碱质量浓度(x)为横坐标,进行线性回归,得回归方程为 $y=10.593x-15.656$ ($r=0.9998$, $n=7$)。结果表明,盐酸小檗碱质量浓度在1~200 $\mu\text{g/ml}$ 范围内与峰面积积分值呈良好线性关系。

2.2.6 精密密度试验 取20 $\mu\text{g/ml}$ 的对照品溶液适量,按上述色谱条件重复进样测定6次,记录峰面积。结果,RSD=0.33% ($n=6$),表明仪器精密密度良好。

2.2.7 稳定性试验 取同一供试品溶液(批号:201211131)适量,分别于配制后0、2、4、6、8、24 h,按上述色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,RSD=1.64% ($n=6$),表明供试品溶液在24 h内稳定。

2.2.8 重复性试验 取同一批(批号:201211131)样品适量,按“2.2.2”项下方法平行制备6份供试品溶液,再按上述色谱条件进样测定,记录峰面积,计算样品含量。结果,样品中盐酸小檗碱的平均质量浓度为13.13 $\mu\text{g/ml}$,RSD=1.52% ($n=6$),表明本方法重复性良好。

2.2.9 加样回收率试验 精密量取已知盐酸小檗碱含量的同一批样品(批号:201211131,质量浓度:13.13 $\mu\text{g/ml}$)1 ml,平行6份,分别精密加入盐酸小檗碱对照品溶液1 ml,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按上述色谱条件进样测定,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($n=6$)

编号	样品含量, μg	加入量, μg	测得量, μg	回收率,%	\bar{x} ,%	RSD,%
1	13.13	20.50	33.93	101.46		
2	13.13	20.50	33.98	101.71		
3	13.13	20.50	34.01	101.85	100.28	1.58
4	13.13	20.50	33.54	99.56		
5	13.13	20.50	33.29	98.34		
6	13.13	20.50	33.37	98.73		

2.2.10 样品含量测定 分别取3批柑柏止痒溶液各适量,按“2.2.2”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盐酸小檗碱的含量。结果,3批样品(批号:201205238、201211131、201212048)中盐酸小檗碱的含量分别为19.26、13.13、13.12 $\mu\text{g/ml}$,平均含量为15.17 $\mu\text{g/ml}$ 。

3 讨论

3.1 黄柏TLC鉴别供试品溶液的制备

由于柑柏止痒溶液组方中含有生物碱、皂苷及大量的表面活性剂,笔者在黄柏TLC鉴别供试品溶液的制备过程中,曾考察采用甲醇超声提取、甲醇提取后再柱萃取等方法,发现操作过程会产生泡沫,而且制备出来的样品黏稠度大,试验效果不理想。最后采取先用甲醇超声提取,滤过后再经柱萃取,然后用正丁醇萃取、水洗除糖类杂质的方法,可使TLC鉴别效果变好。

3.2 含量测定试验中流动相的选择

本试验最早采用水-乙腈系统作为流动相,发现盐酸小檗碱出峰时间过早,峰形不规则,且出现倒峰。改用水-甲醇系统作为流动相,发现当水:甲醇=30:70(V/V)时,盐酸小檗碱的出峰时间为2.2 min,出峰太早;后降低甲醇比例,调节水:甲

醇=60:40(V/V),盐酸小檗碱的出峰时间为7.4 min,出峰时间较为适合,但峰形前倾。故保持水:甲醇=60:40(V/V)的比例不变,在水中加入乙酸铵缓冲盐,可改善峰形。这是因为缓冲盐有利于消除峰的前倾问题,并且能够让峰更加尖锐、出峰时间更加合适^[6]。但是,考察阴性对照溶液的干扰情况发现,所有干扰均发生在5 min之前(见图3),因此调节流动相比例为水(含0.03 mol/L 乙酸铵):甲醇=55:45(V/V),得到盐酸小檗碱的出峰时间为6.1 min,既可获得优异的峰形,又能避开干扰,且检测时间较短。据文献报道,为了让主峰与干扰峰有更好的分离,在流动相中加入了阴性表面活性剂十二烷基磺酸钠^[7],但该表面活性剂容易破坏色谱柱,降低其寿命,故本试验采用乙酸铵代替十二烷基磺酸钠,既能达到分离的效果,又可以充分保护色谱柱。

3.3 含量测定试验中样品提取方法的考察

3.3.1 提取溶剂的选择 由于样品中含有多种成分,为了防止其他物质干扰盐酸小檗碱的出峰时间和峰形,充分保护色谱柱,在进行含量测定之前必须对样品进行前处理。本试验分别用甲醇、乙腈、正己烷3种试剂来处理样品,结果发现,当样品中加入乙腈和正己烷时都发生了明显的皂化现象,难以沉淀样品中的杂质,经滤过后样品依然浑浊,无法达到去除杂质的目的;采用甲醇处理样品时,皂化现象不明显,且可以沉淀样品中的杂质,滤过之后滤液澄清。盐酸小檗碱为生物碱类化合物,极性较大。文献曾使用甲醇、盐酸-甲醇(1:100, V/V)分别进行提取^[8],结果显示,两种溶剂的提取效果相近,但是以甲醇为溶剂更简单。因此,本试验采用甲醇对样品进行提取。

3.3.2 超声时间的选择 本试验参考文献^[9],比较了样品提取10、20、40、60 min的提取效果,发现以40 min的提取效果最好,提取60 min与40 min没有明显差异,故本试验选择超声时间为40 min。

综上所述,所建标准可用于柑柏止痒溶液的质量控制。

参考文献

- [1] 丁南南,黄珊珊,丁丽霞,等.小檗碱的分析方法及药理作用研究进展[J].药物分析杂志,2012,32(7):1 296.
- [2] 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,2010:286-287、附录34.
- [3] 杨明荣.中药制剂中盐酸小檗碱定量分析方法综述[J].北方药学,2010,7(2):62.
- [4] 周松,刘永刚,张国祥,等.黄柏化学成分及质量控制研究进展[J].中国药房,2012,23(39):3 740.
- [5] 吕长准.盐酸小檗碱含量测定方法概述[J].中国医药导报,2010,7(33):141.
- [6] 吴雪丹,丁宝月,傅应华.HPLC法测定复方苦参洗剂中盐酸小檗碱和黄芩苷[J].中成药,2012,34(5):868.
- [7] 沈炜.HPLC测定妇洗康洗剂中盐酸小檗碱含量[J].海峡药学,2010,22(9):55.
- [8] 刘中丽,郑仲毅.高效液相色谱法测定百安洗液中盐酸小檗碱含量[J].中国医药指南,2012,10(19):20.
- [9] 罗敏,罗东玲,席先蓉,等.HPCE测定戊己丸中盐酸小檗碱和芍药苷的含量[J].南京中医药大学学报,2009,25(1):67.

(收稿日期:2014-02-25 修回日期:2014-06-09)