

痔疮外洗散质量标准研究

罗珍妹, 陈惠玲, 汪建君 (厦门市药品检验所, 福建 厦门 361012)

摘要:目的 建立痔疮外洗散的质量标准。方法 采用 TLC 法对方中防风、甘草、花椒进行定性鉴别; 并采用 HPLC 测定黄连中盐酸小檗碱的含量。结果 薄层色谱均检出防风、甘草、花椒; 盐酸小檗碱在 0.052 4 ~ 2.096 0 μg 内呈良好的线性关系, $r=0.999\ 7$; 平均回收率为 99.4%, $\text{RSD}=1.36\%$ 。结论 该方法简便易行, 重复性好, 可作为该制剂质量控制标准。

关键词:痔疮外洗散; 盐酸小檗碱; 高效液相色谱法; 薄层色谱法

中图分类号: R927.11

文献标识码: B

文章编号: 1007-7693(2009)02-0155-04

Studies on the Quality Standard of the External Used Washing Powder for Hemorrhoid

LUO Zhenmei, CHEN Huiling, WANG Jianjun (Xiamen Institute for Drug Control, Xiamen 361012, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a quality standard of the external used washing powder for Hemorrhoid. **METHODS** The Radix Saposhnikoviae, Radix Et Rhizoma Glycyrrhizae and Pericarpium Zanthoxyli were identified by TLC and the content of berberine hydrochloride in Rhizoma Coptidis was determined by HPLC. **RESULTS** Radix Saposhnikoviae, Radix Glycyrrhizae and Pericarpium Zanthoxyli were found in TLC; The linear range of berberine hydrochloride in Rhizoma Coptidis was 0.052 4 ~ 2.096 0 μg ($r=0.999\ 7$), the average recovery was 99.4% with RSD of 1.36%. **CONCLUSION** The method is simple and reproducible. It can be used to control the quality of the external used washing powder for Hemorrhoid.

KEY WORDS: external used washing powder for Hemorrhoid; berberine hydrochloride; HPLC; TLC

痔疮外洗散由芒硝、花椒、防风、黄连等七味药组成, 具有祛毒止痒, 消肿止痛的功效, 用于痔疮漏疮, 肛门痛痒, 坚硬肿胀, 溃流脓血。收载于卫生部药品标准中药成方制剂第二册, 原质量标准无薄层色谱鉴别及含量测定项, 为提高该制剂的有效性、稳定性及可控性, 更有效地控制药品内在质量, 对方中防风、甘草、花椒进行薄层色谱鉴别, 并采用高效液相色谱法对黄连中盐酸小檗碱进行含量测定。

1 仪器与试剂

Agilent 1100 Series 高效液相色谱仪, 可变波长检测器 (VWD), Agilent 色谱工作站, Lambda25 紫外分光光度计。盐酸小檗碱对照品由中国药品生物制品检定所提供, 批号为 110713-200208 (供含量测定用, 纯度按 100% 计); 痔疮外洗散样品由某制药厂提供; 乙腈为色谱纯; 其余试剂为分析纯。防风、甘草、花椒对照药材均购于中国药品生物制品检定所。

2 方法与结果

2.1 薄层色谱鉴别

2.1.1 防风 取本品 5 g, 加石油醚 (60 ~ 90 $^{\circ}\text{C}$) 20 mL, 超声处理 20 min, 滤过, 滤液蒸干, 残渣加乙醇 1 mL 使溶解, 作为供试品溶液。取防风对照药材 1 g 同法制成对照药材溶液。另同法制成防风阴性对照

溶液。照薄层色谱法^[1-2]试验, 吸取上述两种溶液各 10 μL , 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 以石油醚 (60 ~ 90 $^{\circ}\text{C}$) - 乙酸乙酯 (8:2) 为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 置紫外光灯 (365 nm) 下检视。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, 防风阴性对照无相应斑点。见图 1。

