

中图分类号: R917; R927 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2023)08-0077-05
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2023.08.018



高效液相色谱法同时测定除湿止痒软膏中9种成分含量

赵李妮¹, 李慧慧¹, 梁振纲², 方 草^{1△}

(1. 海南医学院第二附属医院, 海南 海口 570102; 2. 海口海关技术中心, 海南 海口 570102)

摘要:目的 建立同时测定除湿止痒软膏中9种成分含量的高效液相色谱(HPLC)法。方法 色谱柱为 Sunfire ODS C₁₈柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-0.1%磷酸溶液(梯度洗脱), 流速为 1.0 mL/min, 检测波长为 290 nm(0~15 min, 虎杖苷和黄柏碱), 220 nm(15~50 min, 氧化苦参碱、苦参碱、小檗碱、黄柏酮、栲酮), 322 nm(50~60 min, 蛇床子素), 254 nm(60~70 min, 大黄素), 柱温为 30 ℃, 进样量为 10 μL。结果 蛇床子素、小檗碱、黄柏碱、黄柏酮、栲酮、苦参碱、氧化苦参碱、虎杖苷、大黄素的质量浓度分别在 4.88~244.0 μg/mL($r=0.9998$)、2.86~143.0 μg/mL($r=0.9996$)、1.16~58.0 μg/mL($r=0.9987$)、1.42~71.0 μg/mL($r=0.9991$)、0.58~29.0 μg/mL($r=0.9995$)、0.86~43.0 μg/mL($r=0.9994$)、0.96~48.0 μg/mL($r=0.9989$)、1.84~92.0 μg/mL($r=0.9997$)、3.06~153.0 μg/mL($r=0.9993$)范围内与峰面积线性关系良好; 精密度、稳定性和重复性试验结果的 RSD 均小于 2.0%; 平均加样回收率分别为 99.37%, 99.77%, 99.56%, 99.48%, 98.98%, 98.82%, 100.93%, 98.94%, 100.64%, RSD 分别为 0.72%, 0.98%, 1.21%, 1.16%, 1.59%, 1.13%, 1.34%, 0.82%, 1.20%($n=9$)。结论 该方法操作简便, 结果准确可靠, 可用于同时测定除湿止痒软膏中9种成分的含量。

关键词: 除湿止痒软膏; 高效液相色谱法; 含量测定

Simultaneous Determination of Nine Components in Chushi Zhiyang Ointment by HPLC

ZHAO Lini¹, LI Huihui¹, LIANG Zhengang², FANG Cao¹

(1. The Second Affiliated Hospital of Hainan Medical University, Haikou, Hainan, China 570102; 2. Haikou Customs Technical Centre, Haikou, Hainan, China 570102)

Abstract: Objective To establish a high-performance liquid chromatography (HPLC) method for the simultaneous determination of nine components in Chushi Zhiyang Ointment. **Methods** The chromatographic column was Sunfire ODS C₁₈ column (250 mm×4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was acetonitrile-0.1% phosphoric acid solution (gradient elution), the flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelength was set 290 nm (0-15 min, polydatin and phellodendrine), 220 nm (15-50 min, oxymatrine, matrine, berberine, obacunone and fraxinellone), 322 nm (50-60 min, osthole), and 254 nm (60-70 min, emodin), the column temperature was 30 ℃, and the injection volume was 10 μL. **Results** The linear ranges of osthole, berberine, phellodendrine, obacunone, fraxinellone, oxymatrine, matrine, polydatin and emodin were 4.88-244.0 μg/mL ($r=0.9998$), 2.86-143.0 μg/mL ($r=0.9996$), 1.16-58.0 μg/mL ($r=0.9987$), 1.42-71.0 μg/mL ($r=0.9991$), 0.58-29.0 μg/mL ($r=0.9995$), 0.86-43.0 μg/mL ($r=0.9994$), 0.96-48.0 μg/mL ($r=0.9989$), 1.84-92.0 μg/mL ($r=0.9997$), and 3.06-153.0 μg/mL ($r=0.9993$), respectively. The RSDs of precision, stability, and repeatability tests were lower than 2.0% ($n=9$). The average recoveries of the above nine components were 99.37%, 99.77%, 99.56%, 99.48%, 98.98%, 98.82%, 100.93%, 98.94% and 100.64% with RSDs of 0.72%, 0.98%, 1.21%, 1.16%, 1.59%, 1.13%, 1.34%, 0.82% and 1.20% ($n=9$), respectively. **Conclusion** The method is simple, accurate, and reliable, which can be used for the simultaneous determination of nine components in Chushi Zhiyang Ointment.

