

消炎洗散质量标准研究

欧 燕¹, 李 希^{2*}, 张 嵩², 冯建安², 邹俊波¹, 黄 嫣¹

(1. 成都中医药大学, 四川 成都 610075; 2. 四川省中医药科学院中医研究所, 四川 成都 610031)

摘要:目的 建立消炎洗散(苦参、黄柏、蛇床子、等)的质量标准。方法 采用 TLC 法对方中苦参、黄柏、蛇床子、紫草、冰片进行定性鉴别;并采用 HPLC 测定苦参中苦参碱、氧化苦参碱,以及黄柏中盐酸小檗碱。结果 薄层色谱均检出苦参、黄柏、蛇床子、紫草、冰片;苦参碱在 0.200 8~2.008 μg 内呈良好的线性关系 $r=0.999\ 21$ 。氧化苦参碱在 0.208 4~2.084 μg 内呈良好的线性关系 $r=0.998\ 85$;平均回收率为 99.68%,RSD 为 1.408%。盐酸小檗碱在 0.204 8~1.024 μg 内呈良好的线性关系 $r=0.999\ 92$;平均回收率为 99.76%,RSD 为 2.660%。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:消炎洗散;苦参碱、氧化苦参碱、盐酸小檗碱;TLC;HPLC

中图分类号:R927.2

文献标志码:A

文章编号:1001-4528(2011)04-0629-05

Quality standard of Xiaoyanxi Powder

OU Yan¹, LI Xi^{2*}, ZHANG Song², FENG Jian-an², ZOU Jun-bo¹, HUANG Yan¹

(1. Chengdu University of TCM, Chengdu 610075, China; 2. Institute of TCM, Sichuan Provincial Academy of Traditional Chinese Medical Science, Chengdu 610031, China)

ABSTRACT: **AIM** To establish a quality standard of Xiaoyanxi Powder (*Sophorae Flavescentis Radix*, *Phellodendri Chinensis Cortex*, *Cnidii Fructus*, etc.). **METHODS** *Sophorae Flavescentis Radix*, *Phellodendri Chinensis Cortex*, *Cnidii Fructus*, *Arnebiae Radix*, *Borneolum Syntheticum* were identified by TLC. Matrine and oxymatrine in *Sophorae flavescentis Radix*, and berberine in *Phellodendri Chinensis Cortex* were determined by HPLC. **RESULTS** *Sophorae flavescentis Radix*, *Phellodendri Chinensis Cortex*, *Cnidii Fructus*, *Arnebiae Radix*, *Borneolum Syntheticum* were detected by TLC. Matrine showed good linear relationship in the range of 0.200 8 – 2.008 μg ($r = 0.999\ 21$). Oxymatrine showed good linear relationship in the range of 0.208 4 – 2.084 μg ($r = 0.998\ 85$). Their average recovery was 98.68% (RSD was 1.408%). Berberine showed good linear relationship in the range of 0.204 8 – 1.024 μg ($r = 0.998\ 85$). The average recovery was 99.76% (RSD was 2.660%). **CONCLUSION** The method is simple and reproducible. It can be used to control the quality of Xiaoyanxi Powder.

KEY WORDS: Xiaoyanxi Powder; matrine; oxymatrine; berberine; TLC; HPLC

消炎洗散是四川省第二中医院肛肠科专家根据中医理论,经过多年的临床实践而制成的中药制剂,由苦参、黄柏、蛇床子、紫草、冰片等多味药组成,具有清热解毒、除湿消肿、敛疮止痒的功效。用于痔疮肿痛、肛门瘙痒、肛门病术后每日坐浴。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,对方中苦参、黄柏、蛇床子、紫草、冰片进行薄层色谱鉴别,并采用高效液相色谱法测定了制

剂中苦参碱、氧化苦参碱以及盐酸小檗碱,该方法简便易行,重复性好,能控制本品的质量。

1 仪器与试剂

Agilent 1100 高效液相色谱仪, VWD 紫外检测器, AUTOSCIENCE 溶剂过滤器, 超声波提取器(中船七院七二六所), Sartorius BP211D 电子天平, 939 薄层自动铺板器(重庆贝可得公司), 硅胶 G60 型(青岛海洋化工集团)。

