

复方樟脑提取物质量标准研究

徐烨¹, 俞静静¹, 梁凯伦¹, 陈素红², 吕圭源^{1*} (1.浙江中医药大学, 杭州 310053; 2.浙江工业大学, 杭州 310053)

摘要: 目的 建立复方樟脑提取物的质量标准。方法 采用 HPLC 对乳香中的 11-羧基- β -乙酰乳香酸进行定性鉴别; TLC 对没药进行定性鉴别; GC 同时测定复方樟脑提取物中的樟脑和冰片的含量。结果 乳香中 11-羧基- β -乙酰乳香酸的 HPLC 色谱峰清晰, 分离度好且阴性无干扰; 没药 TLC 斑点清晰, 专属性强; 樟脑和冰片分别在浓度 0.160~0.962 mg·mL⁻¹ ($r=0.999$) 和 0.246~1.474 mg·mL⁻¹ ($r=0.999$) 内线性关系良好, 平均回收率分别为 102.6% 和 103.9%。结论 所建标准中定性、定量方法操作简便、准确度高且重现性好, 可用于复方樟脑提取物的质量控制。

关键词: 复方樟脑提取物; 质量标准; 高效液相色谱法; 薄层色谱法; 气相色谱法

中图分类号: R284.1; R971.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2017)04-0496-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2017.04.004

Study on Quality Standard of Compound Camphor Extract

XU Ye¹, YU Jingjing¹, LIANG Kailun¹, CHEN Suhong², LYU Guiyuan^{1*} (1.Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China; 2.Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310053, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish the quality standard for compound camphor extract. **METHODS** The acetyl-11-keto- β -boswellic acid in frankincense was identified by HPLC. The myrrh was identified by TLC. The content of camphor and synthetic borneol in compound camphor extract were determined by GC. **RESULTS** The HPLC chromatogram peaks of acetyl-11-keto- β -boswellic acid were clear and well-separated. The clear TLC spots showed good specificity. Camphor and synthetic borneol showed good linear relationships in the range of 0.160–0.962 mg·mL⁻¹ ($r=0.999$) and 0.246–1.474 mg·mL⁻¹ ($r=0.999$), respectively, with the average recoveries of 102.6% and 103.9%. **CONCLUSION** The methods are simple, accurate, reproducible and can be used for quality control of compound camphor extract.

KEY WORDS: compound camphor extract; quality standard; HPLC; TLC; GC

复方樟脑提取物由樟脑、冰片、乳香和没药等中药提取而成, 具有活血散瘀、消肿止痛的功效。现代医学研究表明^[1-3], 樟脑、冰片、乳香和没药外用具有消炎、镇痛、抗菌等药理作用。这些中药在临床制剂中具有广泛应用, 如樟脑乳膏、复方樟脑酊、十一味伤痛膏、冻疮膏和痹痛消巴布膏等^[4-6]。复方樟脑提取物作为中间体, 可作为原料药在相关制剂中进行使用, 有较大的市场前景, 因此需建立较为全面的质量标准, 以为其代替原药在相关制剂中的应用奠定基础。根据前期查阅文献与实验探索, 本实验采用 HPLC 对乳香进行鉴别; 采用 TLC 对没药进行鉴别; 采用 GC 测定复方樟脑提取物中樟脑和冰片含量。

1 仪器、试剂和试药

KQ-500DE 数控超声清洗器(昆山市超声仪器有限公司); Agilent 6890N 气相色谱仪、Agilent

1200 高效液相色谱仪均购自美国 Agilent 公司; 薄层半自动点样仪及扫描仪(CAMAG); FA2204B 分析天平(上海精科天美科学仪器有限公司); AG 135 分析天平(瑞士梅特勒托利多仪器中国有限公司); TC-15 恒温电热套(海宁华星仪器厂)。

冰片(中国药品生物制品检定所, 批号: 110743-200905, 供含量测定用, 纯度: 98%); 樟脑(批号: 110747-201409, 供含量测定用, 纯度: 98.7%); 11-羧基- β -乙酰乳香酸(批号: 111760-201502, 供含量测定用, 纯度 99.3%); 乳香对照药材(批号: 120979-201305)、胶质没药对照药材(批号: 121250-201605)均购自中国食品药品检定研究院; 所用试剂除乙腈为色谱纯, 其余均为分析纯。