Key words: Chushi Zhiyang Ointment; HPLC; content determination

除湿止痒软膏由蛇床子、黄连、黄柏、白鲜皮、苦参、虎杖、紫花地丁、地肤子、蒺藜、茵陈、苍术、花椒、冰片等13味中药组方, 有清热除湿、祛风止痒功效, 用于湿热证或湿阻证急性、亚急性湿疹证的辅助治疗。除湿止痒软膏质量标准虽收载于原国家食品药品监督管理局标准(YBZ19482005)中, 但仅以蛇床子素为定量指标, 有关含量测定的报道较少, 如文献[1-2]采用高效液相色谱(HPLC)法分别测定制剂中虎杖苷和蛇床子素含量。但中药制剂成分复杂, 检测单一指标无法控制产

品的整体质量。为此, 本研究中采用HPLC法同时测定除湿止痒软膏中多种成分(蛇床子素、小檗碱、黄柏碱、黄柏酮、栲酮、苦参碱、氧化苦参碱、虎杖苷、大黄素)的含量。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Agilent 1260型高效液相色谱仪(美国Agilent公司), 包括四元泵、G1315B型二极管阵列检测器(DAD); AG285型电子天平(瑞士Mettler Todedo公司, 精度为

第一作者: 赵李妮, 女, 硕士研究生, 主管药师, 研究方向为医院药学, (电子信箱)zhaolini008@163.com。

△通信作者: 芳草, 女, 大学本科, 主任药师, 研究方向为医院药事管理与临床药学, (电子信箱)tjdaiyan@126.com。

0.01 mg); KQ-300DE型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); Milli-Q型超纯水系统(美国Merck-Millipore公司)。

1.2 试药

除湿止痒软膏(四川德峰药业有限公司,批号分别为190205, 190702, 190802, 191002, 191109,规格为每支20 g);蛇床子素对照品(批号为110822-201710,含量99.5%),盐酸小檗碱对照品(批号为110713-201814,含量86.7%),盐酸黄柏碱对照品(批号为111895-201805,含量94.9%),黄柏酮对照品(批号为111923-201604,含量99.6%),鞣酮对照品(批号为111700-201603,含量99.7%),苦参碱对照品(批号为110805-201709,含量98.7%),氧化苦参碱对照品(批号为110780-201909,含量92.9%),虎杖苷对照品(批号为111575-201603,含量87.3%),大黄素对照品(批号为110756-201913,含量96.0%),均购自中国食品药品检定研究院;乙腈为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Sunfire ODS C₁₈柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈(A)-0.1%磷酸溶液(B),梯度洗脱(0~15 min时10%A→27%A, 15~35 min时27%A→50%A, 35~50 min时50%A→55%A, 50~68 min时