收稿日期:2010-07-26

基金项目:四川省省级科研院(所)科研业务费资助项目(2009-4-272)

作者简介:欧 燕(1987-),女,硕士生。E-mail:lurker666@163.com

* 通信作者:李 希(1969-),女,主任中药师,研究生导师。E-mail:sylx2003@yahoo.com.cn

苦参碱对照品(批号 110805-200507)、氧化苦参碱对照品(批号 110780-200506)、紫草对照药材(批号 121430-200802)、蛇床子素对照品(批号 110822-200305)、冰片对照品(批号 110881-200706)、盐酸小檗碱(批号 110713-200910)、黄柏对照药材(批号 121510-200703)购于中国药品生物制品检定所。消炎洗散样品(批号 090901、090902、090903)由四川省第二中医院制剂室生产提供;甲醇、磷酸、乙腈为色谱纯,水为重蒸馏水,其它试剂均为分析纯。

2 薄层色谱鉴别

2.1 苦参的薄层色谱鉴别^[1-2] 取本品 4 g,加浓氨试液 0.3 mL,三氯甲烷 25 mL,超声处理 20 min,放置过夜,滤过,滤液蒸干,残渣加三氯甲烷 0.5 mL 使溶解作为供试品溶液;同法制成缺苦参阴性对照样品溶液。另取苦参碱对照品、氧化苦参碱对照品,分别加乙醇制成每 1 mL 含 0.2 mg 的溶液,作为对照品溶液。照薄层色谱法试验,吸取上述 4 种溶液各 6 μ L,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以三氯甲烷-甲醇-浓氨(4:1:0.1)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以改良的碘化铋钾试液在日光下检视。供试品色谱中,在与对照品色谱相应的位置上,显相同颜色的斑点,缺苦参阴性对照样品无相应斑点。见图 1。

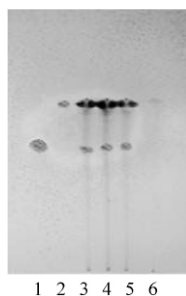


图 1 消炎洗散中苦参
TLC 图谱
1. 氧化苦参碱 2. 苦参碱
3~5. 供试品 6. 苦参阴性对照

2.2 黄柏的薄层色谱鉴别^[3] 取本品 2 g,加甲醇 30 mL,超声 30 min,滤过,滤液浓缩至 5~8 mL,作为供试品溶液;同法制成缺黄柏阴性对照样品溶液。另取黄柏对照药材 0.5 g,加甲醇 5 mL,同供试品溶液制法制成对照药材溶液。再取盐酸小檗碱对照品,加甲醇制成每 1 mL 含 0.5 mg 的溶液,作为对照品溶液。照薄层色谱法试验,吸取上述 4 种溶液各 4 μ L,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以正丁醇-冰醋酸-水(5:1:1)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,在与对照药材及对照药材色谱相应的位置上,显相同颜色的荧光斑点,黄柏阴性对照样品无相应斑点。见图 2。

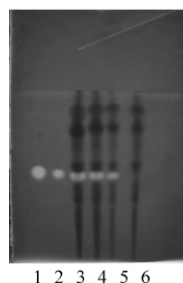


图 2 消炎洗散中黄柏
TLC 图谱
1. 盐酸小檗碱 2. 黄柏对照药材
3~5. 供试品 6. 黄柏阴性对照

2.3 蛇床子的薄层色谱鉴别^{[4] 375} 取本品 3 g,加乙醇 10 mL,超声处理 20 min,滤过,滤液作为供试品溶液;同法制成缺蛇床子阴性对照样品溶液。另取蛇床子素对照品制成每 1 mL 含 0.1 mg 的溶液,作为对照品溶液。照薄层色谱法试验,吸取上述 3 种溶液各 4 μ L,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以环己烷-乙酸乙酯(10:3)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,在与对照品色谱相应的位置上,显相同颜色的荧光斑点,蛇床子阴性对照样品无相应斑点。见图 3。



