文章编号:1008-9926(2009)01-0052-04 中图分类号:R917 文献标识码:A

小败毒膏的质量标准研究①

唐小京②,曹 红③,马 俊④,张 霓⑤

(②第二军医大学 上海 200433;③总后勤部卫生部药品仪器检验所 北京 100071;④河北大学药学院 河北 保定 071002;⑤沈阳药科大学 辽宁 沈阳 110016)

摘 要:**目的** 建立小败毒膏的质量标准。**方法** 采用薄层色谱法对小败毒膏中的大黄、黄柏、金银花、蒲公英、赤芍和陈皮进行定性鉴别;采用高效液相色谱法测定该制剂中大黄酸、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚的含量,色谱柱为 CAPCELL PAK C_{18} (250mm ×4.6mm, 5μm)分析柱;流动相:甲醇-0.1%磷酸溶液 (70∶30);流速:1.0mL/min;检测波长:254nm;柱温:30℃。**结果** 薄层色谱法可鉴别出该制剂中的大黄、黄柏、金银花、蒲公英、陈皮和赤芍。大黄酸、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚分别在 0.076 4~0.764 0、0.070 8~0.708 0、0.073 8~0.738 0、0.041 4~0.414 0μg范围内有良好的线性关系,r分别为 0.999 8、1.000 0、0.999 7、0.999 9,平均回收率分别为 100.87% (*RSD* 为 1.61%),100.70% (*RSD* 为 0.93%),99.82% (*RSD* 为 1.62%),99.91% (*RSD* 为 1.60%),n=6。**结论** 该方法准确、灵敏、重复性好,能有效地控制小败毒膏的质量。

关键词:小败毒膏; TLC; HPLC;大黄酸;大黄素;大黄酚;大黄素甲醚

Study On Quality Standard of Xiaobaidu Gao①

TANG Xiao-Jing②, CAO Hong③, MA Jun④, ZHANG Ni⑤

(② The Second Military Medical University, Shanghai 200433 China)

(③ Institute for Drug and Instrument Control, Health Dept of GLD of the PLA, Beijing 100071 China)

(④ College of Pharmaceutical Sciences, Hebei Univercity, Baoding 071002, Hebei China)

(⑤ Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, Liaoning China)

ABSTRACT: Aim To establish the quality standard for Xiaobaidu Gao. **Methods** Radix Et Rhizoma Rhei, Cortex Phellodendri Chinensis, Flos Lonicerae Japonicae, Herba Taraxaci, Radix Paeoniae Rubra, Pericarpium Citri Reticulatae were identified by TLC. The contents of Rhein, Emodin, Chrysophanol and Rheochrysidn were determined by HPLC. SHISEIDO CAPCELL PAK C_{18} (250mm ×4.6mm, 5μm) was used as the chromatographic column and methanol-0.1% phosphoric acid solution (70∶30) as the mobile phase. The detection wavelength was 254nm; the flow rate was 1.0mL/min, and the column temperature was 30℃. **Results** Radix Et Rhizoma Rhei, Cortex Phellodendri Chinensis, Flos Lonicerae Japonicae, Herba Taraxaci, Radix Paeoniae Rubra, Pericarpium Citri Reticulatae could be identified by TLC. Rhein, Emodin, Chrysophanol and Rheochrysidn showed a good linear relationship in a range of 0.076 4~0.764 0、0.070 8~0.708 0、0.073 8~0.738 0 and 0.041 4~0.414 0μg, r=0.999 8, 1.000 0, 0.999 7 and 0.999 9, The average recovery was 100.87% (*RSD* =1.61%), 100.70% (*RSD* =0.93%), 99.82% (*RSD* =1.62%), 99.91% (*RSD* =1.60%), n=6. **Conclusion** The method is simple with good reproducibility and can be used as the control of Xiaobaidu Gao.

