

HPLC 测定湿疹纳米乳喷雾剂中丹皮酚的含量

陈光宇¹,毛骁丽¹,何群^{2*},赵碧清¹,郭建生¹

(1. 湖南中医药大学药学院,长沙 410208; 2. 湖南中医药大学中药药剂学重点学科,长沙 410208)

[摘要] 目的:建立湿疹纳米乳喷雾剂中丹皮酚的 HPLC 定量方法,控制该制剂的质量。方法:采用高效液相色谱法,Phenomenex C₁₈-ODS 色谱柱,流动相甲醇-水(55:45),流速 1.0 mL·min⁻¹,检测波长 274 nm。结果:标准曲线线性范围在 10.0~100.0 mg·L⁻¹(*r*=0.999 9),48 h 内稳定,加样回收率 99.60%,RSD 1.123%。理论塔板数均在 6 000 以上。分离度达 1.5 以上。结论:方法简便、快速、灵敏、准确,稳定性及重复性好,可作为该制剂中丹皮酚含量测定的常规方法。

[关键词] 湿疹纳米乳喷雾剂; 高效液相色谱; 丹皮酚

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2012)24-0097-04

Determination of Paeonol Concentration
in Eczema Nanoemulsion Spray by HPLC

CHEN Guang-yu¹, MAO Xiao-li¹, HE Qun^{2*}, ZHAO Bi-qing¹, GUO Jian-sheng¹

(1. Hunan University of Traditional Chinese Medicine and Drug Traditional Chinese Medicinal Pharmaceutics
Key Subjects Changsha 410208, China; 2. Hunan University of Traditional Chinese Medicine
and Drug Modernization Laboratory of Traditional Chinese Medicine and Drug, Changsha 410208, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a method for the determination of paeonol in Eczema Nanoemulsion spray by HPLC. **Method:** Using HPLC technique, we detected the samples by the C₁₈ ODS column of Phenomenex company under the wave length at 274 nm, the chromatographic conditions were phenomenex C₁₈-ODS column, mobile phase of methanol-water (55:45), flow rate of 1.0 mL·min⁻¹ and detection wave-length at 274 nm. **Result:** The standard curve was linear over the range of 10.0-100.0 mg·L⁻¹, with the correlation coefficient of 0.999 9. It is steady in 48 hour. The average recovery was 99.70% with RSD 1.12% (*n*=9). The theoretical plates are above 6 000, separating degree is greater than 1.5. **Conclusion:** The analytical method is simple, rapid, sensitive, accurate; stability and reproducibility are good, and the method could be used to determine content of paeonol in a Chinese medicine Eczema Nanoemulsion spray.

[Key words] Eczema Nanoemulsion spray; HPLC; paeonol

湿疹纳米乳喷雾剂由湿疹喷雾剂改变处方及工艺制得,处方来源于湖南中医药大学著名皮肤科专家杨志波教授近几年创制的治疗慢性湿疹的外用经验方。通过药效试验^[1]从药材提取物^[2]筛选出 6 种有效组分,现由丹皮酚、苦参碱、盐酸小檗碱等 6 种中药材提取的有效成分组成,其中,丹皮酚为君药。对于各种制剂中丹皮酚的含量测定已有大量的报道,主要有紫外分光光度法、气相色谱法、高效液相色谱法(HPLC)等^[3],以后者应用的最多。由于本制剂中丹皮酚包在纳米乳的内相,需要先破乳提取出来再定量,故本实验建立了用 HPLC 测定该制剂中丹皮酚含量的方法,该法准确、灵敏、简便、快速、重复性好,为该制剂的质量控制提供了可控的定量方法。

1 材料

Agilent-1200LC 高效液相色谱系统(美国安捷

[收稿日期] 20110816(014)

[基金项目] 国家科技部“十一五”支撑计划(2008BAI53B042)

