

过程中只有一个熔融峰,江苏、大连和辽宁3个样品出现类似峰型,表明这3种可能优于其他样品。这一结果得到了体外溶血性和骨骼肌刺激性实验结果的证实。体外溶血性实验是根据红细胞破裂释放出来的血红蛋白在可见光波长段具有最大吸收的原理,采用酶标仪测定,能消除常规试管观察法带来的主观误差,结果准确、客观、重复性好^[10]。骨骼肌刺激性采用体外培养的L6细胞CK残留量的多少来评价。L6细胞株系大鼠骨骼肌肌原细胞,内含大量CK,当细胞受到不良刺激可释放出CK或因细胞壁破裂CK外流。可从刺激后L6细胞胞内CK残留量判断刺激性大小,胞内CK量愈高,显示对肌肉的刺激性愈小,反之则刺激性愈大。该方法不用进行动物手术,操作简便,已经过广泛验证,是评价非肠道给药引起的肌肉刺激性的可靠方法^[11]。实验结果表明,江苏、大连与辽宁厂家样品的溶血性和刺激性最低,优于其他品牌,与DSC分析结果吻合。

综上所述,DSC技术可作为一种聚山梨酯80质量评价半定量方法,具有重复性良好,分析速度快,较之常规的气相色谱、液相色谱操作具有快速、简单易行、经济成本低等优点。不同质量的聚山梨酯80中所含杂质成分与DSC图谱的对应关系,有待进一步的研究。

[DOI] 10.3870/yydb.2011.11.030

[参考文献]

- [1] 吴毅,金少鸿.药用辅料聚山梨酯80的药理、药动学及分析方法研究进展[J].中国药事,2008,22(8):717-720.
- [2] KELLNER A, CORRELL J W, LADD A T. Sustained

hyperlipemia induced in rabbits by means of intravenously injected surface-active agents [J]. *J Exp Med*, 1951, 93 (4): 373-383.

- [3] TELLINGEN O V, BEIJNEN J H, VERWEI J J, et al. Rapid esterase-sensitive breakdown of polysorbate 80 and its impact on the plasma pharmacokinetics of docetaxel and metabolites in mice [J]. *Clin Cancer Res*, 1995, 5 (10): 2918.
- [4] 马伟从,张青,李慧,等.细辛脑注射液致不良反应文献回顾与原因分析[J].中国药物警戒,2010,7(4):243-246.
- [5] 程欧,高鹏,涂家生,等.聚山梨酯80质量与致敏性关系的研究[J].中国药科大学学报,2010,41(3):244-247.
- [6] EP 6.0 Vol 1 [S]. 2005: 2711-2712.
- [7] 化学药物刺激性、过敏性和溶血性研究技术指导原则 [S].
- [8] LASKA D A, WILLIAMS P D, WHITE S L, et al. *In vitro* correlation of ultrastructural morphology and creatine phosphokinase release in L6 skeletal muscle cells after exposure to parenteral antibiotics [J]. *In Vitro Cell Dev B*, 1989, 26 (4): 393-398.
- [9] 刘宏,唐晓莽,王影,等.灯盏花素磷脂复合物的表征 [J].医药导报,2010,29(11):1395-1397.
- [10] 邹静,张青,唐冰,等.紫外分光光度法测定聚山梨酯80对人红细胞和兔红细胞的溶血度 [J].西南国防医药,2004,14(3):255-256.
- [11] EVANS L A F, GENEREUX P E, GIBBS E M, et al. Predicting injection site muscle damage III: evaluation of intramuscular formulations in the L6 cell model [J]. *Pharm Res*, 1996, 13 (10): 1585-1587.

