

HPCE 同时测定黄强软膏中盐酸小檗碱和泼尼松的含量

孙婷¹, 李珺沫¹, 孙玉刚², 蒋晔^{1*} (1.河北医科大学药学院, 石家庄 050017; 2.河北省唐山市人民医院, 河北 唐山 063001)

摘要: 目的 建立简便、快速的同时测定黄强软膏中盐酸小檗碱和泼尼松含量的高效毛细管电泳。方法 以未涂层弹性石英毛细管(41 cm×50 μm, 有效分离长度33 cm)为分离通道, 30 mmol·L⁻¹四硼酸钠(pH 11.0)-甲醇(7:3)为运行缓冲溶液, 进样时间10 s, 运行电压15 kV。紫外检测波长为238 nm。结果 盐酸小檗碱在32.0~512 μg·mL⁻¹内线性关系良好($r=0.999\ 9$), 平均回收率为99.4%, RSD为1.2%; 泼尼松在16.0~256 μg·mL⁻¹内线性关系良好($r=0.999\ 0$), 平均回收率为99.8%, RSD为1.4%。结论 本法简便、快速, 准确, 为黄强软膏的质量控制提供了新的检测手段。

关键词: 高效毛细管电泳; 黄强软膏; 盐酸小檗碱; 泼尼松

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2009)08-0667-04

Simultaneous Determination of Berberine and Prednisone in Huangqiang Ointment by HPCE

SUN Ting¹, LI Junmei¹, SUN Yugang², JIANG Ye^{1*} (1. School of Pharmacy, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China; 2. Tangshan People's Hospital, Tangshan 063001, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a simple and fast method for the determination of berberine and prednisone simultaneously in Huangqiang ointment by HPCE. **METHODS** An uncoated fused-silica capillary column (41 cm×50 μm, effective length: 33 cm) was used, with a buffer solution of 30 mmol·L⁻¹ sodium borate (pH 11.0)-methanol (7:3), inject time of 10 s and separation voltage of 15 kV. The detection wavelength was 238 nm. **RESULTS** The standard curve of berberine was linear over the range of 32.0-512 μg·mL⁻¹ ($r=0.999\ 9$), and the average recovery was 99.4% with RSD=1.2%. The standard curve of prednisone was linear over the range of 16.0-256 μg·mL⁻¹ ($r=0.999\ 0$), and the average recovery was 99.8% with RSD=1.4%. **CONCLUSIONS** The HPCE method is simple, rapid and accurate. It provides a new detecting method for the quality control of Huangqiang ointment.

KEY WORDS: HPCE; huangqiang ointment; berberine; prednisone

黄强软膏是含盐酸小檗碱, 泼尼松等的复方软膏制剂, 具有清热燥湿、抗炎、抗过敏的功效, 临床上主要用于各种类型的湿疹, 其中盐酸小檗碱和泼尼松为主要有效成分。单独用紫外分光光度法^[1]和RP-HPLC^[2]测定软膏中盐酸小檗碱的含量或单独用HPLC测定泼尼松的含量^[3]已有文献报道, 而盐酸小檗碱和泼尼松的紫外吸收性质和极性相差

较大, 同时分析比较困难, 同时测定两者含量的文献尚未见报道。本实验采用HPCE同时测定了两者的含量, 该方法简便、快速, 结果准确, 为黄强软膏的质量控制提供了新的检测手段。

1 仪器和试剂

1.1 仪器

CL1020型高效毛细管电泳仪(北京彩陆科学

作者简介: 孙婷, 女, 硕士生 *通讯作者: 蒋晔, 男, 教授

Tel: (0311)86266069 E-mail: jiangye@hebmhu.edu.cn

仪器有限公司), CT22色谱信号采集器(南京千谱软件公司), pHs-25型精密酸度计(上海雷磁仪器厂), 未涂层弹性石英毛细管(41 cm×50 μm, 河北永年光纤厂, 有效长度: 33 cm)。