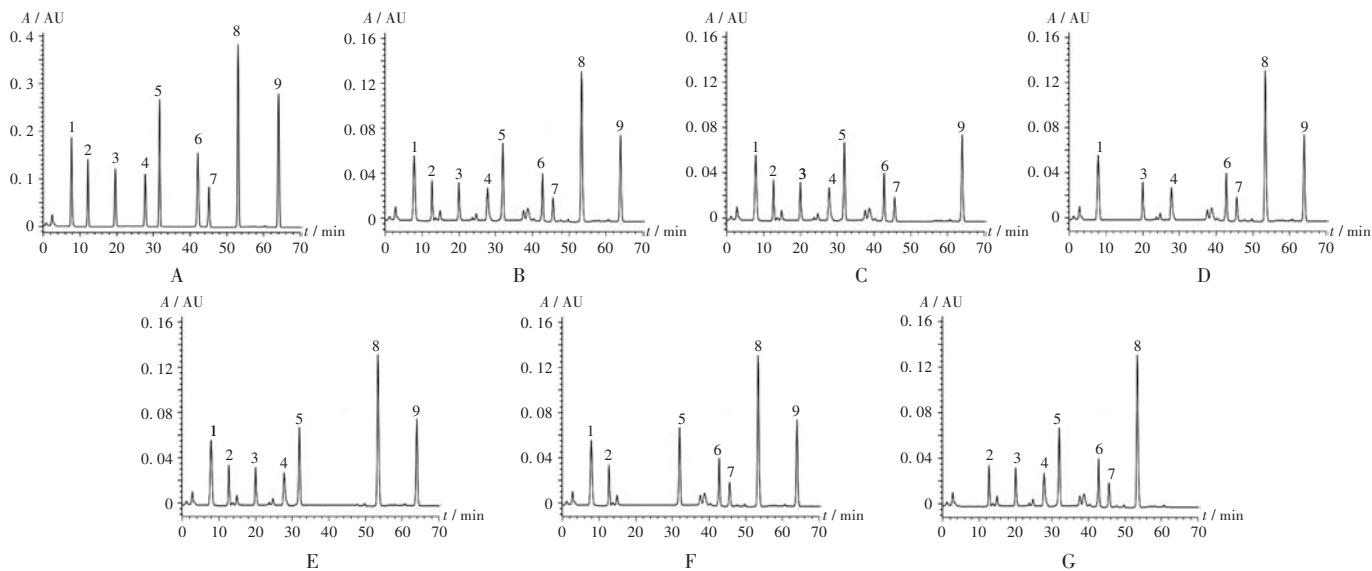
55%A→70%A, 68~70 min时70%A→27%A);流速:1.0 mL/min;检测波长:290 nm(0~15 min,虎杖苷和黄柏碱),220 nm(15~50 min,氧化苦参碱、苦参碱、小檗碱、黄柏酮、鞣酮),322 nm(50~60 min,蛇床子素),254 nm(60~70 min,大黄素);柱温:30℃;进样量:10 μL。

2.2 溶液制备

取各对照品适量,精密称定,加甲醇,制成含蛇床子素0.244 mg/mL、盐酸小檗碱0.143 mg/mL、盐酸黄柏碱0.058 mg/mL、黄柏酮0.071 mg/mL、鞣酮0.029 mg/mL、苦参碱0.043 mg/mL、氧化苦参碱0.048 mg/mL、虎杖苷0.092 mg/mL、大黄素0.153 mg/mL的混合对照品溶液。取样品约1.0 g,精密称定,置具塞瓶中,加入甲醇25 mL,称定质量,超声(功率250 W,频率40 kHz)处理45 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。按除湿止痒软膏的处方及工艺,分别制备缺蛇床子、黄连及黄柏、白鲜皮、苦参、虎杖的阴性样品,按供试品溶液制备方法制备阴性对照品溶液。

2.3 方法学考察

系统适用性试验及专属性试验:取2.2项下3种溶液,按2.1项下色谱条件进样测定,记录色谱图。结果供试品溶液色谱中,在与混合对照品溶液色谱相应位置处有吸收峰,理论板数按蛇床子素峰计应大于5 000,分离度均大于1.5,阴性对照无干扰。详见图1。



1. 虎杖苷 2. 黄柏碱 3. 氧化苦参碱 4. 苦参碱 5. 小檗碱 6. 黄柏酮 7. 鞣酮 8. 蛇床子素 9. 大黄素

A. 混合对照品溶液 B. 供试品溶液 C. 缺蛇床子的阴性对照品溶液 D. 缺黄连、黄柏的阴性对照品溶液 E. 缺白鲜皮的阴性对照品溶液 F. 缺苦参的阴性对照品溶液 G. 缺虎杖的阴性对照品溶液

图1 高效液相色谱图

1. Polydatin 2. Phellodendrine 3. Oxymatrine 4. Matrine 5. Berberine 6. Flavonoid 7. Fraxinus 8. Osthol 9. Emodin

A. Mixed reference solution B. Test solution C. Negative reference solution without Fructus Cnidii D. Negative reference solution without Coptidis Rhizoma and Phellodendri Cortex E. Negative reference solution without Dictamni Cortex F. Negative reference solution without Sophorae Flavescentis Radix G. Negative reference solution without Polygoni Cuspidati Rhizoma et Radix