[第一作者] 陈光宇,研究生,从事剂型与疗效的研究,Tel: 15989257064, E-mail: 506972354@qq.com

[通讯作者] * 何群,教授,硕士生导师,从事剂型与疗效的研究, Tel: 0731-88458231, 13974930514, E-mail: hequn88@126.com

伦公司;包括 G1311A 四元梯度泵,G1313A 标准型自动进样器,G1316A 柱温箱,G1314A 紫外检测器,Agilent Chemstation 色谱工作站),UV 2450 型紫外可见分光光度计,KUDOS SK3300H 型浴式超声仪(上海科导超声仪器有限公司),MA110 型电子分析天平(上海第二天平仪器厂),丹皮酚对照品(中国药品生物制品检定所,批号 110708-200505),甲醇为色谱纯,水为重蒸馏水,其他试剂均为色谱纯。

湿疹纳米乳喷雾剂(中试产品):批号 20100903,20100904,20100905,共 3 批。

2 方法与结果

2.1 最大吸收波长的确定 取丹皮酚对照品适量,精密称定,加甲醇制成对照品溶液,置紫外分光光度计记录其紫外吸收光谱,结果显示丹皮酚在 274 nm 波长处有最大吸收,故选择 274 nm 作为测定波长。

2.2 对照品溶液的制备 取干燥至恒重的丹皮酚对照品约 10.0 mg,精密称定,置 10 mL 量瓶中,加甲醇溶解,并稀释至刻度,摇匀;精密量取 0.2 mL,置 10 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,即得(20.00 mg · L⁻¹)。

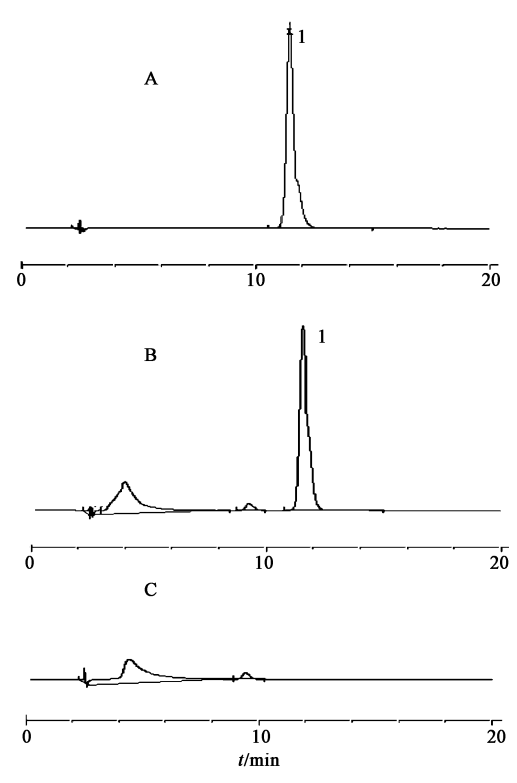
2.3 供试品溶液的制备 精密移取湿疹纳米乳喷雾剂中试样品(批号 20100903)2.0 mL,置 50 mL 量瓶中,用甲醇定容至刻度,超声处理 30 min,静置放冷,用甲醇补足至刻度^[3],摇匀,再精密移取稀释液 1.0 mL,置 10 mL 量瓶中用甲醇定容至刻度,摇匀,再经 0.45 μm 滤膜过滤即得供试液。

2.4 阴性对照液的制备 按处方比例称取除去丹皮酚的其他药物,依照湿疹纳米乳喷雾剂的制备工艺和供试品溶液的制备方法制备阴性对照液。

2.5 色谱条件 Phenomenex C₁₈-ODS 色谱柱(4.6 mm × 250 mm,5 μm),流动相甲醇-水(55:45),检测波长 274 nm,流速 1.0 mL · min⁻¹,柱温 30 ℃,理论塔板数以丹皮酚计不低于 5 000,分离度 > 1.5。