樟脑、冰片、乳香和没药等中药饮片均购自北京人卫中药饮片厂, 经浙江中医药大学药学院中药鉴定教研室张如松教授鉴定确认, 符合中国

基金项目: “重大新药创制”国家科技重大专项(2011ZX09101-002-07); 国家自然科学基金资助项目(81274123)

作者简介: 徐烨, 女, 硕士生 Tel: 17826864973 E-mail: 1263493986@qq.com *通信作者: 吕圭源, 男, 教授, 博士 Tel: (0571)86613601 E-mail: lv.gy@263.net

药典 2015 年版(一部)项下规定。复方樟脑提取物(批号: 20151118、20151215 和 20160114)由浙江中医药大学药物研究所自制, 其制备方法是将樟脑、冰片低温粉碎, 乳香、没药加滑石粉低温粉碎后与其他药材提取物混匀即得。

2 乳香的 HPLC 鉴别

2.1 色谱条件

色谱柱: Welch Materials XB C₁₈(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈(A)和 1%磷酸溶液(B), 梯度洗脱: 0~20 min, 75%A, 21~50 min, 82%A, 51~70 min, 95%A。流速: 1.0 mL·min⁻¹; 检测波长: 250 nm; 柱温: 30 °C; 理论板数按 11-羰基-β-乙酰乳香酸峰计算应≥3 000。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 精密称取 11-羰基-β-乙酰乳香酸对照品 6.05 mg, 置于 25 mL 量瓶, 用甲醇溶解, 并定容至刻度, 密塞, 摇匀即得。

2.2.2 样品溶液的制备 取复方樟脑提取物约 5 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 20 mL, 密塞称定质量, 超声 30 min, 放冷再称定质量, 用甲醇补足减失的质量, 摇匀滤过, 取续滤液即得。

2.2.3 对照药材溶液的制备 精密称取乳香对照药材 0.2 g, 置具塞锥形瓶中, 然后按“2.2.2”项下方法制成对照药材溶液。

2.2.4 阴性样品溶液的制备 按处方比例称取除乳香外的其他药材, 按“2.2.2”项下方法制成阴性样品溶液。

2.3 鉴别试验

分别吸取上述各溶液进样分析, 记录色谱图, 见图 1。结果表明, 样品色谱中在对照品相应位置有色谱峰, 阴性对照无干扰。

3 没药的 TLC 鉴别

3.1 溶液的制备

3.1.1 样品溶液的制备 取复方樟脑提取物约 15 g, 照挥发油测定法^[7](通则 2204 乙法), 加环己烷 2 mL, 缓缓加热至沸, 并保持微沸约 2.5 h, 放置后, 环己烷定容至 10 mL 作为样品溶液。

3.1.2 对照药材溶液的制备 取胶质没药对照药材约 0.5 g, 按“3.1.1”项下方法制成对照药材溶液。

3.1.3 阴性样品溶液的制备 按处方比例称取除没药外的其他药材, 按“3.1.1”项下方法制成阴性样品溶液。

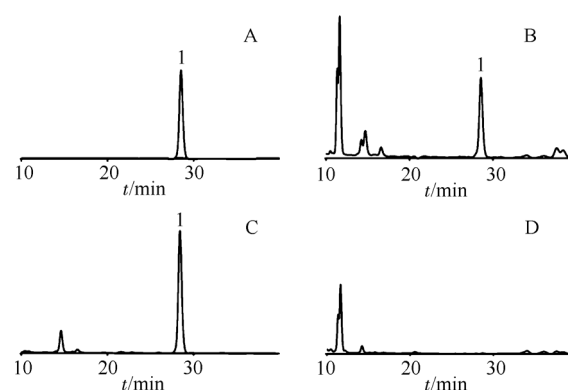


图 1 高效液相色谱图

A—对照品溶液; B—样品溶液; C—对照药材溶液; D—阴性样品溶液; 1—11-羰基-β-乙酰乳香酸。

Fig.1 HPLC chromatograms

A—standard solution; B—sample solution; C—reference medical materials solution; D—negative solution; 1—acetyl-11-keto-β-boswellic Acid.