KEY WORDS: xiaobaidu Gao; TLC; HPLC; rhein; emodin; chrysophanol; rheochrysidn

小败毒膏是由蒲公英、金银花、天花粉、黄柏、大黄、白芷、陈皮、乳香 (麸炒)、当归、赤芍、木鳖子、甘草等 12味中药组成的煎膏剂,具有行气化滞,润肠通便之功效,对大便干燥,肠胃实热,积滞不化有良好的治疗效果。该复方制剂为国家药典委员会“国家药品标准提高行动计划”中要求的中成药,其原标准收载于《中华人民共和国卫生部药品标准》(中药成方制剂)第八册,原有质量标准中仅有性状、鉴别 (薄层色谱鉴别大黄、黄柏)和检查项,不能全面的控制药品的质量。为进一步控制药品的内在质

① 基金项目:国家药典委员会标准提高行动

② 作者简介:唐小京 (1984-),女,江西赣州人,在读硕士。研究方向:中药药物分析。E-mail: tangxiaojing@21cn.com

通讯作者:曹 红, Tel: (010) 66949080; E-mail: caohong66699@sina.com

© 1994-2009 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

量,保证临床用药安全有效,本文在原有质量标准基础上,增加了金银花、蒲公英、赤芍和陈皮的薄层鉴别;并且用 HPLC法测定了小败毒膏中大黄酸、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚的含量,结果满意,全面提高了该药品的质量控制方法。

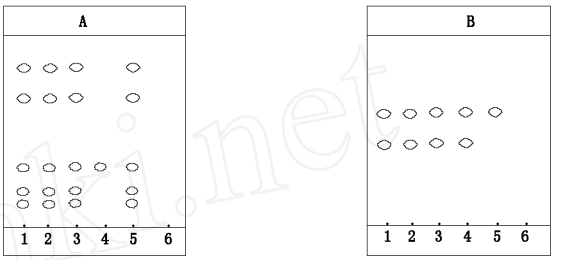
1 仪器与试药

SHIMADZU-20A HPLC; VWD检测器 (日本岛津制作所)。小败毒膏 (规格: 50g/瓶,北京同仁堂天然药物有限公司,批号: 20060525, 20060526, 20060527)。大黄酸对照品、大黄素对照品、大黄酚对照品和大黄素甲醚对照品;大黄对照药材、黄柏对照药材、金银花对照药材、蒲公英对照药材、陈皮对照药材 (均为中国药品生物制品检定所);甲醇为色谱纯,水为超纯水,其它试剂均为分析纯。

2 薄层色谱鉴别

2.1 大黄 取本品 20g,加水 30mL溶解,离心,取上清,移置分液漏斗中,加乙醚 30mL振摇提取,分取乙醚液,水液留备鉴别 2.3项用,乙醚液蒸干,残渣加甲醇 1mL使溶解,作为供试品溶液。另取大黄对照药材 0.2g,加甲醇 20mL超声处理 20min,滤过,滤液蒸干,残渣加 1mL甲醇使溶解,作为对照药材溶液。再取大黄素对照品,制成 1mg·mL^{-1}的溶液,作为对照品溶液。按处方量制备缺大黄的阴性对照样品,并按供试品溶液处理方法制成阴性对照溶液。照薄层色谱法[1]试验,吸取供试品溶液 10μL、对照药材溶液和对照品溶液各 4μL、阴性对照溶液 10μL,分别点于同一硅胶 G薄层板上,以正己烷-石油醚 (60～90℃)-甲酸乙酯-甲醇-水 (3∶1∶1.5∶0.1∶0.5)的上层溶液为展开剂,展开,取出,晾干,置氨蒸气中熏 10min。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。阴性对照无干扰。见图 1。

2.2 黄柏 取本品 15g,加乙醇 5mL搅拌,取上清液作为供试品溶液。另取黄柏对照药材 50mg,加甲醇 5mL,加热回流 30min,滤过,滤液作为对照药材溶液。再取盐酸小檗碱对照品,加甲醇制成含 0.5 mg·mL^{-1}溶液,作为对照品溶液。按处方量制备缺黄柏的阴性对照样品,并按供试品溶液处理方法制成阴性对照溶液。照薄层色谱法[2]试验,吸取供试品溶液 10μL、对照药材溶液和对照品溶液各 2μL,阴性对照溶液 10μL,分别点于同一硅胶 G薄层板上,以正丁醇-冰醋酸-水 (7∶1∶2)为展开剂,展开,取出,晾干,置紫外光灯 (365nm)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,阴性对照无干扰。见图 1。

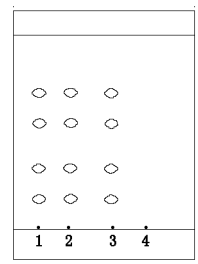


A大黄 1,2,3样品 4大黄素对照品 5对照药材 6阴性对照
B黄柏 1,2,3样品 4对照药材 5盐酸小檗碱 6阴性对照

图 1 大黄与黄柏薄层色谱图

Fig 1 TLC chromatogram of Radix Et Rhizoma Rhei and Cortex Phellodendri Chinensis

