

· 论 著 ·

复方甘草软膏的制备及含量测定法的建立

王 闰, 孟 慧, 许 勇

[摘要] **目的** 以甘草提取物和盐酸多塞平为主药制备复方甘草软膏,并建立质量标准。**方法** 使用 O/W 法制备软膏,采用薄层色谱法(TLC)鉴别甘草、采用紫外扫描法(UV)鉴别盐酸多塞平;采用高效液相色谱法(HPLC)测定软膏中甘草酸和盐酸多塞平的含量。**结果** 通过比移值(Rf 值)的比较可鉴定软膏中的甘草提取物;通过紫外扫描的吸收峰来鉴别软膏中的多塞平。采取不同的色谱条件在波长 252 nm 及 290 nm 处分别测定软膏中的甘草酸和多塞平的含量。测定三个批次的复方甘草软膏,每克软膏中甘草酸的含量均大于 16.2 mg,多塞平的含量均在 45 ~ 55 mg。**结论** 复方甘草软膏中的主药甘草及盐酸多塞平可以通过薄层色谱和紫外鉴定,采用高效液相色谱可以测定软膏中主药的含量。

[关键词] 甘草;盐酸多塞平;软膏;薄层色谱;紫外;高效液相色谱;质量标准

[中图分类号] R927.2 **[文献标志码]** A doi:10.3969/j.issn.1672-271X.2015.04.017

To prepare the compound liquorice ointment and establish the determination method of the compound liquorice ointment

WANG Run, MENG Hui, XU Yong. Department of Pharmacy, 85 Hospital of PLA, Shanghai 200052, China

[Abstract] **Objective** To prepare the compound liquorice ointment with the extract of liquorice and doxepin hydrochloride, and to establish the quality standard of this ointment. **Methods** The extract of liquorice was identified by TLC, and doxepin hydrochloride was identified by UV. The content of glycyrrhizic acid and doxepin hydrochloride of the ointment was determined by HPLC. **Results** The extract of liquorice could be identified through the comparison of the Rf value. Doxepin hydrochloride could be identified through the absorption peak of UV. The content of glycyrrhizic acid and doxepin hydrochloride of the ointment was determined by HPLC with the different chromatographic condition at 252 nm and 290 nm. To determine the three batches of the ointment, the content of glycyrrhizic acid was above 16.2 mg in each gram ointment, and doxepin hydrochloride was between 45 - 55 mg. **Conclusion** The extract of liquorice and doxepin hydrochloride could be identified by TLC and UV. The principal agent content of ointment could be determined by HPLC.

[Key words] licorice; doxepin hydrochloride; ointment; thin layer chromatography; UV; high performance liquid chromatography; quality standard

复方甘草软膏是我院的自制制剂,主要成分为甘草提取物及盐酸多塞平,用于荨麻疹、湿疹、过敏性皮炎、神经性皮炎及其引起的皮肤瘙痒,临床疗效较好。现代药理研究证实,甘草中皂甙类成分具有肾上腺皮质激素样作用和抗炎、抗变态反应等作用^[1-3];盐酸多塞平是传统的三环类抗抑郁药,近年来研究发现,多塞平尚有很强的抗 H1 与 H2 受体作用,其拮抗 H1 受体的作用较传统的抗组胺药苯海拉明强 100 倍^[4],临床上新用于治疗相关的皮肤病^[5-7]。我院根据甘草提取物和盐酸多塞平药理作用,设计组方制备了复方甘草软膏,在临床取得了较好的疗效。为了保证医院制剂的质量,确保临床用药安全,本文建立了复方甘草软膏鉴别方法及含量测定方法。

1 试剂与仪器

甘草提取物(上海沪丰生物科技有限公司,药用,批号:20120306),盐酸多塞平(上海沪丰生物科技有限公司,药用,批号:20120515),甘草对照药材(新疆参茸中药饮片有限公司提供,批号:12032203),盐酸多塞平对照品(上海西问实业有限公司,批号:20120408),甘草酸标准品(中国食品药品检定研究院,批号:110731-201116),甲醇(色谱纯,美国 Fisher 公司),乙腈(色谱纯,美国 SIGMA-ALDRICH 公司),紫外分光光度仪(Lambda 14,美国 Perkin Elmer 公司),Waters 高效液相色谱仪(515 型单元泵 + 2487 型紫外检测器,美国 Waters 公司)。

