

老年咳喘片的质量标准研究

陈洪英*, 刘显锋

(河南省宛西制药股份有限公司, 河南 南阳 473000)

[摘要] 目的: 建立老年咳喘片(薄膜衣片)薄层鉴别及含量测定方法。方法: 采用 TLC 对补骨脂中补骨脂素、异补骨脂素, 淫羊藿中淫羊藿苷进行定性鉴别; 采用 HPLC-ELSD 测定了黄芪中黄芪甲苷的含量。结果: 在 0.966 9 ~6.446 μg , 黄芪甲苷峰面积常用对数值与进样量常用对数值呈良好的线性关系, $r=0.999 8$, 平均回收率为 96.5%, RSD 为 1.05%。结论: 薄层色谱法呈现斑点清晰, 专属性强; HPLC-ELSD 简便准确, 重复性好, 可有效控制老年咳喘片(薄膜衣片)的质量。

[关键词] 补骨脂素; 异补骨脂素; 淫羊藿苷; 黄芪甲苷

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2010)10-0080-03

老年咳喘片收载在中华人民共和国卫生部药品标准中药成方制剂第九册^[1]上, 为糖衣片。由黄芪、淫羊藿、补骨脂、防风等中药组成。为了减少无效成分的服用量便于患者服用, 增加了薄膜衣规格。由于原标准下收载了简单的理化鉴别, 不能有效地控制药品质量, 故对其质量标准进行了修订, 增加了补骨脂、淫羊藿的薄层鉴别, 并增加了黄芪甲苷的含量测定, 经方法学考察, 方法简便, 重现性好, 精密度高, 可有效控制老年咳喘片(薄膜衣片)的质量。

1 材料

1.1 仪器 Agilent 1100 高效液相色谱仪及其化学工作站, ELSD2000ES 蒸发光散射检测器(Alltech 公司), YOKO-ZS 紫外线分析投影仪(武汉药科新技术开发有限公司) 德国 BP211D Satorius1/10 万电子天平。

1.2 试药 老年咳喘片(薄膜衣片)与缺补骨脂、淫羊藿、黄芪阴性样品, 由本公司提供。补骨脂素对照品(110739-200814 含量测定用)、异补骨脂素对照品(1107038-200309 含量测定用), 黄芪甲苷对照品(110781-200613 含量测定用)均购于中国药品生物制品检定所。硅胶 G, H 由青岛海洋化工厂生产。乙腈为色谱纯, 水为纯化水, 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 薄层鉴别

2.1.1 补骨脂的鉴别^[2] 取本品 10 片, 除去薄膜

衣, 研细, 加乙酸乙酯 20 mL, 超声处理 15 min, 滤过, 滤液蒸干, 残渣加乙酸乙酯 1 mL 使溶解, 作为供试品溶液。另取补骨脂素、异补骨脂素对照品, 加乙酸乙酯制成每 1 mL 各含 2 mg 的混合溶液, 作为对照品溶液。再取不含补骨脂的阴性样品, 制成阴性对照样品溶液。吸取上述 3 种溶液各 5 μL , 分别点于同一以羧甲基纤维素钠为黏合剂的硅胶 G 薄层板上, 以正己烷-乙酸乙酯(4:1)为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 喷以 10% 氢氧化钾甲醇溶液, 置紫外灯(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 2 个相同颜色的荧光斑点, 阴性对照样品溶液不显斑点。