Fig. 1 HPLC chromatograms

线性关系考察:精密量取2.2项下混合对照品溶液0.2, 1.0, 2.0, 5.0, 8.0, 10.0 mL, 分别置10 mL容量瓶中,用甲醇定容,摇匀,滤过,按2.1项下色谱条件进样测定,记录色谱图。以待测成分质量浓度($X, \mu\text{g}/\text{mL}$)为横坐标,以峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归。结果见表1。

表1 线性关系考察结果($n=6$)

Tab. 1 Results of the linear relation test ($n=6$)

待测成分	回归方程	r	线性范围($\mu\text{g}/\text{mL}$)
蛇床子素	$Y_1 = 122.4X_1 - 63.2$	0.999 8	4.88~244.0
小檗碱	$Y_2 = 78.6X_2 - 42.7$	0.999 6	2.86~143.0
黄柏碱	$Y_3 = 50.3X_3 - 31.8$	0.998 7	1.16~58.0
黄柏酮	$Y_4 = 57.7X_4 - 34.6$	0.999 1	1.42~71.0
梲酮	$Y_5 = 21.6X_5 + 17.9$	0.999 5	0.58~29.0
苦参碱	$Y_6 = 37.2X_6 - 24.5$	0.999 4	0.86~43.0
氧化苦参碱	$Y_7 = 46.5X_7 - 29.4$	0.998 9	0.96~48.0
虎杖苷	$Y_8 = 62.6X_8 - 38.5$	0.999 7	1.84~92.0
大黄素	$Y_9 = 94.1X_9 - 58.8$	0.999 3	3.06~153.0

精密度试验:取2.2项下混合对照品溶液10 μL ,按2.1项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果蛇床子素、小檗碱、黄柏碱、黄柏酮、梲酮、苦参碱、氧化苦参碱、虎杖苷、大黄素峰面积的RSD分别为0.62%, 0.78%, 1.06%, 1.22%, 0.96%, 0.87%, 0.92%, 0.56%, 0.69% ($n=6$),表明仪器精密度良好。

稳定性试验:取2.2项下供试品溶液适量,分别于室温下放置0, 1, 2, 4, 8, 12, 24 h时按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果蛇床子素、小檗碱、黄柏碱、黄柏酮、梲酮、苦参碱、氧化苦参碱、虎杖苷、大黄素峰面积的RSD分别为0.73%, 0.84%, 1.16%, 1.26%, 1.04%, 0.94%, 0.98%, 0.63%, 0.77% ($n=7$),表明供试品溶液室温下放置24 h内基本稳定。

重复性试验:取同一份样品(批号为190205)适量,按2.2项下方法平行制备供试品溶液6份,按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算含量。结果蛇床子素、小檗碱、黄柏碱、黄柏酮、梲酮、苦参碱、氧化苦参碱、虎杖苷、大黄素平均含量分别为1.214, 0.711, 0.288, 0.351, 0.146, 0.214, 0.241, 0.462, 0.766 mg/g, RSD分别为0.67%, 0.81%, 1.09%, 1.24%, 0.98%, 0.91%, 0.96%, 0.59%, 0.72% ($n=6$),表明方法重复性良好。

加样回收试验:取已知含量的样品(批号为190205)9份,每份约0.5 g,分为3组,分别精密加入混合对照品溶液2.0, 2.5, 3.0 mL,按2.2项下方法制备供试品溶液,按2.1项下色谱条件进样测定,记录各成分的峰面积,计算加样回收率。结果见表2。

2.4 样品含量测定

取各批样品适量,按2.2项下方法制备供试品溶

液,按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算含量。结果见表3。

3 讨论

3.1 流动相选择

预试验中流动相考察了乙腈-0.1%磷酸溶液^[3-5]、乙腈-水^[6-7]、乙腈-无水乙醇-3%磷酸溶液^[8]、乙腈-0.4%磷酸溶液^[9]及甲醇-0.2%磷酸溶液对测定结果的影响^[10-11]。结果显示,以乙腈-0.1%磷酸溶液为流动相时,各色谱峰峰形及分离效果最佳,且方法的专属性、精密度、重复性和稳定性均较理想。