2 实验方法

2.1 复方甘草软膏的制备 称取硬脂酸 100 g、

作者单位: 200052 上海,解放军 85 医院药剂科
通讯作者: 许 勇, E-mail: hello_liuliu_0@163.com

单硬脂酸甘油酯 75 g、16 醇 20 g、18 醇 20 g、白凡士林 50 g、羊毛脂 20 g,混合加热融化,保持温度 80 ℃;另取甘油 50 g、三乙醇胺 8 g、吐温-80 5 g、尼泊金甲酯 1 g、尼泊金乙酯 1 g 加纯化水 100 mL 加热溶解,保持温度 80 ℃,在搅拌下缓缓加入到上述油相中,继续搅拌乳化形成基质;将盐酸多塞平 50 g 溶解在 80 ℃ 165 mL 纯化水中,再加入甘草提取物 250 g 调成糊状后与上述基质混合,加入氮酮 15 g 和 N-甲基吡咯烷酮 15 g,搅拌均匀,待降温至 40 ℃,将 30 g 薄荷脑溶于 30 g 液体石蜡中,再以等量递加法分次加入到以上混合物中,搅拌均匀至室温既得。

2.2 复方甘草软膏的鉴别 破乳:取适量的复方甘草软膏于 100 mL 烧杯中,加 10% 氯化钠溶液 10 mL、甲醇 40 mL,水浴加热融化,加入冰浴中 10 min,破乳提取后再经滤纸滤入 100 mL 的容量瓶中,取下滤纸放入烧杯中;再加入 10% 氯化钠溶液 5 mL、甲醇 20 mL,水浴加热融化后,加入冰浴中 10 min,再次破乳提取,合并滤入 100 mL 的容量瓶中。取下滤纸放入烧杯中,此次只加入 20 mL 甲醇溶液,同法滤入至 100 mL 容量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀。

2.2.1 甘草的鉴别 取甘草对照药材 1 g,加乙醚 40 mL,加热回流 1h,滤过,药渣加甲醇 30 mL,加热回流 1h,滤过,滤液蒸干,残渣分成两份,一份用甲醇溶解,一份用水溶解作为两组对照;与样品提取液一同点样于硅胶 G 薄层板上,以正丁醇-浓氨试液-水-乙醇(13:1:4:2)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以 10% 硫酸乙醇溶液,在 105 ℃ 加热至斑点显色,于紫外灯下检视,并计算比移值(R_f 值)。

2.2.2 盐酸多塞平的鉴别 取盐酸多塞对照品 10 mg 于 100 mL 量瓶中,加入 10% 氯化钠溶液 15 mL,用甲醇稀释至刻度,摇匀作为对照。

取复方甘草软膏 0.5 g 于 100 mL 烧杯中,以 1 mol/L HCL-甲醇溶液为溶剂,10% 氯化钠溶液进行破乳提取,与甘草提取方法相同,提取盐酸多塞平,作为样品。另取未加盐酸多塞平,只加等量甘草提取物的同基质软膏,同法提取,作为样品的空白校正。于波长 200 ~ 400 nm 测定其紫外吸收,以及其在最高吸光度的吸收波长。

2.3 含量测定方法

2.3.1 甘草酸的测定 色谱条件:色谱柱:Waters C18 柱(3.9 × 150 mm),粒度:5 μm,柱温:室温,流动相:乙腈-0.01 mol/L 磷酸(30:70),流速:1.0 mL/min,检测波长:252 nm,进样量:20 μL。

标准品的制备:将甘草酸标准品 20 mg,置于 50 mL 棕色容量瓶中,加适量甲醇超声溶解,稀释至刻

度,冷藏备用。

样品的制备:取复方甘草软膏 0.2 g 于 100 mL 烧杯中,加入 20 mL 流动相,10% 氯化钠 5 mL,水浴加热融化后,加入冰浴中 10 min,破乳提取后经有机滤膜滤入 50 mL 量瓶中,取滤膜放入烧杯加入 15 mL 流动相,10% 氯化钠 3 mL,水浴加热至融化后加入冰浴中 10 min,破乳提取后经有机滤膜一并滤入 50 mL 量瓶中,加流动相稀释至刻度,摇匀备用。