3.2 鉴别试验

吸取样品、对照药材和阴性样品溶液各 2 μL, 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 以环己烷-乙醚(4:1)为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 立即喷以 10% 硫酸乙醇溶液, 在 105 °C 加热至斑点显色清晰, 置紫外光灯(365 nm)下检视, 结果见图 2, 供试品色谱与对照药材色谱在相应的位置上显相同颜色的荧光斑点, 阴性样品色谱无干扰。

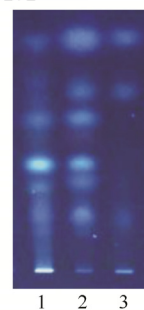


图 2 薄层色谱图

1—没药对照药材溶液; 2—样品溶液; 3—阴性样品溶液。

Fig.2 TLC chromatograms

1—reference medical materials solution of myrrh; 2—sample solution; 3—negative solution.

4 樟脑、冰片的含量测定

4.1 色谱条件

毛细管柱: HP-INNOWAX-19091N-113(30 m×0.32 mm, 0.25 μm); 柱温: 初始温度 110 °C 维持 15 min, 再以 10 °C·min⁻¹ 的速度升温至 220 °C, 维持 12 min; 进样口温度: 210 °C; FID 检测器温度: 230 °C; 进样量: 1 μL; 分流比: 10:1; 氢气流速: 45 mL·min⁻¹; 空气流速: 350 mL·min⁻¹;

尾吹: 20 mL·min⁻¹, 理论板数按樟脑峰计算应≥10 000。在此色谱条件下樟脑、冰片与相邻色谱峰均能与基线分离, 见图 3。

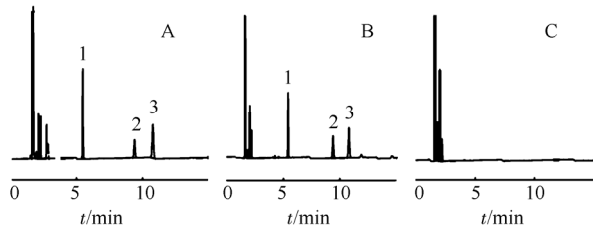


图3 气相色谱图

A-混合对照品溶液; B-样品溶液; C-阴性样品溶液; 1-樟脑; 2-异龙脑; 3-龙脑。

Fig. 3 GC chromatograms

A-standard solution; B-sample solution; C-negative; 1-camphor; 2-isoborneol; 3-borneol.

4.2 溶液的制备

4.2.1 对照品溶液的制备 精密称取樟脑对照品 32.50 mg、冰片对照品 50.12 mg, 置 10 mL 量瓶中, 用乙酸乙酯溶解并定容至刻度, 密塞, 摇匀, 得到樟脑对照品储备液。

4.2.2 样品溶液的制备 取复方樟脑提取物约 0.8 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入乙酸乙酯 10 mL, 密塞, 称定质量, 超声处理 30 min, 放冷, 再称定质量, 用乙酸乙酯补足减失的质量, 摇匀过滤, 取续滤液, 即得。

4.2.3 阴性样品溶液的制备 按处方比例称取除樟脑、冰片外的其他药材, 按“4.2.2”项下方法制成阴性样品溶液。

4.3 线性关系考察

分别精密吸取对照品储备液 2.0, 2.5, 3.0 mL, 置 10 mL 量瓶中, 用乙酸乙酯稀释并定容至刻度, 密塞, 摇匀得 4, 5, 6 号线性溶液; 分别精密吸取 5 号线性溶液 2.0, 4.0 mL, 置 10 mL 量瓶中, 用乙酸乙酯稀释并定容至刻度, 密塞, 摇匀得 1, 2 号线性溶液; 精密吸取 6 号线性溶液 5.0 mL, 置 10 mL 量瓶中, 用乙酸乙酯稀释并定容至刻度, 密塞, 摇匀得 3 号线性溶液。各取 1 μL, 按“4.1”项下方法依次进样。以对照品浓度(X , mg·mL⁻¹)为横坐标, 峰面积(Y)为纵坐标, 绘制标准曲线, 樟脑和冰片的回归方程分别为: $Y=1\ 716X-11.940$, $r=0.999$; $Y=1\ 567X+5.973$, $r=0.999$ 。结果表明樟脑和冰片分别在浓度 0.160~0.962 mg·mL⁻¹、0.246~1.474 mg·mL⁻¹ 内与峰面积呈良好的线性关系。