2.6 分离条件的考察 精密吸取供试品溶液、对照品溶液、阴性对照液各 10 μL,分别注入高效液相色谱仪,按 2.5 项下色谱条件进样分析。供试品色谱中,在与对照品色谱相应的位置上有一相同的色谱峰,而阴性对照液未见干扰(图 1)。

2.7 线性范围考察 分别精密移取丹皮酚对照品储备液(每 1 mL 含 1.00 mg 的溶液)0.1,0.2,0.4,0.6,0.8,1.0 mL 对照品溶液,置 10 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,即得 10.0,20.0,40.0,60.0,80.0,100.0 mg · L⁻¹ 的对照品溶液,分别过



A. 对照品;B. 样品;C. 阴性样品;1. 丹皮酚

图 1 对照品、湿疹纳米乳喷雾剂中试样品、阴性样品色谱图
0.45 μm 滤膜,按上述 2.5 色谱条件,分别进样 10 μL,测定峰面积积分值,以峰面积积分值为纵坐标 A、丹皮酚浓度 C 为横坐标绘制标准曲线,计算得回归方程:A = 60.31C + 23.40 (R² = 0.999 9),表明丹皮酚质量浓度在 10.0 ~ 100.0 mg · L⁻¹ 呈良好的线性关系。

2.8 超声提取时间的考察 选择常用的超声提取时间 15,30,45 min 进行考察。

取湿疹纳米乳喷雾剂中试样品(批号 20100903)9 份,分成 3 组,每组每份精密移取 2.0 mL,置 50 mL 量瓶中,用甲醇定容至刻度,每组分别超声处理(功率 250 W,频率 33 kHz)15,30,45 min,静置放冷,用甲醇补足至刻度,摇匀。再精密移取稀释液 1.0 mL,置 10 mL 量瓶中用甲醇定容至刻度,摇匀。再经 0.45 μm 微孔滤膜过滤即得。每组重复 3 次(平行作 3 份),每份按上述色谱条件分别进样 10 μL,结果见表 1,方差分析见表 2,多重比较见表 3。

根据表 3,显然, $\bar{x}_2$ 与 $\bar{x}_3$, $\bar{x}_1$ 与 $\bar{x}_2$ 两组间有统计意义; $\bar{x}_1$ 与 $\bar{x}_3$ 之间无统计意义,故供试品的超声提取时间 15,45 min 之间无统计意义,30,15 min 之间,30,45 min 之间有统计意义,丹皮酚含量平均值越高,提取量越多,所以在超声提取 30 min 之前未

表 1 不同超声时间提取制备的供试液丹皮酚含量测定

重复 次数	不同提取时间丹皮酚含量/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$					
	15 min	理论塔板数	30 min	理论塔板数	45 min	理论塔板数
1	4.652	4621	4.728	8 282	4.699	8 211
2	4.632	4 669	4.728	8 217	4.689	8 219
3	4.621	4 721	4.775	8 124	4.604	8 187
$\bar{x}$	4.635	4 670	4.744	8 208	4.664	8 206

表 2 不同超声提取时间下制备的供试液中
丹皮酚含量的方差分析

变异来源	平方和	自由度	均方	<i>F</i>	<i>P</i>
处理间	1 185.838	2	592.919 2	7.75	0.021 7
处理内	459.052 2	6	76.508 7		
总变异	1 644.891	8			

表 3 LSD 法多重比较(下三角为均值差,上三角为显著水平)

No.	均值	2	3	1
2	1 186.037		0.031 2	0.009
3	1 166.051	19.985 6		0.356 4
1	1 158.917	27.120 3	7.134 7	

注:LSD05 = 17.475 4, LSD01 = 26.477 8。

提取完全,30 min 时提取完全,30 min 后丹皮酚含量反而下降,因此,超声提取时间采用 30 min 最佳。

2.9 仪器精密度试验 精密吸取同一对照品溶液,重复进样 6 次,每次进样 10 μL ,测定峰面积积分值,计算得丹皮酚 RSD 0.174% ($n = 6$)。