2.3 金银花和蒲公英 取鉴别 2.1项下的水液,挥至无醚味,加乙酸乙酯萃取 3次 (40mL, 30mL, 30mL),合并乙酸乙酯萃取液,蒸干,残渣加热水 20mL使溶解,冷却,过 D101型大孔吸附树脂柱 (1.5cm, 12cm),用水 50mL冲洗,弃去水液,再用 80%乙醇溶液 80mL冲洗,收集 80%的乙醇洗脱液,蒸干,残渣加甲醇 1mL使溶解,作为供试品溶液。另取金银花对照药材,加甲醇 5mL,浸泡 12h,滤过,取滤液作为金银花对照药材溶液,再取蒲公英对照药材粉末 1g,加甲醇 20mL,加热回流 30min,滤过,滤液蒸干,残渣加甲醇 1mL使溶解,作为蒲公英对照药材溶液。按处方量制备缺金银花和蒲公英的阴性对照样品,并按供试品溶液处理过程制成阴性对照溶液。照薄层色谱法[1]试验,吸取上述供试品溶液 15μL、对照药材溶液各 5μL、阴性对照 15μL,分别点于同一聚酰胺薄膜上,以醋酸为展开剂,展开,取出,晾干,置紫外光灯 (365nm)下检视,供试品色谱中,在与对照品色谱相应的位置上,显相同颜色的荧光斑点,阴性对照无干扰。见图 2。



1样品 2金银花 3蒲公英 4阴性对照

图 2 金银花和蒲公英薄层色谱图

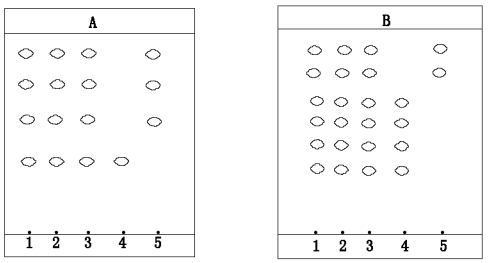
Fig 2 TLC chromatogram of Flos Lonicerae Japonicae and Herba Taraxaci

2.4 赤芍 取本品 15g,加水 30mL溶解,离心,取

© 1994-2009 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

上清,移置分液漏斗中,用水饱和正丁醇萃取 3次,每次 30mL,合并正丁醇液,用正丁醇饱和的水洗两次,每次 10mL,正丁醇液水浴蒸干,残渣加甲醇 1mL使溶解,过中性氧化铝柱(5g,内径 1.5cm,200～300目),甲醇 50mL洗脱,收集甲醇洗脱液,蒸干,残渣加甲醇 1mL使溶解,作为供试品溶液。另取芍药苷对照品,加乙醇制成含 2mg·mL^{-1}的对照品溶液。按处方量制备缺赤芍的阴性对照样品,并按供试品溶液处理过程制成阴性对照溶液。照薄层色谱法[1]试验,吸取上述供试品溶液 10μL、对照品溶液 5μL、阴性对照溶液 10μL,分别点于同一硅胶 G薄层板上,以三氯甲烷-乙酸乙酯-甲醇-甲酸(40∶5∶10∶0.2)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以 5%香草醛硫酸溶液,在 105℃下加热至斑点显色清晰。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。见图 3。

2.5 陈皮 取本品 20g,加水 30mL溶解,用水饱和的正丁醇分 2次萃取(40mL×2),合并正丁醇液,正丁醇液用 5%的 NaOH溶液洗 2次,每次 10mL,弃去水液,正丁醇液水浴蒸干,残渣加 1mL甲醇使溶解,作为供试品溶液。另取陈皮对照药材 0.3g,加甲醇 10mL,加热回流 20min,滤过,滤液蒸干,残渣加甲醇 1mL使溶解,作为对照品溶液。按处方量制备缺陈皮的阴性对照样品,并按供试品溶液处理过程制成阴性对照溶液。薄层色谱法[1]试验,吸取上述供试品、对照品溶液、阴性对照溶液各 10μL,分别点于同一硅胶 G薄层板上,用正己烷-乙酸乙酯(2∶3)为展开剂,展开,取出,晾干,置紫外光灯下(365nm)检视,阴性对照无干扰。见图 3。