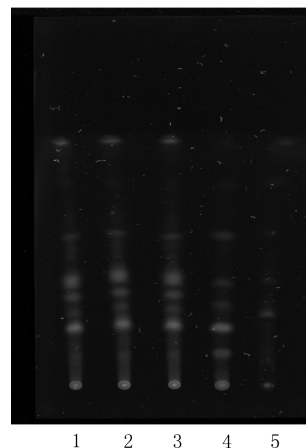


图 1 防风 TLC 图谱

1, 2, 3-供试品; 4-防风对照药材; 5-防风阴性对照

Fig 1 Chromatograms of Radix Saposhnikoviae by TLC

1, 2, 3-test samples; 4-sample of Radix Saposhnikoviae; 5-test sample without Radix Saposhnikoviae

作者简介: 罗珍妹, 女, 副主任药师

Tel: (0592) 5619842

E-mail: luozhenmei@yahoo.cn

2.1.2 甘草 取本品 5 g,加乙醚 40 mL,加热回流 1 h,滤过,药渣加甲醇 30 mL,加热回流 1 h,滤过,滤液蒸干,残渣加水 30 mL 使溶解,用正丁醇提取 3 次,每次 20 mL,合并正丁醇液,用水洗涤 3 次,蒸干,残渣加甲醇 2 mL 使溶解,作为供试品溶液。取甘草对照药材 1 g,同法制成对照药材溶液。再取甘草酸铵对照品,加甲醇制成每 1 mL 含 2 mg 的溶液,作为对照品溶液。另同法制成甘草阴性对照溶液。照薄层色谱法^[1-2] 试验,吸取上述三种溶液各 5 μ L,分别点于同一用 1% 氢氧化钠溶液制备的硅胶 G 薄层板上,以乙酸乙酯-甲酸-冰醋酸-水(15:1:1:2)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以 10% 硫酸乙醇溶液,在 105 $^{\circ}$ C 加热至斑点显色清晰,在日光下检视。供试品色谱中,在与对照药材色谱相应的位置上,显相同颜色的斑点;在与对照品色谱相应的位置上,显相同颜色的斑点。甘草阴性对照无相应斑点。见图 2。

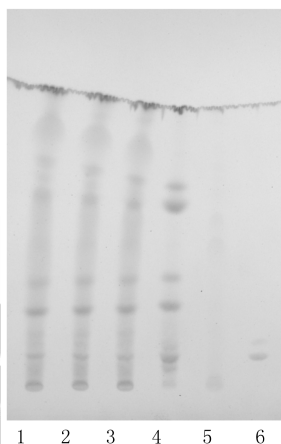


图 2 甘草 TLC 图谱

1,2,3-供试品;4-甘草对照药材;5-甘草阴性对照;6-甘草酸铵对照品

Fig 2 Chromatograms of Radix Et Rhizoma Glycyrrhizae by TLC

1,2,3-test samples;4-sample of Radix Et Rhizoma Glycyrrhizae;5-test sample without Radix Et Rhizoma Glycyrrhizae;6-sample of ammonium glycyrrhizate

2.1.3 花椒 取本品 10 g,加乙醚 30 mL,超声处理 30 min,滤过,滤液挥至 1 mL,作为供试品溶液。取花椒对照药材 2 g,同法制成对照药材溶液。另同法制成花椒阴性对照溶液。照薄层色谱法^[1-2] 试验,吸取上述两种溶液各 5 μ L,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以正己烷-乙酸乙酯(4:1)为展开剂,展开,取出,晾干,置紫外灯下(365 nm)下检视。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。花椒阴性对照无相应斑点。见图 3。

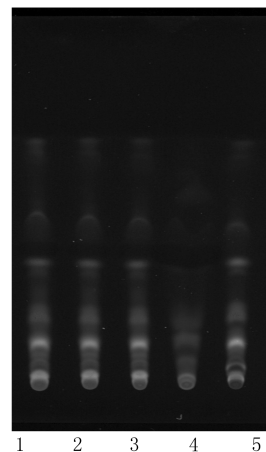


图 3 花椒 TLC 图谱

1,2,3-供试品;4-花椒阴性对照;5-花椒对照药材

Fig 3 Chromatograms of Pericarpium Zanthoxyli by TLC

1,2,3-test samples;4-test sample without Pericarpium Zanthoxyli;5-sample of Pericarpium Zanthoxyli