精密吸取同一批号供试品溶液,重复进样 6 次,每次进样 10 μL ,测定峰面积积分值,计算得丹皮酚 RSD 0.088% ($n = 6$)。

2.10 稳定性试验 分别精密移取同一批号供试品溶液,分别在 0,4,8,12,24,48 h 进样 10 μL ,按供试液项下测定其丹皮酚峰面积积分值,并且计算得 RSD 0.74% ($n = 6$)。

结果说明供试品溶液在 48 h 内峰面积积分值的变化不是由丹皮酚氧化分解所致,而是测定误差引起的,测定误差的 RSD < 2%,符合定量分析要求,可认为供试品溶液在 48 h 内基本稳定,故供试品溶液丹皮酚含量测定应在 48 h 内完成。

2.11 精密度试验 取批号为 20100903 的供试品,精密移取 2.0 mL,共 6 份,置 50 mL 量瓶中,用甲醇定容至刻度,超声处理 30 min,静置放冷,用甲醇补足至刻度,摇匀。再精密移取稀释液 1.0 mL,置 10 mL 量瓶中用甲醇定容至刻度,摇匀。再经

0.45 μm 滤膜过滤即得。按 **2.5** 色谱条件分别进样 10 μL 测定其丹皮酚峰面积积分值,计算得平均含量为 4.630 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,RSD 1.76 %,说明该分析方法的重复性良好。

2.12 加样回收率实验 精密称取已知含量的同一批号的湿疹纳米乳喷雾剂中试样品(批号 20100903,含量 4.630 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)1.0 mL,分别加 1.000 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 丹皮酚 4.0,5.0,6.0 mL,用甲醇定为 50 mL,再精密移取 1 mL,用甲醇定容至 10 mL。过滤,即得。按 **2.5** 色谱条件分别进样 10 μL 测定其丹皮酚峰面积积分值,计算回收率,见表 5。

表 5 丹皮酚加样回收率试验($n = 9$)

No.	样品中含量 / $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	加入量 / mg	实测量 / mg	回收率 /%	平均 回收率 /%	RSD /%
1	4.630	4.000	8.615	99.62		
2	4.630	4.000	8.628	99.95		
3	4.630	4.000	8.628	99.95		
4	4.630	5.000	9.613	99.66		
5	4.630	5.000	9.631	100.02	99.66	1.123
6	4.630	5.000	9.727	101.94		
7	4.630	6.000	10.50	97.83		
8	4.630	6.000	10.57	99.00		
9	4.630	6.000	10.57	99.00		

2.13 湿疹纳米乳喷雾剂中丹皮酚的含量测定 取 3 批(批号为 20100903, 20100904, 20100905)湿疹纳米乳喷雾剂,分别按供试品溶液制备方法制备供试液,测定 3 批样品中丹皮酚的含量,结果见表 6,统计学结果见表 7,由表 7 结果可知样品 3 个批次之间的丹皮酚含量无统计学意义,但是每个批号的 RSD < 2%,皆符合含量测定的要求。

3 讨论

采用了纳米技术制备纳米乳,丹皮酚是包在纳米乳的内相,在含量测定中,必须采用超声法破乳将丹皮酚提取出来。考察了 15,30,45 min 的超声效果,结果 30 min 提取效果最好,能够使丹皮酚完全提取出来,又不因时间过长而使丹皮酚分解损失,且塔板理论数均到达 8 000 以上,至于超声时间与理论塔板数之间的关系,可能的解释是:湿疹喷雾剂中丹皮酚包在纳米乳中,粒径在 40 ~ 50 nm 属胶体分散体系,未破乳的纳米乳堵塞色谱柱固定相填料,影