2.1.2 淫羊藿的鉴别^[2] 取本品 10 片, 除去薄膜衣, 研细, 加乙醇 20 mL, 温浸 30 min, 滤过, 滤液蒸干, 残渣加少量甲醇润湿, 加水 2 mL 使溶解, 通过 D101 型大孔吸附树脂(内径 1.5 cm, 柱高 10 cm)上, 以 3 mL \cdot min⁻¹ 的流速, 分别用水、30% 乙醇各 50 mL 洗脱, 再用 70% 乙醇洗脱, 收集 70% 乙醇洗脱液 50 mL, 蒸干, 残渣加 1 mL 甲醇使溶解, 作为供试品溶液, 另取淫羊藿苷对照品, 加甲醇制成每 1 mL 含 0.2 mg 的溶液, 作为对照品溶液。再取不含淫羊藿的阴性样品, 制备阴性对照溶液。吸取上述 3 种溶液各 10 μL , 分别点于同一以羧甲基纤维素钠为黏合剂的硅胶 H 薄层板上, 以乙酸乙酯-丁酮-甲酸-水(10:1:1:1)为展开剂, 展开, 取出, 晾干。喷以 AlCl_3 试液, 置紫外灯(365 nm)下检视, 供试品色谱中, 在与对照品色谱中相应位置上, 显相同颜色的荧光斑点, 阴性对照样品溶液不显斑点。

2.2 含量测定

[收稿日期] 2010-05-04

[通讯作者] * 陈洪英, 主管药师, 从事新药开发及质量标准的研究, Tel: 0377-63536961, E-mail: yfbwanxi@163.com

2.2.1 色谱条件 色谱柱 Hypersil ODSC₁₈ (4.0 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相乙腈-水 (32:68); 流速 1.0 mL · min⁻¹; 柱温 25 °C; ELSD 2000ES 蒸发光散射检测器; 漂移管温度 100 °C, 气流速度 2.8 mL · min⁻¹。理论板数按黄芪甲苷峰计算应不低于 4 000。

2.2.2 对照品溶液的制备 取黄芪甲苷对照品适量, 精密称定 13.43 mg, 置 25 mL 量瓶中, 加甲醇溶液并稀释至刻度, 作为对照品贮备液 (0.537 2 mg · mL⁻¹), 精密量取贮备液 6 mL, 置 10 mL 量瓶中加入甲醇稀释至刻度, 摇匀, 即得 0.322 3 g · L⁻¹ 的对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液的制备 取本品 40 片, 除去包衣, 精密称定, 研细, 取细粉 8 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶重, 精密加入甲醇 75 mL, 密塞, 超声处理 (功率

250 W, 频率 50 KHz) 30 min, 滤过, 精密量取续滤液 50 mL, 回收甲醇并浓缩至干, 残渣加水 30 mL 微热使溶解, 用水饱和正丁醇振摇提取 3 次, 每次 40 mL, 合并正丁醇提取液, 用氨试液洗涤 2 次, 每次 50 mL, 弃去氨试液, 正丁醇蒸干, 用甲醇溶解并转移至 5 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 滤过, 即得。

2.2.4 阴性对照样品溶液的制备 取缺黄芪阴性样品 8 g, 按供试品溶液的制备方法制成缺黄芪的阴性对照样品溶液。

2.3 系统适用性试验 取上述 3 种溶液各 10 μL 分别测定, 见图 1。表明供试品溶液与对照品溶液有相同保留时间的色谱峰, 并且阴性对照溶液在黄芪甲苷色谱峰相应的保留时间处无干扰, 黄芪甲苷峰与其他组分达到基线分离, 理论板数按黄芪甲苷峰计算应为 4 000。

