

金菟亮光胶囊质量标准研究

王刚^{1*}, 田应彪¹, 杨松松²

(1. 遵义医学院, 贵州 遵义 563003; 2. 辽宁中医药大学, 辽宁 沈阳 110032)

[摘要] 目的: 建立金菟亮光胶囊的质量标准。方法: 采用薄层色谱(TLC)法对方中菟丝子、金钗石斛进行定性鉴别; 采用反相高效液相色谱法对金丝桃苷进行定量分析: 色谱柱为 Dikma Diamons C₁₈ (150 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-0.025 mol · L⁻¹磷酸水(40 : 60), 流速为 0.8 mL · min⁻¹, 检测波长为 370 nm。结果: TLC 斑点清晰, 分离度较好。金丝桃苷进样量在 0.101 ~ 0.606 μg 范围内与峰面积积分值呈良好线性关系 ($r = 0.9996$); 平均加样回收率为 95.2%, RSD = 1.3% ($n = 5$)。结论: 该方法简便, 准确, 可用于金菟亮光胶囊的质量控制。

[关键词] 金菟亮光胶囊; 反相高效液相色谱法; 薄层色谱法; 金丝桃苷

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)03-0053-03

[收稿日期] 2009-07-20

[通讯作者] * 王刚, Tel: (0852) 8609461; E-mail: wg8855350@163.com

人参皂苷 Re 和人参皂苷 Rg₁ 为主, 人参皂苷 Rb₁ 含量较低、且与杂质峰无法得到很好的分离, 测定误差较大, 因此, 选择人参皂苷 Rg₁ 和人参皂苷 Re 作为本品中的含量测定指标。

表 3 样品含量测定

批号	人参皂苷 Re、人参皂苷 Rg ₁ 含量(mg/支)	RSD %
081118	0.92	
081125	0.89	2.32
090109	0.88	

在试验中, 曾按《中国药典》2005 年版一部中人参、人参叶、三七、红参等多种含人参皂苷的药材及复方中药的色谱条件进行试验, 经反复试验优选, 以正文所选流动相, 即乙腈-水二元系统梯度洗脱, 以甲醇冲洗色谱柱(避免连续进样带来的相互干扰), 结果重复性最佳, 出峰时间适宜, 峰形尖锐、对称, 且人参皂苷 Rg₁ 和人参皂苷 Re 与杂质峰分离较好。

样品溶液制备中, 经试验, 水饱和正丁醇萃取 5 次即可将人参皂苷 Rg₁ 和人参皂苷 Re 提取完全; 氨试液洗涤次数在 3 次以上时, 虽然制备的供试品颜色变浅, 样品 HPLC 色谱中杂质峰吸收度变小, 但也会造成人参皂苷类成分的损失, 因此, 在制备供试品

金菟亮光胶囊由菟丝子和金钗石斛两味中药的有效部位组成, 具有补肾益精、养肝明目的功效, 用于治疗老年性白内障等症。笔者对方中菟丝子、金

溶液时, 用水饱和的正丁醇振摇提取 5 次、氨试液洗涤 2 次。

本试验中还采用了蒸发光散射检测器(WATERS 2420 型)进行对人参皂苷 Re 和人参皂苷 Rg₁ 含量测定, 其结果与紫外检测器的测定结果基本一致。考虑到紫外检测器较为普及, 因此选用紫外检测器进行测定。对供试品及对照品色谱中的人参皂苷 Rg₁ 和人参皂苷 Re 峰进行 200 ~ 400 nm 紫外光谱扫描, 结果两者均在紫外末端区 200 nm 有强吸收, 参考《中国药典》2005 年一部人参等药材项下测定波长, 选择与药典一致的 203 nm 为检测波长。

[参考文献]

- [1] 高敏. 人参注射剂质量标准研究[J]. 云南中医中药杂志, 2003, 24(5): 31.
- [2] 陈勇敢, 王荔, 宋景芳. 薄层扫描法测定冠心康颗粒中人参皂苷 Re 的含量[J]. 中国药业, 2004, 13(9): 30.
- [3] 刘华钢, 赖茂祥, 梁秋云, 等. 三七含量测定方法的研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2004, 10(5): 14.
- [4] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S] 一部, 2005: 7.