图 3 消炎洗散中蛇床子
TLC 图谱
1. 蛇床子素 2~4. 供试品
5. 蛇床子阴性对照

2.4 紫草的薄层色谱鉴别^{[4] 320} 取本品 5 g,加石油醚(60~90 $^{\circ}$ C) 20 mL,超声处理 20 min,滤过,滤液浓缩至约 1 mL,作为供试品溶液;同法制成缺紫草阴性对照样品溶液。另取紫草对照药材 0.5 g,同供试品溶液制法制成对照药材溶液。照薄层色谱法试验,吸取上述 3 种溶液各 6 μ L,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以环己烷-甲苯-乙酸乙酯-甲酸(5:5:0.5:0.1)为展开剂,展开,取出,晾干,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,紫草阴性对照样品无相应斑点。见图 4。



图 4 消炎洗散中紫草
TLC 图谱
1. 紫草对照药材 2~4. 供试品
5. 紫草阴性对照

2.5 冰片的薄层色谱鉴别^{[4] 787} 取本品 12 g,加乙

醚 40 mL, 冷浸 30 min, 滤过, 滤液挥干, 残渣加三氯甲烷 1 mL, 作为供试品溶液; 同法制成冰片阴性对照样品溶液。另取冰片对照品制成每 1 mL 含 5 mg 的溶液, 作为对照品溶液。照薄层色谱法试验, 吸取上述 3 种溶液各 4 μ L, 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 以石油醚 (30 ~ 60 $^{\circ}$ C) - 甲酸乙酯 (19 : 2) 为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 喷以 1% 香草醛硫酸溶液, 105 $^{\circ}$ C 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, 冰片阴性对照样品无相应斑点。见图 5。

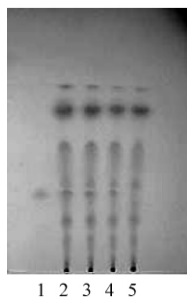


图 5 消炎洗散中冰片
TLC 图谱
1. 冰片对照品 2-4. 供试品
5. 冰片阴性对照

3 苦参碱和氧化苦参碱的 HPLC 法测定

3.1 色谱条件^[5-7] 色谱柱为 Agilent Eclipse XBD- C_{18} 柱 (4.6 mm $\times$ 150 mm, 5 μ m); 保护柱: Agilent ZORBAX XBD- C_{18} 柱 (4 mm $\times$ 4 mm, 5 μ m); 流动相: 甲醇-0.05 mol/L 磷酸二氢钠 (含 0.2% 磷酸, 1% 高氯酸钠) (20 : 80); 柱温: 30 $^{\circ}$ C; 检测波长: 220 nm。理论板数按苦参碱、氧化苦参碱峰计应不低于 3 000。

3.2 对照品溶液的制备 精密称取苦参碱对照品 5.02 mg, 氧化苦参碱 5.21 mg, 加水制成每 1 mL 含苦参碱 0.100 4 mg、氧化苦参碱 0.104 2 g 的混合对照品溶液。

3.3 供试品溶液的制备^[8-9] 取本品约 5 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 加入浓氨试液 1 mL, 再精密加入三氯甲烷 50 mL, 称定重量, 超声处理 40 min, 放冷, 再称定重量, 加三氯甲烷补足减失的重量, 滤过, 取续滤液 10 mL 回收溶剂至干, 残渣加 50% 甲醇溶解并转移至 10 mL 量瓶中, 加 50% 甲醇至刻度, 摇匀, 滤过, 离心, 即得。

3.4 阴性对照样品溶液的制备 按处方比例, 取除苦参外的其他各味药, 按制剂工艺制成阴性对照样品, 再按 3.3 项下方法制备, 即得。

3.5 专属性试验 取对照品溶液、供试品溶液和阴性对照溶液各 10 μ L, 分别注入液相色谱仪, 依法测定。阴性对照样品在苦参碱和氧化苦参碱相对保留时间处未见色谱峰, 结果表明阴性样品对检测无干