高效液相色谱法测定洁泽洗液中盐酸小檗碱含量*

马永贵¹, 谢委¹, 方建国¹, 陈琢²

(华中科技大学同济医学院附属同济医院 1. 药学部; 2. 中西医结合研究所, 武汉 430030)

[摘要] 目的 建立洁泽洗液中盐酸小檗碱的含量测定方法。方法 采用高效液相色谱法, 色谱柱: Phenomil ODS 色谱柱(4.6 mm×150 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-0.1%磷酸溶液(40:60); 流速: 1.0 mL·min⁻¹; 检测波长: 265 nm; 柱温: 40℃; 进样量: 10 μL。结果 盐酸小檗碱在2.53~101.20 μg·mL⁻¹浓度范围内线性关系良好($r=1.0000$); 盐酸小檗碱的平均加样回收率分别为102.88% (RSD=2.13%), 98.01% (RSD=0.17%), 100.15% (RSD=2.57%) ($n=3$)。结论 该方法灵敏快速、准确可靠, 可作为洁泽洗液中盐酸小檗碱的含量测定方法。

[关键词] 小檗碱; 盐酸; 洁泽洗液; 色谱法; 高效液相; 含量测定

[中图分类号] R286; R927.1

[文献标识码] A

[文章编号] 1004-0781(2011)11-1484-03

Determination of Berberine Hydrochloride in *Jieze* Lotion by HPLC

MA Yong-gui¹, XIE Wei¹, FANG Jian-guo¹, CHEN Zhuo² (1. Department of Pharmacy; 2. Institute of Combination of Chinese Traditional and Western Medicine, Tongji Hospital Affiliated with Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China)

ABSTRACT Objective To establish a HPLC method for determination of berberine hydrochloride in *jieze* lotion.

Methods Chromatography was carried out on a column of the Phenomil ODS (4.6 mm×150 mm 5 μm), with a mobile phase as Mentol-0.1% Phosphoric Acid (40:60). The flow rate was set at 1.0 mL·min⁻¹, and the detection wavelength was at 265 nm; The sample was loaded for 10 μL and column temperature was 40 °C. **Results** A good linearity of berberine hydrochloride was obtained within 2.53-101.20 μg·mL⁻¹; The average recoveries of berberine hydrochloride was 102.88% (RSD=2.13%) 98.01% (RSD=0.17%), 100.15% (RSD=2.57%) (n=3), respectively. **Conclusion** The method is simple, rapid, sensitive and accurate, which can be used for quality control of berberine hydrochloride in *jieze* lotion.

KEY WORDS Berberine, hydrochloride; *Jieze* lotion; HPLC; Determination

洁泽洗液是我院医院制剂(制剂批准文号:鄂药制字 Z20103135),用于防治下生殖道感染。黄柏为方中主药,性寒味苦,入肾、膀胱经,具有清热燥湿、泻火解毒的功效,尤擅除下焦湿热^[1-2]。笔者选择盐酸小檗碱作为该药含量测定指标,以期反映和控制其内在质量。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 美国 Agilent1100 型高效液相色谱仪, KQ-250B 型超声波清洗器, AUV 220D 型双量程分析天平(日本岛津,感量:0.1 mg/0.01 mg)。

1.2 试剂 盐酸小檗碱(中国药品生物制品检定所,批号:0713-200107,供含量测定用),洁泽洗液(自制,批号:090710,090816,090820,090826,100312,100316,100320),甲醇为色谱纯,水为新制备的纯化水,其他试剂为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱: Phenomil ODS 色谱柱(4.6 mm×150 mm 5 μm);流动相: 甲醇-0.1% 磷酸溶液(40:60);流速: 1.0 mL·min⁻¹;检测波长: 265 nm;柱温: 40 °C;进样量: 10 μL。

2.2 系统适用性实验 精密吸取对照品溶液和样品溶液各 10 μL,注入液相色谱仪测试,结果盐酸小檗碱的保留时间约为 14.0 min,理论板数按盐酸小檗碱峰计算,不低于 3 000。

2.3 供试品溶液的制备 精密量取本品 2 mL,置 50 mL 量瓶中,用流动相稀释至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.4 对照品溶液的制备 取盐酸小檗碱对照品适量,精密称定,加甲醇制成每毫升含 20 μg 的溶液,即得。

2.5 阴性对照溶液的制备 按洁泽洗液处方制备不含黄柏药材的阴性样品,按“2.3”项下制备方法制成阴性对照溶液。

2.6 干扰实验 按上述色谱条件,精密量取盐酸小檗碱对照品溶液、供试品溶液和阴性对照溶液各 10 μL,分别注入色谱仪。供试品溶液色谱图中,在与对照品色谱图相应位置上有相同色谱峰,而阴性溶液在此保留时间处无干扰。结果见图 1。