钗石斛药材做了薄层色谱(TLC)鉴别,并用高效液相色谱(HPLC)法对金丝桃苷进行了含量测定,并进行了方法学研究。

1 仪器与试药

日本岛津 LC-10AT 高效液相色谱仪;统 SPD-10A 紫外-可变波长检测器;Class-vp 色谱工作站;Dikma Diamons C₁₈ 柱;MettlerAE240 型电子天平;KQ2200DB 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂);甲醇为色谱纯,水为重蒸馏水,其它试剂为分析纯。

金丝桃苷对照品(中国药品生物制品检定所,批号:111521-200303)、金钗石斛对照药材(中国药品生物制品鉴定所);金菟亮光胶囊样品(遵义医学院第一附属医院制剂室提供,批号:060609、060912、061101)。

2 薄层鉴别

2.1 菟丝子的鉴别 取本品 3 粒,倾出内容物,置 50 mL 量瓶中,用甲醇 10 mL 超声使溶解,摇匀,作为供试品溶液。另取金丝桃苷对照品,加乙醇制成每 mL 含 0.5 mg 的溶液,作为对照品溶液。照薄层色谱法^[1]试验,分别吸取上述两种溶液各 8 μL 点于同一以 0.3% 羧甲基纤维素钠为黏合剂的硅胶 G 薄层板上,以氯仿-醋酸乙酯-甲酸(4:4:2)为展开剂,展开,取出,晾干,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,显黄褐色的斑点。阴性液在此处无干扰。

2.2 金钗石斛鉴别 取本品 3 粒,倾出内容物,置 50 mL 量瓶中,用甲醇 10 mL 超声使溶解,摇匀,作

为供试品溶液。另取金钗石斛对照药材 5 g,同法制成对照药材溶液。照薄层色谱法^[1]试验,分别吸取上述两种溶液各 8 μL 点于同一以 0.3% 羧甲基纤维素钠为黏合剂的硅胶 G 薄层板上,以氯仿-醋酸乙酯-甲醇(7:2:1)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以 5% FeCl₃ 乙醇试液。供试品色谱中,在与对照药材色谱相应的位置上,显紫色的斑点。阴性液在此处无干扰。

3 检查

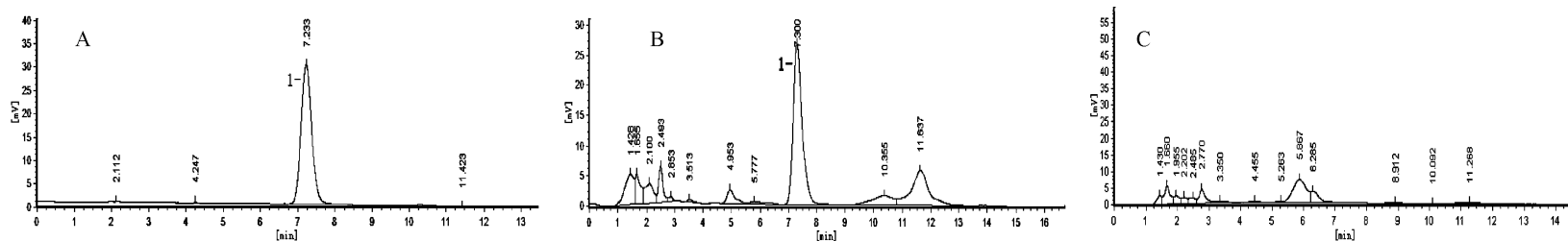
3.1 水分 取本品若干粒,倾出内容物,精密称定 5g,按照水分测定法^[1]中的烘干法测定。本品含水量为 7.2% 低于 9.0%^[1]。

3.2 装量差异 取本品 10 粒,照胶囊剂“装量差异”的检查方法^[1]检查,结果表明,每粒装量均在 -10% ~ +10% 以内。

3.3 崩解时限 取本品 6 粒,照崩解时限检查法^[1]检查,结果表明,本品崩解时限均在 1 h 以内。

4 含量测定

4.1 色谱条件与系统适应性试验 色谱柱: Dikma Diamons C₁₈ 柱(150 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相: 甲醇-0.025 mol · L⁻¹ 磷酸水(40:60);检测波长: 370 nm;柱温: 40 °C;流速: 0.8 mL · min⁻¹;进样量: 3 μL。进样前样品用 0.45 μm 微孔滤膜过滤。在上述条件下,金丝桃苷与其它色谱峰达到了基线分离,阴性液在金丝桃苷色谱峰相应的位置上无干扰峰出现。结果见图 1。



A. 对照品; B. 供试品; C. 阴性液; 1-金丝桃苷

图 1 高效液相色谱图

4.2 对照品溶液的制备 精密称取金丝桃苷对照品 10.01 mg 置 100 mL 量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,制成每 mL 含 0.101 mg 的对照品溶液。

4.3 供试品溶液的制备 取本品内容物,研细,取 0.20 g,精密称定,置 50 mL 量瓶中,用 95% 乙醇 40 mL 超声使溶解并稀释至刻度,摇匀。溶液经微孔滤膜(0.45 μm)滤过,收集续滤液作为供试品溶液。

4.4 阴性供试品液 按处方工艺制成不含菟丝子的阴性样品,按“4.3”项下方法制成阴性对照品溶液,按“4.1”项下色谱条件进样。

4.5 标准曲线的绘制 精密吸取对照品溶液 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0 μL 注入高效液相色谱仪中,测定色谱峰面积,以对照品浓度为横座标,峰面积为纵座标,绘制标准曲线,经回归处理,回归方程为: A