将标准液分别配置为浓度为 1.25、6.25、12.5、25、50 μg/mL 的溶液,精密吸取 20 μL 进样,记录色谱峰面积,以峰面积为纵坐标(y),以标准品浓度为横坐标(x)进行回归分析,计算回归方程。

2.3.2 盐酸多塞平的测定 色谱条件:色谱柱:Waters C18 柱(4.6 × 150 mm),粒度:5 μm,柱温:室温,流动相:甲醇-乙腈-0.02 mol/L 磷酸二氢钠(35:20:45),用 2.0 mol/L 磷酸调 pH 至 2.5,流速:1.0 mL/min,检测波长:290 nm,进样量:20 μL。

对照品的制备:将盐酸多塞平对照品 20 mg,置于 50 mL 棕色容量瓶中,加适量甲醇超声溶解,稀释至刻度,冷藏备用。

样品的制备:方法同 2.3.1 项下的样品制备。

将对照品溶液分别配置为浓度为 1.25、6.25、12.5、25、50 μg/mL 的溶液,精密吸取 20 μL 进样,记录色谱峰面积,以峰面积为纵坐标(y),以标准品浓度为横坐标(x)进行回归分析,计算回归方程。

精密吸取浓度为 12.5 μg/mL 的甘草酸标准品溶液和多塞平对照品溶液 20 μL,分别在其色谱条件下,连续进样 5 次,计算其相对标准偏差(RSD),考察测定方法的精密度;精密吸取浓度为 12.5 μg/mL 的甘草酸标准品溶液和多塞平对照品溶液 20 μL,分别在其色谱条件下,于 0、2、4、8、12、24 h 测定,测定甘草酸和多塞平的峰面积,计算其 RSD,考察测定方法的稳定性;取复方甘草软膏(批号 20140310),按 2.3 项下方法制备样品溶液 6 份,分别在不同色谱条件下,求得甘草酸和多塞平的峰面积,计算其 RSD,考察测定方法的重复性。

3 结果

3.1 乳膏的制备 所制备品为棕色软膏,气微香。

3.2 复方甘草软膏的鉴别

3.2.1 甘草薄层色谱(TLC)鉴别 复方甘草软膏中的甘草成分使用薄层色谱法进行鉴定。如图 1 所示,软膏样品的 $R_f = 1.5/7.5 = 0.2$,对照药材(甲醇、水)的 $R_f = 1.5/7.5 = 0.2$,根据薄层色谱的结果,表明制备的软膏中含有甘草成分。



图1 甘草鉴定的播出色谱图

3.2.2 多塞平的紫外鉴别 多塞平对照品和复方甘草软膏的紫外扫描分别见图2、图3,多塞平对照品和样品均在298 nm处有特征的紫外吸收,参考文献中多塞平在297 nm处有最大的紫外吸收^[8],根据紫外扫描图谱,表明制备的软膏中含有多塞平成分。在软膏样品进行紫外扫描时需排除甘草成分的干扰,因此同法制备只含甘草成分的软膏(不含多塞平),进行破乳提取,作为样品测定时的空白对照。

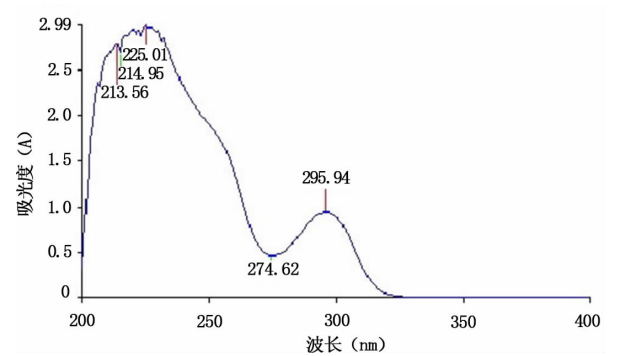


图2 多塞平对照品紫外-可见扫描图谱

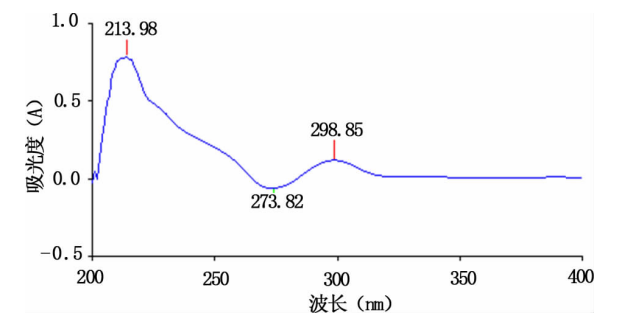


图3 软膏样品紫外-可见扫描图谱

3.3 含量测定方法

3.3.1 甘草酸和多塞平的测定 甘草酸标准品及软膏样品的高压液相(HPLC)图谱见图4、图5,以峰

面积为纵坐标(y),以标准品浓度为横坐标(x)进行回归分析,得回归方程: $y = 50\ 152x + 12\ 391$ ($r = 0.9996$),线性范围为1.25~50 μg/mL。