2.2 含量测定

2.2.1 色谱条件的选择 色谱柱 Zorbax SB C₁₈ (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m),流动相:乙腈-0.033 mol $\cdot$ L⁻¹ 磷酸二氢钾溶液(35:65);检测波长:265 nm;流速:1.0 mL $\cdot$ min⁻¹;柱温:30 $^{\circ}$ C,进样量:10 μ L;理论板数按盐酸小檗碱峰计应不低于 3 000。

2.2.2 线性关系考察 精密称取盐酸小檗碱对照品适量,加甲醇制成每 1 mL 含 0.052 4 mg 的对照品溶液,分别精密吸取对照品溶液 1,3,5,10,15,20,25,30,40 μ L,注入液相色谱仪,按上述色谱条件测定峰面积,以峰面积(A)为纵坐标,进样量(μ g)为横坐标进行线性回归,得回归方程: $Y = 3\,812.27X + 63.46$, $r = 0.999\,7$,结果盐酸小檗碱进样量在 0.052 4 ~ 2.096 0 μ g 内与峰面积呈良好的线性关系。

2.2.3 对照品溶液的制备 取盐酸小檗碱对照品适量,精密称定,加甲醇制成每 1 mL 含盐酸小檗碱 50 μ g 的溶液,即得。

2.2.4 供试品溶液的制备 取本品 0.5 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入盐酸-甲醇(1:100)混合溶液 50 mL,密塞,称定重量,超声处理(功率 300 W,频率 28 kHz)30 min,放冷,再称定重量,用盐酸-甲醇(1:100)的混合液补足减失的重量,摇匀,滤过。滤液用微孔滤膜(0.45 μ m)滤过,作为供试品溶液。

2.2.5 阴性对照试验 按处方中各药味的比例,称取不含黄连各味药,按制剂工艺制成阴性对照样品,再按“2.2.4”项下方法,制备缺黄连的阴性对照溶液,吸取供试品溶液、对照品溶液、阴性对照溶液各 10 μ L,分别注入液相色谱仪,依法测定,结果阴性对

照溶液对样品中盐酸小檗碱峰无干扰,表明本法测定盐酸小檗碱具有专属性。

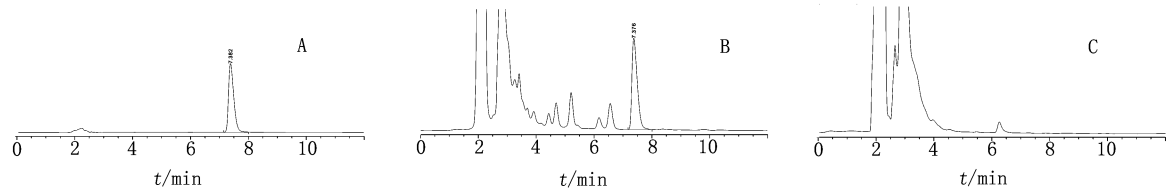


图4 痔疮外洗散 HPLC 图谱
A-盐酸小檗碱对照品;B-痔疮外洗散供试品;C-缺黄连阴性对照

Fig 4 Chromatograms of external used washing power for hemorrhoid by HPLC
A-sample of berberine hydrochloride;B-test sample;C-test sample without Rhizoma Coptidis

2.2.6 仪器精密度试验 取同一盐酸小檗碱对照溶液(批号为110713-200208)浓度为 $0.2524\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$,重复进样6次,每次进样 $10\text{ }\mu\text{L}$,按上述条件测定峰面积值, $\text{RSD}=0.26\%$ ($n=6$)结果表明仪器精密度良好。

2.2.7 重复性试验 取同一批号样品6份(批号5109998),按“2.2.4”项下方法处理,平行测定6次,结果盐酸小檗碱平均含量为 $7.24\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$, $\text{RSD}=1.53\%$ 。

2.2.8 稳定性试验 取同一供试品溶液(5109998)

按上述色谱条件在0,6,12,18,24,48 h,分别进样 $10\text{ }\mu\text{L}$ 测定盐酸小檗碱峰面积,结果 $\text{RSD}=0.51\%$,表明供试品溶液在48 h内基本稳定。

2.2.9 回收率试验 采用加样回收法。精密称取已知盐酸小檗碱含量的同一批号样品6份(批号5109998),分别精密加入一定量的盐酸小檗碱对照品溶液,依正文制备方法进行含量测定,并计算回收率,结果平均回收率为 99.4% , $\text{RSD}=1.36\%$,结果见表1。