4.4 仪器精密度试验

按“4.1”项下方法, 取上述 4 号线性对照品溶液连续进样 6 次, 测定峰面积。结果樟脑、冰片峰面积的 RSD 分别为 0.39%, 1.77%, 表明仪器精密度良好。

4.5 稳定性试验

按“4.1”项下方法, 取样品溶液, 分别于 0, 2, 4, 6, 9, 11, 15, 20, 24 h 进样, 测定峰面积, 计算 RSD。结果樟脑、冰片峰面积的 RSD 分别为 1.26%, 1.30%, 表明樟脑、冰片在 24 h 内稳定性良好。

4.6 重复性试验

按“4.2.2”项下方法制备样品溶液, 平行处理 6 份, 按“4.1”项下方法测定峰面积, 代入标准曲线计算各组份含量。结果樟脑、冰片含量的 RSD 分别为 1.68%, 2.89%, 表明该方法的重复性良好。

4.7 加样回收率试验

取已知含量的样品 6 份, 精密称定, 分别精确加入混合对照品溶液 1 mL(樟脑对照品浓度为 2.981 mg·mL⁻¹, 冰片对照品浓度为 4.949 mg·mL⁻¹), 按“4.2.2”方法制备, 按“4.1”项下方法测定峰面积并计算含量, 结果见表 1。

表 1 加样回收率试验结果($n=6$)

Tab.1 Results of recovery experiments($n=6$)

成分	原有量/ mg	加入量/ mg	测得量/ mg	回收率/ %	平均回 收率/%	RSD/ %
樟脑	3.429	2.981	6.505	103.2	102.6	1.34
	3.386	2.981	6.467	103.4		
	3.369	2.981	6.357	100.3		
	3.262	2.981	6.321	102.6		
	3.871	2.981	6.978	104.2		
	3.742	2.981	6.765	102.0		
冰片	4.463	4.949	9.624	104.3	103.9	0.83
	4.480	4.949	9.575	102.9		
	4.497	4.949	9.633	103.8		
	4.488	4.949	9.670	104.7		
	4.409	4.949	9.589	104.7		
	4.940	4.949	10.02	102.7		

4.8 含量测定

取不同批号样品, 按“4.2.2”项下方法制备样品溶液, 测定提取物中樟脑与冰片含量, 结果见表 2。

表 2 样品测定结果

Tab. 2 Result of sample determination

批 号	樟脑/mg·g ⁻¹	冰片/mg·g ⁻¹
20151118	5.849	8.676
20151215	5.737	8.498
20160114	5.948	8.945

5 讨论

5.1 质量评价指标的确定

复方樟脑提取物由樟脑、冰片、乳香和没药等中药提取而成,具有活血散瘀、消肿止痛的功效,其中樟脑、冰片、乳香和没药起着主要的药理作用。临床上相关制剂有十一味伤痛膏、冻疮膏等,在对这些制剂进行质量评价时,通常采用对乳香和没药进行鉴别、对樟脑和冰片进行含量测定的方法。

有文献^[8-9]对乳香中的 11-羧基- β -乳香酸、11-羧基- β -乙酰乳香酸等多个乳香酸类成分进行鉴别和含量分析,但在本复方中乳香的组分比例较小,因此本实验采用 HPLC 对乳香进行鉴别,以保留时间适中的 11-羧基- β -乙酰乳香酸作为指标性成分。没药分为胶质没药和天然没药,本复方中的没药是胶质没药,目前对含胶质没药的制剂或提取物的鉴别研究较少。胶质没药的挥发油组分较多且各组分相对含量较低^[10],因此本实验参考中国药典 2015 年版^[11]中对胶质没药药材鉴别方法,采用 TLC 法对提取物中的胶质没药进行鉴别。