1.2 试剂

盐酸小檗碱对照品(中国药品生物制品检定所, 批号: 110713-200609, 供含量测定用), 泼尼松对照品(中国药品生物制品检定所, 批号: 100012-200105, 供含量测定用), 黄强软膏(河北省中医院, 批号: 070314, 070411, 070423), 甲醇、四硼酸钠均为分析纯, 水为重蒸水。

2 方法和结果

2.1 电泳条件

未涂层弹性石英毛细管(41 cm×50 μm, 有效分离长度33 cm); 运行缓冲溶液: 30 mmol·L⁻¹四硼酸钠(pH 11.0)-甲醇(7:3); 运行电压: 15 kV; 紫外检测波长: 238 nm; 高度差进样, 高度差为10 cm; 进样时间: 10 s。每次开机依次用0.1 mol·L⁻¹氢氧化钠、重蒸水、运行缓冲溶液分别冲洗毛细管柱10 min; 每次进样前以运行缓冲溶液冲洗毛细管柱3 min。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 分别精密称取盐酸小檗碱对照品12.8 mg、泼尼松对照品6.40 mg, 置同

一25 mL量瓶中, 用甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 作为混合对照品储备液, 其中盐酸小檗碱、泼尼松的质量浓度分别为512 μg·mL⁻¹、256 μg·mL⁻¹。精密量取混合对照品储备液2.5 mL置10 mL量瓶中, 用甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 得混合对照品溶液, 其中盐酸小檗碱、泼尼松的质量浓度分别为128 μg·mL⁻¹、64.0 μg·mL⁻¹。

2.2.2 供试品溶液的制备 精密称取软膏约0.16 g, 置10 mL量瓶中, 加甲醇适量, 置80 °C水浴中, 加热使溶解, 放冷至室温, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀。置冰浴中冷却20 min, 取出后迅速滤过, 弃去初滤液。取续滤液2 mL置10 mL量瓶中, 用甲醇溶解并稀释至刻度, 用0.45 μm微孔滤膜滤过, 作为供试品溶液。

2.2.3 阴性对照品溶液的制备 取阴性样品, 按“2.2.2”项下方法处理, 得阴性对照品溶液。

2.3 专属性试验

按“2.1”项下电泳条件进样分析, 对照品溶液、供试品溶液和阴性对照品溶液的色谱图, 见图1, 其中盐酸小檗碱和泼尼松色谱峰的分离度大于10, 理论板数以盐酸小檗碱计算不低于27 000, 以泼尼松计算不低于9 000。从图中可见, 空白试验无干扰。

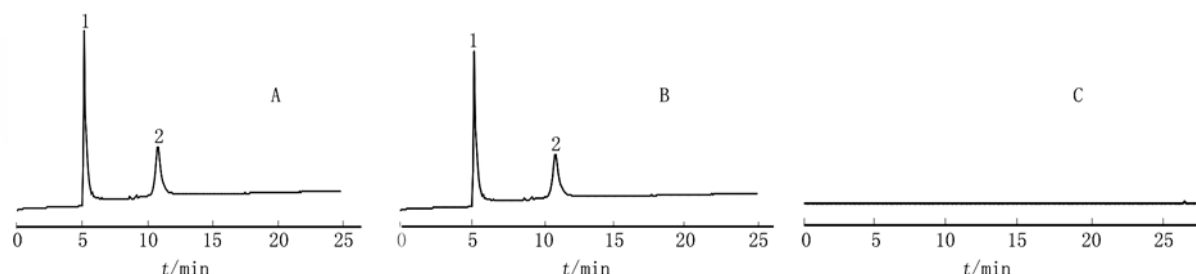


图1 高效毛细管电泳色谱图

A-对照品; B-黄强软膏样品; C-阴性对照品; 1-小檗碱; 2-泼尼松

Fig 1 The HPCE chromatograms

A-reference substance; B-sample of Huangqiang ointment; C-negative reference substance; 1-berberine; 2-prednisone