表1 回收率试验结果

Tab 1 Results of recovery test

取样量/g	已知量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
0.252 9	1.935	1.978	3.906	99.6	99.4	1.36
0.253 6	1.940	1.978	3.956	101.9		
0.256 5	1.962	1.978	3.928	99.4		
0.257 5	1.970	1.978	3.918	98.5		
0.254 5	1.947	1.978	3.906	99.0		
0.257 2	1.968	1.978	3.905	97.9		

2.2.10 样品含量测定 取样品6批依法制备供试品溶液,吸取盐酸小檗碱对照品溶液与供试品各 $10\text{ }\mu\text{L}$,注入液相色谱仪,测定峰面积,计算样品中盐酸小檗碱含量,结果见表2。

表2 样品测定结果

Tab 2 Results of sample determination

批号	含量/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	RSD/%
5109997	6.85	0.69
5109998	7.65	0.51
5109999	6.20	0.16
20060501	6.41	1.40
20060502	6.58	0.28
20060503	6.38	1.05

3 讨论

3.1 不同提取方法比较

本试验采用超声处理提取法提取盐酸小檗碱,比中国药典超声处理后,再上碱性氧化铝柱层析及回流提取法简便,快速、省时,超声处理提取方法,能使样品中的盐酸小檗碱提取完全。见表3。

表3 不同提取方法的比较

Tab 3 Comparisons of different abstraction

提取方法	实验结果/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$
1. 取样品0.5 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入盐酸-甲醇(1:100)混合液50 mL,超声处理30 min,放冷,用盐酸-甲醇(1:100)混合液补足减失重量	7.56
2. 取样品1 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入盐酸-甲醇(1:100)混合液20 mL,置50℃水浴上加热15 min,取出,放冷,再超声处理30 min,放冷,用盐酸-甲醇(1:100)混合液补足减失重量,滤过,精密称取滤液2 mL至中性氧化铝柱(100~200目,4 g,内径1 cm,干法装柱)上,用甲醇35 mL洗脱,收集洗脱液,蒸干。残渣加甲醇适量使溶解,并转移至10 mL量瓶中,加甲醇至刻度	5.49
3. 取样品0.5 g,置具塞锥形瓶中,精密加入盐酸-甲醇(1:100)混合液50 mL,称定重量,在水浴上回流2 h,冷却,用盐酸-甲醇(1:100)混合液补足减失重量	7.64

3.2 样品的取样量对盐酸小檗碱含量测定结果的影响,通过实验,取样量在 $0.18\sim0.74\text{ g}$,按上述条件测定盐酸小檗碱含量,结果基本一致, $\text{RSD}=$

1.99% ($n=4$)。

3.3 检测波长的选择

取盐酸小檗碱对照品溶液,在 220 ~ 400 nm 范围内扫描,结果在 265 nm,345 nm 处均有最大吸收,参照中国药典 2005 年版一部复方黄连片中盐酸小檗碱的含量测定,检测波长确定为 265 nm,曾用 265 nm,345 nm 检测波长测定样品中盐酸小檗碱含量,结果含量基本一致。

3.4 不同色谱柱对盐酸小檗碱含量测定结果的影响

三种不同色谱柱含量测定结果基本一致,RSD = 1.65%,结果见表 4。

3.5 方法学验证表明

采用薄层色谱法对方中防风、甘草、花椒进行定性鉴别,高效液相色谱法对黄连中盐酸小檗碱

进行含量测定,该方法操作简便,结果准确,重复性好,能够有效地控制药品质量。

表 4 不同色谱柱测定含量结果

Tab 4 Results of sample with different chromatographic columns

色谱柱类型及规格	含量/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$	RSD/%
Zorbax SB C ₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm)	7.65	1.68
Eclipse XDB-C ₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm)	7.86	
Kromasil C ₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm)	7.89	

REFERENCES

- [1] Ch. P (2005) Vol I (中国药典 2005 年版. 一部) [S]. 2005: 591.
- [2] MIAO M S, LI Z G. Modern Applied Control Technology of Chinese Medicine(现代实用中药质量控制技术) [M]. Vol 1. Beijing: People's Medical Publishing house, 2000: 475.

收稿日期: 2008-01-08