3.2 提取方式及提取溶剂选择

预试验中比较了回流提取、超声提取、柱纯化和直接稀释法这4种提取方式对测定结果的影响。结果显示,直接稀释法下待测成分含量明显低于回流提取、超声提取、柱纯化法(后三法的结果无显著差异)。鉴于超声提取更简便,且样品含有的十二烷基硫酸钠、甘油、羟苯乙酯、凡士林、十六醇损失最少,因此选择超声提取法。提取溶剂分别考察了无水乙醇^[2]、甲醇^[12-13]、50%乙醇^[14-15],结果显示以甲醇为溶剂时各成分综合提取效果最佳。

3.3 检测波长选择

采用DAD检测器在全波长范围内扫描上述9种待测成分的单一对照品溶液,结果在290 nm波长处虎杖苷、黄柏碱均有较强吸收,220 nm波长处氧化苦参碱、苦参碱、小檗碱、黄柏酮、梲酮均有强吸收,322 nm波长处蛇床子素有较强吸收,322 nm波长处大黄素有较强吸收,为确保各待测成分处于最佳检测波长,本试验中进行了波长切换。

3.4 方法评价

本研究中建立的HPLC法可用于同时测定除湿止痒软膏中9种成分含量,试验操作简便,结果准确可靠,可用于除湿止痒软膏的多指标质量控制。

参考文献

- [1] 段冀江,何红梅,李沙沙,等. HPLC法测定除湿止痒软膏中虎杖苷含量[J]. 辽宁中医药大学学报,2013,15(1):60-61.
- [2] 段冀江,何红梅,李沙沙,等. HPLC法测定除湿止痒软膏中蛇床子素含量[J]. 辽宁中医药大学学报,2012,14(12):189-190.
- [3] 朱利霞,汪旭,张汉扬,等. HPLC法同时测定白鲜皮中白鲜碱、黄柏酮和梲酮的含量[J]. 中华中医药学刊,2013,31(12):2706-2708.
- [4] 蔡国云,邢婧,张琳,等. UPLC-PDA同时测定三黄方药液10种成分含量[J]. 药物分析杂志,2016,36(8):1357-1363.
- [5] 苏静华,张超,孙磊,等. HPLC法同时测定黄连上清片的黄芩-黄连-黄柏药对中9个指标性成分的含量[J]. 药物分析杂志,2015,35(11):1940-1945.
- [6] 孔德暄,朱映睿,朱蔚然,等. HPLC同时测定虎杖根不同部位中的5种活性成分[J]. 中国现代中药,2020,22(1):53-57.

表2 加样回收试验结果(n=9)
Tab. 2 Results of the recovery test (n=9)