2.4 线性关系考察

以混合对照品储备液作为线性1号工作溶液, 从1号工作溶液中精密量取5 mL置10 mL量瓶中, 用甲醇溶解并稀释至刻度, 得2号工作溶液, 依此法对倍稀释得3, 4, 5号系列标准溶液, 按“2.1”项下电泳条件进样, 记录色谱图, 以峰面积A为纵坐标, 浓度C(μg·mL⁻¹)为横坐标进行线性回归, 回归方程及线性范围分别为: $A=2.18 \times 10^2 C - 10.7$

($r=0.999\ 9$), $A=3.88 \times 10^2 C + 36.3$ ($r=0.999\ 0$)。结果表明, 盐酸小檗碱、泼尼松分别在32.0~512 μg·mL⁻¹、16.0~256 μg·mL⁻¹内线性关系良好。

2.5 定量限试验

取线性标准溶液继续稀释, 进样并记录电泳图, 盐酸小檗碱的定量限为 32.0 μg·mL⁻¹, 泼尼松的定量限为 16.0 μg·mL⁻¹。

2.6 日内和日间精密度试验

取同一批(批号: 070411)样品 6 份, 按“2.2.2”项下方法配制供试品溶液, 分别进样, 记录峰面积, 测定日内精密度, 盐酸小檗碱和泼尼松含量的RSD 分别为 1.5%、1.7%; 每天取同一批(批号: 070411)样品 1 份, 连续 6 d, 按“2.2.2”项下方法配制供试品溶液, 分别进样, 记录峰面积, 测定其日间精密度, 盐酸小檗碱和泼尼松峰含量的 RSD 分别为 2.4%、2.5%。

2.7 重复性试验

取同一批(批号: 070411)样品 5 份, 按“2.2.2”项下方法处理, 进样测定, 记录电泳图, 盐酸小檗碱和泼尼松峰含量的 RSD 分别为 1.2%, 1.4%。

2.8 稳定性试验

取同一供试品溶液分别在0, 2, 4, 6, 8, 12, 24 h进样分析。盐酸小檗碱和泼尼松含量的RSD分别为1.4%、1.9%, 表明供试品溶液在24 h内稳定。

2.9 回收率试验

按处方比例, 精密称取盐酸小檗碱对照品、泼尼松对照品和空白基质适量, 用甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 配成标示量80%、100%、120% 3种浓度的溶液, 按“2.1”项下电泳条件进样分析, 计算回收率及RSD。结果见表1。

表1 盐酸小檗碱和泼尼松回收率测定结果(n=9)

Tab 1 Results of recovery test of berberine and prednisone (n=9)

组分	加入量 /μg	测得量 /μg	回收率/%	平均值 /%	RSD/%
盐酸小 檗碱	154	151	98.0	98.9	1.0
	154	152	98.7		
	154	154	99.9		
	128	128	100.2	99.0	1.1
	128	126	98.7		
	128	126	98.1		
	102	101	98.6	100.2	1.4
	102	103	100.4		
	102	104	101.4		
泼尼松	76.8	76.0	98.9	100.2	1.4
	76.8	78.1	101.6		
	76.8	76.7	99.9		
	64.0	63.0	98.4	99.6	1.5
	64.0	63.4	99.1		
	64.0	64.9	101.4		
	51.2	51.8	101.1	99.6	1.4
	51.2	50.9	99.3		
	51.2	50.3	98.3		

2.10 含量测定

取 3 批软膏样品, 按“2.2.2”项下方法处理, 按“2.1”项下电泳条件进样, 记录色谱图, 以外标法计算盐酸小檗碱和泼尼松的含量, 结果见表 2。

表 2 黄强软膏中盐酸小檗碱和泼尼松含量的测定结果(n=3)

Tab 2 Results of content determination of berberine and prednisone (n=3)

批号	盐酸小檗碱标示 百分含量/%	泼尼松标示百分 含量/%
070314	99.0±0.75	98.4±1.08
070411	98.4±1.79	98.8±1.23
070423	98.9±1.05	98.5±1.79