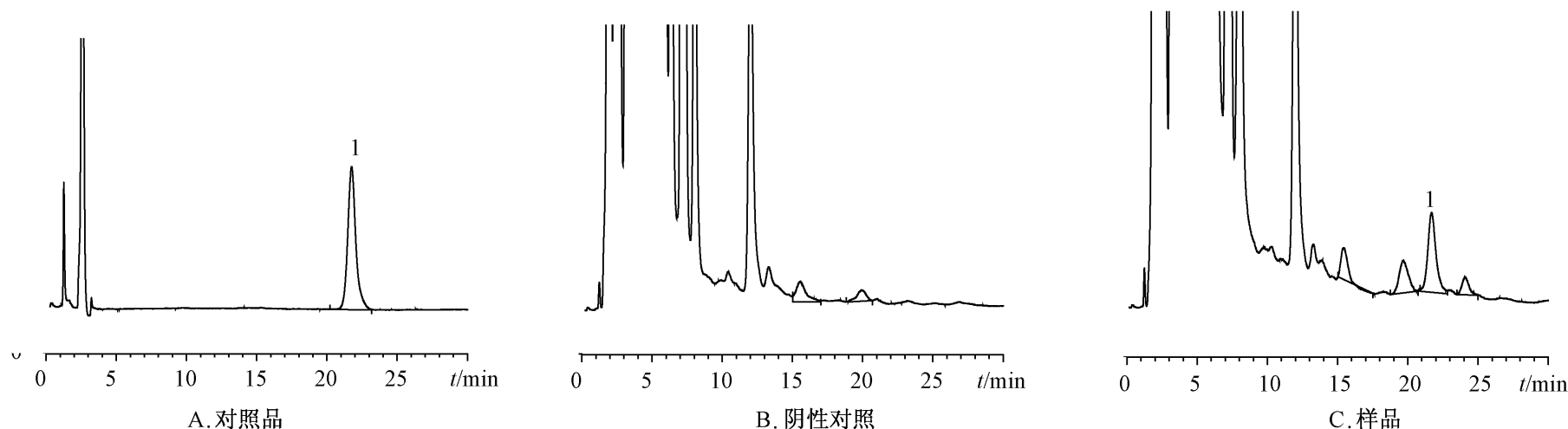


图 1 老年咳喘片 (薄膜衣片) HPLC 色谱图
1. 黄芪甲苷

2.4 线性关系考察 精密吸取黄芪甲苷对照品溶液 (0.322 3 g · L⁻¹) 3, 5, 8, 12, 18, 20 μL 进样, 以黄芪甲苷的峰面积积分值 (Y) 为纵坐标, 进样量 (X) 为横坐标, 绘制标准曲线, 计算回归方程 $Y = 1.59X + 1.03$, $r = 0.999 8$, 线性范围 0.966 9 ~ 6.446 μg。

2.5 稳定性试验 精密吸取同一批供试品溶液, 分别于 0, 2, 4, 8 h 进样 10 μL, 测定黄芪甲苷的峰面积的 RSD 为 0.92%, 表明供试品溶液在 8 h 内稳定。

2.6 精密度试验 精密吸取同一批供试品溶液, 连续进样 6 次, 每次 10 μL, 测得黄芪甲苷的峰面积的 RSD 为 1.12%, 表明该方法精密度较好。

2.7 重复性试验 精密称定同一批样品 6 份, 按 2.2.3 项下方法, 分别制备供试品溶液, 黄芪甲苷测定的平均值为 0.059 mg/片, RSD 为 1.50%, 表明重复性较好。

2.8 加样回收率试验 精密称取已知黄芪甲苷含

量的老年咳喘片 (薄膜衣片) (批号 090201, 含量 0.058 mg/片) 细粉 6 份, 每份取样 4 g 精密称定, 分别加入对照品溶液 (0.537 2 mg · g⁻¹) 2 mL, 按 2.2.3 项下方法制备样品溶液, 并测定, 计算回收率, 见表 1。

表 1 老年咳喘片中黄芪甲苷的回收率试验

No.	样品重量/g	原黄芪甲苷含量/mg	加入量/mg	测得总量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
1	4.088 2	0.948 5	1.074 4	1.990 6	96.99		
2	4.083 6	0.947 4	1.074 4	1.971 1	95.28		
3	4.085 8	0.947 9	1.074 4	1.999 7	97.90	96.5	1.05
4	4.145 7	0.961 8	1.074 4	2.005 6	97.15		
5	3.985 7	0.924 7	1.074 4	1.957 4	96.12		
6	4.106 7	0.952 7	1.074 4	1.979 4	95.56		

2.9 样品测定 取供试品 10 批, 按供试品溶液的制备方法及其上述色谱条件, 精密吸取对照品溶液 5,

15 μL 与供试品溶液 10 μL 测定, 见表 2。

表 2 老年咳喘片(薄膜衣片)含量测定 mg/片

批号	含量	批号	含量
090101	0.045	090401	0.068
090201	0.058	090405	0.038
090202	0.054	090601	0.040
090203	0.056	091001	0.052
090301	0.062	100301	0.049