扰。见图 6。

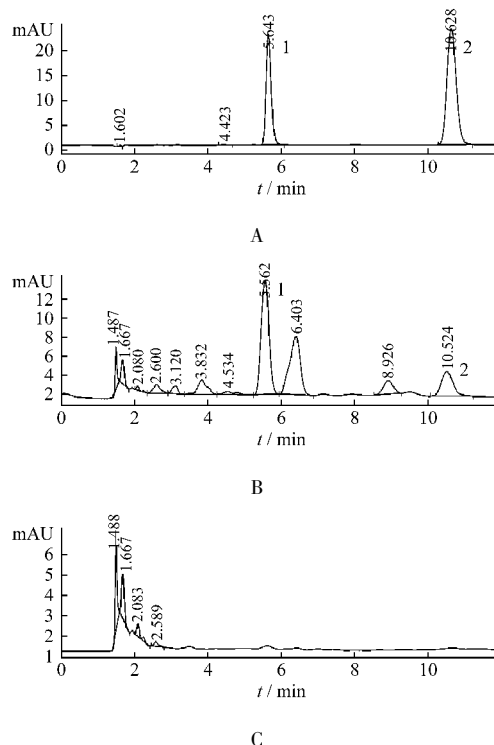


图 6 苦参碱、氧化苦参碱对照品 (A)、消炎洗散样品 (B) 和阴性对照品 (C) 的 HPLC 图谱

A. 苦参碱、氧化苦参碱对照品 B. 消炎洗散样品
C. 阴性对照品 1. 苦参碱 2. 氧化苦参碱

3.6 线性关系考察 分别精密吸取上述对照品溶液 2、4、6、8、10、20 μ L, 注入液相色谱仪。按上述色谱条件测定峰面积, 以峰面积对进样量进行线性回归, 得苦参碱回归方程 $Y = 533.265\ 594\ 5X - 19.783\ 39$, $r = 0.999\ 21$, 结果表明苦参碱进样量在 0.200 8 ~ 2.008 μ g 与峰面积线性关系良好; 同样得氧化苦参碱回归方程 $Y = 615.210\ 659\ 2X - 29.641\ 68$, $r = 0.998\ 85$, 结果表明氧化苦参碱进样量在 0.208 4 ~ 2.084 μ g 与峰面积线性关系良好。

3.7 精密度试验 精密吸取对照品溶液浓度为 0.100 4 mg/mL 的苦参碱、0.104 2 mg/mL 的氧化苦参碱, 连续进样 5 次, 每次 10 μ L, 按上述条件测定峰面积值, 苦参碱峰面积 RSD 为 0.83%, 氧化苦参碱峰面积 RSD 为 0.429%。

3.8 稳定性试验 精密吸取供试品 (批号 090901) 溶液, 分别于 0、1、2、4、6、8、24 h 测定样品中苦参碱和氧化苦参碱的峰面积, 结果苦参碱峰面积 RSD 为 3.799%, 氧化苦参碱峰面积 RSD 为 3.287%, 表明供试品溶液在 24 h 内基本稳定。

3.9 重复性试验 取同一批号 (批号 090901) 样品 6 份, 分别制备供试品溶液, 进样测定, 结果苦参碱、

氧化苦参碱总和平均质量分数为1.581 2 mg/g, RSD为3.798%。

3.10 加样回收率试验 精密称取同一批样品(批号090901)9份,已知苦参碱、氧化苦参碱量,分别精密加入一定量的苦参碱、氧化苦参碱对照品溶液,进行测定,并计算回收率,结果平均回收率为99.68%,RSD为1.408%结果见表1。

表1 回收率试验结果

取样量	已知量	加入量	测得量	回收率	平均回收	RSD
/g	/mg	/mg	/mg	/%	率/%	/%
2.455 86	3.883	3.066 6	6.935	99.52		
2.402 31	3.799	3.066 6	6.814	98.32		
2.452 35	3.878	3.066 6	7.012	102.2		
2.486 94	3.932	3.873 6	7.769	99.06		
2.502 05	3.956	3.873 6	7.785	98.85	99.68	1.408
2.465 66	3.899	3.873 6	7.802	100.76		
2.462 25	3.893	4.680 6	8.467	97.72		
2.453 38	3.879	4.680 6	8.551	99.82		
2.454 02	3.88	4.680 6	8.602	100.88		

3.11 样品测定 取3批样品分别制备供试品溶液,注入液相色谱仪,测定峰面积积分值,按外标法计算样品中苦参碱、氧化苦参碱质量分数,结果见表2。

表2 苦参碱和氧化苦参碱的测定结果 (n=3)