3 讨论

3.1 缓冲体系的选择

分别考察了盐酸小檗碱和泼尼松在磷酸盐、硼酸盐等缓冲液中对分离情况的影响, 结果表明当选用30 mmol·L⁻¹四硼酸钠缓冲液(pH 11.0)时, 盐酸小檗碱和泼尼松的分析时间短, 峰形尖锐并达到基线分离。

3.2 检测波长的选择

盐酸小檗碱在 263 nm 和 345 nm 两处有最大吸收, 泼尼松的最大吸收为 238 nm。在处方中, 盐酸小檗碱和泼尼松的含量比为 2:1, 且泼尼松吸收系数远小于盐酸小檗碱吸收系数, 为了提高泼尼松的检测灵敏度, 故选择泼尼松最大吸收 238 nm 处为检测波长。

3.3 电泳条件的优化

3.3.1 运行缓冲溶液pH值的影响 考察了四硼酸钠溶液分别在pH值为9, 10, 11, 12对分离的影响。结果表明, 随着pH值增大, 电渗流增大, 分析时间缩短。当pH值大于11时, 盐酸小檗碱与泼尼松分离度减小, 不利于分离测定, 故选用pH值为11作为运行缓冲溶液pH值。

3.3.2 缓冲溶液浓度的影响 考察了四硼酸钠溶液浓度分别为10, 20, 30, 40 mmol·L⁻¹时, 缓冲溶液浓度对分离的影响。结果表明, 随着缓冲液浓度升高, 电流增大, 分析时间缩短。当浓度大于30 mmol·L⁻¹, 电流迅速增加造成基线不稳, 兼顾两者关系, 故选用30 mmol·L⁻¹四硼酸钠溶液。

3.3.3 有机溶剂比例的影响 泼尼松为亲脂性物质, 盐酸小檗碱为极性物质, 两者溶解度相差较大, 随着有机溶剂比例增加(缓冲溶液含 10%、20%、

30%、40%、50%甲醇), 泼尼松溶解度增大, 但迁移时间随之增加。结果表明, 当甲醇比例为 30% 时, 盐酸小檗碱与泼尼松达到良好分离。

3.3.4 工作电压的影响 随着工作电压增大(10, 15, 20, 25 kV), 迁移时间缩短, 但过大电压产生的焦耳热效应, 导致柱效和分离度都降低。结果表明, 当电压为 15 kV 时, 分离度良好, 迁移时间适宜, 故选用 15 kV 作工作电压。

3.4 耐用性试验

电泳条件优化的结果表明, pH值在10~11内, 缓冲溶液中四硼酸钠浓度为20~30 mmol·L⁻¹内, 缓冲溶液中甲醇比例占25%~35%内, 工作电压为15 kV时进行测定, 仅仅是迁移时间有变化, 测定结果几乎不受影响, 表明该方法有良好的耐用性。

3.5 泼尼松能够被检测的可能原因

泼尼松是肾上腺皮质激素类物质, 在通常情况下不电离, 无法与电中性物质分离, 但在pH=11.0的条件下, 泼尼松的迁移时间明显大于电渗流的迁

移时间, 以硫脲为标记物, 电渗流的迁移时间为 7.89 min, 泼尼松的迁移时间为10.7 min, 泼尼松与电渗流有良好分离。其原因可能是由于在碱性条件下, 泼尼松的21位亚甲基H受C=O和-OH的影响, 容易失去形成阴离子, 使其迁移时间增加, 能与其它中性物质分离。

REFERENCES

- [1] XI Y, YU M Y, YANG M, et al. Quantitative determination of berberine in berberine hydrochloride ointment [J]. Acta Univ Tradit Med Sin Pharmacol Shanghai(上海中医药大学学报), 2004, 18 (4) : 49-50.
- [2] LI L, HE Y X, FU C M. Determination of berberine hydrochloride in quyou ointment by RP-HPLC [J]. Cent South Pharm(中南药学), 2004, 2 (6) : 350-351.
- [3] WANG Q R, WANG L F, GUO H. Determination of prednisone ointment by HPLC[J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 1997, 17 (2) : 119-120.

收稿日期: 2009-01-12