本复方中的冰片是合成龙脑,中国药典 2015 年版规定,合成龙脑含樟脑不得超过 0.5%,含量测定项下规定含龙脑不得低于 55.0%;有文献^[12-13]报道,采用 GC 测定樟脑、冰片(合成龙脑)含量时,以冰片中的主要成分,即异龙脑和龙脑的峰面积之和作为冰片的峰面积计算,并且忽略了冰片中可能含有的樟脑成分对樟脑含量测定的影响,故本实验采用 GC 同时对樟脑和冰片进行含量测定,以异龙脑和龙脑这 2 个峰的面积之和作为冰片的峰面积进行计算。

5.2 检测波长的选择

采用 HPLC 对乳香进行鉴别时设定了 2 个检测波长,分别是 210 和 250 nm,实验中发现 11-羧基- β -乙酰乳香酸在 250 nm 处有最大吸收,且与检测波长为 210 nm 的色谱图相比,在 250 nm 检测时指标峰分离度好且无干扰,因此选择 250 nm

作为检测波长。

5.3 提取方法的选择

在对樟脑、冰片进行含量测定的文献中,采用了 2 种提取方法,分别是挥发油提取法和超声提取法。这 2 种提取方法都有较好的重现性和准确度,但考虑到挥发油提取法操作繁琐、费时,因此选取操作较为方便简单的超声提取法。

本实验所建标准中对乳香、没药定性分析方法简单易操作、专属性较强;对樟脑、冰片的定量分析方法简便快速、结果准确度高且重现性好,可用于复方樟脑提取物的质量控制,为相关提取物的质量标准研究提供了研究基础,也为其代替原药在相关制剂中的应用奠定了基础。

REFERENCES

- [1] 熊颖,吴雪茹,涂兴明,等.樟脑的药学研究进展[J].检验医学与临床,2009,6(12):999-1001.
- [2] 黄卫东,吕武清.冰片的研究进展[J].中国药业,2008,17(4):64-66.
- [3] CHANG Y P, HAN Y M, ZHANG J Y. Research advance on chemical constituents and pharmacological action of *Boswellia carterii* [J]. *Drugs Clin*(现代药物与临床), 2012, 27(1): 52-59.
- [4] 谢若男,杨满琴,萧伟,等.气相色谱法测定十一味伤痛膏中冰片和樟脑的含量[J].中医药临床杂志,2012,24(8):777-779.
- [5] PAN Z H, XIE X H. Determination of camphor in Donchang ointment by GC [J]. *Res Pract Chin Med*(现代中药研究与实践), 2008, 22(4): 45-47.
- [6] ZHAN Q, CHEN H M, YU Z M, et al. Optimization for extraction technology of Bitongxiao cataplasm by multicriteria comprehensive assessment [J]. *Chin J Mod Appl Pharm*(中国现代应用药学), 2016, 33(7): 891-895.
- [7] 中国药典. 四部[S]. 2015: 203-204.
- [8] 王赵,孙磊,康帅,等.乳香基原研究(II).性状、显微、TLC和 HPLC 鉴别技术分析三种乳香[J].中药材,2014,37(6):981-984.
- [9] 潘英妮,张文杰,王群,等.冠心苏合丸中乳香的薄层色谱鉴别和 11-羧基- β -乙酰乳香酸的含量测定[J].时珍国医国药,2015,26(5):1025-1027.
- [10] 田金改,石上梅.进口天然没药与胶质没药挥发油成分的研究[J].中国中药杂志,1996,21(4):235-237,256.
- [11] 中国药典.一部[S]. 2015: 186-187.
- [12] ZHU J, JIA X B, ZHENG Z Y, et al. Determination of camphor, borneolum and menthol syntheticum in Touguling adhesive plasters by GC [J]. *Chin J Hosp Pharm*(中国医院药学杂志), 2012, 32(11): 831-833.
- [13] ZHENG W Q. Determination of camphor, synthetic borneol, menthol in HanBi Ointment by GC [J]. *Strait Pharm J*(海峡药学), 2014, 26(5): 34-37.

收稿日期: 2016-09-26

(本文责编: 曹粤锋)