批号	质量分数/(mg/g)			平均质量分数/(mg/g)	RSD/%
	1	2	3		
090901	1.637 3	1.624 3	1.609 8	1.623 8	1.235
090902	1.738 9	1.776 4	1.751 2	1.755 5	0.986
090903	1.583 0	1.611 8	1.598 9	1.597 9	1.421

4 盐酸小檗碱的 HPLC 法测定^{[4]286}

4.1 色谱条件 色谱柱为 Agilent Eclipse XBD-C₁₈ 柱(4.6 mm×150 mm 5 μm);保护柱:Agilent ZOR-BAX XBD-C₁₈ 柱(4 mm×4 mm 5 μm);流动相:乙腈-0.1%磷酸溶液(50:50)(每100 mL加十二烷基磺酸钠0.1 g);柱温:30℃;检测波长:265 nm。理论板数按盐酸小檗碱峰计应不低于4 000。

4.2 对照品溶液的制备 精密称取在100℃干燥5 h的盐酸小檗碱对照品适量,加流动相制成1 mL含0.051 2 mg的溶液,即得。

4.3 供试品溶液的制备 取本品约2 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,置100 mL量瓶中,加流动相80 mL,超声处理40 min,放冷,用流动相稀释至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

4.4 阴性对照样品溶液的制备 按处方比例,取除黄柏外的其他各味药,按制剂工艺制成阴性对照样品,再按4.3项下方法制备,即得。

4.5 专属性试验 取对照品溶液、供试品溶液和阴性对照溶液各10 μL,分别注入液相色谱仪,依法测定,阴性对照样品在盐酸小檗碱相对保留时间处未见色谱峰,结果表明阴性样品对检测无干扰。见图7。

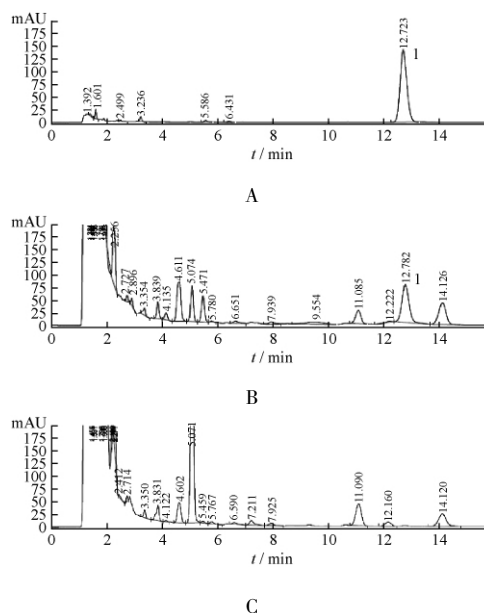


图7 盐酸小檗碱对照品(A)、消炎洗散样品(B)和阴性对照品(C)HPLC图谱

1. 盐酸小檗碱

4.6 线性关系考察 分别精密吸取上述对照品溶液2、4、6、8、10、20 μL,注入液相色谱仪。按上述色谱条件测定峰面积,以峰面积对进样量进行线性回归,得盐酸小檗碱回归方程 $Y = 4\ 247.32X + 25.365\ 48$, $r = 0.999\ 92$,结果表明盐酸小檗碱进样量在0.204 8~1.024 μg与峰面积线性关系良好。

4.7 精密度试验 精密吸取对照品溶液浓度为0.051 2 mg/mL的盐酸小檗碱,连续进样5次,每次10 μL,按上述条件测定峰面积值,盐酸小檗碱峰面积RSD为1.28%。

4.8 稳定性试验 精密吸取供试品(批号090901)溶液,分别于0、1、2、4、6、8、24 h测定样品中盐酸小檗碱的峰面积,结果盐酸小檗碱RSD为2.875%,表明供试品溶液在24 h内基本稳定。

4.9 重复性试验 取同一批号(批号090901)样品6份,分别制备供试品溶液,进样测定,结果盐酸小檗碱平均质量分数为1.26 mg/g,RSD为3.041%。

4.10 加样回收率试验 精密称取同一批样品(批号090901)9份,已知盐酸小檗碱量,分别精密加入一定量的盐酸小檗碱对照品溶液,进行测定,并计算回收率,结果平均回收率为99.76%,RSD为