多塞平对照品及软膏样品的HPLC图谱见图6、图7,以峰面积为纵坐标(y),以标准品浓度为横坐标(x)进行回归分析,得回归方程: $y = 32\ 367x + 674\ 630$ ($R = 0.9995$),线性范围为1.25~50 μg/mL。

精密度实验,甘草酸和多塞平的RSD分别为0.78%和1.04%;稳定性实验,甘草酸和多塞平的RSD分别为0.75%和1.06%;重复性实验;甘草酸和多塞平的RSD分别为1.13%,1.45%。表明该测定方法符合要求。

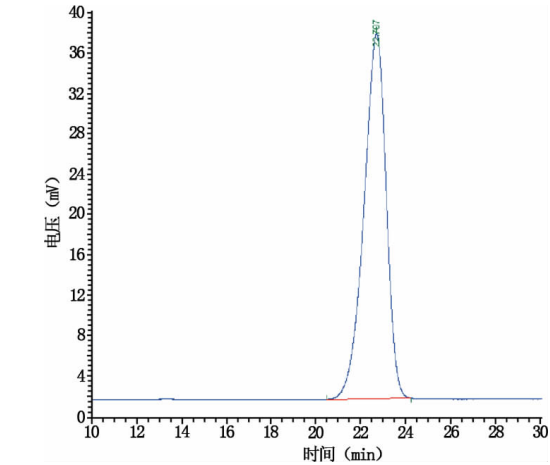


图4 甘草酸标准品的HPLC图谱

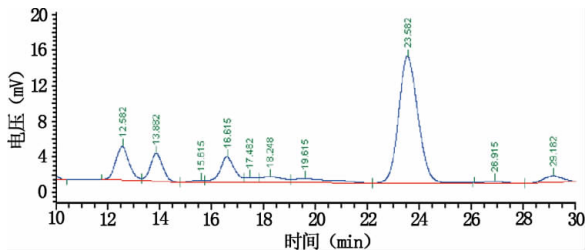


图5 甘草酸样品的HPLC图谱

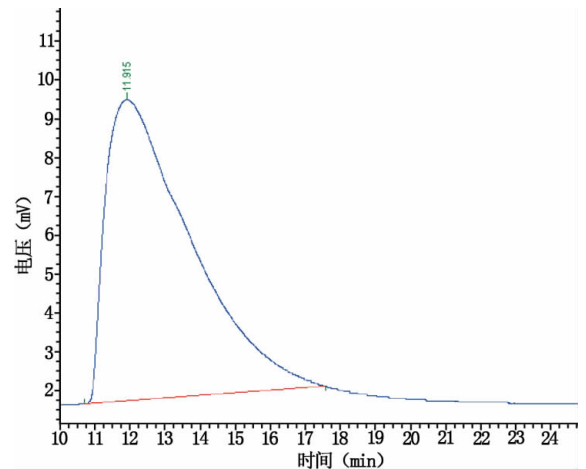


图6 多塞平对照品的HPLC图谱

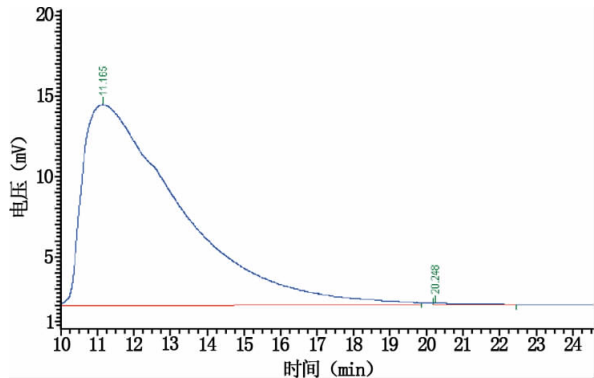


图 7 多塞平样品的 HPLC 图谱

3.3.2 样品测定 参考《中国药典》中相关的质量标准,规定本品 1g 软膏中甘草酸不得少于 16.2 mg,多塞平的含量应为 45 ~ 55 mg。取三组不同批号的软膏,测定甘草酸和多塞平的含量,结果见表 1,均符合规定的质量标准。