A赤芍 1,2,3样品 4芍药苷对照品 5阴性对照
B陈皮 1,2,3样品 4对照药材 5阴性对照

图 3 赤芍及陈皮薄层色谱图

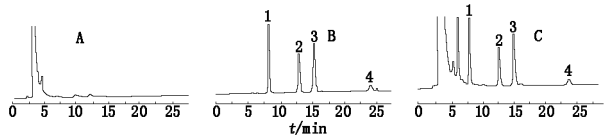
Fig 3 TLC chromatogram of Radix Paeoniae Rubra and Pericarpium Citri Reticulatae

3 含量测定

3.1 色谱条件 色谱柱:资生堂 CAPCELL PAK C_{18}(250mm×4.6mm,5μm)色谱柱;流动相:甲醇-0.1%磷酸溶液(70∶30);流速:1.0mL/min;检测波长:254nm;柱温:30℃;进样量 20μL。理论板数以大黄素峰计算不得少于 3 000。

3.2 溶液的制备 (1)对照品溶液 精密称取大黄酸、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚对照品适量,加甲醇溶解于同一容量瓶中,配制成浓度为 38.2、35.4、36.2、20.7μg·mL^{-1}的大黄酸、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚混合对照品储备液。精密量取 3mL对照品储备液加甲醇稀释至 10mL量瓶中,作为对照品溶液。(2)供试品溶液 精密称取本品 1g,置具塞锥形瓶中,加入 1mol·L^{-1}盐酸 30mL使溶解,再加三氯甲烷 30mL,水浴加热回流 2h,放冷,置分液漏斗中,用少量三氯甲烷洗涤锥形瓶,洗液并入分液漏斗中,分取三氯甲烷层,酸液再用三氯甲烷提取 3次,每次 10mL,合并三氯甲烷液,回收溶剂至干,残渣加 2mL乙酸乙酯溶解,转移至 10mL量瓶中,加甲醇定容到刻度,过 0.45μm微孔滤膜,取续滤液,即得。(3)阴性对照溶液 按处方量比例称取除大黄以外的其余药材,按制备工艺制成缺大黄的阴性样品,按(2)项下方法制得阴性对照溶液,

3.3 专属性试验 在上述色谱条件下,精密吸取对照品溶液,供试品溶液及阴性对照溶液各 20μL进样,观察样品峰的保留时间处是否有杂质峰,结果表明被测组分色谱峰处阴性对照溶液无干扰,见图 4。



A阴性对照 B对照品 C样品
1大黄酸 2大黄素 3大黄酚 4大黄素甲醚

图 4 HPLC色谱图

Fig 4 HPLC chromatogram of sample

3.4 线性关系的考察 取对照品储备液,按不同比例稀释,得大黄酸浓度分别为 3.82、4.58、7.64、11.46、22.96、38.20μg·mL^{-1},大黄素浓度分别为 3.54、4.25、7.08、10.62、21.24、35.4μg·mL^{-1},大黄酚浓度分别为 3.69、4.43、7.38、11.07、22.14、36.2μg·mL^{-1},大黄素甲醚浓度分别为 2.07、2.48、4.14、6.21、12.42、20.70μg·mL^{-1}的混合对照品溶液。分别取上述溶液各 20μL进样分析,以进样量(μg)为横坐标(X),峰面积为纵坐标(Y),绘制标准曲线,计算回归得方程:

$Y = 5.17 \times 10^6 X - 3.53 \times 10^2$, $r = 0.999\ 8$

$Y = 3.95 \times 10^6 X - 1.07 \times 10^2$, $r = 1.000\ 0$

$Y = 5.16 \times 10^6 X + 4.03 \times 10^4$, $r = 0.999\ 7$

© 1994-2009 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

$Y = 2.50 \times 10^{5} X - 4.02 \times 10^{2}$, $r = 0.9999$

结果表明大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚分别在 0.0764～0.7640、0.0708～0.7080、0.0738～0.7380、0.0414～0.4140μg范围内呈良好的线性关系。

3.5 重复性试验 取同一批号样品 1g(批号:20060525),精密称定,平行 6份,按 3.2(2)方法制备成供试品溶液,在上述色谱条件下分别进样 20μL,结果大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚的平均含量分别为 84.21、88.99、122.3、45.21μg·g^{-1},*RSD*分别为 1.23%、1.97%、1.88%、2.12%。

3.6 稳定性试验 取重复性试验中的一份供试品溶液,于 0、1、2、4、6、8、10、12h测定大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚的峰面积,结果 12h内峰面积基本不变,*RSD* 分别为 0.18%、0.13%、0.21%、0.30%,供试液在 12h内稳定。