表 6 湿疹纳米乳喷雾剂中丹皮酚含量测定

样品批号	样品	峰面积	丹皮酚含量	平均值	RSD
	编号	积分值	/g·L ⁻¹	/g ·L ⁻¹	/%
20100903	1	1 194. 2	4. 776	4. 630	1. 76
	2	1 166. 3	4. 665		
	3	1 138. 9	4. 555		
	4	1 151. 2	4. 604		
20100904	5	1 154. 6	4. 618	4. 611	0. 58
	6	1 141. 2	4. 564		
	7	1 158. 5	4. 633		
	8	1 154. 6	4. 618		
20100905	9	1 145. 4	4. 581	4. 633	0. 38
	10	1 161. 6	4. 646		
	11	1 160. 5	4. 641		
	12	1 153. 4	4. 613		

表 7 不同样品批号之间丹皮酚含量测定方差分析

变异来源	平方和	自由度	均方	<i>F</i>	<i>P</i>
处理间	0. 001 0	2	0. 000 5		
处理内	0. 035 4	9	0. 003 9	0. 124 0	0. 884 5
总变异	0. 036 4	11			

响柱效(影响分离效果),使理论塔板数降低,超声提取 30 min 使其完全破乳,没有大分子干扰分离效果,测定结果准确、可靠、符合定量分析要求。

HPLC 分析时流动相的组成和配比,本文参考了一些文献报道^[3-4],并针对本制剂处方的特点进行了探索,结果以甲醇-水(55:45)的分离效果较好。

[参考文献]

[1] 王彦礼,包旭红,王怡薇,等. 青鹏膏剂对豚鼠瘙痒及湿疹模型的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(14):233.

[2] 孙梦锦,何群,赵碧清,等. 湿疹喷雾剂醇沉纯化工艺的研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2009,15(12):45.

[3] HE Qun, LIU Ping-an, ZHAO Bi-qing, ect. Determination of Paeonol in Yuxianling Granules by HPLC [J]. J China Pharm(中国药房),2007, 18(15): 1154.

[4] ZHAO Bi-qing, HE Qun, ZHANG Chun-tao, ect. Determination of content of paeonol in Eczema Spray by HPLC [J]. Chinese Medicinal Herb(中草药),2005, 36(3): 381.

[5] 付成效,何群,周军,等. 湿疹喷雾剂的蒸馏与水提取工艺研究[J]. 湖南中医学院学报,2005,25(5):24.

[责任编辑 顾雪竹]

《中国中药杂志》2013 年征订启事

《中国中药杂志》系中国科协主管,中国药学会主办,中国中医科学院中药研究所承办的综合性中药学术期刊。创刊于 1955 年 7 月,是创刊最早、发行量最大的中药学术刊物。《中国中药杂志》全面反映我国中医科研最高学术水平,主要报道该领域新成果、新技术、新方法与新思路,内容包括栽培、资源与鉴定、炮制、药剂、化学、药理、不良反应、临床等。设有专论、综述、研究论文、研究报告、临床、学术探讨、药事管理、经验交流、信息等栏目。主要读者对象为医药领域各级管理部门、研究院所、大专院校、企业以及医院等从事医药科研、管理、生产、医院制剂及临床研究等方面的专业人员。

《中国中药杂志》现为半月刊,128 页,2013 年定价每期 30 元,全年 24 期定价为 720 元。国内刊号 11 - 2272/R,国际刊号 1101 - 5302。

本刊现已全面实现网络编辑办公,如欲投稿或联系本刊、获取本刊各种信息动态请登录中国中药杂志网站 www. cjcm. com. cn 或 www. 中国中药杂志. com。

联系电话:稿件查询 010 - 64045830 转 602;主任电话 010 - 64058556;资源与栽培栏编辑:010 - 64048925;制剂栏编辑:010 - 64040392;化学栏编辑:010 - 64040113;药理栏编辑:010 - 84022522;临床栏编辑:010 - 64059766;电子杂志制作发行及网上维护:010 - 64030625。