表 1 复方甘草软膏中甘草酸和多塞平的含量 (mg/g 软膏)

批号	甘草酸	多塞平
20140310	21.06	50.59
20140415	18.50	52.26
20140428	24.44	54.56

4 讨 论

考虑到软膏中成分复杂,在测定甘草酸含量时,通过调整流动相极性延长了保留时间,从而排除干扰,达到准确测定的目的^[9]。在测定多塞平时,选择了与测定甘草酸不同的流动相,文献报道多塞平存在异构体^[10],色谱可能出现双峰。依照相关文献^[11-12],采用 2.0 mol/L 磷酸调流动相的 pH 至 2.5,取得了较好的结果。

关于复方甘草软膏中甘草酸和多塞平的含量的标准,参考了《中国药典》中复方甘草片及盐酸多塞平片的含量标准。复方甘草片的药典标准为每片含甘草浸膏粉 112.5 mg,含甘草酸不得少于 7.3 mg;而每克软膏中含有甘草提取物 250 mg,根据复方甘

草片中含甘草浸膏粉的量,折算得每克软膏中甘草酸不得少于 16.2 mg,而测定的三批制剂,每克软膏中甘草酸都大于 16.2 mg。盐酸多塞平片的药典标准为每片含多塞平应为标示量的 90% ~ 110%,根据软膏制备时的投药量,每克软膏中多塞平的标示量为 50 mg,即每克软膏中多塞平的含量应为 45 ~ 55 mg,而测定的三批制剂,每克软膏中多塞平的含量均在标示量的 90% ~ 110%。本文所制定的含量标准可以更好地控制软膏的质量,保证临床的疗效。

【参考文献】

[1] 王 兵,王亚新,赵红燕,等. 甘草的主要成分及其药理作用的研究进展[J]. 吉林医药学院学报,2013,34(3):215-218.

[2] 张明发,沈雅琴,张艳霞. 甘草及其有效成分的皮肤药理和临床应用药物评价研究[J]. 药物评价研究,2013,36(2):146-156.

[3] 王 娟. 甘草制剂在部分皮肤病治疗中的应用研究[J]. 中国中医药资讯,2012,4(4):17-18.

[4] 郭源源,王 晖. 多塞平非抗精神病的药理作用与临床应用[J]. 医药导报,2007,26(1):84-86.

[5] 潘经媛,邱银生,严汉池,等. 盐酸多塞平乳膏的止痒和抗过敏作用[J]. 中国药理学通报,2005,21(12):1505-1508.

[6] 兰建平. 依巴斯汀联合多塞平治疗慢性特发性荨麻疹 60 例临床观察[J]. 皮肤病与性病,2010,32(3):34-35.

[7] 鲁格平,孙治华,刘运华,等. 多虑平治疗尿毒症皮肤瘙痒临床疗效分析(附 56 例临床报告)[J]. 国际泌尿系统杂志,2013,33(6):869-870.

[8] 中华人民共和国药典二部[M]. 2010 版,北京:中国医药科技出版社,2010:695-695.

[9] 钟桂香,严 佳,黄爱文,等. 高效液相色谱法测定氯化铵甘草口服溶液中吗啡、愈创甘油醚和甘草酸的含量[J]. 东南国防医药,2014,16(3):229-232.

[10] 楼丽君,张剑英,周静安,等. 高效液相色谱法测定血清中多塞平异构体含量[J]. 医药导报,2006,25(9):962-963.

[11] 陈新善. HPLC-测定复方盐酸多塞平胶囊中盐酸多塞平与盐酸可乐定的含量[J]. 中国药事,1998,12(4):223-225.

[12] 张肖玲,张 蜀,邓 红,等. 盐酸多塞平乳膏的经皮渗透性比较研究[J]. 中国新药杂志,2013,22(4):477-481.

(收稿日期:2015-04-19;修回日期:2015-06-05)

(本文编辑:张仲书; 英文编辑:王建东)