待测成分	取样量 (g)	样品含量 (mg)	加入量 (mg)	测得量 (mg)	回收率 (%)	\bar{X} (%)	RSD (%)	待测成分	取样量 (g)	样品含量 (mg)	加入量 (mg)	测得量 (mg)	回收率 (%)	\bar{X} (%)	RSD (%)
蛇床子素	0.504 3	0.612	0.488	1.095	98.98			苦参碱	0.501 7	0.073	0.073	0.145	98.63		
	0.501 9	0.609	0.488	1.091	98.77				0.505 1	0.074	0.087	0.160	98.85		
	0.502 8	0.610	0.488	1.097	99.80				0.504 9	0.074	0.087	0.161	100.00		
	0.503 5	0.611	0.610	1.219	99.67				0.503 1	0.073	0.087	0.159	98.85		
	0.502 9	0.611	0.610	1.227	100.98	99.37	0.72		0.504 3	0.108	0.086	0.192	97.67		
	0.501 7	0.609	0.610	1.213	99.02				0.501 9	0.107	0.086	0.193	100.00		
	0.505 1	0.613	0.732	1.341	99.45				0.502 8	0.108	0.086	0.193	98.84		
	0.504 9	0.613	0.732	1.336	98.77				0.503 5	0.108	0.108	0.215	99.07		
	0.503 1	0.611	0.732	1.335	98.91				0.502 9	0.108	0.108	0.214	98.15	98.82	1.13
小檗碱	0.504 3	0.359	0.286	0.641	98.60			0.501 7	0.107	0.108	0.212	97.22			
	0.501 9	0.357	0.286	0.642	99.65			0.505 1	0.108	0.129	0.238	100.78			
	0.502 8	0.357	0.286	0.641	99.30			0.504 9	0.108	0.129	0.236	99.22			
	0.503 5	0.358	0.358	0.711	98.60			0.503 1	0.108	0.129	0.235	98.45			
	0.502 9	0.358	0.358	0.712	98.88	99.77	0.98	氧化苦参碱	0.504 3	0.122	0.096	0.217	98.96		
	0.501 7	0.357	0.358	0.717	100.56			0.501 9	0.121	0.096	0.216	98.96			
	0.505 1	0.359	0.429	0.791	100.70			0.502 8	0.121	0.096	0.217	100.00			
	0.504 9	0.359	0.429	0.793	101.17			0.503 5	0.121	0.120	0.242	100.83			
	0.503 1	0.358	0.429	0.789	100.47			0.502 9	0.121	0.120	0.243	101.67	100.93	1.34	
黄柏碱	0.504 3	0.145	0.116	0.261	100.00			0.501 7	0.121	0.120	0.243	101.67			
	0.501 9	0.145	0.116	0.262	100.86			0.505 1	0.122	0.144	0.269	102.08			
	0.502 8	0.145	0.116	0.263	101.72			0.504 9	0.122	0.144	0.268	101.39			
	0.503 5	0.145	0.145	0.288	98.62			0.503 1	0.121	0.144	0.269	102.78			
	0.502 9	0.145	0.145	0.287	97.93	99.56	1.21	虎杖苷	0.504 3	0.233	0.184	0.414	98.37		
	0.501 7	0.144	0.145	0.287	98.62			0.501 9	0.232	0.184	0.415	99.46			
	0.505 1	0.145	0.174	0.319	100.00			0.502 8	0.232	0.184	0.413	98.37			
	0.504 9	0.145	0.174	0.318	99.43			0.503 5	0.233	0.230	0.459	98.26			
	0.503 1	0.145	0.174	0.317	98.85			0.502 9	0.232	0.230	0.458	98.26	98.94	0.82	
黄柏酮	0.504 3	0.177	0.142	0.318	99.30			0.501 7	0.232	0.230	0.461	99.57			
	0.501 9	0.176	0.142	0.319	100.70			0.505 1	0.233	0.276	0.504	98.19			
	0.502 8	0.176	0.142	0.318	100.00			0.504 9	0.233	0.276	0.508	99.64			
	0.503 5	0.177	0.178	0.351	97.75			0.503 1	0.232	0.276	0.509	100.36			
	0.502 9	0.177	0.178	0.352	98.31	99.48	1.16	大黄素	0.504 3	0.386	0.306	0.696	101.31		
	0.501 7	0.176	0.178	0.351	98.31			0.501 9	0.384	0.306	0.692	100.65			
	0.505 1	0.177	0.213	0.391	100.47			0.502 8	0.385	0.306	0.699	102.61			
	0.504 9	0.177	0.213	0.392	100.94			0.503 5	0.386	0.383	0.771	100.52			
	0.503 1	0.177	0.213	0.389	99.53			0.502 9	0.385	0.383	0.774	101.57	100.64	1.20	
鞣酮	0.504 3	0.074	0.058	0.131	98.28			0.501 7	0.384	0.383	0.772	101.31			
	0.501 9	0.073	0.058	0.132	101.72			0.505 1	0.387	0.459	0.841	98.91			
	0.502 8	0.073	0.058	0.131	100.00			0.504 9	0.387	0.459	0.842	99.13			
	0.503 5	0.074	0.073	0.144	95.89			0.503 1	0.385	0.459	0.843	99.78			
	0.502 9	0.073	0.073	0.145	98.63	98.98	1.59								

[7] 廉 莲,万国盛,贾伟利,等. HPLC 同时测定黄柏中 6 种化学成分含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(2): 94-97.

[8] 侯杰荣,柯发敏,侯思奎. HPLC 法同时测定苦参中 3 种生物碱的含量[J]. 中药材, 2014, 37(2): 273-275.