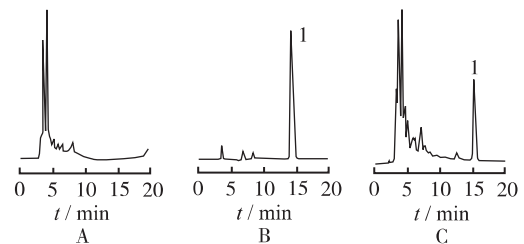


图 1 3 种溶液的高效液相色谱图

A. 阴性对照溶液; B. 盐酸小檗碱对照品; C. 样品; 1. 盐酸小檗碱

Fig 1 HPLC chromatogram of 3 kinds of solutions

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

2.7 线性关系考察 精密称取盐酸小檗碱对照品 12.65 mg,置 25 mL 量瓶,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀;精密吸取上述溶液 5 mL,置 25 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀。再精密吸取上述溶液 0.25, 0.50, 1.00, 2.00, 5.00, 10.00 mL 分别置 10 mL 量瓶中,加甲醇稀释并定容至刻度。分别精密吸取上述溶液 10 μL 注入液相色谱仪,记录色谱图。以峰面积的积分值为纵坐标,盐酸小檗碱浓度为横坐标,绘制标准曲线,得到一条直线。计算回归方程得: $Y = 55.147X -$

[收稿日期] 2010-12-01 [修回日期] 2011-02-05

[基金项目] *湖北省计划生育专项基金资助项目(基金编号: JS-20100001);武汉市科技计划项目(基金编号: 200960323131)

[作者简介] 马永贵(1971-),男,浙江缙云人,主管药师,硕士,主要从事新药研究及临床药学工作。电话: 027-83649095, E-mail: myg913@tom.com。

[通讯作者] 陈琢(1965-),女,主任医师,主要研究方向:中西医结合妇产科。电话: 027-83662658, E-mail: chenz@tjh.tjmu.edu.cn。

28.866 $r=1.0000$ 。结果表明盐酸小檗碱在 2.53 ~ 101.20 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内线性关系好。

2.8 精密度实验

2.8.1 重复性实验 精密量取同一批号的洁泽洗液(批号:090710)6份,按照“2.3”项下制备方法制备供试品溶液,依法测定。结果供试品中盐酸小檗碱平均含量为 0.60 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, RSD 为 1.76%。

2.8.2 中间精密度实验 分别在不同的日期,由不同的分析人员测定3份样品溶液,记录色谱图,计算。结果样品盐酸小檗碱含量的 RSD 值为 1.77%。

2.9 供试品溶液的稳定性实验 取供试品溶液,于室温(20~25℃)下放置,在不同时间段(0, 2, 4, 6, 8 h)分别进样测定,测得盐酸小檗碱峰面积的 RSD 为 1.32%,说明供试品溶液在放置 8 h 内含量稳定。

2.10 加样回收率实验 取已知含量的洁泽洗液适量(批号:090710)按含量测定项下的取样量的一半,精密量取9份(每份1 mL),再精密添加盐酸小檗碱对照品储备液 4, 5, 6 mL; 每个梯度平行3份;按“2.3”项下的方法制备供试品溶液,分别取 10 μL 进样,注入液相色谱仪测定,结果3种不同浓度的平均加样回收率分别为: 102.88% (RSD = 2.13%), 98.01% (RSD = 0.17%), 100.15% (RSD = 2.57%)。结果见表1。

表1 洁泽洗液中盐酸小檗碱加样回收率实验结果

Tab. 1 Results of recovery test of berberine hydrochloride in jize lotion $n=3$

序号	原有量	加入量	测得量	回收率/ %
	mg			
1	0.600 0	0.476 8	1.091 4	103.06
2	0.600 0	0.476 8	1.100 5	104.97
3	0.600 0	0.476 8	1.079 7	100.61
4	0.600 0	0.596 0	1.185 2	98.19
5	0.600 0	0.596 0	1.183 4	97.89
6	0.600 0	0.596 0	1.183 8	97.95
7	0.600 0	0.715 2	1.301 7	98.11
8	0.600 0	0.715 2	1.336 5	102.98
9	0.600 0	0.715 2	1.310 6	99.36