根据测定结果及考虑到药材来源及产地差异, 故暂定本品每片含黄芪以黄芪甲苷计, 不少于 0.03 mg。

3 讨论

本试验通过对薄层条件的反复摸索对方中补骨脂、淫羊藿进行了研究, 制定了其定性鉴别的方法, 按照药典补骨脂^[2]薄层鉴别, 分离度较好。药典淫羊藿^[2]薄层鉴别, 温浸制备供试品溶液, 斑点分离不好, 杂质干扰严重, 后通过 D101 型大孔吸附树脂柱制备供试品溶液, 经薄层展开, 斑点分离度较好, 阴性无干扰, 专属性强。

(上接第 79 页)

取溶剂, 提取 2 h, 50 mL 石油醚脱脂 3 次, 50 mL 氯仿萃取 5 次可将乙肝宁颗粒中的川楝素基本提取完全。

在流动相系统的选择中, 实验比较了甲醇-水、乙腈-水等流动相系统, 从分离情况和出峰时间等综合分析选择乙腈-水(30:70)等度洗脱为佳, 峰形对称且分离度较好, 保留值适宜, 柱后处理简便、省时。

用二极管阵列检测器在本试验溶剂体系条件下, 分析了川楝素对照品色谱峰和 3 个样品中目标组分相应色谱峰的紫外光谱, 结果保留值相同处紫外光谱基本一致, 川楝素在 210 nm 处有最大吸收。待测组分与杂质峰基本能基线分离, 检测灵敏度高, 因此, 确定川楝素检测波长为 210 nm。

对照品川楝素结构中具有半缩醛结构, 始终有 2 个互变异构体存在^[5]。因此, 本研究以川楝素 2 个峰面积之和计算。

应用本方法测定, 川楝素和制剂中的其他成分

在含量测定中, 建立供试品制备方法过程中, 参照了《中国药典》药材黄芪^[2]含量项下供试品溶液的制备方法及文献资料^[3]比较了索氏提取和超声提取对分离效果和含量测定值的影响, 结果表明, 超声提取出的杂质比索氏提取少, 色谱上更有利于黄芪甲苷与其它组分的分离; 黄芪甲苷的量无明显差别, 且操作简便。所以选择超声提取。

本试验建立的薄层鉴别方法专属性强, 含量测定方法简便, 灵敏, 重复性好, 可作为老年咳喘片(薄膜衣片)的质量控制方法。

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国卫生部药品标准中药成方制剂[S]. 第九册. 1996:70.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 一部. 北京:化学工业出版社, 2005:129, 213, 229.
- [3] 丘明朋. HPLC-ELSD 测定止血灵胶囊中黄芪甲苷的含量[J]. 中成药, 2008, 30(8):附 6.

[责任编辑 顾雪竹]

可完全分离, 样品制备方法简单, 测定结果准确, 回收率、线性、精密度均符合中药分析要求, 且方法简便、快速、准确且灵敏, 可作为乙肝宁颗粒中川楝素的质控方法, 用于建立该制剂的成品质量标准。

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 一部. 北京:化学工业出版社, 2005:290.
- [2] 高学敏. 中药学[M]. 北京:中国中医药出版, 2002:295.
- [3] 齐双岩, 金若敏, 刘红杰, 等. 川楝子致大鼠肝毒性机制研究[J]. 中国中药杂志, 2008, 33(16):2045.
- [4] 梁国华, 罗秀伟. 高效液相色谱法测定乙肝宁颗粒中药药苷含量[J]. 中国药业, 2008, 17(1):29.
- [5] 刘红亚, 崔红梅, 周绚. RP-HPLC 法测定川楝子药材中川楝素的含量[J]. 世界科学技术——中医药现代化, 2008, 10(3):52.

[责任编辑 顾雪竹]