2.66% ,结果见表 3。

表 3 回收率试验结果

取样量	已知量	加入量	测得量	回收率	平均回收	RSD
/g	/mg	/mg	/mg	/%	率/ %	/ %
1.065 66	1.343	1.075 2	2.419	100.07		
1.038 89	1.309	1.024	2.297	96.48		
1.063 91	1.341	1.075 2	2.432	101.47		
1.081 2	1.362	1.382 4	2.793	103.52		
1.088 76	1.372	1.382 4	2.788	102.43	99.76	2.66
1.070 56	1.349	1.331 2	2.652	97.88		
1.068 86	1.347	1.638 4	3.012	101.62		
1.064 42	1.341	1.587 2	2.895	97.91		
1.064 74	1.342	1.587 2	2.873	96.46		

4.11 样品测定 取 3 批样品分别制备供试品溶液 ,注入液相色谱仪 ,测定峰面积积分值 ,按外标法计算样品中盐酸小檗碱质量分数 ,结果见表 4。

表 4 盐酸小檗碱测定结果 (n=3)

批 号	质量分数/(mg/g)			平均质量分数	RSD
	1	2	3	/ (mg/g)	/ %
090901	1.255 6	1.243 2	1.289 3	1.262 7	1.583
090902	1.283 7	1.316 4	1.314 6	1.304 9	2.056
090903	1.227 9	1.215 7	1.234 7	1.226 1	1.967

5 讨论

5.1 中国药典苦参项下采用氨基柱测定苦参碱和氧化苦参碱 ,但在实验中发现用氨基柱测定峰形较差 ,保留时间太短。后改用 C₁₈ 柱测定 ,结果峰形较好 ,且方法可靠。

5.2 本实验原参照中国药典苦参项下苦参碱和氧化苦参碱测定的流动相:乙腈-无水乙醇-3% 磷酸溶

液(80 : 10 : 10) ,但峰形较差 ,拖尾严重。经试验筛选出流动相:甲醇-0.05 mol/L 磷酸二氢钠(20 : 80) 进行分离 ,峰形好 ,理论板数较高。

5.3 实验中曾分别采用甲醇、50% 甲醇^[10]、水配制苦参碱和氧化苦参碱的混合对照品溶液 ,结果水配制的混合对照品溶液的峰形较甲醇和 50% 甲醇好 ,因此选择水为溶媒配制对照品溶液。

参考文献:

[1] 苗明三 ,李振国. 现代实用中药质量控制技术 [M] . 北京: 人民卫生出版社 ,2000:636-637.

[2] 贾敏鸽 ,孙文基. 苦参及其复方中苦参碱与氧化苦参碱的转化研究 [J] . 药物分析杂志 ,2003 ,23(2) :91-92.

[3] 刘训红 ,王玉玺 ,房克慧 ,等. 中药材薄层色谱鉴别 [M] . 天津:天津科学出版社 ,1989:299-300.

[4] 中国药典[S] . 一部. 2010.

[5] 朱丽君 ,刘 斌 ,石任兵. HPLC 法测定苦参生物碱部位中 4 种成分含量 [J] . 北京中医药大学学报 ,2007 ,30(11) :781.

[6] 周自桂 ,郭 萍. 高效液相色谱法测定苦参素分散片的含量 [J] . 江苏药学与临床研究 ,2005 ,13(3) :22.

[7] 邱文伟 ,简淑娟 ,龚惠仇. 高效液相色谱法测定苦参素胶囊中氧化苦参碱及有关物质的含量 [J] . 中药材 ,2005 ,28(7) :601.

[8] 赵韶华 ,刘敏彦. 苦参中苦参碱的含量测定方法探讨 [J] . 中国中医药信息杂志 ,2004 ,11(2) :53.

[9] 张 毅 ,HPLC 法测定苦参中苦参碱的含量 [J] . 安徽医药 ,2004 ,8(2) :123.

[10] 邓富良 ,陈本美. HPLC 测定山豆根中苦参碱的含量 [J] . 中成药 ,2001 ,23(9) :670.