2.11 耐用性实验

2.11.1 不同色谱柱的比较 另取两个不同型号的色谱柱 [(AtlantisTM C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), SHIMADZU VP-ODS (4.6 mm × 250 mm, 5 μm)] 精密吸取同一份供试品溶液(按照“2.3”项下制备方法制备)及对照品溶液各 10 μL , 按照上述色谱条件注入液相色谱仪,测定供试品溶液中盐酸小檗碱的含量,分别计算含量的平均值,与重复性项下供试品的含量比较,盐酸小檗碱含量的 RSD 为 3.45%。

2.11.2 不同流动相比例的比较 另使用两个不同比

例的流动相 [甲醇-0.1% 磷酸溶液 (38 : 62), 甲醇-0.1% 磷酸溶液 (42 : 58)] 按照上述色谱条件,精密吸取“2.11.1”项下供试品溶液及对照品溶液各 10 μL , 注入液相色谱仪,测定供试品溶液中盐酸小檗碱的含量,分别计算含量的平均值,与重复性项下供试品的含量比较,盐酸小檗碱含量的 RSD 为 0.96%。

2.11.3 不同检测波长的比较 另使用两个不同的检测波长 ($\lambda=220, 240 \text{ nm}$) 按照上述色谱条件,精密吸取“2.11.1”项下供试品溶液及对照品溶液各 10 μL , 注入液相色谱仪,测定供试品溶液中盐酸小檗碱的含量,分别计算含量的平均值,与重复性项下供试品的含量比较,盐酸小檗碱含量的 RSD 为 2.48%。

2.12 样品含量测定 精密量取洁泽洗液(批号:100312, 100316, 100320)适量,按“2.3”项下制备方法制备。分别精密吸取溶液各 10 μL , 注入液相色谱仪,3批样品中盐酸小檗碱的含量分别为 0.51 (RSD = 0.92%), 0.52 (RSD = 1.83%) 和 0.54 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ (RSD = 1.01%)。

3 讨论

文献报道有多种方法来测定黄柏及其制剂中盐酸小檗碱的含量^[2-7]。笔者在本实验中考察甲醇-磷酸缓冲盐、甲醇-0.1% 磷酸、甲醇-水-冰醋酸及乙腈-0.1% 磷酸作为流动相时的出峰情况,结果发现甲醇-0.1% 磷酸溶液 (40 : 60) 作流动相时,保留时间理想,柱效高,出峰峰形好,且不含缓冲盐,对色谱柱的损坏较小。该方法经济、环保,结果准确,重复性好,因此可作为本制剂含量的控制方法。

[DOI] 10.3870/yydb.2011.11.031

[参考文献]

- [1] 韦红, 陈琢, 徐萍, 等. 洁泽1号抗解脲支原体药效实验及其对解脲支原体宫颈炎的治疗作用[J]. 华中科技大学学报: 医学版, 2007, 36(1): 87-90.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 214.
- [3] 迟芳振, 刘群, 李伟妮. 黄柏胶囊中盐酸小檗碱的含量测定[J]. 医药导报, 2005, 24(9): 821.
- [4] 王文清, 黄京芳. 牛黄肛炎宁栓中胆红素和盐酸小檗碱的含量测定[J]. 中国医院药学杂志, 2002, 22(11): 658-661.
- [5] 刘莉, 程龙琼, 周世玉, 等. 高效液相色谱法测定乌梅丸盐酸小檗碱含量[J]. 医药导报, 2008, 27(11): 1405-1406.
- [6] 吴普荣, 邢耘. 高效液相色谱法测定一清颗粒盐酸小檗碱含量[J]. 医药导报, 2009, 28(2): 242-243.
- [7] 吴小红. 高效液相色谱法测定肠康片中盐酸小檗碱的含量[J]. 医药导报, 2009, 28(1): 111-112.