$= 7.10 \times 10^5 C - 2.01 \times 10^4$, 相关系数 $r=0.9996$ 。结果表明金丝桃苷的浓度在 $0.101 \sim 0.606 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 范围内与峰面积积分值呈良好线性关系。

4.6 精密度试验 精密吸取同一供试品溶液, 按“4.1”项下色谱条件, 连续进样 5 次, 测定金丝桃苷的峰面积。结果, 平均峰面积为 477 835.8, $RSD = 0.7\%$, 表明仪器精密度良好。

4.7 稳定性考察 精密吸取同一供试品溶液, 分别于 0, 2, 4, 8, 12 h, 按“4.1”项下色谱条件, 测定金丝桃苷的峰面积。结果, $RSD = 1.2\%$, 供试品溶液在 12 h 内基本稳定。

4.8 重复性考察 精密称取同一批供试品(批号: 061101) 5 份, 按“4.1”项下色谱条件, 测定金丝桃苷的含量。结果金丝桃苷平均含量为 1.9% , $RSD = 1.3\%$, 表明方法重复性良好。

4.9 加样回收率 取已知含量的样品(批号 061101) 内容物 5 份, 每份约 0.2 g, 精密称定, 加入金丝桃苷对照品适量, 按“4.3”项下方法制备供试品溶液, 过滤后进样 $3 \mu\text{L}$, 记录色谱图, 计算回收率。结果, 平均回收率为 95.2% , RSD 为 1.3% 。结果见表 1。

表 1 加样回收率($n=5$)

序号	样品量 (g)	样品含量 (mg)	金丝桃苷加入量(mg)	实测量 (mg)	回收率 (%)	平均回收率(%)	RSD (%)
1	0.1892	3.7689	3.732	7.3631	96.3		
2	0.2108	4.1991	3.732	7.7553	95.3		
3	0.1986	3.9561	3.732	7.4682	94.1	95.2	1.3
4	0.1924	3.8326	3.732	7.3344	93.8		
5	0.1967	3.9183	3.732	7.5196	96.5		

4.10 样品含量测定 按“4.3”项下方法制备 3 批供试品溶液, 分别吸取对照品溶液和供试品溶液各 $3 \mu\text{L}$, 注入高效液相色谱仪, 按色谱条件测定峰面积, 以外标一点法计算金丝桃苷含量。结果见表 2。

表 2 样品含量测定结果($n=3$)

批号	金丝桃苷含量 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$	RSD(%)
060609	19.92	0.6
061912	20.14	1.1
061101	20.09	0.9

5 讨论

在进行金钗石斛的 TLC 鉴别时, 曾选用氯仿-醋酸乙酯-甲酸(4:4:1)、氯仿-甲醇(10:1)、氯仿-乙酸乙酯-甲醇(8:2:1)、氯仿-丙酮(10:1)、乙酸乙酯-甲醇(8:2) 作为展开剂进行试验, 效果并不理想, 斑点分离不开, 且阴性对照有干扰。改用氯仿-乙酸乙酯-甲酸(7:2:1) 作为展开剂, 斑点集中, 层次清晰, 分离效果较好, 重复性好, 稳定可靠, 具可操作性。

金丝桃苷是方中君药菟丝子的主要指标性成分, 因此, 选择金丝桃苷作为控制本品质量的指标性成分。本试验曾选用甲醇-水(40:60)、甲醇-0.2% 磷酸溶液(55:45)、甲醇-0.1% 冰醋酸溶液(40:60)、水-异丙醇-乙酸(80:16:4) 为流动相进行试验, 结果金丝桃苷的分离度较差, 阴性液干扰较大。经多次摸索, 用甲醇-0.025 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸水(40:60) 作为流动相, 阴性液无干扰, 金丝桃苷与其他组分色谱峰完全达到基线分离, 经多次测试, 系统具有很好的重现性和稳定性。

在金丝桃苷含量测定中, 曾选择 354、370 nm 两种波长。实验结果表明, 选择 354 nm 波长测定峰形较差, 峰面积较小, 而以 370 nm 波长测定峰形及峰面积较好, 因此确定 370 nm 为测定波长。提取条件的选择, 参阅有关文献^[2], 采用甲醇超声法。提取时间考察, 分别超声提取 10, 20, 30 min, 测定结果表明: 提取 20 min 已提取完全, 故采用超声提取 20 min; 提取溶剂量考察, 分别采用甲醇 20, 40, 60 mL 超声提取, 测定结果表明: 采用甲醇 40 mL 已提取完全, 故采用超声提取 40 mL。

综上所述, 本方法简便, 准确, 可用于金菟亮光胶囊的质量控制。

[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: 附录 II、M IX、H B、X A.
- [2] 曹艳萍. HPLC 法测定墓头回中金丝桃苷[J]. 中草药, 2006, 37(9): 1418.