3.7 加样回收率试验 取已知含量的小败毒膏样品 0.5g(批号:20060525),精密称取 6份,按 100%的比例分别加入对照品适量,按 3.2项下制备供试品溶液,按 3.1项下进行测定,计算回收率,结果见表 1。

3.8 样品测定 按 3.2方法制备对照品溶液和供试品溶液,分别精密吸取各 20μL,按上述色谱条件测定,3批样品测定结果见表 2,根据 3批样品测定结果,确定本品以每 1g含大黄酸、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚的总量计,不得少于 220μg。

4 讨论

4.1 通过实验,确定了小败毒膏中大黄、金银花、蒲公英、黄柏、陈皮、赤芍 的薄层色谱鉴别方法,阴性对照表明其他成分对本法无干扰,说明该方法专属性较强,操作简便,重复性好,可作为该药品的定性控制指标。

4.2 在确定色谱条件过程中,考察了不同比例的甲醇-0.1%磷酸流动相,发现当甲醇的比例为 55%时,芦荟大黄素峰可以得到基线分离,但是此时 5种蒽醌类成分的峰型均变钝,且出峰时间拖得很长,故本文采用测定大黄药材中 4个组分:大黄酸、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚的总量来控制药品的含量。

4.3 在水解时酸的用量方面,考察了加入 0.5、1、2mol·L^{-1}的盐酸时提取效率的差异,发现盐酸加的过多或过少都会导致蒽醌类成分提取不够完全,最终确定为 1mol·L^{-1}盐酸为水解的最适浓度。在提取时间方面,考察了回流 1、2、3h的差异,确定回流时间 2h最为恰当,蒽醌类成分含量最高。

表 1 大黄酸加样回收率测定结果 (n =6)

Tab 1 The recovery of Rhein (n =6)

名称	称样量(g)	样品量(μg)	加入量(μg)	测得量(μg)	回收率(%)	均(%)	*RSD*(%)
大黄酸	0.5218	43.94	45.01	88.67	99.38		
	0.5386	45.36	45.01	90.32	99.90		
	0.5185	43.66	45.01	89.43	101.7	100.9	1.61
	0.5072	42.71	45.01	87.56	99.64		
	0.5293	44.57	45.01	91.23	103.7		
	0.5354	45.09	45.01	90.54	101.0		
大黄素	0.5218	46.43	52.05	99.15	101.3		
	0.5386	47.93	52.05	100.68	101.4		
	0.5185	46.14	52.05	98.02	99.67	100.7	0.93
	0.5072	45.14	52.05	97.74	101.1		
	0.5293	47.10	52.05	99.93	101.5		
	0.5354	47.64	52.05	99.36	99.35		
大黄酚	0.5218	63.84	71.86	134.7	98.59		
	0.5386	65.90	71.86	138.1	100.5		
	0.5158	63.44	71.86	133.4	97.38	99.82	1.62
	0.5072	62.06	71.86	133.6	99.62		
	0.5293	64.76	71.86	137.6	101.3		
	0.5354	65.51	71.86	138.4	101.5		
大黄素甲醚	0.5218	23.59	25.21	49.03	100.9		
	0.5386	24.35	25.21	48.96	97.62		
	0.5158	23.44	25.21	48.90	101.0	99.91	1.60
	0.5072	22.93	25.21	48.15	100.0		
	0.5293	23.93	25.21	49.54	101.6		
	0.5354	24.21	25.21	48.99	98.31		

表 2 3批样品含量测定结果 (n =3,μg·g^{-1})

Tab 2 The results of content determination in the sample (n =3,μg·g^{-1})

批号	大黄酸	大黄素	大黄酚	大黄素甲醚	总量	均
20060525	84.21	88.99	122.3	45.21	340.7	
20060526	75.34	93.42	109.65	43.80	322.2	326.6
20060527	89.53	85.02	102.92	39.36	316.8	

参考文献:

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 (一部) [S]. 北京:化学工业出版社, 2005. 附录 VIB; 189; 47; 611; 15

[2] 卫生部部颁标准 [S]. 中药部颁标准. Z8-29

[3] 张红霞,金 艺,许海燕,等. HPLC法测定胃力片中大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚的含量 [J]. 沈阳药科大学学报, 2007, 24(7): 417

(收稿日期: 2008-03-14;修回日期: 2008-09-19)

(本文编辑 梁爱君)

© 1994-2009 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net